

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

FLÁVIA REGINA DA SILVA SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CELULASES E HEMICELULASES POR
LINHAGENS FÚNGICAS MESÓFILAS ISOLADAS
DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

MARÇO/2014

FLÁVIA REGINA DA SILVA SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CELULASES E HEMICELULASES POR
LINHAGENS FÚNGICAS MESÓFILAS ISOLADAS
DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO SIMÕES
RIBEIRO LEITE**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Tecnologia Ambiental.

DOURADOS/MS

MARÇO/2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

S237p Santos, Flávia Regina da Silva.
Produção e caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense / Flávia Regina da Silva Santos – Dourados-MS : UFGD, 2014.
68 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Enzimas – Produção. 2. Resíduos agroindustriais.
3. Fungos. I. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Título.

CDD: 572.7



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Produção e caracterização de celulasas e hemicelulasas por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense”**, de autoria de **Flávia Regina da Silva Santos**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
(Orientador - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Margareth Batistote

Profa. Dra. Margareth Batistote
Membro Examinador (UEMS)

Kelly Oliveira

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 18 de março de 2014.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso”. (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e saúde;

Aos meus pais, pelo apoio e por terem me dado todas as condições para trilhar esse caminho, e sempre acreditarem em meu potencial;

Ao prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela valiosa orientação, dedicação e conhecimentos transmitidos.

À Universidade Federal da Grande Dourados por ter me possibilitado realizar o curso e este trabalho;

Aos professores que participaram da banca de qualificação e defesa, Kelly Mari, Marcelo Paz, Margareth Batistote, obrigada pelas contribuições;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFGD, que passaram de maneira dedicada seus conhecimentos.

À todos os colegas que passaram ou estão trabalhando no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, obrigada pelo dia-a-dia no laboratório, companheirismo e pelos bons momentos que passamos juntos;

A técnica de laboratório Fabi, pela atenção e disposição a atender nossas necessidades;

Ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da UNESP/Rio Claro pela identificação taxonômica dos fungos filamentosos utilizados no trabalho;

A todas as demais pessoas que contribuíram, direta e indiretamente na realização deste trabalho.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro
nm: Nanômetro
Mmol: Micromol
CMC: Carboximetilcelulose
DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico
g: Grama
HCl: Ácido Clorídrico
min: Minuto(s)
mL: Mililitro
mM: Milimolar
NaOH: Hidróxido de Sódio
pH: Potencial Hidrogeniônico
pNPG: p-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo
pNPX: p-nitrofenil-β-D xilopiranosídeo
RPM: Rotação por minuto
U: Unidade para quantificação de atividade enzimática

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1	Produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. em diferentes substratos por Cultivo em Estado Sólido em 60% de umidade, temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo	27
-----------------	--	----

CAPITULO III

Tabela 1	Produção de β -glicosidase pelo fungo <i>Gongronella</i> sp. em diferentes substratos por Cultivo em Estado Sólido, em 60% de umidade, 28°C por 96 horas de cultivo	52
Tabela 2	Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNP β G) e inibidor	61
Tabela 3	Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por <i>Gongronella</i> sp.	62

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Representação da fibra de celulose e seus componentes, celulose, microfibrilas, hemicelulose e lignina (Adaptado por GRAMINHA et al., 2007)	2
Figura 2	Polímero de celulose (SANDGREN et al., 2005)	3
Figura 3	Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas (SUN; CHENG, 2002)	3
Figura 4	Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose (SJÖSTRÖM, 1992)	4
Figura 5	Representação da lignina (Adaptado de GRAMINHA et al., 2007).....	5
Figura 6	Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011)	7
Figura 7	Estrutura de uma molécula de xilana. Em (a) os sítios de ação das diversas enzimas hidrolíticas. Em (b) a hidrólise de xilooligossacarídeos por uma β -xilosidase (COLLINS et al., 2005)	10

CAPITULO II

Figura 1	Produção de xilanase, CMCCase e β -glicosidase pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. em função da temperatura em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido, em 60% de umidade por 96 horas de cultivo	29
Figura 2	Produção de xilanase, CMCCase e β -glicosidase pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. em função da umidade inicial do meio em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido por 96 horas de cultivo, nas temperaturas (A) 25°C (B) 35°C (C) 30°C	30
Figura 3	Produção de xilanase, CMCCase e β -glicosidase pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. em função do tempo de cultivo em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido (A) 25°C em 60% de umidade (B) 35°C em 55% de umidade (C) 30°C em 55% de umidade	32

Figura 4	(A) Atividade de xilanase em função da variação do pH. (B) Atividade de xilanase em função da variação da temperatura.....	34
Figura 5	(A) Atividade de CMCase em função da variação do pH. (B) Atividade de CMCase em função da variação da temperatura ...	35
Figura 6	(A) Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH. (B) Atividade de β -glicosidase em função da variação da temperatura	36
Figura 7	(A) Estabilidade enzimática de xilanase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de xilanase em função da temperatura após 1 hora de incubação	37
Figura 8	(A) Estabilidade enzimática de CMCase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de CMCase em função da temperatura após 1 hora de incubação	37
Figura 9	(A) Estabilidade enzimática de β -glicosidase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de β -glicosidase em função da temperatura após 1 hora de incubação	38
 CAPITULO III 		
Figura 1	Produção de β -glicosidase pelo fungo <i>Gongronella</i> sp. em função da temperatura por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, com 60% de umidade por 96 horas	53
Figura 2	Produção de β -glicosidase pelo fungo <i>Gongronella</i> sp. em função da umidade inicial do meio por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, por 96 horas, em 28°.....	55
Figura 3	Produção de β -glicosidase pelo fungo <i>Gongronella</i> sp. em função do tempo por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, com 55% de umidade, em 30°C	56
Figura 4	(A) Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH. (B) Atividade de β -glicosidase em função da variação da temperatura	57
Figura 5	(A) Estabilidade enzimática de β -glicosidase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de β -glicosidase em função da temperatura após 1 hora de incubação	58

Figura 6	Efeito da concentração de etanol sobre a atividade de β -glicosidase	59
Figura 7	Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da β -glicosidase	60

RESUMO

A tecnologia enzimática é utilizada por proporcionar vantagens no estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo. Enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são empregadas em diversos processos industriais, tais como, na indústria de alimentos e bebidas, aditivos para ração animal, indústria têxtil, farmacêutica, biotecnológica, papel e celulose e produção de bioetanol. Essas enzimas podem ser obtidas através do Cultivo em Estado Sólido (CES) tornando-se uma alternativa atraente tanto pelo ponto de vista ambiental como industrial, pois os resíduos gerados pela agricultura podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo. O trabalho teve por objetivo avaliar a produção e caracterização dessas enzimas por fungos filamentosos mesófilos isolados do solo do Cerrado sul-mato-grossense utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos em CES. Os resultados obtidos indicam que o farelo de trigo é o melhor substrato na produção de xilanase, CMCCase e β -glicosidade. Para o microrganismo *Penicillium* sp. o cultivo contendo 60% de umidade inicial em 25°C após 72 horas se mostrou mais expressivo para xilanase, atingindo cerca de 1.094,8 U/g (109,48 U/mL). Para CMCCase e β -glicosidase a umidade inicial do meio foi mais significativa em 55% na temperatura de 30°C e 35 °C, respectivamente, atingindo cerca de 213,4 U/g (21,34 U/mL) de CMCCase entre 96 e 120 horas e 69,4 U/g (6,94 U/mL) de β -glicosidase após 144 horas de cultivo. Foi estudado a β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Gongronella* sp., o cultivo contendo 55% de umidade inicial na temperatura de 30°C após 96 horas de inoculação foi mais significativo para produção da enzima, apresentando cerca de 215,4 U/g (21,5 U/mL). As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade quanto ao pH e à temperatura. A β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Gongronella* sp. foi inibida significativamente em concentrações superiores a 10mM de glicose e 25% de etanol. Os resultados permitem concluir que os microrganismos isolados apresentam grande interesse biotecnológico, por apresentar potencial para a produção de enzimas de celulolíticas e hemicelulolíticas, meio de baixo valor agregado e características importantes para hidrólise da biomassa vegetal visando produção de bioetanol.

