



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

HUGO MARQUES GALINDO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOGLUCANASES E
ENDOGLUCANASES DE MUCORALES UTILIZANDO FERMENTAÇÃO
SÓLIDA**

RECIFE
2016

HUGO MARQUES GALINDO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOGLUCANASES E
ENDOGLUCANASES DE MUCORALES UTILIZANDO FERMENTAÇÃO
SÓLIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco

RECIFE
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Galindo, Hugo Marques

Produção e caracterização de exoglucanases e endoglucanases de mucorales utilizando fermentação sólida / Hugo Marques Galindo-Recife: O Autor, 2016.

57 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

Coorientadora: Luciana de Oliveira Franco

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências

- 1. Mucorales 2. Celulase 3. Fermentação I. Gusmão, Norma Buarque (orientadora) II. Franco, Luciana de Oliveira (coorientadora) III. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-267

HUGO MARQUES GALINDO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOGLUCANASES E
ENDOGLUCANASES DE MUCORALES UTILIZANDO FERMENTAÇÃO
SÓLIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 04/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Marcos Antonio Barbosa de Lima

Departamento de Biologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Centro de Ciências e Tecnologia - Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino e meu guia; aos meus pais queridos e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir concluir mais uma etapa de minha jornada acadêmica com saúde e sucesso.

E é com muita satisfação que digo obrigado a todas as pessoas que, nestes dois anos de mestrado, se mantiveram simplesmente presentes. Por isso meus sinceros agradecimentos a...

- À Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão pela oportunidade concedida, orientação e apoio, o que tornou possível a concretização deste trabalho.
- À Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco por ter sido minha co-orientadora e pelo seu incentivo, orientação e auxílio.
- A Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki, pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP e uso da infra-estrutura para a realização dos experimentos.
- Aos Professores da Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pelas disciplinas ministradas e a funcionária da secretaria, Carol, pela sua atenção durante todo o período de mestrado.
- A todos os amigos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB pela colaboração no desenvolvimento do trabalho experimental. Principalmente à Adriana Souza e Marcos Luna, pela grande ajuda diante dos momentos difíceis.
- Minha gratidão enorme mais uma vez aos meus pais, Gilson Galindo e Edna Lúcia Galindo pelo apoio em todos os momentos decisivos de minha vida.
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.
- Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite.
- A UFPE pela oportunidade concedida.
- A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

A conversão da celulose em açúcares fermentáveis é realizada por um complexo enzimático de celulasas capaz de hidrolisar as frações de celulose a seus monômeros de glicose. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de celulasas (endoglucanases e exoglucanases) por fungos Mucorales isolados a partir de solo do Bioma Caatinga. Inicialmente, 13 isolados de fungos foram avaliados quanto à capacidade de produção de celulasas (CMCase e FPase) utilizando farelo de palha de milho como substrato através de fermentação em estado sólido (FES), durante 96 horas de cultivo a 35°C. Foi detectada atividade enzimática em todos os isolados, sendo *Rhizopus microsporus* SIS 04 o isolado que apresentou maior atividade para ambas as celulasas testadas (CMCase: 1,375 U/mL; FPase: 0,105 U/mL). Este isolado foi cultivado nas condições de fermentação determinadas através de planejamento fatorial utilizando como variáveis independentes: temperatura e umidade. A atividade de CMCase em 72 horas de incubação aumentou de 1,375 para 1,477 U/mL na temperatura de 38°C e umidade de 100%; e a atividade de FPase, em 72 horas de incubação aumentou de 0,105 para 0,118 U/mL, na temperatura de 38°C e umidade de 50%, notando-se que a temperatura foi a variável mais significativa para a atividade dessas celulasas. A caracterização das enzimas produzidas pelo isolado *Rhizopus microsporus* SIS 04 demonstrou que o extrato enzimático com atividade de CMCase apresentou pH ótimo de 6 e temperatura ótima de 60°C, tendo sua atividade residual acima de 80% nos valores de pH: 4, 5, 6 e 7, e temperatura de 60°C; para atividade de FPase apresentou pH ótimo de 6 e temperatura ótima de 50°C, tendo sua atividade residual acima de 80% nos valores de pH: 5 e 6, e temperatura de 50 e 60°C. Evidenciando assim melhores resultados de atividade enzimática em temperaturas elevadas e valores de pH de ácido a levemente alcalino.

Palavras-chave: *Rhizopus microsporus*. Celulasas. Farelo de palha de milho.

ABSTRACT

The conversion of cellulose to fermentable sugars is performed by an enzyme complex of cellulases able to hydrolyze the cellulose fraction their glucose monomers. The aim of this study was to evaluate the potential for cellulases production (endoglucanases and exoglucanases) by Mucorales fungi isolated from soil of Caatinga. Initially, thirteen fungal isolates were evaluated for capacity of cellulase production (CMCase and FPase) using corn husk bran as substrate in solid state fermentation (SSF) for 96 h incubation at 35°C. It was detected enzymatic activity in all isolates, but *Rhizopus microsporus* Sis 04 was the isolate that showed the highest activity for both tested cellulases (CMCase: 1.375 U/mL; FPase: 0.105 U/mL). This isolate was selected for optimization of fermentation conditions through a factorial design using as independent variables temperature and humidity. The CMCase activity at 72 h of incubation increased from 1.375 to 1.477 U/ml at 38°C and humidity of 100%; as well as the activity of FPase at 72 h of incubation increased from 0.105 to 0.118 U/ml, at temperature of 38°C and humidity of 50%, showing that the temperature was the most significant variable for the activity of these cellulases, where culture conditions were optimized. The characterization of cellulases produced by *R. microsporus* Sis 04 demonstrated that the enzymatic extract with CMCase activity showed optimum pH of 6 and optimum temperature of 60°C, and its residual activity above 80% in pH 4, 5, 6 and 7 and temperature of 60°C. However, FPase activity showed optimum pH of 6 and optimum temperature of 50°C, and its residual activity above 80% in pH 5 and 6, and temperature of 50 and 60°C. Thus, it was demonstrated that best results in enzymatic activity were reached at high temperatures and pH values from acid to slightly alkaline.

Keywords: *Rhizopus microsporus*. Cellulases. corn husk bran.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da cadeia de celulose.	17
Figura 2 - Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares do polímero de celulose.	17
Figura 3 - Representação esquemática da fibra de celulose.	18
Figura 4 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.....	20
Figura 5 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^2 em cultivo de 72h, tendo como variáveis independentes (1) temperatura, (2) umidade, e como variável resposta a atividade de CMCCase.	38
Figura 6 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^2 em cultivo de 72h, tendo como variáveis independentes (1) temperatura, (2) umidade, e como variável resposta a atividade de FPase.....	40
Gráfico 1 - Atividade de CMCCase das 13 amostras cultivadas em farelo de palha de milho a 35°C por 96h.....	35
Gráfico 2 - Atividade de FPase das 13 amostras cultivadas em farelo de palha de milho a 35°C por 96h.....	36
Gráfico 3 - Atividade residual de CMCases secretadas pelo fungo <i>Rhizopus microsporus</i> SIS 04 em diferentes valores de pH.	42
Gráfico 4 - Atividade residual de CMCases secretadas pelo fungo <i>Rhizopus microsporus</i> SIS 04 em diferentes faixas de temperatura.	42
Gráfico 5 - Atividade residual de FPases secretadas pelo fungo <i>Rhizopus microsporus</i> SIS 04 em diferentes valores de pH.	43
Gráfico 6 - Atividade residual de FPases secretadas pelo fungo <i>Rhizopus microsporus</i> SIS 04 em diferentes faixas de temperatura.	43
Gráfico 7 - Estabilidade das enzimas com atividade de CMCCase em pH 3 a 9 por 24h.	45
Gráfico 8 - Estabilidade das enzimas com atividade de CMCCase em temperaturas de 50, 60 e 70°C até 60 minutos.....	45
Gráfico 9 - Estabilidade das enzimas com atividade de FPase em pH 3 a 9 por 24h.....	46
Gráfico 10 - Estabilidade das enzimas com atividade de FPase em temperaturas de 50, 60 e 70°C até 60 minutos.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.....	25
Tabela 2 - Amostras de Mucorales selecionadas para avaliação da produção de celulases.	29
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , com 4 pontos centrais e 4 pontos axiais.....	32
Tabela 4 - Atividades enzimáticas do complexo celulolítico produzidas por isolados de Mucorales em farelo de palha de milho por 96h a 35°C.	34
Tabela 5 - Atividade de CMCases (U/mL) através de planejamento fatorial 2^2 em meio de farelo de palha de milho.	38
Tabela 6 - Atividade de FPases (U/mL) através de planejamento fatorial 2^2 em meio de farelo de palha de milho.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGL	- β -glicosidase
CBHs	- Celobiohidrolases
CMC	- Carboximetilcelulose
CMCase	- Atividade de endoglucanases sobre CMC
DNS	- (Ácido) Dinitrosalicílico
FES	- Fermentação em Estado Sólido
FPase	- Atividade de celulase total sobre papel de filtro
GHs	- Glucanohidrolases
G	- Gramas
H	- Hora(s)
L	- Litro
MG	- Miligrama
Min	- Minuto(s)
mL	- Mililitro
Nm	- Nanômetro
PDA	- Potato Dextrose Agar
RPM	- Rotações por minuto
U	- Unidade enzimática (quantidade de enzima capaz de formar 1 μ mol de produto por minuto nas condições do experimento)
UI	- Unidade Internacional
Mmol	- Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	16
2.1.1 Estrutura da celulose	16
2.2 ENZIMAS CELULOLÍTICAS	18
2.2.1 Endoglucanases	19
2.2.2 Exoglucanases	19
2.2.3 β-glicosidasases	20
2.2.4 Importância econômica das celulases	20
2.3 FUNGOS DO SOLO SEMI-ÁRIDO	22
2.4 MICRO-ORGANISMOS LIGNOCELULOLÍTICOS	23
2.4.1 Fungos da ordem Mucorales	24
2.5 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	25
2.6 FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO (FES)	26
2.7 OBJETIVOS	28
2.7.1 Objetivo Geral	28
2.7.2 Objetivos Específicos	28
3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	28
3.1 MATERIAL	28
3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	29
3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	29
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS	30
3.5 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	30
3.5.1 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)	30
3.5.2 Atividade em papel de filtro (FPase)	30
3.5.3 Determinação de açúcares redutores e curva de calibração	31
3.5.4 Análise estatística	31
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
3.6.1 Seleção das condições de fes	32
3.7 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE REAÇÃO	32
3.8 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE EM DIFERENTES VALORES DE PH	33
3.9 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA	33

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	33
4.1. ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	35
4.1.1 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase).....	35
4.1.2 Atividade em papel de filtro (FPase)	36
4.2 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FES	37
4.3 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE REAÇÃO	41
4.3.1 CMCase	41
4.3.2 FPase.....	42
4.4 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE EM DIFERENTES VALORES DE PH E TEMPERATURA.....	44
4.4.1 CMCase	44
4.4.2 FPase.....	45
5. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento da ocorrência e distribuição dos fungos que ali se encontram, tem nos levado ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes micro-organismos tornando-se importantes em aplicações biotecnológicas (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004). A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, em geral os fungos que degradam substâncias celulósicas colonizando as plantas, suas raízes e resíduos vegetais, desempenhando importante função de reciclagem de nutrientes. Em solos de regiões de clima árido e semi-árido a composição de espécies de fungos é amplamente variável, não estando esses organismos distribuídos de maneira uniforme nos solos, mas concentrados em micro-habitat que contém fontes orgânicas e condições abióticas favoráveis. O isolamento de novos micro-organismos de ambientes onde se conhece pouco da biodiversidade microbiana, como a Caatinga nordestina, tem incentivado, nas últimas décadas, um aumento nos estudos de bioprospecção microbiana voltada para pesquisas envolvendo o potencial biotecnológico desses organismos (SMRITHI *et al.*, 2013; MONCIARDINI *et al.*, 2014).

A celulose é o principal constituinte da parede celular da maioria das plantas e dentre as moléculas encontradas naturalmente é o biopolímero mais abundante e renovável do mundo e sua hidrólise por celulasas de micro-organismos é total e específica, cujo produto final é a glicose. Este fato tem estimulado o uso de processos de fermentação pelo homem, a fim de se obter glicose a partir de celulose (LYNCH *et al.*, 1981; OJUMU, 2003; LIMA *et al.*, 2013).

A composição dos materiais lignocelulósicos varia de acordo com a espécie vegetal, entretanto a composição média consiste em 50% de celulose, 25% de hemicelulose (ambos são carboidratos resultantes da polimerização de açúcares) e 25% de lignina (polímero aromático produzido a partir de precursores fenólicos, não contendo açúcares). Processos que utilizam resíduos de origem vegetal como substrato para produção de enzimas vêm sendo alvo de intensas pesquisas, visto que a celulose corresponde por cerca de metade da composição da biomassa vegetal e a degradação deste homopolímero libera glicose a ser prontamente fermentada (VÁSQUE *et al.*, 2007).

O conjunto de enzimas responsáveis pela degradação da celulose é denominado complexo celulase. Esse complexo está dividido em três grupos: Endoglucanases (EC 3.2.1.4): iniciam a hidrólise e promovem uma rápida solubilização do polímero celulósico. Estas enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra

celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor; Exoglucanases: divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As CBHs (EC 3.2.1.91) são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose. As GHs (EC 3.2.1.91) possuem estratégias de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero; β -glicosidases (EC 3.2.1.21): enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose (ZHANG *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2008; CHANDRA *et al.*, 2010).