Palavras-chave: Cultivo em Estado Sólido, enzimas microbianas, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Enzyme technology is used to provide benefits in establishing a technologically clean process. Cellulolytic enzymes and cellulolytic and hemicellulolytic are employed in many industrial processes, such as in the food and beverage industry, additives for animal feed, textile, pharmaceutical, biotech, pulp and paper and bioethanol production. These enzymes can be obtained through the Cultivation Solid State (CSS) making it an attractive alternative to both the environmental point of view as industrial because the waste generated by agriculture can be used as raw materials at low cost. The study aimed to evaluate the production and characterization of these enzymes by filamentous fungi isolated from soil mesophilic Cerrado sul-mato-grossense using different agro-industrial residues as substrates at CSS. The results indicate that wheat bran is the best substrate for the production of xylanase, CMCase and β -glucosidase. For *Penicillium* sp. the medium containing 60% of water content at 25°C after 72 hours was more expressive for xylanase, reaching about 1.094.8 U/g (109.48 U/mL). For CMCase and β -glucosidase initial moisture content of the media was more significant at 55% at 30°C and 35°C, respectively, representing approximately 213.4 U/g (21,34 U/mL) of CMCase between 96 and 120 hours and 69.4 U/g (6.94 U/mL) of β -glucosidase after 144 hours of cultivation. The β -glucosidase produced by the microorganism *Gongronella* sp. was studied, the medium containing 55% of water content at 30°C after 96 hours of inoculation was significant for enzyme production, presenting approximately 215.4 U/g (21,5 U/mL). The enzymes were characterized with respect to pH optimum, temperature optimum and stability of pH and temperature. The β -glucosidase produced by the microorganism *Gongronella* sp. was significantly inhibited at concentrations above 10mM glucose and 25% ethanol. The results indicate that the isolated microorganisms have great biotechnological interest because it presents potential for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, through low added value and important characteristics for hydrolysis of plant biomass to bioethanol production.

Keywords: Growing Solid State, microbial enzymes, organic residues.

SUMÁRIO

CAPITULO I: REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL...	1
1.1.1. CELULOSE	2
1.1.2. HEMICELULOSE	4
1.1.3. LIGNINA.....	5
1.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS	6
1.2.1. Endoglucanase	7
1.2.2. Exoglucanase	8
1.2.3. β -glicosidase	8
1.3. ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS	9
1.4. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES) EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	10
1.5. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES E XILANASES	12
2. REFERÊNCIAS	14
CAPITULO II: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES PELO <i>Penicillium</i> sp. ISOLADO DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE	19
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. METODOLOGIA	23
2.1. Microrganismo utilizado	23
2.2. Otimização da produção de celulases e hemicelulases por Cultivo em Estado Sólido (CES)	23
2.2.1. Inóculo	23
2.2.2. Seleção do substrato para produção de celulases e hemicelulases	24
2.2.3. Temperatura ótima para a produção das enzimas	24
2.2.4. Variação da umidade inicial do meio de cultivo	24
2.2.5. Variação do tempo de cultivo	25
2.3. Extração enzimática	25
2.4. Determinação da atividade de Xilanase	25
2.5. Determinação da atividade de CMCCase	26
2.6. Determinação da atividade de β -glicosidase	26
2.7. Caracterização físico-química das enzimas	26
2.7.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
3.1. Otimização da produção de celulases e hemicelulases por Cultivo em Estado Sólido (CES)	27
3.1.1. Seleção dos substratos para produção de celulases e hemicelulases	27
3.1.2. Temperatura ótima para a produção das enzimas	28
3.1.3. Variação da umidade do meio de cultivo	30
3.1.4. Variação do tempo de cultivo	31
3.2. Caracterização físico-química das enzimas produzidas pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.	34
3.2.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividades das enzimas	34

3.2.2. Efeito da estabilidade ao pH e a temperatura	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
5. REFERENCIAS	39
CAPITULO III: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β-GLICOSIDASE OBTIDA PELO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO <i>Gongronella</i> sp. ISOLADO DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE	45
RESUMO	45
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. METODOLOGIA	49
2.1. Microrganismo utilizado	49
2.2. Otimização da produção de β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES)	49
2.2.1. Inóculo	49
2.2.2. Seleção do substrato para produção de β -glicosidase	49
2.2.3. Temperatura ótima para a produção da enzima	50
2.2.4. Variação da umidade inicial do meio de cultivo	50
2.2.5. Variação do tempo de cultivo	50
2.3. Extração enzimática	50
2.4. Determinação da atividade de β -glicosidase	51
2.5. Caracterização físico-química da β -glicosidase	51
2.5.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima	51
2.5.2. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade da enzima	51
2.5.3. Avaliação do potencial catalítico do extrato enzimático	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
3.1. Otimização da produção de β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES)	52
3.1. Seleção do substrato para produção de β -glicosidase	52
3.2. Temperatura ótima para a produção da enzima	53
3.3. Variação da umidade inicial do meio de cultivo	54
3.4. Variação do tempo de cultivo	55
3.2. Caracterização físico-química da β -glicosidase produzida pelo fungo <i>Gongronella</i> sp.	57
3.2.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática	57
3.2.2. Efeito do etanol sobre a atividade da enzima	59
3.2.3. Efeito da glicose sobre a atividade da enzima	60
3.2.5. Avaliação do potencial catalítico do extrato enzimático	62
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
5. REFERENCIAS	64

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A biomassa vegetal representa a fonte renovável mais abundantemente encontrada na natureza, abrangendo predominantemente, os materiais agroindustriais, os resíduos urbanos e as madeiras de angiospermas e gimnospermas. Os materiais lignocelulósicos são formados basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes. Essas frações dominantes são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais. O tamanho e a forma da parede celular, assim como a composição química dos materiais lignocelulósicos varia de espécie para espécie. De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

A célula vegetal apresenta uma fina, porém resistente parede celular. As paredes da célula vegetal são subdivididas em parede primária e parede secundária. A distribuição de celulose, de hemicelulose e de lignina varia consideravelmente entre estas camadas. Essa parede celular vegetal é formada por diversos polissacarídeos e outros compostos secretados pela célula, sendo formados e unidos através de ligações covalentes e não covalentes (TAIZ; ZIEGER, 2004).

É possível distinguir dois tipos de parede celular vegetal, a parede celular primária e a secundária. A parede primária é depositada durante o crescimento celular, ela deve ser mecanicamente estável e satisfatoriamente flexível para permitir a expansão das células e não ocorrer ruptura, consiste principalmente de polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectinas. Após cessar o crescimento celular, inicia-se o processo de diferenciação celular, com início da formação da parede secundária, que confere estabilidade mecânica a planta, apresentando compostos de celulose, hemicelulose e lignina. A transição da parede celular primária para a formação da parede celular secundária é caracterizada pela diminuição da síntese de pectina e um grande aumento na síntese de celulose, hemicelulose e lignina (TAIZ; ZIEGER, 2004; RAVEN et al., 2001).

Os fungos e bactérias presentes no solo desempenham um papel fundamental na reciclagem de carbono de volta para o ecossistema (ARO et al., 2005). A complexidade

dos componentes da parede celular vegetal a torna resistente ao ataque químico e bioquímico, dificultando o acesso das várias enzimas envolvidas em sua degradação, por isso o entendimento da sua estrutura e como agem essas enzimas é fundamental para a viabilização do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável (FARINAS, 2011).

1.1.1. CELULOSE

Dentre os materiais naturais, a celulose é o polissacarídeo lignocelulósico mais abundante na biosfera e o principal constituinte das biomassas (SÁNCHEZ, 2009), sua estrutura está ligada à hemicelulose e à lignina (RAMOS, 2003), ilustrado na figura 1.

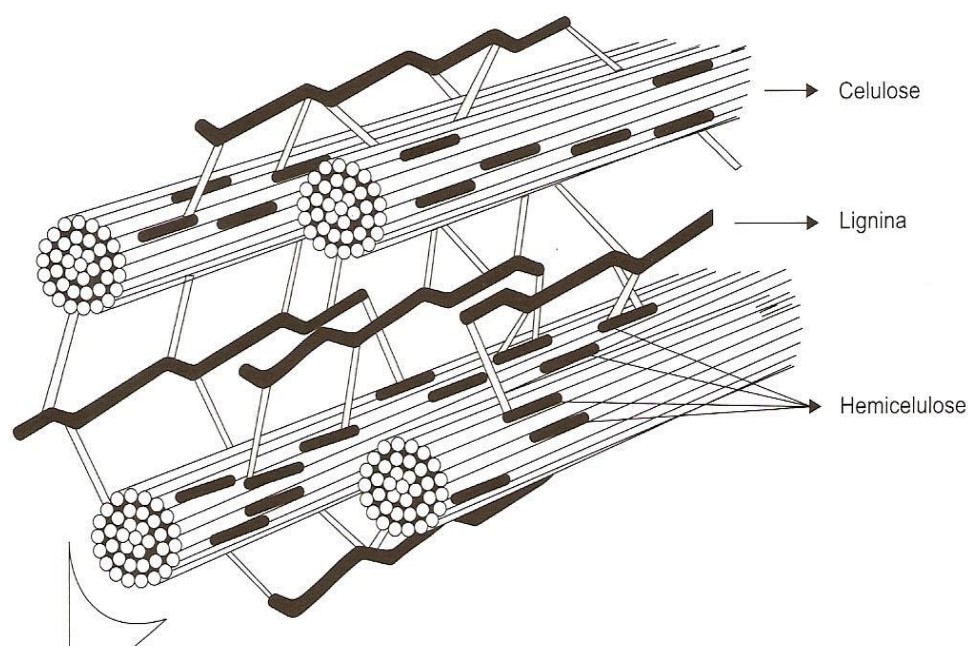


Figura 1 - Representação da fibra de celulose e seus componentes, celulose, microfibrilas, hemicelulose e lignina (Adaptado por GRAMINHA et al., 2007).

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Duas unidades de glicose adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água. A celobiose é a unidade básica de repetição da cadeia de celulose (Figura 2) (FARINAS, 2011).

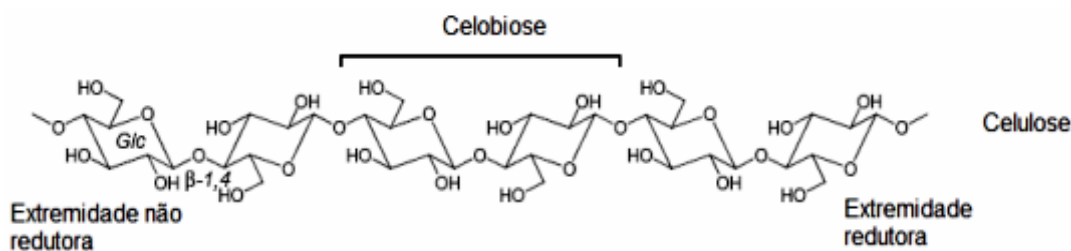


Figura 2 - Polímero de celulose (SANDGREN et al., 2005)

Através de interações não covalentes, acontece uma agregação das cadeias lineares, formando estruturas cristalinas, chamadas microfibrilas. As microfibrilas apresentam região cristalina, onde as fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade e região amorfa, onde as fibras estão mais distantes entre si, apresentando-se menos compactas, como visto na figura 3 (LYND et al., 2002; ARANTES; SADDLER, 2010).

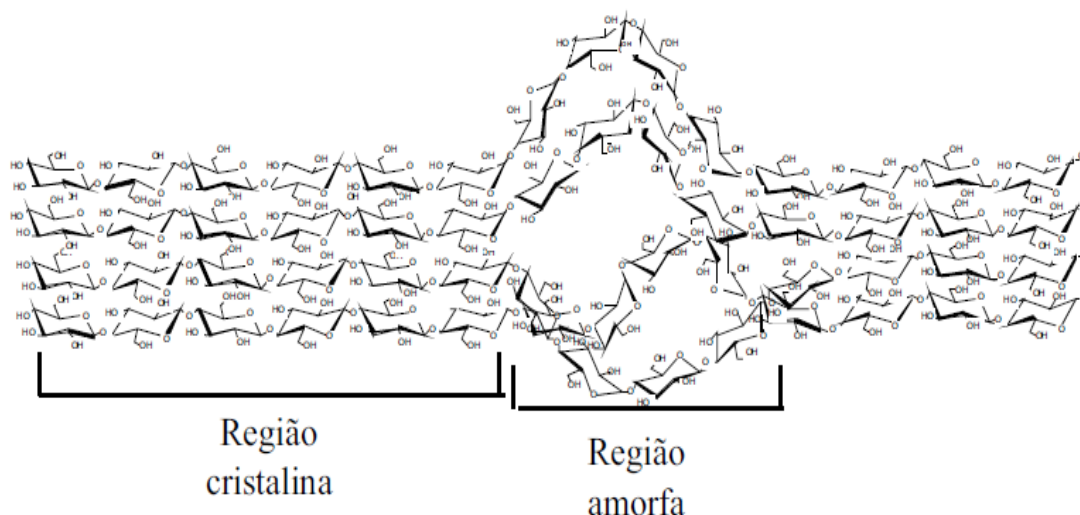


Figura 3 - Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas (SUN; CHENG, 2002).

Na estrutura cristalina, os átomos são altamente ordenados e o empacotamento das cadeias impede a penetração de água e enzimas no interior da microfibrila. A celulose cristalina confere rigidez à parede celular vegetal, dificultando sua degradação por microrganismos. Nas regiões não cristalinas (amorfas) a água e enzimas têm maior acesso, sendo mais facilmente hidrolisada que a forma cristalina, e primeiramente atacada e degradada. Além de regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam

irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas, como a água e enzimas (LYND et al., 2002; ARANTES; SADDLER, 2010).

1.1.2. HEMICELULOSE

A estrutura da hemicelulose é linear, semelhante à da celulose, porém, diferentemente desta, a hemicelulose apresenta grande variedade de açúcares nas ramificações, o que impede a formação de grandes regiões cristalinas (JOVANOVIC et al., 2009).

O principal constituinte da hemicelulose é a xilana, um heteropolissacarídeo cuja cadeia principal é formada por resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4, contendo ramificações laterais de pentoses e hexoses, como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose e por seus ácidos urônicos, visto na figura 4 (COLLINS et al., 2005; POLIZELI, et al., 2005). No geral, a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses dependem do tipo de parede celular e varia de espécie para espécie (POLIZELI, et al., 2005).