Grande quantidade de materiais celulósicos, gerados a partir de atividades agrícolas e práticas agroindustriais vem se acumulando no ambiente sendo caracterizados como geradores de poluição ambiental (ABU *et al.*, 2000; HOWARD *et al.*, 2004). Em contrapartida, esforços estão sendo feitos para converter os resíduos de celulose em produtos de interesse biotecnológico. O uso de celulasas microbianas para fins de sacarificação da celulose em glicose tem atraído a atenção dos pesquisadores pela possibilidade de bioconversão de material celulósico em produtos de alto valor econômico (LIU *et al.*, 2013).

O custo do substrato celulósico no processo de sacarificação desempenha papel importante na determinação de sua economia. Muita ênfase está sendo dada ao uso de substratos de baixo custo, sendo os resíduos agrícolas e agroindustriais alvos de triagem nesse processo por serem considerados ricas fontes de celulose (HECK *et al.*, 2002). O emprego de enzimas específicas para degradação de biomassa vegetal é muito mais interessante que a hidrólise ácida mediante ao seu alto custo e risco ao ambiente (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004; GARVEY *et al.*, 2013). Com base nisto, estudos utilizando resíduos agroindustriais vêm sendo realizados visando à redução do impacto ambiental e o desenvolvimento de tecnologias que agreguem valor aos subprodutos (LAUFENBERG *et al.*, 2003; DELABONA *et al.*, 2012).

A fermentação em estado sólido (FES) é o processo fermentativo que requer a utilização de matriz sólida. Essa matriz sólida pode ser a fonte de nutrientes, também chamada de substrato, ou um suporte impregnado pelos nutrientes adequados ao desenvolvimento do micro-organismo. A umidade e o tipo de substrato empregado são os fatores mais importantes que influenciam o processo de FES. A seleção do substrato depende de vários fatores, relacionados principalmente com o custo e disponibilidade, dessa forma a seleção de vários resíduos agroindustriais vem sendo envolvida nesse processo (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Processos biotecnológicos como a FES são alternativas para utilização de resíduos agroindustriais como, palha de arroz (KHAN *et al.*, 2007), farelo de arroz (LATIFIAN *et al.*, 2007), farelo de aveia (CAMASSOLA; DILLON, 2009), bagaço de cana-de-açúcar (MASSADEH *et al.*, 2001). Utilizado com diferentes micro-organismos, esse bioprocessos vêm sendo uma alternativa para solucionar grande parte dos problemas de poluição ambiental geradas por acúmulo de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Desta forma, pesquisas que vislumbrem avaliar o potencial de fungos da ordem Mucorales, os quais estão inseridos no subfilo Mucoromycotina do reino Fungi (HIBBETT *et al.*, 2007), em produzir celulases utilizando resíduos agroindustriais como fonte de celulose e aplicá-las industrialmente, devem ser estimuladas. Diante disso, verificou-se a importância de realização deste estudo, objetivando detectar a produção de endoglucanases e exoglucanases por espécies de fungos da ordem Mucorales por meio de fermentação sólida, utilizando farelo de palha de milho como substrato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A biomassa lignocelulósica é a fonte renovável mais abundantemente encontrada na natureza. Essa biomassa é constituída por três principais componentes poliméricos: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes e não covalentes. Esses componentes, majoritários são responsáveis por 97-99% de toda massa seca desses materiais (SZENGYEL, 2000; CHU *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2013).

A celulose apresenta entre 5.000 e 10.000 unidades do monossacarídeo D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ formando cadeias lineares. Estas cadeias encontram-se fortemente alinhadas e ligadas entre si, formando uma fita altamente ordenada, cristalina, relativamente inacessível ao ataque enzimático. Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares são formadas entre suas longas cadeias de celulose originando microfibrilas cristalinas insolúveis em água. Como resultado, a celulose é muito resistente, muito estável e de difícil degradação (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A lignina é uma macromolécula ramificada e amorfa, sua estrutura é bastante heterogênea formando uma rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aryl-éter. A lignina se encontra fortemente ligada à hemicelulose e às fibras de celulose, aumentando a resistência da estrutura e a recalcitrância à conversão por agentes químicos e microbianos. (WHETTEN; SEDEROFF, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Formada por uma mistura de polissacarídeos ramificados de baixa massa molecular (xilose e arabinose, contém também glicose, manose e galactose), e estas características resultam em materiais flexíveis e mais facilmente hidrolisáveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (TAIZ; ZEIGER, 2004; CASTRO, 2006).

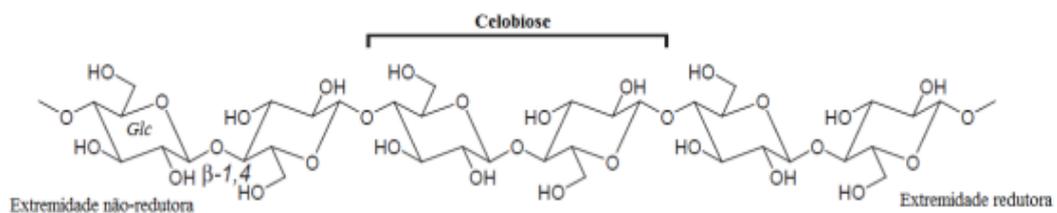
2.1.1 Estrutura da Celulose

A parede celular dos vegetais é constituída predominantemente por um organizado e complexo arranjo de polissacarídeos de elevada massa molecular, constituídos por celulose, hemicelulose e pectina, além da lignina. A parede celular é responsável por conectar as células e formação dos tecidos, promover a sinalização celular, além de proporcionar forma, rigidez e proteção às células vegetais. A composição desses elementos estruturais na parede celular pode variar entre as espécies vegetais, entretanto a celulose destaca-se como o

principal polissacarídeo, sendo considerado o biopolímero mais abundante na natureza (LODISH, 2008; SÁNCHEZ, 2009; ZHENG, *et al.*, 2014).

A celulose é formada por cadeias lineares de unidades de D-glicose (grau de polimerização: 2000 a 15000 resíduos) unidas covalentemente entre si por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). A unidade repetitiva da celulose é formada pelo dissacarídeo celobiose. O final da cadeia com o resíduo de glicose com o carbono anomérico não ligado a outro resíduo de glicose é chamado extremidade redutora do polímero, já a extremidade oposta é chamada de não-redutora (Figura 1) (SANDGREN *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2010; ZHENG, *et al.*, 2014).

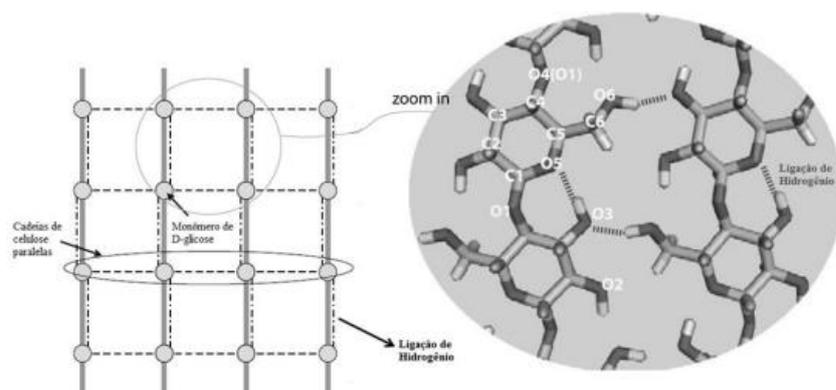
Figura 1 - Estrutura química da cadeia de celulose.



Fonte: SANDGREN *et al.*, 2005.

Após a síntese, dezenas de cadeias de celulose são organizadas paralelamente formando uma estrutura fibrilar cristalina, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermolecular além de interações hidrofóbicas e forças Van de Waals. Em particular, a grande densidade de interações intermoleculares é proporcionada pelas ligações de hidrogênio que contribuem significativamente para a rigidez e cristalização do polímero (figura 2) (COSGROVE, 2005; SHEN; GNANAKARAN, 2009).

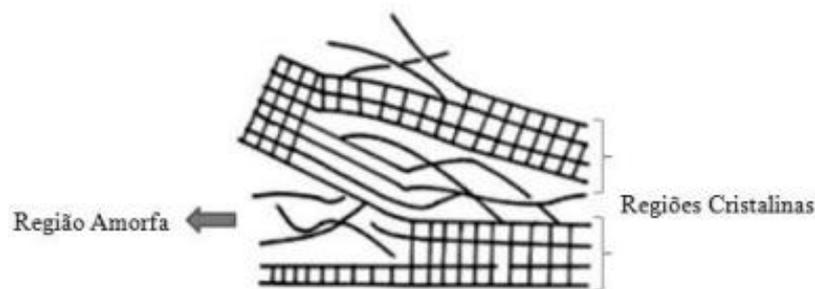
Figura 2 - Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares do polímero de celulose.



Fonte: SHEN; GNANAKARAN, 2009.

O grau de cristalinidade das fibrilas de celulose é bastante variável entre tecidos e espécies vegetais. Regiões cristalinas das microfibrilas são entremeadas por regiões menos organizadas molecularmente, sendo denominadas de regiões amorfas (Figura 3). Devido a algumas propriedades físicas da celulose, tais como grau de polimerização, acessibilidade e cristalinidade, muitas vezes faz-se necessário uma etapa de pré- tratamento da biomassa ou resíduo lignocelulósico a fim de aumentar o rendimento das reações de hidrólise enzimática da celulose (BEGUIN; AUBERT, 1994; SÁNCHEZ, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da fibra de celulose.



Fonte: KLEMM, 2005.

2.2 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Enzimas são catalisadores biológicos muito potentes e eficazes quando comparadas com catalisadores químicos. Uma das características notáveis das enzimas é a alta especificidade pelo substrato e em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato. Como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas quantidades e podem ser recuperadas dependendo das condições de tratamento utilizados (SANTOS, 2012). A biotecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e possibilitam menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis (ROCHA, 2010).

As celulasas pertencem à classe de hidrolases, que são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre os materiais celulósicos promovendo sua total hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade em ser convertida em etanol (CASTRO; PEREIRA, 2010).

As celulasas são divididas em três grupos, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, sendo assim classificadas em: a) Endoglucanases (EGases), que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases (ExGases), que atuam na região externa da celulose; e c) β - glicosidases (β Gases), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose. As enzimas do complexo celulásico atuam em conjunto e apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. Tal efeito é conhecido como sinergia. Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis com grau de polimerização até 6. A etapa de despolimerização realizada por EGases e ExGases é o passo limitante para todo o processo de hidrólise da celulose. A hidrólise secundária envolve a hidrólise de celobiose em glicose pelas β -glicosidases, embora algumas β -glicosidases também hidrolisem celodextrinas (LYND *et al.*, 2002; ZHANG; LYND, 2004; MAEDA *et al.*, 2013; NARRA *et al.*, 2014).

2.2.1 Endoglucanases

As endoglucanases (EGases) são responsáveis por iniciar a hidrólise dos polímeros de celulose. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando oligossacarídeos e açúcares, formando assim novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. As EGases são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos em diversos graus de polimerização (LYND *et al.*, 2002; DIENES *et al.*, 2004). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para determinar a atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (ZHANG *et al.*, 2006; MAEDA *et al.*, 2013; NARRA *et al.*, 2014).

2.2.2 Exoglucanases

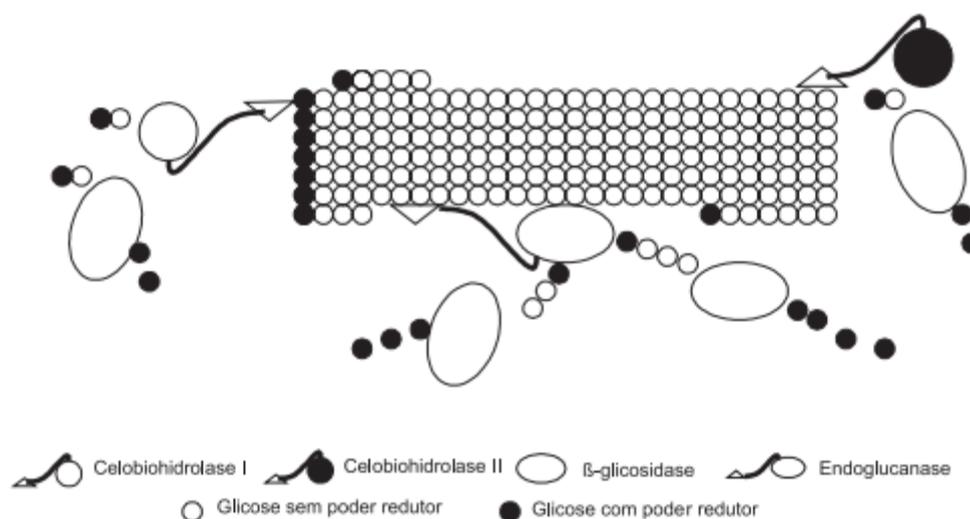
As exoglucanases (ExGases) são representadas pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). As GHs são pouco reportadas, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. As ExGases atuam nas extremidades dos polímeros de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (LYND *et al.*, 2002). As CBHs participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis por um fenômeno ainda não tão bem elucidado, a amorfogênese. Porém sabe-se que esse fenômeno envolve uma ruptura física do substrato,

acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais, promovendo aumento na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (ZHANG; LYND, 2004). As CBHs ainda podem ser divididas em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (ZHANG *et al.*, 2006; NARRA *et al.*, 2014).