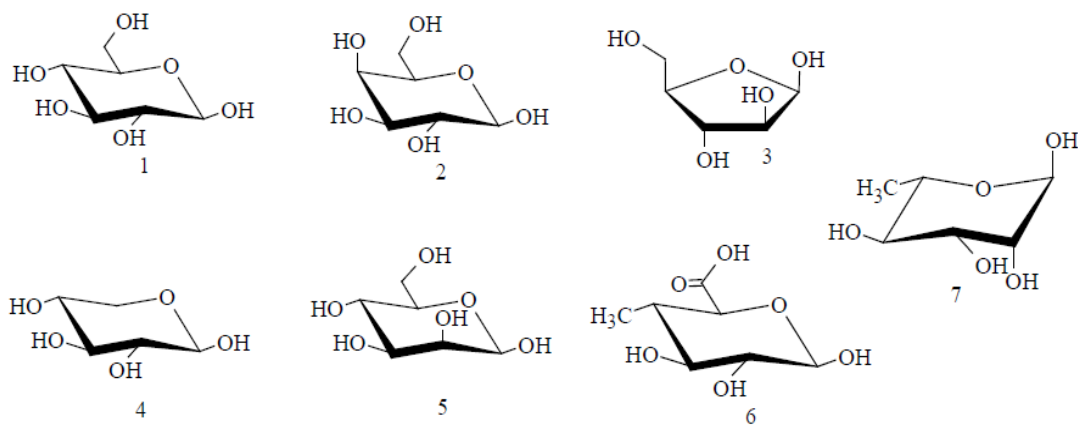


Figura 4 - Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose. (SJÖSTRÖM, 1992).

Na parede celular a xilana está intimamente relacionada com a celulose, revestindo as microfibrilas e dificultando a ação das celulases, além de ser

covalentemente ligada à lignina. Deste modo, a xilana é importante na conexão entre celulose e lignina (COLLINS et al., 2005).

1.1.3. LIGNINA

A lignina é um polímero aromático complexo, diferente da celulose e da hemicelulose que formam cadeia, o mecanismo de polimerização da lignina resulta em uma rede tridimensional de compostos aromáticos que envolvem os outros componentes da parede celular, defendendo contra a ação de enzimas produzidas por microrganismos patogênicos e saprófitos. A remoção da lignina representa um passo fundamental para reciclagem de carbono no ecossistema terrestre, bem como a utilização industrial da biomassa. O polímero de lignina é altamente resistente à degradação química e biológica devido a sua estrutura molecular, onde formam uma rede tridimensional complexa devido a uma variedade de ligações incluindo ester, éter e carbono-carbono (Figura 5) (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009).

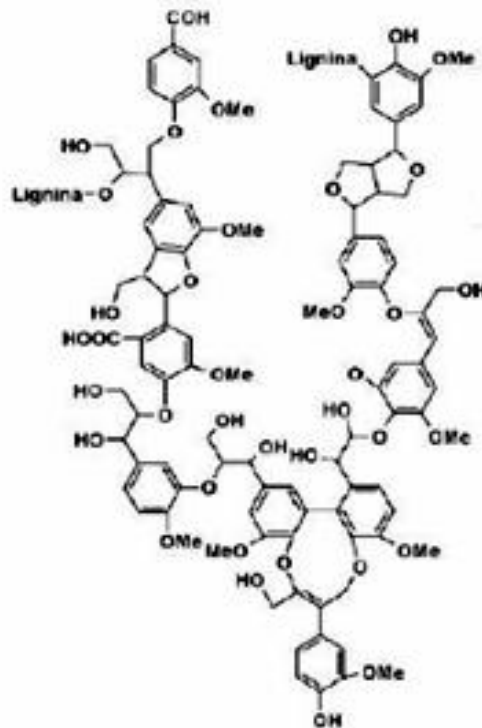


Figura 5 - Representação da lignina (Adaptado de GRAMINHA et al., 2007).

A lignina confere resistência à compressão hídrica e rigidez à parede celular, apresenta funções mecânicas de sustentação, aumenta a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos e reduz a digestibilidade de material vegetal por animais (TUOMELA et al., 2000; BASSO et al., 2010). À medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de lignina tende a ser maior (RAVEN, 2001).

Mesmo presente em menores quantidades em relação aos outros componentes, a lignina atribui limitação suficiente para retardar ou evitar completamente, a ação enzimática, dificultando a hidrólise do material lignocelulósico (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

1.2. ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis. A glicose liberada apresenta maior interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

A hidrólise enzimática de material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de diferentes enzimas, denominado complexo celulolítico: as endoglucanases (EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa da celulose e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Quando atuam em conjunto apresentam um rendimento melhor do que quando atuam isoladamente (BASSO et al., 2010; CASTRO; PEREIRA JR., 2010), a figura 6 ilustra o sinergismo das três enzimas.

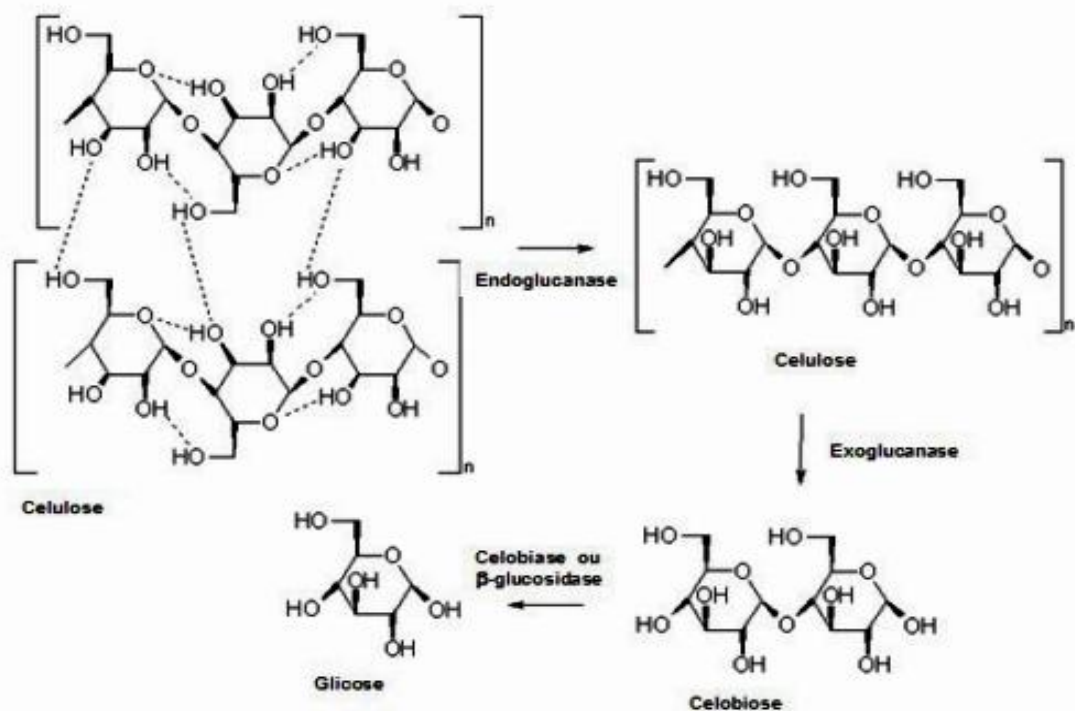


Figura 6 - Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase na degradação da estrutura da celulose (FARINAS, 2011).

Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis com grau de polimerização até 6. A etapa de despolimerização realizada por endoglucanases e exoglucanases 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 (ZHANG; LYND, 2004).

1.2.1. Endoglucanase

As endoglucanases ou endo- β -1,4-glicanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose, hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. Resulta em uma rápida redução no tamanho da cadeia ou grau de polimerização, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES et al., 2004). Devido ao

seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade a carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO; TAN, 2002; ZHANG et al., 2006).