2.2.3 β -glicosidases

As enzimas β -glicosidases, conhecidas também como celobiasas, possuem propriedade de hidrolisar celobioses e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose. As celobiasas são responsáveis pelo aumento do rendimento total dos açúcares fermentescíveis, pois reduzem a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (LYND *et al.*, 2002; LYND; ZANG, 2002). Assim como as celobiohidrolases, também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (WILSON, 2008). A Figura 4 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.

Figura 4 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: CASTRO, 2010.

2.2.4 Importância econômica das celulasas

As celulasas possuem um grande potencial biotecnológico, podendo ser empregadas nas indústrias alimentícias, de rações animais, têxtil e de detergentes, na reciclagem de papel, além da possibilidade de aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais para a

produção de etanol. Outro grande potencial biotecnológico das celulases consiste no processo de reciclagem de papel, onde conseguem remover, com eficácia, partículas de tinta aderidas à superfície das fibras e favorecendo a brancura do papel (BHAT *et al.*, 2000; SINGHANIA *et al.*, 2010; YOON *et al.*, 2014).

A sacarificação de resíduos lignocelulósicos por celulases, com a posterior produção de etanol de segunda geração, também chamado de etanol celulósico, representa uma busca incessante por pesquisadores de vários países do mundo, no sentido de encontrar novas fontes alternativas aos combustíveis fósseis. A utilização ou reutilização da biomassa vegetal, além de reduzir a emissão de CO² na atmosfera, agrega valor à matéria e contribui para reduzir o impacto ambiental ocasionado pelo acúmulo de resíduos lignocelulósicos, gerados anualmente (PANDEY *et al.*, 2000; LIN; TANAKA, 2006). A conversão da celulose a etanol compreende as etapas de sacarificação e fermentação dos açúcares liberados. Na sacarificação ocorre à hidrólise dos polissacarídeos que pode ser por via ácida ou enzimática e posteriormente os açúcares liberados são fermentados por leveduras. A hidrólise ácida é bem conhecida, porém apresenta muitas desvantagens, como a geração de inibidores da fermentação por leveduras e a difícil recuperação dos açúcares liberados. A hidrólise enzimática é o método mais eficiente e que não gera inibidores, sendo que seu processo está em pleno desenvolvimento e pode contribuir na utilização da biomassa (SANTOS, *et al.*, 2012). O uso da biotecnologia para converter celulose em etanol fornece oportunidades para as empresas na área de desenvolvimento de enzimas, principalmente celulases e hemicelulases (GOLDBECK *et al.*, 2013).

O mercado internacional de enzimas industriais e especiais é estimado em U\$S 4 bilhões. O mercado externo brasileiro desses biocatalisadores é estimado em cerca U\$S 200 milhões (ANDREUS *et al.*, 2014). As enzimas de uso industrial ocupam 60% do mercado mundial. Entre as mais utilizadas, se destacam as amilases (25,4%), celulases (17,1%) e lipases (7,2%). A América representa 3,4% da demanda mundial de enzimas, sendo o Brasil o país mais expressivo deste conjunto, responsável por 60% do consumo de enzimas no continente (MONTEIRO; SILVA, 2009). O mercado industrial de enzimas cresce continuamente devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (ORLANDELLI, *et al.*, 2012; REINEHR *et al.*, 2014). O mercado mundial de enzimas deve chegar a 7,652 bilhões de dólares em 2020, de acordo com um novo estudo da Grand View Research, Inc. (PRWEB, 2014).

Dentre as enzimas de interesse comercial encontram-se as celulases e hemicelulases devido as suas diversas aplicações em vários segmentos industriais. A produção de celulases é uma importante área de pesquisa e no mercado industrial, ocupa a terceira posição no ranking mundial, representando 20% do volume total de enzimas comercializadas. A forte demanda da celulase é atribuída as suas principais aplicações na indústria de papel e celulose, têxtil, alimentos e bebidas, indústria de detergentes e ração animal. Esta demanda tende a ser fortemente impulsionada caso o etanol obtido da biomassa lignocelulósica se torne o principal combustível utilizado (SINGHANIA *et al.*, 2010; YOON *et al.*, 2014).

O alto custo de produção de enzimas e sua aplicação em grande volume nos processos industriais constituem-se como maior obstáculo. Nesse sentido, investimento em pesquisas tem sido realizado avaliando a biomassa lignocelulósica, a cepa microbiana utilizada, as condições de cultivo para a bioprospecção de enzimas, como uma estratégia viável para a obtenção de produtos de alto valor agregado a um baixo custo (REINEHR *et al.*, 2014).

2.3 FUNGOS DO SOLO SEMI-ÁRIDO

A região conhecida como semi-árido brasileiro compreende uma área de 857.999,3 km² cobrindo aproximadamente 8% do território nacional, abrangendo o norte de Minas Gerais e quase todos os estados do Nordeste, exceto o Maranhão (SUDENE, 1997). Nessa região o aspecto fitofisionômico predominante é a Caatinga. A formação vegetal denominada Caatinga, bioma único no mundo, é um mosaico de florestas secas e vegetação arbustiva, com enclaves de florestas úmidas e de cerrados (TABARELLI; SILVA 2003). É o principal bioma da região Nordeste brasileira, ocupando cerca de 844.453 km² ou 54,53% da área da região (IBGE, 2005).

O clima semi-árido submete essa biota a condições climáticas extremas, como altas temperaturas médias anuais (26-28°C) e baixas precipitações (300-1000mm/ano), que são irregulares e concentradas em 3 a 6 meses por ano (PRADO, 2003; LEAL *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2014). O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes micro-organismos que poderão ser importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (RUEGGER; TAUKTORNISIELO 2004; SMRITHI *et al.*, 2013; MONCIARDINI *et al.*, 2014).

A região da Caatinga pernambucana é parte da diversidade biológica ainda pouco explorada no Brasil e, devido a características ambientais próprias, apresentam fungos

resistentes a condições extremas. Em consequência, de situações de estresse, muitos desses fungos respondem com o aumento da produção de enzimas com elevado potencial biotecnológico (SENA *et al.*, 2006). No semi-árido, de acordo com parâmetros da Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE), o material examinado em referências bibliográficas sobre fungos depositados em herbários e coleções de cultura de diversas instituições do Nordeste verifica-se que o número de fungos conhecidos para o semi-árido é extremamente baixo, quando comparado com o número total de espécies conhecidas para o mundo (QUEIROZ, 2006).

2.4 MICRO-ORGANISMOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Micro-organismos celulolíticos apresentam estratégias diferentes para realizarem a hidrólise da celulose, sendo importante a escolha do tipo de celulose que será adicionada ao meio de cultura, celulose insolúvel (papel de filtro ou celulose microcristalina-Avicel) ou solúvel (carboximetilcelulose - CMC). O papel de filtro, utilizado para determinação de FPase, é composto em sua maior parte de celulose microcristalina e em menor parte de celulose amorfa, essa celulose microcristalina é o mesmo tipo de celulose encontrado na celulose microcristalina –Avicel (MCDONALD, *et al.*, 2012).

Dentre um grande número de micro-organismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos se destacam devido à sua maior facilidade de cultivo e extração enzimática, pois secretam suas enzimas diretamente no meio em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com grande potencial para diversas aplicações, sendo os mais utilizados em processos industriais (SINGH *et al.*, 2009). Suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas permitem seu crescimento em substratos sólidos e a bioconversão dos mesmos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes micro-organismos em diversos processos biotecnológicos (GUIMARÃES *et al.*, 2006, KUMAR *et al.*, 2008).

Os micro-organismos são fontes preferenciais de produção de celulases, devido à ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Entre eles, os melhores produtores das citadas enzimas são os fungos filamentosos em virtude de sua estrutura filamentosa e do seu grande potencial secretor, permitindo eficiência na obtenção de preparados enzimáticos com elevado poder de hidrólise. O conhecimento de novas linhagens com boa produção enzimática é de grande interesse biotecnológico, não apenas para obtenção

de biocatalisadores que apresentem características adequadas aos processos industriais aos quais se destinam, mas também para o conhecimento e exploração da biodiversidade microbiana existente (COLEN, 2006; YEOMAN *et al.*, 2010).

2.4.1 Fungos da ordem Mucorales

Dentro do subfilo Mucoromycotina, encontram-se a ordem Mucorales, cujos representantes são predominantemente sapróbios, presentes em muitos substratos como o solo, mas também há parasitas de plantas, fungos e animais. São geralmente caracterizados pelo abundante micélio não septado e de rápido crescimento, apresentando parede celular composta por quitina e quitosana e com hifas hialinas cenocíticas, portando septos que delimitam estruturas reprodutivas (ex: esporângios) e, em algumas outras partes, quando o micélio envelhece (SANTIAGO; SOUZA-MOTTA, 2008).

Reproduzem-se assexuadamente por meio de esporos (esporangiósporos) produzidos em mesoesporângios ou esporângios multi-esporulados, sendo estes últimos, caracterizados pela inclusão de uma columela de forma e tamanho variado. No entanto, também se reproduzem sexuadamente através da formação de zigósporos, esporos que apresentam parede espessa e escura, com ou sem ornamentações, sendo formados no interior do zigosporângio após fusão de dois gametângios iguais ou desiguais formados no ápice de hifas sob a influência de substâncias voláteis (derivados do β -caroteno) que proporcionam a atração de hifas compatíveis (HOFFMAN *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2013).

A classificação taxonômica de Mucorales, bem como de fungos no geral esta longe de ser totalmente resolvida devido a descoberta de novos táxons. Com o advento da biologia molecular, toda a classificação biológica esta passando por processo de revisão (HIBBETT *et al.*, 2007). Dadas suas propriedades estruturais e fisiológicas, os fungos da ordem Mucorales recebem múltiplas aplicações em biotecnologia. Muitas espécies dessa ordem são eficientes em produzir enzimas e ácidos orgânicos de interesse industrial (SANTIAGO; SOUZA-MOTTA, 2006, NEVES *et al.*, 2012). Em um contexto ecológico, os fungos Mucorales participam principalmente da decomposição dos açúcares simples na fase inicial de degradação da matéria orgânica e contribuindo para a manutenção da fertilidade do solo (TRUFEM, 1998). Eles são considerados os únicos representantes verdadeiramente sapróbios, de maneira que a maioria pode degradar amido além de proteínas e lipídios, embora algumas espécies sejam celulolíticas ou quitinolíticas (CARLILE; WATKINSON, 1996; MICHELIN, 2005).

2.5 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes resíduos como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (SANCHÉS, 2009). O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, pode ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALVIRA *et al.*, 2010). Apesar de o processo enzimático de hidrólise ser considerado de grande potencialidade na biotecnologia, este enfrenta vários gargalos tecnológicos, sendo o custo de produção um dos pontos mais avaliados. Dentre as alternativas existentes a fim de diminuir estes custos, está o emprego de resíduos agroindustriais como substratos alternativos, estes geralmente descartados pela indústria, o qual se mostra uma fonte riquíssima de substratos para aplicação neste processo (MURUGAN *et al.*, 2011). Um fator que também pode interferir na quantidade de enzimas produzidas é a característica específica de cada resíduo utilizado (PINTO *et al.*, 2005). A constituição química parcial de alguns resíduos pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	46	26	21
Farelo de trigo	34	18	9
Palha de arroz	43	22	17
Farelo de cevada	23	32	24
Palha de arroz	33	31	20
Palha de milho	37	22	17

Fonte: PINTO *et al.*, 2005.

São produzidas anualmente no mundo cerca de 6,0 bilhões de toneladas de lignocelulose na forma de resíduos agroindustriais (FAOSTAT, 2010). Nesse contexto, a utilização de resíduos celulósicos como fonte de carboidratos para a produção de moléculas de interesse vem sendo amplamente discutida, por apresentar um potencial privilegiado para a produção de insumos de alto valor agregado. Com este objetivo, a rota enzimática tem se

apresentado como uma tecnologia vantajosa visando à adequada e eficiente bioconversão da lignocelulose em seus componentes. O bioetanol derivado da biomassa lignocelulósica pode contribuir para a solução da dependência mundial pelas fontes de energia fóssil. Neste sentido, os biocombustíveis de 2ª geração se mostram como alternativas energéticas promissoras, pois utilizam fontes renováveis como matéria prima sem a competição pelo uso da terra com fins alimentares. No Brasil, apesar da grande produção do etanol a partir da sacarose de cana-de-açúcar, a produção de etanol derivado do material lignocelulósico se apresenta como uma alternativa viável e sustentável em contextos de iminente crise energética (ALVIRA *et al.*, 2010; CARDONA *et al.*, 2010).

2.6 FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A Fermentação em Estado Sólido (FES) pode ser definida como o crescimento de micro-organismos em materiais ou substratos sólidos na ausência de água livre. O substrato escolhido para fermentação deve, no entanto conter uma umidade suficiente para suportar o crescimento e metabolismo microbiano, na forma adsorvida na matriz sólida. A matriz sólida pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte como capacidade de absorver os nutrientes que se encontram em solução. Os níveis de umidade relativa estão estritamente relacionados com o tipo de substrato ou suporte utilizado, bem como sua capacidade máxima de retenção de água. (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; RAHARDJO *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2011).

O uso da FES vem tornando-se vantajoso no que se refere ao crescimento de fungos filamentosos, pois se assemelha melhor ao habitat natural destes micro-organismos. Tal vantagem também se estende a produção enzimática, onde proporciona uma maior produção quando comparada ao processo de fermentação submersa. Na FES, as enzimas fúngicas são produzidas diretamente sob o substrato insolúvel em água ou suporte inerte, na presença de quantidades variáveis de água. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato, possuindo ainda uma maior estabilidade a variações de temperatura e pH (HOLKER *et al.*, 2005; ROCHA, 2010; ZHANG *et al.*, 2013).

A escolha de um substrato adequado para FES depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade do seu uso. Nos últimos anos, tem havido crescente interesse no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais como substrato para processos de FES. Do ponto de vista ambiental, essa prática torna-se vantajosa, visto que a biomassa, na sua forma de resíduos da agricultura e resíduos florestais, é gerada em muitas toneladas

anualmente, o que pode ocasionar problemas ambientais devido ao acúmulo na natureza (PANDEY *et al.*, 2000; PANDEY, 2003; MACIEL, 2006; COLLA *et al.*, 2010).

A falta de aplicação prática deixa de agregar valor a estes resíduos, que poderiam gerar lucros para os mais diversos setores industriais, visto a possível utilização em FES. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes resíduos como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos e enzimas. Sendo assim, a FES tornou-se um processo adequado para a utilização de resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, milho entre outros) como substrato, servindo como fontes de carbono e energia. Sendo assim, os materiais lignocelulósicos podem ser utilizados como substratos na produção de enzimas celulolíticas (IANDOLO *et al.*, 2011; DHILLON *et al.*, 2012).

Tendo em vista que o crescimento de fungos filamentosos produtores de celulases ocorre naturalmente em condições similares à FES, a produção de celulases utilizando esse processo está rapidamente atraindo interesse por ser uma tecnologia com custo eficaz e pelo uso de micro-organismos, especialmente fungos filamentosos que produzem relativamente altas concentrações de celulases devido às condições da fermentação que mostram similaridade com o meio-ambiente natural (SINGHANIA *et al.*, 2010).

O uso de resíduos agroindustriais como substrato alternativo para a produção de enzimas celulolíticas por FES, pode se tornar um método competitivo para a produção destas enzimas, com uso de tecnologia apropriada, melhora no modelo dos biorreatores e domínio dos controles operacionais (SINGHANIA *et al.*, 2009; FARINAS *et al.*, 2010). Essa é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de biorreatores em escala industrial, uma vez que a FES, apesar dos elevados rendimentos para a produção de enzimas, apresenta como principal fator limitante a dificuldade de controle nos gradientes das variáveis operacionais inerentes ao processo. A FES para a produção de enzimas industriais pode ser considerada como uma tecnologia futura para a produção comercial de celulases, considerando o baixo custo de entrada e a habilidade para utilizar naturalmente fontes disponíveis de celulose como substrato (IANDOLO *et al.*, 2011; BHUNIA *et al.*, 2012).

2.7 OBJETIVOS

2.7.1 Objetivo Geral

Analisar a produção de endoglucanases e exoglucanases por espécies de fungos da ordem Mucorales por meio de fermentação sólida utilizando farelo de palha de milho como substrato.

2.7.2 Objetivos Específicos

1. Detectar e quantificar a atividade enzimática de endoglucanases (CMCase) e celulasas totais (FPase) produzidas através de fermentação sólida utilizando farelo de palha de milho por 13 espécies de Mucorales isoladas de solo;
2. Selecionar amostra com melhor perfil de produção para as enzimas;
3. Definir a melhor condição de cultivo para produção de CMCases e FPases pelo isolado promissor através de um planejamento experimental;
4. Determinar o pH ótimo e temperatura ótima para atividade CMCase e FPase no extrato enzimático do isolado promissor;
5. Analisar a estabilidade do extrato enzimático em diferentes faixas de pH e temperatura.

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 MATERIAL

Para avaliação da produção enzimática foram utilizadas treze amostras de fungos da ordem Mucorales (Tabela 2), todas isoladas de solo do semiárido pernambucano e depositadas no Banco de Cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia - NPCIAMB da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP. Os isolados foram preservados sob óleo mineral, sendo reativados através da transferência de fragmentos de micélio para caldo Sabouraud e mantidos a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após observação de crescimento em caldo foram feitos repiques em meio Agar Sabouraud para verificação da viabilidade e pureza.

O farelo da palha de milho foi obtido em casa de ração, posteriormente seco em estufa de secagem e esterilização a 70 °C por 24 horas, peneirado na granulométrica aproximada de 1,2 mm (20 mesh).

Tabela 2 - Amostras de Mucorales selecionadas para avaliação da produção de celulases.

Identificação	Isolados
SIS 01	<i>Fenellomyces heterothallicus</i>
SIS 03	<i>Rhizopus arrhizus</i>
SIS 04	<i>Rhizopus microsporus</i>
SIS 07	<i>Cunninghamella echinulata</i>
SIS 08	<i>Rhizopus stolonifer</i>
SIS 09	<i>Absidia cylindrospora</i>
SIS 10	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
SIS 11	<i>Cunninghamella phaeospora</i>
SIS 12	<i>Rhizopus microsporus</i>
SIS 13	<i>Lichtheimia blakesleeana</i>
SIS 14	<i>Cunninghamella elegans</i>
SIS 15	<i>Mucor subtilissimus</i>
SIS 16	<i>Mucor hiemalis</i>

Fonte: Própria, 2016.

3.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As culturas esporuladas em BDA (*Potato Dextrose Agar*) foram suspensas em solução de Tween 80 a 0,01% e submetidas à contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular BIOVAL L1000. O inóculo foi padronizado em 10^7 esporos/mL.

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10g de farelo de palha de milho previamente autoclavado em vapor fluente, adicionado com 1 ml de suspensão contendo 10^7 de esporos. Foram adicionados volumes de água destilada esterilizada até a obtenção de um teor de umidade desejada (entre 90 a 100%). Os cultivos foram realizados em triplicata e conduzidos a 35°C em estufa bacteriológica, durante 96 horas.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Foram realizadas suspensões nos frascos Erlenmeyer com os substratos fermentados adicionando 50 ml de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM e posteriormente feita a extração por filtração dos extratos enzimáticos obtidos. Em seguida os extratos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação os sobrenadantes foram colocados cuidadosamente em tubos de vidro com capacidade de 15 mL e armazenados em freezer vertical a -4°C. Posteriormente os sobrenadantes/extratos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas.

3.5 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.5.1 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)

Para determinar a atividade de CMCase, de acordo com a metodologia adaptada de GHOSE (1987), que representa a dosagem de endoglucanases, foi realizado a dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC) a 2% p/v diluído previamente na solução citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM. Os ensaios reacionais foram conduzidos adicionando em tubo de ensaio 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de CMC a 2% p/v. Em outro tubo foi adicionado 0,5 mL de solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático comparado ao controle da reação. O branco conteve 0,5 mL CMC a 2% e 0,5 mL de solução tampão. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos, e a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) segundo metodologia de MILLER (1959) para quantificação de açúcar redutor. Os tubos foram submergidos a água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

3.5.2 Atividade em papel de filtro (FPase)

A atividade de FPase ou atividade em papel de filtro, que abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de GHOSE (1987) a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm (cerca de 50 mg). Os ensaios reacionais foram conduzidos adicionando em tubo de ensaio 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Em outro tubo foi adicionando 1 mL da

mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, comparado ao controle da reação. Em um terceiro tubo foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro, este foi comparado ao branco. As amostras foram incubadas em estufa a 50°C por 60 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNSA (MILLER, 1959). Os tubos foram alocados em água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 16 mL de água destilada para posterior medição de absorbância a 540 nm realizada em espectrofotômetro. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

3.5.3 Determinação de açúcares redutores e curva de calibração

O método do DNSA (ácido 3,5-dinitrossalicílico) para determinação de açúcares redutores, segundo metodologia adaptada de MILLER (1959), foi previamente padronizado por uma curva de calibração. A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L, com intervalos de 0,2 g/L. A absorbância foi medida no espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de absorbância das amostras foram convertidos a valores de concentração de glicose ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) mediante interpolação na curva padrão. Após as determinações analíticas anteriores, as concentrações enzimáticas foram calculadas segundo a equação (1):

$$[\text{enzima}] = [\text{AR}] \times V_{\text{mistura}} \times (t_{\text{reação}})^{-1} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

[AR] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)

V = volume da mistura reacional (mL)

$t_{\text{reação}}$ = tempo de reação enzimática (min)

Sendo assim, a unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática foi expressa em U por mL de substrato (U/mL).

3.5.4 Análise estatística

Para comparar os resultados de atividade enzimática dos isolados de Mucorales quanto a produção de CMCase e FPase, os dados foram submetidos a análise de variância utilizando Statistica 7,0 software. As médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste t de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um delineamento experimental para determinar as condições de FES para melhor atividade de CMCase e FPase. Os experimentos estatísticos e as análises foram realizados utilizando o software Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Utilizou-se para os delineamentos o isolado mais promissor na determinação das atividades de CMCase e FPase.

3.6.1 Seleção das condições de FES

Um planejamento fatorial completo 2^2 , resultando em 8 experimentos, incluindo 4 pontos centrais, foi utilizado para determinar o efeito das variáveis independentes: umidade e temperatura de incubação, sob a variável dependente ou resposta: atividade enzimática de CMCase e FPase. Na Tabela 3 está representada a matriz do planejamento fatorial. A seleção das condições ótimas de FES, utilizando farelo de palha de milho, para atividade de celulases foi realizada com o isolado que apresentou os maiores resultados para atividade enzimática de CMCase e FPase, variando-se o tempo de fermentação (24 a 96 horas).

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , com 4 pontos centrais e 4 pontos axiais.

Ensaio	Variáveis	
	Umidade	Temperatura
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0

Nível (+1): Umidade 100%, Temperatura 38°C; Ponto central (0): Umidade 75%, Temperatura 27°C; Nível (-1): Umidade 50%, Temperatura 16°C. Fonte: Própria, 2016.

3.7 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE REAÇÃO

Os extratos enzimáticos obtidos do isolado promissor nas melhores condições de fermentação foi caracterizado quanto pH ótimo e temperatura ótima para atividade de

CMCase e FPase. O perfil de pH para atividade enzimática foi analisado em ensaios com soluções tampões com diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) a 50°C. O perfil de temperatura para atividade enzimática foi analisado em ensaios com diferentes temperaturas (8, 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C) no pH ótimo encontrado para cada atividade.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE EM DIFERENTES VALORES DE PH

A estabilidade enzimática frente a diferentes valores de pH foi avaliada através da incubação na proporção 1:1, extrato enzimático:solução tampão (v/v), utilizando tampões com valores de pH 3,0 a 9,0, com variação de 1,0 ponto entre cada amostra. Após 24h de incubação em temperatura laboratorial (25°C) foram determinadas as atividades residuais de CMCase e FPase. Todos os ensaios reacionais foram realizados em triplicata.

3.9 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica foi avaliada através de incubação do extrato enzimático a 50°C, 60°C e 70°C e foram medidas as atividades residuais de CMCase e FPase nos intervalos de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, em ambas as temperaturas de incubação. O pH utilizado nos ensaios foi o ótimo verificado no item 3.7 para cada atividade. Todos os ensaios reacionais foram realizados em triplicata.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A atividade de endoglucanase (CMCase) e celulasas totais (FPase) foi detectada em todos os 13 isolados de Mucorales utilizando meio de cultivo contendo apenas farelo de palha de milho como substrato indutor na fermentação sólida por 96 horas a 35°C, onde os resultados estão expressos na tabela 4. O isolado *Rhizopus microsporus* SIS 04 apresentou os resultados mais significativos na produção de ambas as enzimas testadas, sendo escolhido para determinar as condições de cultivo mais favoráveis, variando temperatura e umidade, para melhor atividade de CMCase e FPase por este isolado, através de um planejamento fatorial 2² nas condições experimentais testadas. Foi realizado uma caracterização parcial do extrato enzimático de *Rhizopus microsporus* SIS 04 quanto ao pH ótimo e temperatura ótima para atividade de CMCase e FPase, bem como foi verificado a estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura de incubação.

Tabela 4 - Atividades enzimáticas do complexo celulolítico produzidas por isolados de Mucorales em farelo de palha de milho por 96h a 35°C.