1.2.2. Exoglucanase

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases e pelas glucanohidrolases. Essas enzimas são capazes de liberar glicose diretamente dos terminais do polímero (LYND et al., 2002). Atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO; TAN, 2002). As celobiohidrolases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, um fenômeno ainda não esclarecido completamente, entretanto sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, causando desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases (ZHANG; LYND, 2004). As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Elas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outra enzima do complexo celulolítico, a β -glicosidade (BON et al., 2008)

1.2.3. β -glicosidase

As β -1,4-glicosidases ou celobiasas hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis com liberação de glicose (CASTRO; PEREIRA JR., 2010), reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA et al., 2002), além de aumentar o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008). A ação das β -glicosidases além de finalizar a despolimerização, também contribui para a taxa global do processo consumindo a celobiose, que é um inibidor de endoglucanase e exoglucanase (OLSEN et al., 2011).

1.3. ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS

Por causa do baixo grau de polimerização e de sua natureza amorfa, a hemicelulose é degradada mais facilmente que a celulose. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa, dada a sua estrutura variável e ramificada (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

De acordo com o principal resíduo de açúcar presente na estrutura polimérica, as hemiceluloses podem ser denominadas de xilanas, glicomananas, galactanas, ou arabinanas (BHAT,HAZLEWOOD, 2001). A xilana representa a principal classe de hemicelulose. A degradação da xilana em açúcares é fundamental para se obter elevadas eficiências no processo de conversão de biomassa em energia renovável. Para completa hidrólise da xilana é necessário uma ampla variedade de enzimas agindo sinergicamente para convertê-la em unidades de xilose (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

As hemicelulases são frequentemente classificadas de acordo com o seu modo de ação em diferentes substratos. As endoxilanases (endo-1,4- β -D-xilanases, E.C. 3.2.1.8) clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando diminuição do grau de polimerização do substrato, produzindo xilooligômeros e xilobiose. Os xilooligômeros e xilobiose produzidos pela ação das endoxilanases são hidrolisados por β -xilosidases (1,4- β -D-xilosidases, E.C.3.2.1.37) que liberam xilose a partir da extremidade não redutora. (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; POLIZELI et al., 2005; ALVES-PRADO et al., 2010). As xilanases são inibidas por altas concentrações de seus produtos, uma das funções das β -xilosidases é diminuir a inibição causada pela concentração de xilooligossacarídeos, o que aumenta a eficiência da hidrólise da xilana (POLIZELI et al., 2005). As cadeias laterais presentes na xilana são liberadas por: α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) removem ramificações de L-arabinose presentes em arabinoxilanas e glicuronoarabinoxilanas (DE VRIES e VISSER, 2001; POLIZELI et al., 2005); α -glucuronidases (EC 3.2.1.131) hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano; acetilxilana esterases (EC 3.1.1.6) removem grupos acetil presentes em acetilxilanas (CAUFRIER et al., 2003); e os ácidos fenólicos esterases também podem estar presentes: ácido ferrúlico esterase (3.1.1.73) e o ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.) que clivam na xilana as ligações ester entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido *p*-coumárico, respectivamente

(POLIZELI et al., 2005). O sinergismo entre as enzimas xilanolíticas aumentam a susceptibilidade do polímero de xilana ao ataque enzimático (DE VRIES et al., 2001), ilustrado na figura 7.

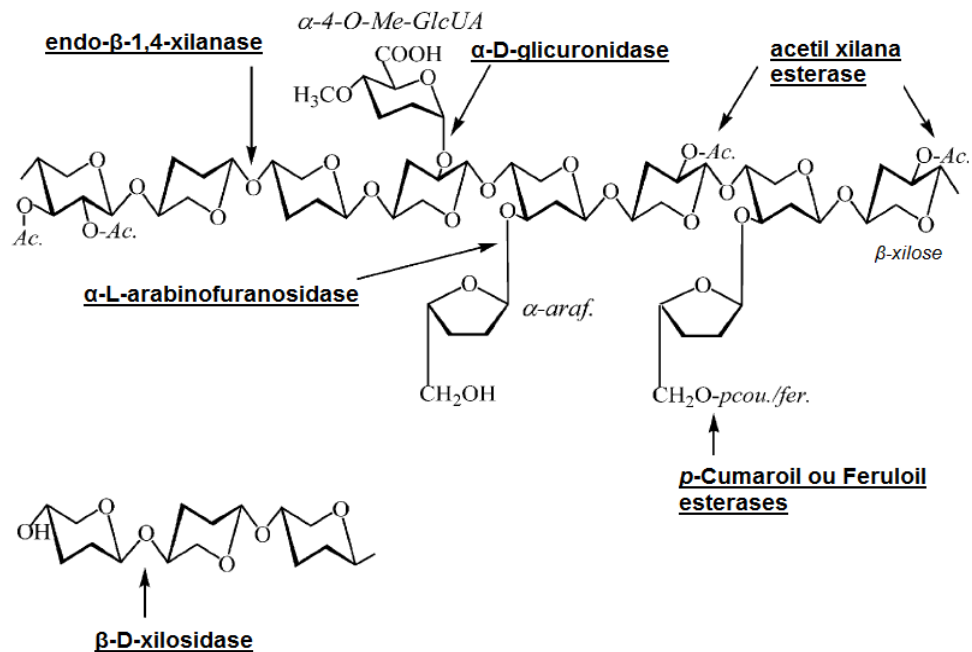


Figura 7 – Esquema da estrutura hipotética da xilana e as enzimas envolvidas em sua degradação (COLLINS et al., 2005).

1.4. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES) NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

O Cultivo em Estado Sólido (CES) é definido como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (RODRIGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Entre as vantagens do CES pode-se citar a baixa demanda de água e energia, utilização de equipamentos menos complexos, menor espaço necessário para o processo de cultivo, meios de culturas mais simples, baixo custo operacional, maior produtividade dos extratos enzimáticos. Por utilizar menor quantidade de água, reduz efluentes líquidos a tratar e a probabilidade de contaminação por bactérias é menor (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; PARIS et al., 2010). Esse processo também tem a propriedade de simular o hábitat natural de microrganismos selvagens, principalmente fungos filamentosos (RODRIGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011)

Entretanto, o processo de CES apresenta algumas limitações, a heterogeneidade do meio dificulta o controle de alguns parâmetros, como pH, agitação, oxigênio, aeração, concentração de nutrientes e produtos, a remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano e a determinação de crescimento microbiano, o que torna complicado automatizar o processo (PARIS et al., 2010).

A otimização deste processo se torna necessária para aumentar a produção enzimática e obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Algumas variáveis operacionais são determinantes no processo de cultivo microbiano, como a escolha de um microrganismo específico, seleção do substrato, concentração de fontes de carbono, umidade, temperatura, pH e tempo de cultivo (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2010).

O CES é amplamente discutido para maior produtividade enzimática e redução dos custos de produção (SINGHANIA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2010), possui potencial significativo na obtenção de produtos para indústrias de alimentos, farmacêutica e agrícola, além de ter interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (PANDEY et al., 2003; CASTILHO et al., 2000).

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para produção de enzimas microbianas (SIQUEIRA et al., 2010). É crescente o interesse pela utilização de resíduos agrícolas para obtenção de combustíveis renováveis, como o etanol celulósico. No Brasil, apesar da grande produção de etanol a partir da sacarose de cana, a produção de álcool derivado da lignocelulose é uma alternativa viável e sustentável (RODRIGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). No entanto, a produção de etanol de segunda geração, em escala comercial, é atualmente limitada pelo alto custo das celulasas (SIQUEIRA et al., 2010). Nesse sentido, os custos das celulasas podem ser reduzidos por meio de melhoramento genético dos microrganismos e do uso de resíduos como matéria-prima de baixo custo, e consequente aumento da especificidade enzimática (CASTRO; PEREIRA JR., 2010; MAEDA et al., 2011).