Identificação	Isolados	Atividade de CMCase (U/mL)	Atividade de FPase (U/mL)
SIS 01	<i>Fenellomyces heterothallicus</i>	1,228	0,085
SIS 03	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1,314	0,093
SIS 04	<i>Rhizopus microsporus</i>	1,375	0,105
SIS 07	<i>Cunninghamella echinulata</i>	1,254	0,083
SIS 08	<i>Rhizopus stolonifer</i>	1,346	0,097
SIS 09	<i>Absidia cylindrospora</i>	1,228	0,098
SIS 10	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1,185	0,089
SIS 11	<i>Cunninghamella phaeospora</i>	1,166	0,079
SIS 12	<i>Rhizopus microsporus</i>	1,205	0,104
SIS 13	<i>Lichtheimia blakesleeana</i>	1,211	0,079
SIS 14	<i>Cunninghamella elegans</i>	1,220	0,092
SIS 15	<i>Mucor subtilissimus</i>	1,252	0,082
SIS 16	<i>Mucor hiemalis</i>	1,234	0,082

OSBURNE *et al.* (2002) relataram que estudos relacionados à bioprospecção de fungos se mostram promissores na industrial pois, apesar do escasso conhecimento sobre a biodiversidade microbiana, se vê grande variedade de produtos industriais provenientes destes micro-organismos.

Trabalhos que verificam a eficiência da palha de milho como substratos para produção de celulasas vêm sendo realizados nos últimos anos, como por exemplo, os trabalhos de FANG *et al.* (2010) que analisaram a produção FPase pelos fungos *Aspergillus niger* (0,25 U/ml) e *Thichoderma reesei* (2,5 U/ml) por fermentação submersa utilizando este substrato como indutor. LIU *et al.* (2011) testaram alguns substratos para verificar em qual haveria maior produção de celulasas pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, sendo a palha de milho e a peptona os escolhidos por induzirem a maior produção dessas enzimas. Neste estudo, todos os isolados foram capazes de utilizar o farelo de palha de milho como substrato para produção de celulasas sem a necessidade de qualquer outro indutor ou suprimento além da celulose contido no resíduo.

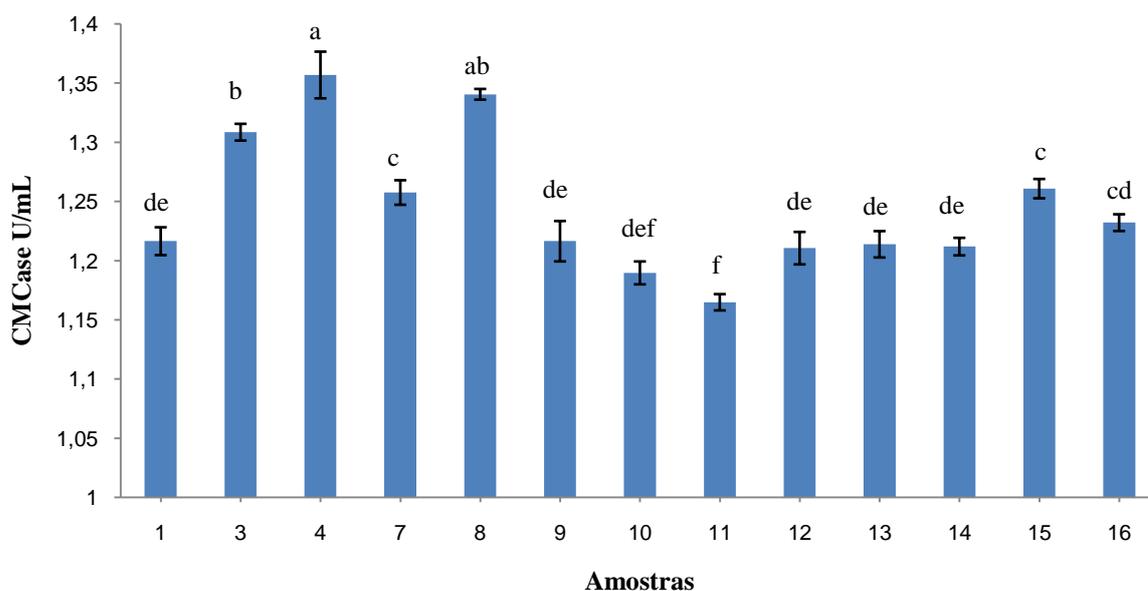
ROCHA (2010) destaca que cada micro-organismo pode se adequar a um processo ou outro de cultivo e produzir diferentes complexos enzimáticos de acordo com o substrato e o método de fermentação adotado. A FES é uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para a reutilização dos resíduos celulolíticos gerados, diminuindo danos ambientais bem como a valorização econômica desses rejeitos. Para PANDEY *et al.* (2003) cada uma das técnicas possui suas potencialidades e particularidades sendo assim, a tecnologia de FES não deve ser encarada como uma técnica que vem em substituição a fermentação líquida, mas como uma ferramenta a mais que vem contribuir com o potencial da produção enzimática por micro-organismos.

4.1. ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.1.1 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)

Foi observado que todos os 13 isolados apresentaram atividade enzimática para Endoglucanases. Os melhores resultados foram observados em 3 isolados: *Rhizopus microsporus* SIS 04 (1,375 U/mL); *Rhizopus stolonifer* SIS 08 (1,346 U/mL) e *Rhizopus arrhizus* SIS 03 (1,314 U/mL) respectivamente, onde houve diferença estatística (Gráfico 1). A carboximetilcelulose (CMC) foi utilizada como substrato indutor preferencial para quantificar a atividade dessas enzimas (CAO; TAN, 2002).

Gráfico 1 - Atividade de CMCase das 13 amostras cultivadas em farelo de palha de milho a 35°C por 96h.



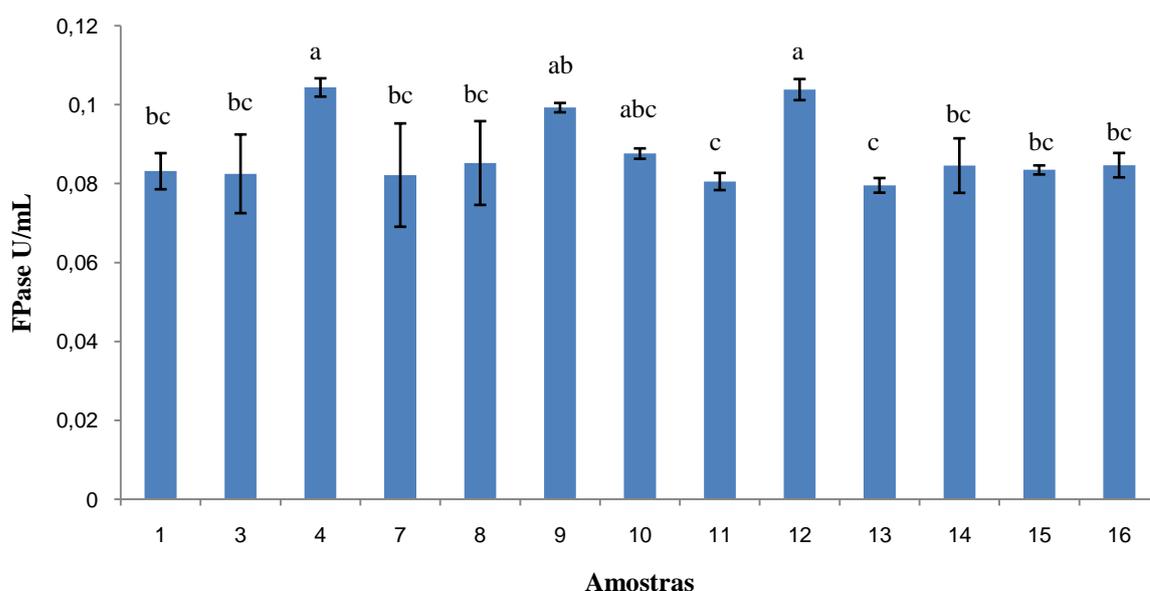
*Letras discriminam diferenças significativas ($p < 0,5$) de controle utilizando o teste de Tukey.

CUNHA *et al.* (2012) utilizaram em seu estudo o fungo *Aspergillus niger* para a produção de CMCases em bagaço de cana-de-açúcar como substrato sob fermentação submersa a 32°C por 30h, e obtiveram uma produção de 1,36 U/ml. NAIR *et al.* (2008) investigaram 10 cepas de *Aspergillus niger* para a produção de CMCCase que produziram em média 1,81 U/mL, utilizando farelo de trigo como substrato em FES. Resultado semelhante de atividade foram encontrados por GOMATHI *et al.* (2012), onde *Aspergillus flavus* produziu 1,40 U/mL, também utilizando farelo de trigo como substrato em 72 horas de cultivo. Em comparação a estes autores, valor semelhante de atividade de CMCCase foi encontrado neste estudo pelo isolado *Rhizopus microsporus* SIS 04 com produção de 1,375 U/mL.

4.1.2 Atividade em papel de filtro (FPase)

Para celulases totais (Exoglucanases e Endoglucanases), foi observado que todos os 13 isolados apresentaram atividade enzimática. Os melhores resultados foram observados em 3 isolados: *Rhizopus microsporus* SIS 04 (0,105 U/mL); *Rhizopus microsporus* SIS 12 (0,104 U/mL) e *Absidia cylindrospora* SIS 09 (0,098 U/mL) respectivamente, não diferindo estatisticamente (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Atividade de FPase das 13 amostras cultivadas em farelo de palha de milho a 35°C por 96h.



*Letras discriminam diferenças significativas ($p < 0,5$) de controle utilizando o teste de Tukey.

PEREIRA (2013), trabalhando com *Aspergillus niger* obteve 0,10 U/mL de FPase em farelo de trigo, após 168 horas de cultivo submerso. Neste trabalho, *Rhizopus microsporus* SIS 04 produziu 0,105 U/mL de FPase, resultado semelhante ao obtido pelo autor, entretanto foi necessário um tempo menor de cultivo de 96 horas. WANG *et al.* (2011) utilizando o mesmo substrato e a mesma espécie de fungo estudado por PEREIRA (2014), obtiveram um pico de produção de FPase de 3 U/mL após 144 horas. Esse resultado foi superior comparado a *Rhizopus microsporus* SIS 04, porém foi necessário um tempo maior de fermentação para *Aspergillus niger*, que pode ter favorecido a maior produção. FANG *et al.* (2010) considerou a palha de milho como sendo um bom indutor para produção de FPases, obtendo uma produção de 0,25 U/mL após 48 horas de cultivo.

A maior parte dos estudos é focada em fungos com capacidade superior de produzir celulases, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola*, sendo o gênero *Trichoderma* relatado como o mais eficiente na degradação da celulose (LYND *et al.*, 2002; SAAD, 2010). Para CASTRO *et al.* (2010) os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são os melhores produtores de exoglucanases e endoglucanases, e são reconhecidos também pelas elevadas concentrações de β -glicosidases, o que representa uma vantagem no processo de sacarificação da biomassa. Entretanto, estudos com outros gêneros, pertencentes até mesmo a outros filos com potencial para produção de celulases vem sendo amplamente estimulados, a fim de se obter linhagens cada vez mais promissoras na produção dessas enzimas. Dentro deste contexto, faz-se interessante a busca por fungos Mucorales que desempenhem também esse papel. Os isolados de Mucorales estudados neste trabalho obtiveram valores semelhantes de atividade de celulases quando comparados a outros fungos ditos na literatura como bons produtores dessas enzimas em substratos de baixo custo.

4.2 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FES

Na Tabela 5 encontram-se os resultados do planejamento fatorial 2^2 , demonstrando o efeito da temperatura e umidade sob a atividade de CMCase por *Rhizopus microsporus* SIS 04. O tempo de fermentação variou de 24 a 96 horas, porém foi observado que no tempo de 72 horas de fermentação se obteve os maiores rendimentos de atividade enzimática. No ensaio 4 foi obtido melhor rendimento de atividade (1,477 U/mL) em temperatura de 38°C e umidade de 100%.

Pode-se observar que a variável independente temperatura contribuiu significativamente para produção enzimática, tendo influência positiva. A variável

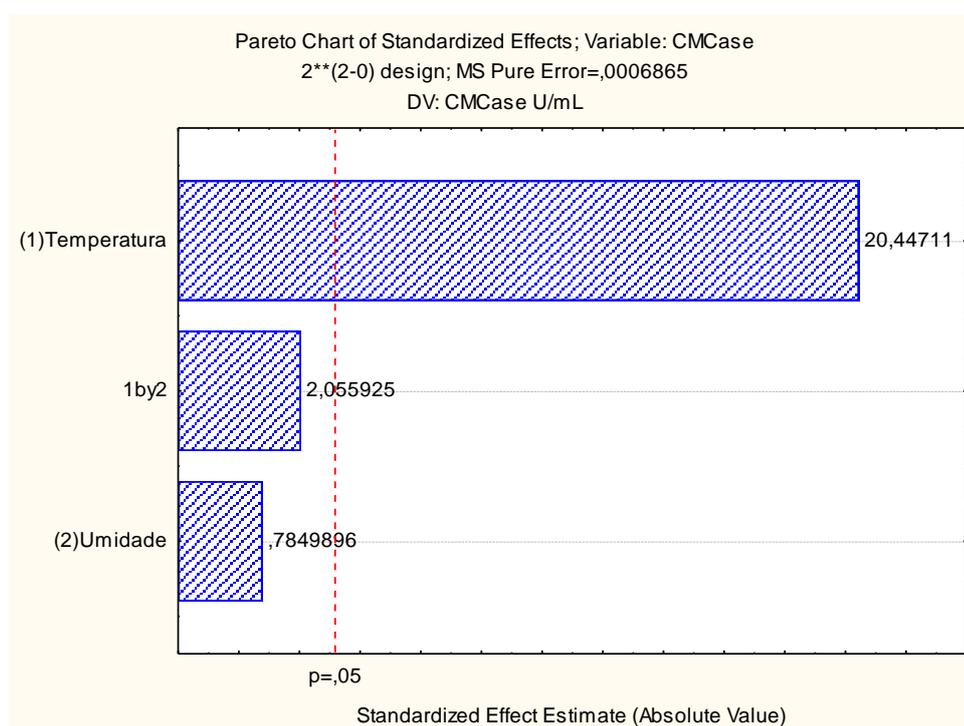
independente umidade não contribuiu significativamente para produção. A interação das duas variáveis não apresentou efeito significativo como mostra o diagrama de Pareto de efeitos padronizados com o nível de 95% de confiança (Figura 5). Sendo assim, a máxima produção de atividade de CMCase pode ser explicada pelo o aumento da temperatura. A atividade enzimática (1,477 U/mL) obtida nas condições de fermentação através do planejamento fatorial teve diferença estatística significativa quando comparada com a fermentação realizada para determinação da detecção de CMCase (1,375 U/mL).

Tabela 5 - Atividade de CMCases (U/mL) através de planejamento fatorial 2² em meio de farelo de palha de milho.

Ensaio	Atividade enzimática (U/mL)			
	24h	48h	72h	96h
1	0,509	0,547	0,611	0,638
2	0,505	0,536	0,631	0,622
3	0,654	1,167	1,369	1,309
4	0,701	1,236	1,477	1,371
5	0,737	1,105	1,124	1,095
6	0,731	1,099	1,132	1,103
7	0,750	1,083	1,119	1,089
8	0,723	1,070	1,129	1,062

Fonte: Própria, 2016.

Figura 5 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2² em cultivo de 72h, tendo como variáveis independentes (1) temperatura, (2) umidade, e como variável resposta a atividade de CMCase.



Fonte: Própria, 2016.

PACHECO *et al.*, (2014), estudando a produção de endoglucanase (CMCase) por *Aspergillus niger* em farelo de semente de jaca, observou que o tempo ótimo de produção ocorreu em 72h de fermentação, na temperatura de 30°C e umidade de 50%, com atividade de 64,44 (U/mg). Quando o autor aumentou a temperatura de fermentação para 35°C provocou uma elevação na atividade enzimática para 138,46 (U/mg) em 60% de umidade. Sendo assim, pode-se destacar que no nosso trabalho a temperatura também foi um fator determinante na produção enzimática, sendo o comportamento em função do teor de água pouco relevante.

MAURYA *et al.* (2012), obtiveram atividade máxima de endoglucanases de (2,63 U/mL) através de otimização com o fungo *Thichoderma reesei* utilizando como substrato farelo de trigo com umidade de 70%, a 30°C após 144 horas de cultivo. Neste trabalho foi obtido um valor menor de rendimento de atividade enzimática para CMCase (1,477 U/mL) por *Rhizopus microsporus* SIS 04 comparado com *Thichoderma reesei*, porém no nosso estudo foi necessário um tempo menor de incubação de 72 horas para produção máxima, avaliando as mesmas variáveis temperatura e umidade, indicando assim que um menor tempo de cultivo foi favorável a produção.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA (2010) avaliou o efeito da temperatura e tempo de fermentação sobre a atividade de CMCase e obteve um valor máximo de 41 U/g (2.04 U/mL) ao cultivar *Aspergillus niger* empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com vapor em FES por 72 horas a 32°C. Valor aproximado de atividade de CMCase também foi obtido por *Rhizopus microsporus* SIS 04 no mesmo intervalo de tempo e temperatura aproximada.

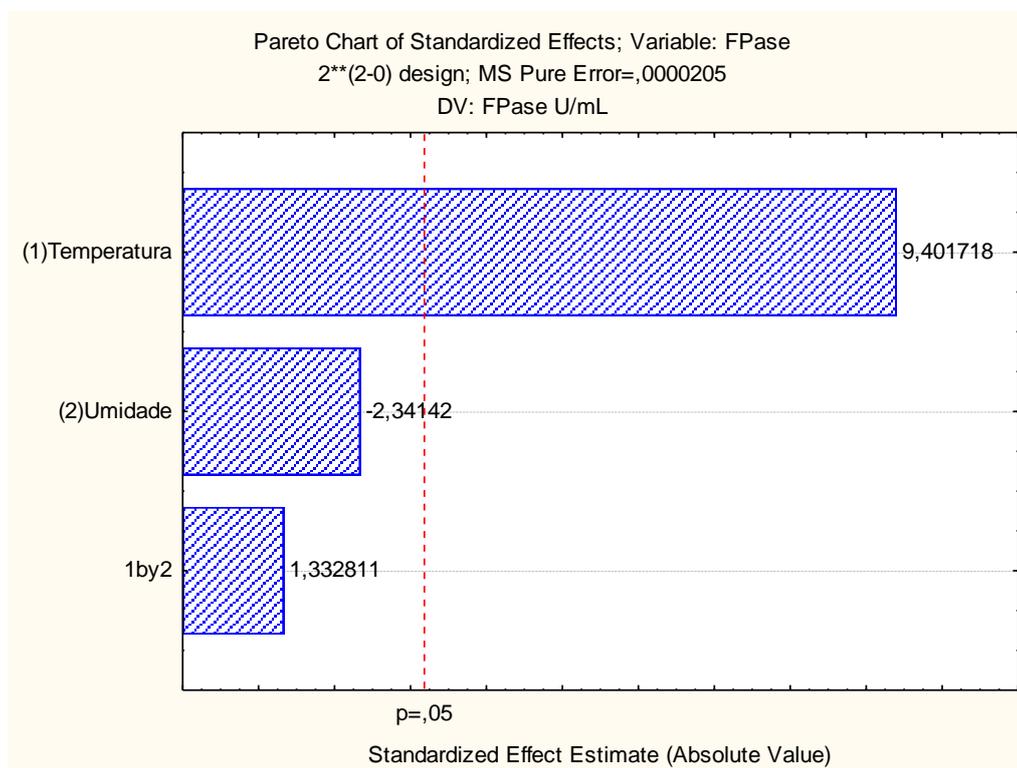
Na Tabela 6 encontram-se os resultados do planejamento fatorial 2², demonstrando o efeito da temperatura e umidade na a produção de FPase por *Rhizopus microsporus* SIS 04. O tempo de fermentação variou de 24 a 96 horas, porém foi observado que no tempo de 72 horas de fermentação se obteve os maiores rendimentos de atividade enzimática. No ensaio 3 foi obtido melhor rendimento de atividade (0,119 U/mL) em temperatura de 38°C e umidade de 50%. Pode-se observar que a variável independente temperatura também foi determinante para produção enzimática. A variável independente umidade não contribuiu significativamente para maiores atividades. A interação das duas variáveis não apresentou efeito significativo como mostra o diagrama de Pareto de efeitos padronizados com o nível de 95% de confiança (Figura 6). A atividade enzimática (0,119 U/mL) obtida nas condições de fermentação através do planejamento fatorial teve diferença estatística significativa quando comparada com a fermentação realizada para determinação da detecção de FPase (0,105 U/mL).

Tabela 6 - Atividade de FPases (U/mL) através de planejamento fatorial 2^2 em meio de farelo de palha de milho.

Ensaio	Atividade enzimática (U/mL)			
	24h	48h	72h	96h
1	0,051	0,067	0,071	0,076
2	0,046	0,053	0,061	0,060
3	0,080	0,103	0,119	0,099
4	0,076	0,108	0,114	0,101
5	0,076	0,101	0,102	0,111
6	0,075	0,087	0,093	0,098
7	0,076	0,090	0,101	0,109
8	0,071	0,099	0,112	0,100

Fonte: Própria, 2016.

Figura 6 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^2 em cultivo de 72h, tendo como variáveis independentes (1) temperatura, (2) umidade, e como variável resposta a atividade de FPase.



Fonte: Própria, 2016.

SCHEUFELE *et al.* (2012), trabalhando com bagaço de cana de açúcar tratado com hidrólise ácida e alcalina, conseguiram obter atividade enzimática de FPase para *Trichoderma* sp. isolado de bioma amazônico de 0,162 U/mL (96h/38°C). Resultado aproximado de atividade de FPase (0,119 U/mL) por *Rhizopus microsporus* SIS 04 na temperatura de 38°C em 72 horas, foi obtido neste estudo quando as condições de cultivo foram otimizadas.

As condições de FES e a escolha do micro-organismo adaptável ao processo e com potencial para produção de celulases é uma alternativa que vem sendo usada por muitos pesquisadores para potencializar a produção e aplicabilidade dessas enzimas, como por exemplo, na produção de etanol de segunda geração (SINGHANIA *et al.*, 2009).

4.3 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE REAÇÃO

Foram analisados os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade de endoglucanases (CMCase) e celulases totais (FPase) de *Rhizopus microsporus* SIS 04 nos extratos enzimáticos obtidos nas condições de fermentação determinadas através do planejamento fatorial afim de se obter os valores ótimos.

4.3.1 CMCase

Os extratos enzimáticos com atividade de CMCase apresentaram maior atividade residual no pH 6 (Gráfico 3), porém observa-se atividade residual acima de 80% nos valores de pH 4, 5, 6 e 7. MORETTI *et al* (2012) determinaram uma maior atividade de CMCase em pH 6,0 para *Thichoderma aurantiacus* e *Aspergillus fumigatus*, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A temperatura ótima para a atividade das CMCases foi 60°C em pH 6 (Gráfico 4). Resultado semelhante obteve DELABONA *et al* (2012) que determinaram a temperatura ótima de 65°C para a atividade das CMCases produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, estando o valor próximo ao observado neste trabalho. SAQIB *et al* (2010) obteve uma temperatura ótima de 64,3°C para atividade de CMCase produzida por *Aspergillus fumigatus* SMN1 por FES utilizando palha de trigo como substrato. Resultado também semelhante ao encontrado por *Rhizopus microsporus* SIS 04.

Gráfico 3 - Atividade residual de CMCase secretadas pelo fungo *Rhizopus microsporus* SIS 04 em diferentes valores de pH.

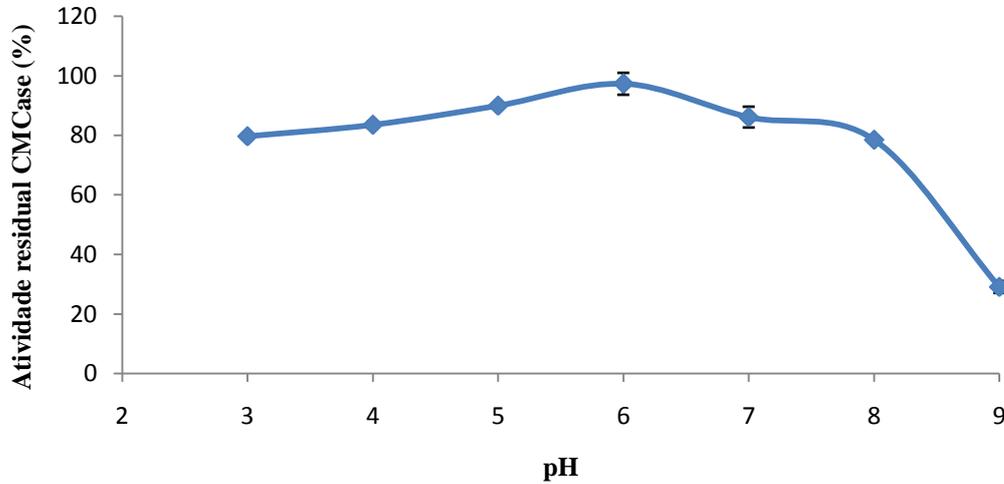
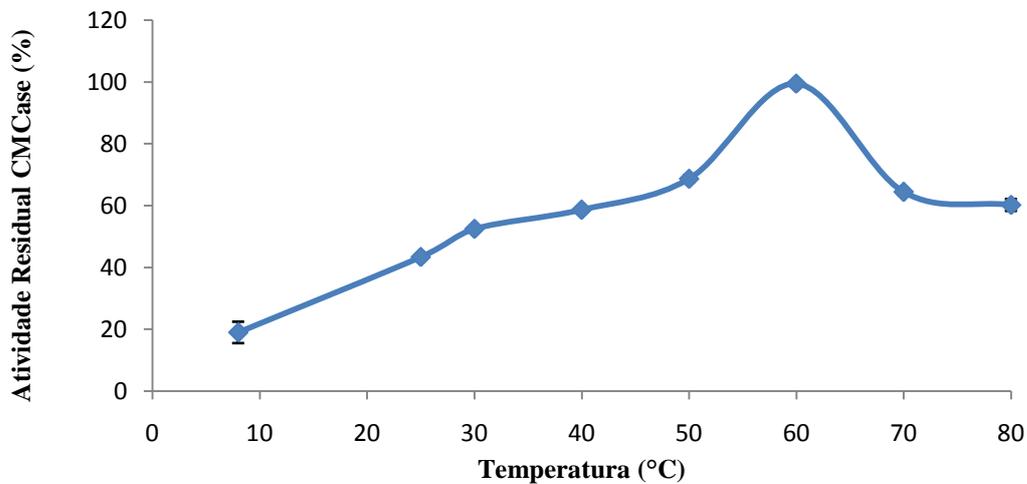


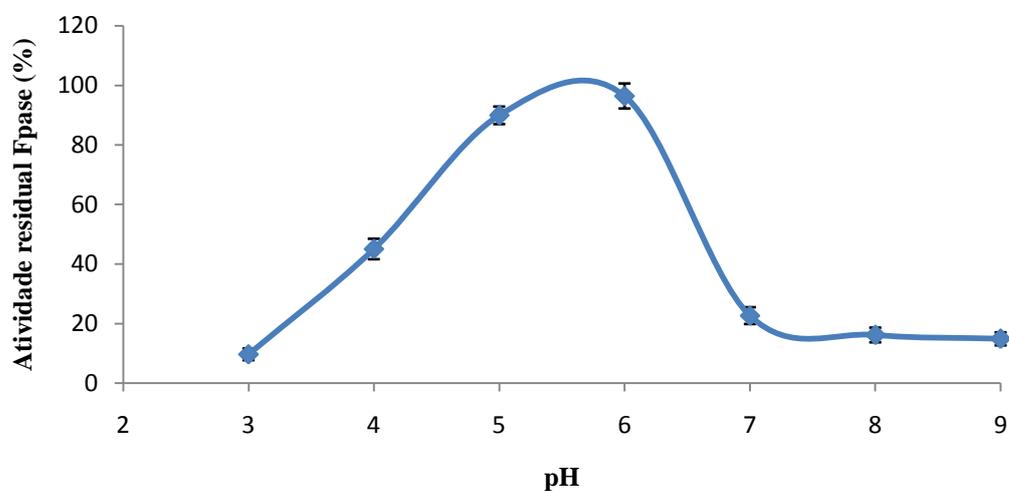
Gráfico 4 - Atividade residual de CMCase secretadas pelo fungo *Rhizopus microsporus* SIS 04 em diferentes faixas de temperatura.