A produção industrial das enzimas necessitam o entendimento e controle dos parâmetros envolvidos no crescimento do microrganismo e de sua capacidade produtiva. O custo e os baixos teores de produção das enzimas são os principais fatores a serem superados para a aplicação industrial do processo. Reduzir os custos de

produção por meio da otimização é o objetivo da pesquisa básica para aplicações industriais (SCHEUFELE et al., 2012)

1.6. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES E XILANASES

As celulases podem ser aplicadas como aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade por ruminantes e monogástricos. Podem ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, com o objetivo de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulases também podem atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Na indústria têxtil, em processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

Podem ser aplicadas em formulações de detergentes domésticos e industriais, preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimuladores de ensilagem e no tratamento de lixo orgânico e de águas residuais (BHAT, 2000).

As enzimas celulolíticas podem viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ricos em celulose. As β -glicosidases são as enzimas celulolíticas responsáveis pela degradação enzimática da celobiose, fazendo que esta enzima apresente grande potencial para a indústria de etanol (PARRY et al., 2001).

A maior parte das isoflavonas da soja se encontram na forma glicosilada, as β -glicosidases são capazes de desglicosilar estes compostos, melhorando a absorção destes pelo intestino humano (PARK et al., 2001). Consumo de alimentos ricos em isoflavonas podem contribuir para controle e prevenção de doenças, como osteoporose, sintomas de menopausa, diabetes, doenças cardiovasculares, câncer de mama, próstata e colón (CHUN et al., 2008).

As xilanases desempenham importante papel na hidrólise da xilana, além aumentar a eficiência das celulases na hidrólise enzimática da biomassa vegetal, pois a hemicelulose se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose,

dificultando a ação das celulases durante o processo de sacarificação. A remoção da hemicelulose altera substancialmente a estrutura e a acessibilidade da fibra às outras enzimas participantes do processo. A xilose obtida pela ação das xilanases pode ser convertida a etanol e xilitol. O xilitol é um adoçante natural semelhante à sacarose, possui baixo teor calórico e não cariogênico, podendo ser utilizado pela indústria de alimentos e pela indústria farmacêutica na formulação de medicamentos para tratar problemas digestivos (YANG et. al., 2006; MERINO; CHERRY, 2007; POLIZELI et al., 2005).

Xilanases podem ser aplicadas na extração, clarificação e estabilização de sucos de frutas e vegetais, na redução da viscosidade e incremento da recuperação de aromas, óleos essenciais, sais minerais e vitaminas (POLIZELI et al., 2005). A Aplicação conjunta com outras enzimas em cervejarias e vinícolas pode reduzir a concentração de β -glicanas, pois estas aumentam a viscosidade dos mostos e afeta a etapa da filtração, dificultando a clarificação dos vinhos (KULKARNI et al., 1999). Na panificação as xilanases vêm sendo empregadas no pão para aumentar o volume, determinando a textura do miolo e seu sabor final (CAMACHO; AGUIAR, 2003). Auxiliam na digestibilidade de rações animais, uma vez que a hemicelulose é uma fibra insolúvel e a sua ingestão na forma integral, possui pouco valor nutricional para os animais ruminantes (XIN; HE, 2013).

Uma das maiores aplicações do complexo xilanolítico está relacionado às indústrias de celulose e papel. A utilização da xilanase no branqueamento das polpas, leva à diminuição do consumo de branqueadores químicos sem comprometer a alvura do papel. Assim, as xilanases auxiliam na redução da poluição ambiental causada por esses compostos químicos residuais, além de reduzir os custos com os reagentes organoclorados. No entanto, deve-se ressaltar que, para maior eficiência desta aplicação específica, deve-se trabalhar com extratos enzimáticos resistentes a alcalinidade, altas temperaturas e totalmente livre de celulases, para não comprometer o resultado final do papel (KULKARNI et al., 1999; XIN; HE, 2013).

Considerando a importância biotecnológica das enzimas acima discutidas, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar a produção e a caracterização de celulases e hemicelulases obtidas pelo Cultivo em Estado Sólido de linhagens mesófilas isoladas do solo do Cerrado Sul-mato-grossense.

2. REFERENCIAS

- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333–346, 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA. M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-759, 2005.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.
- BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. **Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases**. In Enzymes in farm animal nutrition. Bedford, M. R. & Partridge, G. G. (eds). CABI Publishing. p. 11-23, 2001.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol**. In: Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E.P.S. et al.(eds). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.
- CAMACHO, N. A.; AGUILAR, O. G. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 159-172, 2003.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.
- CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; JR, G. L. S. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, p.239-247, 2000.
- CASTRO, A. M. de; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CAUFRIER, F.; MERTINO, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. **Carbohydrate Research**, v.338, p. 687-692, 2003.

CHUN, J.; KIM, J. S.; KIM, J. H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp.4. **Food Chemistry**, v. 109, p. 278-284, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.3-23, 2005.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 11-21, 2004.

DODD, D; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology: Bioenergy**, v. 18, p. 2–17, 2009.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, São Carlos, SP. p.13, 2011.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A.Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, p. 1-22, 2007.

JOVANOVIĆ, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, p. 687-697, 2009.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v.23, p.411-456, 1999.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p.506-577, 2002.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M. de; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, p.1196-1201, 2011.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 95-120, 2007.

- OLSEN, S. N.; LUMBY, E.; MCFARLAND, K.; BORCH, K.; WESTH, P. Kinetics of Enzymatic High-Solid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass Studied by Calorimetry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 626-635, 2011.
- PANDEY, A. Solid-State fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M.. Estudo do crescimento de *Aspergillus casingii* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. **Estudos Tecnológicos**, v. 6, n.1, p.22-35, 2010.
- PARK, J.; LAPPE, M.; TEICHMANN, A. Mapping protein family interactions: Intramolecular and intermolecular protein family interaction repertoires in the PDB and yeast. **The Journal of Molecular Biology**, v. 307, p. 929–938, 2001.
- PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemistry Journal**, v. 353, p. 117-127, 2001.
- PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 2104-2111, 2002.
- POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (Mini-Review), v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª edição. Editora Guanabara Hoogan, Rio de Janeiro, 2001.
- RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F; FARINAS, C. S; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.
- RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, A.T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n.2, p. 164–177, 2009.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.89, p.246-291, 2005.

SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 310-321, dez. 2012.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial Hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.219-228, 2003.

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

SIQUEIRA, F. G. de; SIQUEIRA, L. G. de; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FERREIRA FILHO, E. X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, p.20-26, 2010.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2 ED. California, USA: Academic Press, 1992.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 33-46, 2002.

SUN, Y. CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresouce Technology**, v.83, p. 1-11, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169-183, 2000.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES E.; AGUILAR, C. N.; ROMERO-GOMES, S. D.; DIAZ-GODINES, G. AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

XIN, F.; HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 309–315, 2013.

YANG, Y. Z.; YANG, S. Q.; YAN, Q. J. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.97, n.15, p. 1794-1800, 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, p. 797-824, 2004.