4.3.2 FPase

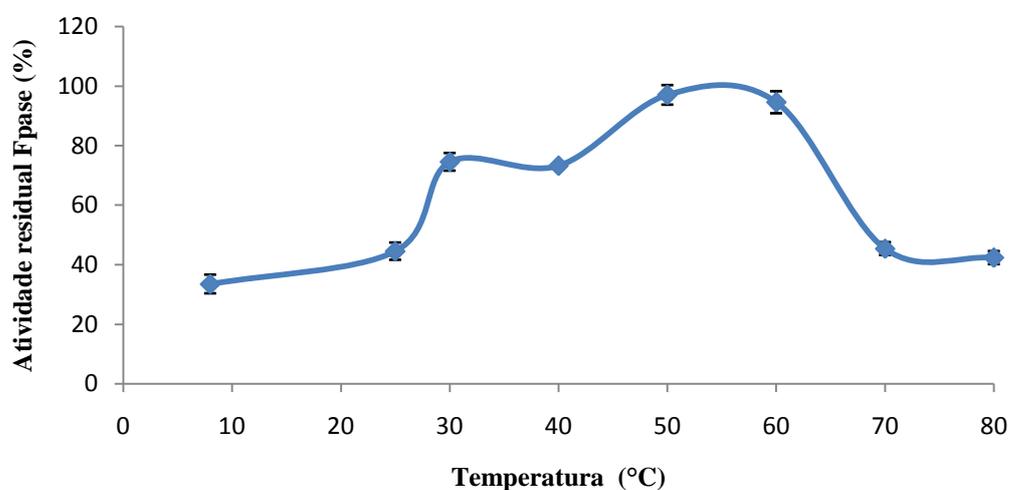
Os extratos enzimáticos com atividade de FPase apresentaram maior atividade no pH 6 (Gráfico 5), porém observa-se atividade residual acima de 80% nos pHs 5 e 6. Fato semelhante ocorreu em trabalho realizado por DHILLON *et al.* (2012), cujo pH ótimo foi 5,5, utilizando *Aspergillus niger* como produtor de FPase. O cultivo de *Rhizopus oryzae* PR7 em Fermentação líquida (72h/ 37°C) usando como substrato casca de limão resultou na produção de celulases totais com pH 5 como ótimo (MUKHERJEE, 2011).

Gráfico 5 - Atividade residual de FPases secretadas pelo fungo *Rhizopus microsporus* SIS 04 em diferentes valores de pH.



A temperatura ótima para a atividade das FPases ocorreu em 50°C (Gráfico 6), onde o extrato enzimático foi incubado em tampão com pH 6. Pode-se observar atividade residual acima de 80% em 50°C e 60°C. DELABONA *et al* (2013) estudando a atividade enzimática de FPases produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus* verificaram que a faixa de temperatura onde as enzimas apresentaram maior atividade foi entre 45 a 60°C, o que está semelhante com o observado neste trabalho.

Gráfico 6 - Atividade residual de FPases secretadas pelo fungo *Rhizopus microsporus* SIS 04 em diferentes faixas de temperatura.



Em fungos, o pH em que há maior desenvolvimento e maior atividade metabólica, consequentemente, maior produção de enzimas, está na faixa de 4 a 6 conforme TORTORA *et al.* (2005). Quanto a temperatura, POLIZELI *et al.*, 2005 citam que os micro-organismos termofílicos são de interesse biotecnológicos por possuir estabilidade térmica maior do que uma enzima produzida em temperaturas menores.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE EM DIFERENTES VALORES DE PH E TEMPERATURA

4.4.1 CMC_{Case}

No gráfico 7, observa-se que após 24 horas de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de pH sua atividade residual manteve-se acima de 80% nos pHs 3, 4, 5, 6, e 7. Nos pHs 8 e 9 houve declínio de atividade. As atividades enzimáticas foram determinadas na temperatura ótima de 60°C. LIU *et al.* (2011), também observaram uma maior estabilidade do extrato enzimático de *Aspergillus fumigatus* entre os pHs 4 e 8 durante 20 horas de incubação a 50°C.

O gráfico 8 demonstra a estabilidade do extrato enzimático nas temperaturas de 50, 60 e 70°C em pH 6 por 60 minutos. Quando o extrato enzimático foi incubado a 50°C observou-se atividade residual acima de 70% apenas no início da análise. A atividade decaiu até o final do ensaio, tendo seu mínimo de atividade residual de 40,82% no tempo de 60 minutos. Quando o extrato enzimático foi incubado a 60°C observou-se uma redução de sua atividade residual para abaixo de 90% logo após os primeiros 10 minutos de ensaio e a atividade manteve-se decrescente até o final da análise, com atividade residual mínima de 62,02%. A 70°C observou-se uma diminuição gradual da atividade residual desde os primeiros minutos de análise de 54,96% para 38,05% no final do ensaio. FALKOSKI *et al.* (2013) quando incubaram o extrato enzimático de *Chrysosporthe cubensis* a 60°C por 48 horas, relataram perda total da atividade de CMC_{Case}, diferentemente do verificado por *Rhizopus microsporus* SIS 04 nesse trabalho que manteve 62,02% de sua atividade residual a 60°C após 60 minutos de incubação.

Gráfico 7 - Estabilidade das enzimas com atividade de CMCase em pH 3 a 9 por 24h.

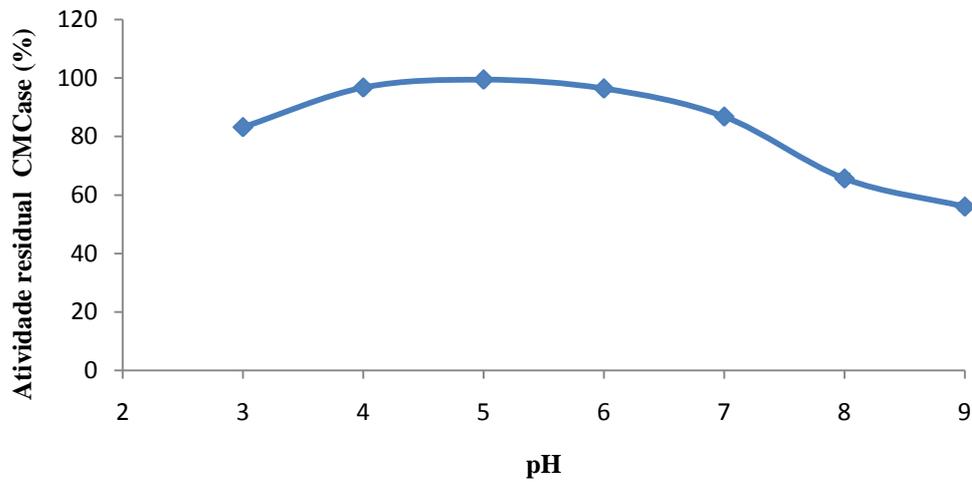
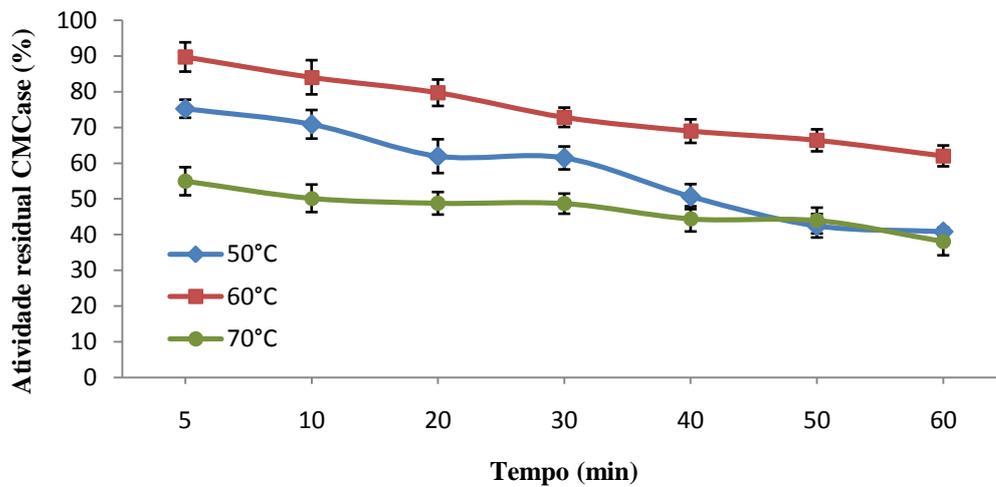


Gráfico 8 - Estabilidade das enzimas com atividade de CMCase em temperaturas de 50, 60 e 70°C até 60 minutos.



4.4.2 FPase

No gráfico 9, observa-se que após 24 horas de incubação da enzima nos diferentes valores de pH, o extrato enzimático manteve sua atividade acima de 80% nos pHs 5 e 6. Nos pHs 3, 4, 7, 8 e 9 houve atividade abaixo de 60%. As atividades enzimáticas foram determinadas na temperatura ótima de 50°C. Nos experimentos de SIQUEIRA (2010), a atividade de FPase apresentou melhor resultado em pH 5,0 no cultivo de *A. oryzae* crescido em engaço de bananeira, porém, a amplitude de faixa de pH para essas enzimas foi estendida entre 3,5 e 8,0, chegando a mais de 70% da atividade máxima observada. Os estudos de

DUTTA *et al.* (2008) mostraram máxima atividade FPase em pH 6,5 para o *Penicillium citrinum*, próxima ao valor encontrado para melhor estabilidade de pH neste trabalho.

O gráfico 10 demonstra a estabilidade do extrato enzimático nas temperaturas de 50, 60 e 70°C em pH 5 por 60 minutos. Quando o extrato enzimático foi incubado a 50°C observou-se atividade residual acima de 70% durante todo o tempo de análise. A atividade manteve-se praticamente estável nessa faixa até o final do ensaio, tendo seu máximo de atividade residual de 82,44% em 30 minutos do ensaio. Quando o extrato enzimático foi incubado a 60°C observou-se uma redução de sua atividade residual para abaixo de 70% logo após os primeiros 5 minutos de ensaio e a atividade manteve-se decrescente até o final do ensaio, com atividade residual mínima de 58,01%. Em 70°C observou-se uma diminuição da atividade residual nos primeiros minutos de análise de 55,15% para 40,05% no final do ensaio. A FPase de uma linhagem de *Aspergillus* manteve aproximadamente 76% da sua atividade após ser pré-incubada por 5 horas a 50 °C. Entretanto, após este tempo, a atividade foi caindo gradativamente até 8 horas de incubação, quando ela perdeu totalmente sua atividade (RODRIGUES, 2009). Em outros trabalhos, a FPase produzida por *Acremonium* sp. EA0810, cultivado com bagaço de cana, perdeu 70% da sua atividade quando pré-incubada por 30 minutos a 55 °C (ALMEIDA, 2009). DUTTA *et al.* (2008) reportaram a perda de 70% da atividade inicial de uma FPase de *Penicillium citrinum* após ser pré-incubada por 30 minutos a 55 °C. Nesse trabalho, os extratos obtidos da FES do farelo de palha de milho mostraram melhor termoestabilidade em 50°C.

Gráfico 9 - Estabilidade das enzimas com atividade de FPase em pH 3 a 9 por 24h.

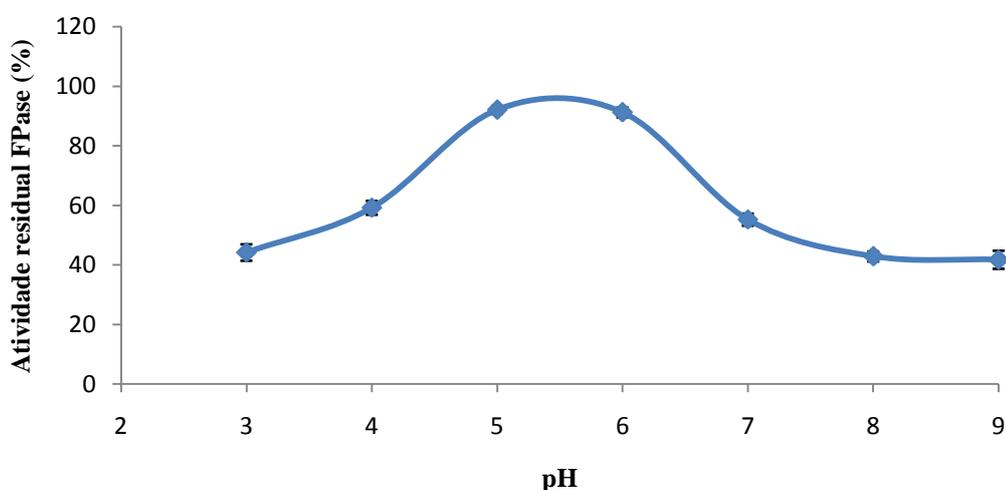
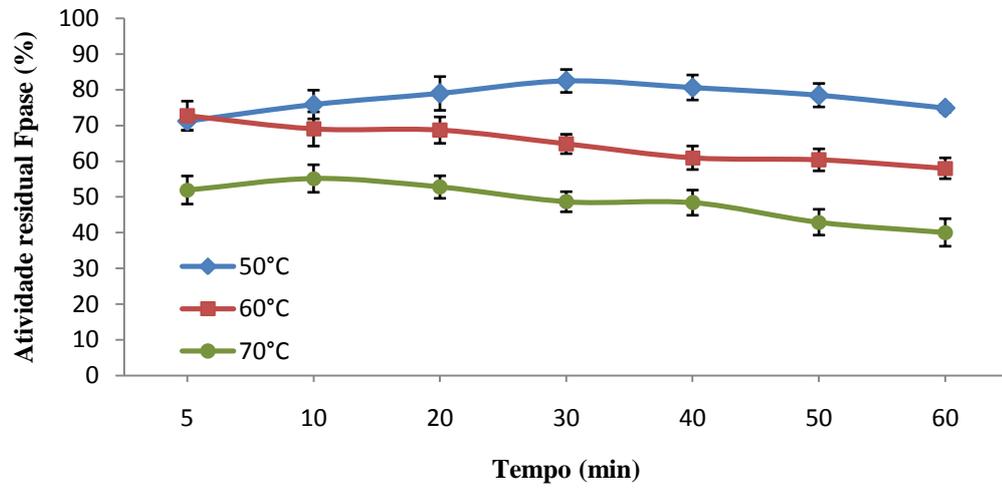


Gráfico 10 - Estabilidade das enzimas com atividade de FPase em temperaturas de 50, 60 e 70°C até 60 minutos.



5. CONCLUSÕES

Todas as amostras testadas foram capazes de produzir celulases em farelo de palha de milho como substrato em fermentação sólida;

Foi possível detectar a atividade de celulases sem a necessidade de qualquer outro indutor ou suprimento além da celulose contida no farelo da palha de milho;

A amostra SIS 04, *Rhizopus microsporus*, foi selecionado como melhor produtor potencial para as celulases testadas;

O uso de um planejamento fatorial 2^2 aplicado a delineamento experimental do tipo fatorial completo demonstrou ser uma ferramenta importante para previsão preliminar de um modelo estatístico, onde foi estabelecido os valores adequados de temperatura e umidade para melhor produção de celulases por *Rhizopus microsporus* SIS 04, apresentando influência dos parâmetros independentes do processo;

A temperatura foi à variável mais importante na produção das celulases;

Os extratos enzimáticos com atividade de CMCase apresentaram pH ótimo de 6 e temperatura ótima de 60°C e mantiveram-se estáveis entre os valores de pH de 3 a 7 na mesma temperatura;

Os extratos enzimáticos com atividade de FPases apresentaram pH ótimo de 6; temperatura ótima de 50°C e mantiveram-se estáveis entre os valores de pH de 5 a 6 na mesma temperatura.

REFERÊNCIAS

- ABU, E. A. et al. Cellulase (EC 3.2. 1.3) production from sorghum bran by *Aspergillus niger* SL1: An assessment of pretreatment methods. In: **Proceedings of the international conference on biotechnology: commercialization and food security**. Abuja, Nigeria. p. 153-157, 2000.
- ALMEIDA, M. N. Caracterização de celulases e hemicelulases dos fungos *Acremonium zeae* e *Acremonium* sp. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ANDREAUS, J. et al. Enzyme technology in Brazil—A need and a challenge. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 1-1, 2014.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J.P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2, p. 642-647, 2009.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. Fungi and biotechnology. **The Fungi**, p. 253-264, 1996.
- CASTRO, A M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CASTRO, A. M. D. et al. Multiresponse Optimization of Inoculum Conditions for the Production of Amylases and Proteases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.
- CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Saccharum spp.). 2006. 212 f.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

- CASTRO, A.M.D. et al. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 151-158, 2010.
- CHANDRA, M. et al. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy**. v.34, n.5, p.805-811, 2010.
- CHU, F.J. et al. Hydrolysis of bamboo cellulose and cellulase characteristics by *Streptomyces griseoaurantiacus* ZQBC691. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, n. 2, p. 220-225, 2012.
- COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006. 206f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, MG.
- COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8308-8314, 2010.
- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews: molecular cell biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.
- COSTA, P. A. et al. Changes in soil pore network in response to twenty-three years of irrigation in a tropical semiarid pasture from northeast Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 137, p. 23–32, 2014.
- CUNHA, F. M. et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.
- DELABONA, P.S. et al. Effect initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.
- DELABONA, P.S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.
- DHILLON, G.S. et al. Potencial of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulose and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6-13, 2012.
- DIENES, D.; EGYHAZI, A.; RECZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p. 11-21, 2004.
- DUTTA, T. et al. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 275-282, 2008.

FALKOSKI, D.L. et al. *Crysoporthe cubensis*: a new source of celluloses and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource technology**, vol.130, p. 296-305, 2013.

FANG, H. et al. Otimização de enzimática hidrólise de steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulose from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource technology**, v. 101, n. 11, p. 4111-4119, 2010.

FAOSTAT (2010). Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em: ago de 2014.

FARINAS, C. S. et al. Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. Editora Blucher, São Paulo, 2010.

GARVEY, M. et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 10, p. 581-593, 2013.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOLDBECK, R. et al. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource technology**, v. 128, p. 797-803, 2013.

GOMATHI, D. et al. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S67-S73, 2012.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

HECK, J.X. et al. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2002.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HOFFMANN, K. et al. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, n. 1, p. 57-76, 2013.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOWARD, R.L. et al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2004.

- IANDOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 40–51, 2011.
- KHAN, M.H. et al. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 42, n. 4, p. 381-386, 2007.
- KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.
- LATIFIAN, M.; ESFAHANI, Z.H.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture condition for cellulose production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3634-3637, 2007.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n. 2, p. 167-198, 2003.
- LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.
- LIMA, M. A. et al. *Aspergillus niger* β -glucosidase has a cellulase-like tadpole molecular shape: insights into glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase structure and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 32991–3005, 2013.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.
- LIU, D. et al. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial Cell Factories**, **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 11-25, 2012.
- LIU, D. et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717-725, 2011.
- LIU, G. et al. An endo-1, 4- β -glucanase PdCel5C from cellulolytic fungus *Penicillium decumbens* with distinctive domain composition and hydrolysis product profile. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 3, p. 190-195, 2013.
- LODISH, Harvey. **Molecular cell biology**. Macmillan, 2008.
- LYNCH, J. M. et al. Cellulase activities of some aerobic micro-organisms isolated from soil. **Microbiology**, v. 127, n. 2, p. 231-236, 1981.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulose. utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and bioengineering**. v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MACIEL, G.M. (2006). Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Xilanases por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Bagaço de Cana de Açúcar e Farelo De Soja. 2006. 133f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MAEDA, R. N. et al. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013.

MASSADEH, M.I. et al. Synergism of cellulose enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 21, p. 1771-1774, 2001.

MAURYA, D. P. et al. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 5-8, 2012.

MCDONALD, J. E.; ROOKS, D. J.; MCCARTHY, A. J. Methods for the isolation of cellulose-degrading microorganisms. **Methods Enzymol**, v. 510, p. 349-374, 2012.

MICHELIN, M. Estudo da glucoamilase e da alfa-amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas. 2005 160f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONCIARDINI, P. et al. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORETTI, M. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of Cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Production of extra cellular exoglucanase by *Rhizopus oryzae* from submerged fermentation of agro wastes. **Recent Research in Science and Technology**, v.3, n.3, p. 69-75, 2011.

MURUGAN, S. et al. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. **Enzyme research**, London, v. 2011, p. 1-7, 2011.

NAIR, S.G.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal Microbiology research**, v. 2, n. 4, p. 82-86, 2008.

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

NEVES, M.L.C. et al. Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 318, p. 34-39, 2012.

NUNES, R. M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 135-150, 2014.

OJUMU, T. V. et al. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 150-152, 2003.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

OSBURNE, M. S. et al. Tapping into Microbial Diversity for Natural Products Drug Discovery Some microbiologists are probing the rich diversity of their backyards instead of going far afield to find useful natural products. **ASM News-American Society for Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 411-417, 2002.

PACHECO, C. S. V. et al. (2014). Aproveitamento da Semente da Jaca para a Obtenção de Endoglucanase a partir de *Aspergillus niger* por Fermentação em Estado Sólido. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde= Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 1, 2015.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

PEREIRA, D. E. P. Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do bioma cerrado, 2013.

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico**, 2005.

POLIZELI, M.L. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. **Ecologia e conservação da Caatinga**, v. 2, p. 3-74, 2003.

PRWEB (2014) – Disponível em: <<http://www.prweb.com/pdfdownload/12061920.pdf>>. Acesso em: mar de 2015.

QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro**. Ministério da ciência e Tecnologia. Brasília, Brasil, 2005.

RAHARDJO, H. et al. Response of a residual soil slope to rainfall. **Canadian Geotechnical Journal**, v. 42, n.2, p.340-351, 2005.

REINEHRA, C. O. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

ROCHA, C.P. Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. 2010, 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia.

RODRIGUES, R. S. Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol. 2009. 95f. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais – Brasil.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. Tese (Doutorado), 2010, 228f. Universidade de São Paulo, São Carlos.

RUEGGER, M.J.; TAU-K-TORNISIELO S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia - Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica** v. 27, n.2, p. 205-11, 2004.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANDGREN, M; STÅHLBERG, J; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SANTIAGO, A.L.C.M.A. SOUZA-MOTTA, C.M. Isolation of Mucorales from processed maize (*Zea mays* L.) and screening for protease activity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, n.4, p 698-700, 2008.

SANTIAGO, A.L.C.M.A., SANTOS, P.J.P., MAIA, L.C. Mucorales from semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**.v.44, n.1, p 299-305, 2013.

SANTIAGO, A.L.C.M.A.; SOUZA-MOTTA, C.M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Botanica Brasilica** v. 20, n. 3, p.641-647, 2006.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SAQIB, A. AN et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SCHEUFELE, F. B. et al. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 310-321, 2012.

SENA, A.R. et al. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, 2006.

SHEN, T.; GNANAKARAN, S. The Stability of Cellulose: A Statistical Perspective from a Coarse-grained Model of Hydrogen-Bond Networks. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 8, p. 3032-3040, 2009.

SINGH, B. et al. Controlled release of the fungicide thiram from starch–alginate–clay based formulation. **Applied Clay Science**, v. 45, n. 1, p. 76-82, 2009.

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

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SIQUEIRA, F. G. Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. 2011, 277f. Tese de doutorado. Brasília-DF.

SMRITHI, S. et al. Bioprospecting of Microbes Producing Commercially Useful Products. **PHARMANEST-An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 1419-1426, 2013.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SUDENE. (1997). Caracterização do semi-árido brasileiro. Disponível em: <<http://www.asabrazil.org.br>>. Acesso em: fev de 2015.

SZENGYEL, Z. Ethanol from Wood - Cellulase enzyme production (PhD thesis). Lund University. **Chemical Engineering**, v. 1, 2000.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. D. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. **Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: Universidade Federal de Pernambuco**, p. 777-796, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. **Fisiologia Vegetal. 3ª ed.** Porto Alegre, RS. Editora Artimed, p. 309-332, 2004.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Porto Alegre, Artmed Editora, 2009.

TRUFEM, S. F. B. **Taxonomia de Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, p. 18-49, 1998.

VÁSQUEZ, M.P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 12, n.1, p. 137-140, 2007.

WANG, B.; XIA, L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4568-4572, 2011.
WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. **Lignin biosynthesis**. **The Plant Cell**, v. 7, p.1001-1013, 1995.

YEOMAN, C.J. et al. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. **Advances in applied microbiology**, cap. 1, v. 70, p. 1-55, 2010.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **biomass and bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

ZHANG, X. et al. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences**, v. 33, n. 1, p. 153-158, 2013.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.