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES de *Penicillium* sp ISOLADO DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

RESUMO

Enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas apresentam diversas aplicações para indústrias de alimentos, farmacêutica, biotecnológica, papel e celulose. Essas enzimas podem ser obtidas através do Cultivo em Estado Sólido (CES) tornando-se uma alternativa atraente tanto pelo ponto de vista ambiental como industrial, pois os resíduos gerados pela agricultura podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo. O trabalho visou avaliar a produção e caracterização de xilanase, CMCase e β -glicosidade por uma linhagem de *Penicillium* recentemente isolado do solo do Cerrado sul-mato-grossense. Foram avaliados alguns parâmetros de cultivo, tais como: diferentes resíduos agroindustriais, umidade, temperatura e tempo de cultivo. Os resultados mostraram que o farelo de trigo foi o melhor substrato para a produção das enzimas. O cultivo contendo 60% de umidade na temperatura de 25°C após 72 horas se mostrou mais expressivo para xilanase, atingindo cerca de 1.094,8 U/g (109,48 U/mL). A umidade inicial de 55% foi melhor para produção de CMCase e β -glicosidase na temperatura de 30 e 35°C, respectivamente, atingindo cerca de 213,4 U/g (21,34 U/mL) de CMCase entre 96 e 120 horas e 69,4 U/g (6,94 U/mL) de β -glicosidase após 144 horas de cultivo. A xilanase e CMCase apresentaram maior atividade catalítica em pH 4,0 na temperatura de 55°C. A atividade enzimática original foi recuperada na faixa de pH 3,0-8,0 após 24 horas de incubação, em ambas enzimas analisadas. Quanto a termoestabilidade, a xilanase manteve-se estável de 35 a 40°C e a CMCase de 35 a 60°C, no período de uma hora de incubação. A β -glicosidase apresentou atividade ótima em pH 4,5 na temperatura de 65°C, mantendo sua atividade original na faixa de pH 4,0-8,0 e termoestável após 1 hora de incubação na temperatura de 45°C. Os resultados permitem concluir que o *Penicillium* isolado apresentou potencial na produção de enzimas de celulolíticas e hemicelulolíticas em meio de baixo valor agregado e características relevantes para hidrólise da biomassa vegetal visando produção de bioetanol.

Palavras-chave: Cultivo em Estado Sólido, fungo filamento, enzimas microbianas.

ABSTRACT

Cellulolytic enzymes and cellulolytic and hemicellulolytic present several applications for food, pharmaceutical, biotech, pulp and paper industries. These enzymes can be obtained through the Cultivation in Solid State making it an attractive alternative to both the environmental point of view as industrial because the waste generated by agriculture can be used as raw materials at low cost. The study evaluated the production and characterization of xylanase, CMCCase and β -glucosidase by a *Penicillium* recently isolated from soil of Cerrado sul-mato-grossense. Some parameters of cultivation, such as were evaluated: different agro-industrial residues, humidity, temperature and time of cultivation. The results showed that wheat bran was the best substrate for the production of enzymes. The medium containing 60% humidity at 25°C after 72 hours was more expressive for xylanase, reaching about 1.094.8 U/g (109.48 U/mL). The initial moisture content of 55% was best for the production of CMCCase and β -glucosidase in the temperature of 30 and 35°C, respectively, reaching about 213.4 U/g (21.34 U/mL) of CMCCase between 96 and 120 hours and 69.4 U/g (6.94 U/mL) of β -glucosidase after 144 hours of cultivation. The xylanase and CMCCase showed higher catalytic activity at pH 4.0 at 55°C. The original enzymatic activity was recovered in the pH range of 3.0-8.0 after 24 hours of incubation, both enzymes analyzed. As for thermostable xylanase was stable 35 to 40°C and CMCCase 35-60°C during an hour of incubation. The β -glucosidase showed optimal activity at pH 4.5 at a temperature of 65°C, maintaining the original activity in the pH range 4.0-8.0 and thermostable after 1 hour incubation at 45°C. The results indicate that the *Penicillium* isolate showed potential in the production of cellulolytic enzymes and cellulolytic and hemicellulolytic amid low value-added and relevant features for hydrolysis of plant biomass to bioethanol production.

Keywords: Cultivation in Solid State, fungus filament, microbial enzymes.

1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm conquistado lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, mostrando características operacionais e econômicas, sendo vantajosos em relação aos processos químicos convencionais, pois os processos convencionais demandam a utilização de produtos químicos que geram resíduos de difícil tratamento. A utilização de enzimas apresenta uma alternativa destes produtos, tanto para a simplificação como na redução de custos (BORZANI, 2001). No entanto, o custo elevado das enzimas é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo, reduzir os custos de produção é fundamental para aplicações industriais (SANTOS et al., 2013).

Em razão de o Brasil exercer grande atividade agrícola, são gerados enormes volumes de resíduos que são rotineiramente acumulados no meio ambiente. Devido à quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais, estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo para processos secundários. Neste contexto o Cultivo em Estado Sólido (CES) exerce papel de destaque no aproveitamento desses resíduos, visando a síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial, além de ser benéfico ao meio ambiental (DANTAS; AQUINO, 2010; BASSO et al., 2010). Os fungos são os microrganismos mais promissores neste processo, visto que necessitam de baixos níveis de água para o crescimento e o desenvolvimento das hifas permite que eles colonizem e penetrem no substrato e na região porosa entre as partículas do substrato (SANTOS et al., 2013; DANTAS; AQUINO, 2010).

Farelos, cascas, bagaços e outros resíduos têm como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais heterogêneos. Servem como fonte de carbono e energia, e suporte para o crescimento microbiano (PANDEY, 2003). A transformação dos polímeros constituintes da parede celular vegetal em açúcar fermentescíveis é uma etapa essencial na produção de alimentos, produtos químicos e farmacêuticos (BASSO et al., 2010).

A celulose é um polímero linear de unidades de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, sendo o principal componente da biomassa das plantas (BENTO et al., 2012). Formada por cadeias lineares de glicose com ligações β -(1 \rightarrow 4), fortemente

alinhas e ligadas entre si, formam uma fita altamente ordenada, cristalina e relativamente resistente ao ataque enzimático (BASSO et al., 2010).

As celulasas são enzimas que formam um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol. A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: a endoglucanase (EC. 3.2.1.4) tem a propriedade de clivar ligações internas da fibra celulósica; a exoglucanase (EC. 3.2.1.91) atuam na região externa da celulose e a β -glicosidase (EC. 3.2.1.21) hidrolisa oligossacarídeos solúveis em glicose. As celulasas podem ser aplicadas na produção de alimentos e bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos; na indústria têxtil, em processos de biopolimento e bioestonagem; indústria de polpa e papel; produção de bioetanol e aditivos para ração animal (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A hemicelulose é um polissacarídeo de baixo peso molecular quando comparado à celulose, formada por D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, D-arabinose e ácidos 4-O-metil-glicurônico, D-galacturônico e D-glicurônico. Os açúcares estão unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e ocasionalmente ligações glicosídicas β -1,3. (BENTO et al., 2012). A xilana representa a principal classe de hemicelulose. É mais suscetível à hidrólise que a celulose, pois não possui regiões cristalinas e apresenta baixo grau de polimerização. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa, dada a sua estrutura variável e ramificada (SHALLOM; SHOHAM, 2003).

A hidrólise enzimática da hemicelulose ocorre pela ação sinérgica de diversas endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares. Por exemplo, a hidrólise da cadeia principal, envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas, endo 1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37). Dependendo do tipo de xilana, podem ser necessárias enzimas auxiliares para a clivagem das cadeias laterais, como α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.131) e acetil-xilana-esterase (EC 3.1.1.72), entre outras (CARVALHO et al., 2009). Enzimas xilanólíticas apresentam aplicações na conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos e combustíveis, como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft; nas indústrias de alimentos e bebidas, indústria têxtil e

elaboração de ração animal, além de deixar a fibra de celulose mais acessível ao ataque enzimático das celulasas (SHEN et al., 2011; XIN, F.; HE, 2013)

A ampla variedade quanto às características das enzimas potencializa a aplicação em diferentes processos na indústria e agregam valor sobre as indústrias de biotecnologia, além de estimular a exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas e no desenvolvimento de complexos enzimáticos eficientes para a hidrólise de polímeros de origem vegetal (BARATTO et al, 2011).

O trabalho visou analisar os parâmetros fermentativos para a produção de celulasas e hemicelulasas em CES por um fungo filamentoso mesófilo recentemente isolado do solo do Cerrado sul-mato-grossense, identificado como *Penicillium* sp., variando alguns parâmetros de cultivo como, diferentes substratos, umidade, temperatura e tempo de cultivo. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo utilizado

Neste trabalho foi utilizado um fungo filamentoso isolado de amostras de solo do Cerrado Sul-mato-grossense identificado como *Penicillium* sp., pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da UNESP/Rio Claro, por técnicas de morfologia e biologia molecular. O microrganismo foi cultivado a 28°C em meio ágar Sabouraud Dextrose. Posteriormente ao crescimento foi mantido na temperatura de 4°C.

2.2. Otimização da produção de celulasas e hemicelulasas por Cultivo em Estado Sólido (CES)

2.2.1. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da

superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agrícolas) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão.

2.2.2. Seleção do substrato para produção de celulasas e hemicelulasas

Para produção das enzimas foram testados diferentes substratos agrícolas: farelo de trigo, farelo de soja, casca e arroz, sabugo de milho e palha de milho. Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Todos os substratos foram umedecidos a 60% com solução nutriente (descrita anteriormente). Após a inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos a 28°C por 96 horas. O substrato que apresentou melhor produção das enzimas foi adotado para a avaliação de outros parâmetros.

2.2.3. Temperatura ótima para a produção das enzimas

Foram testadas cinco temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g do substrato esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Os substratos foram umedecidos a 60% com solução nutriente. Após o período de inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos nas diferentes temperaturas por 96 horas. A temperatura ótima de produção de cada enzima foi adotada para a avaliação do próximo parâmetro.

2.2.4. Variação da umidade inicial do meio de cultivo

As umidades testadas foram de 50% a 80%, variando a cada 5%. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Os substratos foram umedecidos com solução nutriente. Após a inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos na temperatura

ideal para cada enzima por 96 horas. A melhor umidade para a produção de cada enzima foi adotada para a avaliação do próximo parâmetro de cultivo.

2.2.5. Variação do tempo de cultivo

O tempo de cultivo foi variado de 24 horas a 168 horas. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Os substratos foram umedecidos com solução nutriente. Após a inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos na temperatura ideal de cada enzima e retirados a cada 24 horas para extração enzimática.

2.3. Extração enzimática

Para a extração das enzimas foi adicionado 50 mL de água destilada nos meios fermentados, estes foram mantidos em agitação em incubadora de agitação orbital (Shaker) por 1 hora a 160 RPM, em seguida foram filtrados utilizando tecido tipo voal, para separar o meio sólido do extrato enzimático, e posteriormente centrifugados (15,000 x g/5 min). O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

2.4. Determinação da atividade de Xilanase

O substrato para xilanase foi preparado a partir de xilana “Beechwood” a 0,5% em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada pela adição de 900 µL desse substrato com 100 µL do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C, foi adicionado 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para paralisar a reação e colocado em banho de ebulição a 100°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de xilose por minuto de reação (ALVES-PRADO et al., 2010).

2.5. Determinação da atividade de CMCase

O substrato para CMCase foi preparado utilizando carboximetil-celulose (CMC-Sigma) a 3% em solução-tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada pela adição de 900 μ L desse substrato com 100 μ L do filtrado enzimático, reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C, foi adicionado 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para paralisar a reação e colocado em banho de ebulição a 100°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de glicose por minuto de reação (ALVES-PRADO et al., 2010).

2.6. Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela adição de 50 μ L do filtrado enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio a 0,1M, no pH 4,5 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP β G, Sigma), reagindo por 10 minutos na temperatura de 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação (LEITE et al., 2008).

2.7. Caracterização físico-química das enzimas

2.7.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade das enzimas a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 a 8,0), nesta etapa foi utilizado tampão McIlvaine a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 35 a 70°C, no respectivo pH ótimo das enzimas. A estabilidade das enzimas ao pH foi avaliada incubando-as por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH (3,0 a 10,5). Os tampões utilizados para o pH foram: McIlvaine 0,1M (3,0 a 8,0),

Tris-HCl 0,1M (8,0 a 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 a 10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura de 30 a 70°C. As atividades residuais foram mensuradas nas respectivas condições ótimas de cada enzima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização da produção de celulases e hemicelulases por Cultivo em Estado Sólido (CES)

3.1.1. Seleção do substrato para produção de celulases e hemicelulases

Dentre as fontes de carbono testadas (resíduos agrícolas) para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo filamentoso *Penicillium* sp., o melhor indutor foi o farelo de trigo, atingindo cerca de 562,5 U/g de xilanase; 212,3 U/g de CMCase e 39,9 U/g de β -glicosidase após 96 horas da inoculação, seguido pelo farelo de soja, obtendo 487,70 U/g de xilanase; 55,97 U/g de CMCase e 14,76 U/g de β -glicosidase após 96 horas da inoculação. As demais fontes de carbono testadas (casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho) induziram fracamente a produção das enzimas comparadas ao farelo de trigo e farelo de soja, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1- Produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase pelo fungo *Penicillium* sp. em diferentes substratos por Cultivo em Estado Sólido em 60% de umidade, temperatura de 28°C por 96 horas de cultivo.

Substratos	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	β -glicosidase (U/g)
Casca de arroz	109,17	15,67	4,88
Farelo de trigo	562,57	212,33	39,93
Farelo de soja	487,70	55,97	14,76
Palha de milho	59,85	4,9	0,5
Sabugo de milho	82,65	9,67	0,42

Vários autores têm testado diferentes resíduos agroindustriais como matérias-primas para produção de celulases e xilanases em fungos filamentosos (SINGHANIA et al, 2009; NIEVES et al, 2009; KABEL et al, 2005; LEITE et al., 2008).

O farelo de trigo é o principal subproduto da moagem do trigo, compondo uma mistura heterogênea dos fragmentos dos grãos originada da camada hialina-aleurona da semente. As proteínas de melhor valor biológico e vitaminas estão concentradas no farelo, que se torna uma fonte muito rica desses nutrientes (DI LENA; PATRONI; QUAGLIA, 1997). A complexidade nutricional deste tipo de resíduo favorece o crescimento microbiano e a produção de diversas enzimas de interesse industrial (HAQUE et al., 2002).

O farelo de trigo é um bom indutor para produção de celulases e hemicelulases. Diversos autores relatam significativas produções enzimáticas utilizando farelo de trigo como substrato para o CES (KALOGERIS et al., 2003; LI et al., 2004; SINGHANIA et al., 2007; LEITE et al., 2008; GONÇALVES et al., 2013).

A produção de enzimas microbianas é diretamente dependente da natureza do substrato, tem que servir como suporte sólido e fonte de nutrientes. O substrato considerado ideal é aquele que fornece tanto a fonte de carbono (energia) como a fonte de nitrogênio para o microrganismo, deve ser barato, disponível em ampla quantidade, facilmente processável e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, bem como para uma possível hidrólise comercial posterior (PANDEY et al., 2003; KANG et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2005).

3.1.2. Temperatura ótima para a produção das enzimas

Na avaliação da temperatura de cultivo, o fungo *Penicillium* sp. apresentou maiores produções enzimáticas quando cultivados em temperaturas entre 25°C a 35°C. A enzima xilanase apresentou maior produção nos cultivos em temperatura de 25°C, atingindo cerca de 1.030 U/g, caindo significativamente a partir de 30°C (Figura 1A). Maior atividade de CMCase foi alcançada nos cultivos em temperatura de 35°C, cerca de 202,9 U/g (Figura 1B) e a β -glicosidase apresentou melhor produção em temperaturas de 30°C e 35°C, atingindo máxima produção de 43,7 U/g em 30°C (Figura 1C). O crescimento microbiano e a produção das enzimas foram reduzidos nos cultivos em temperatura de 40°C. Os resultados indicam mesofilia do microrganismo.

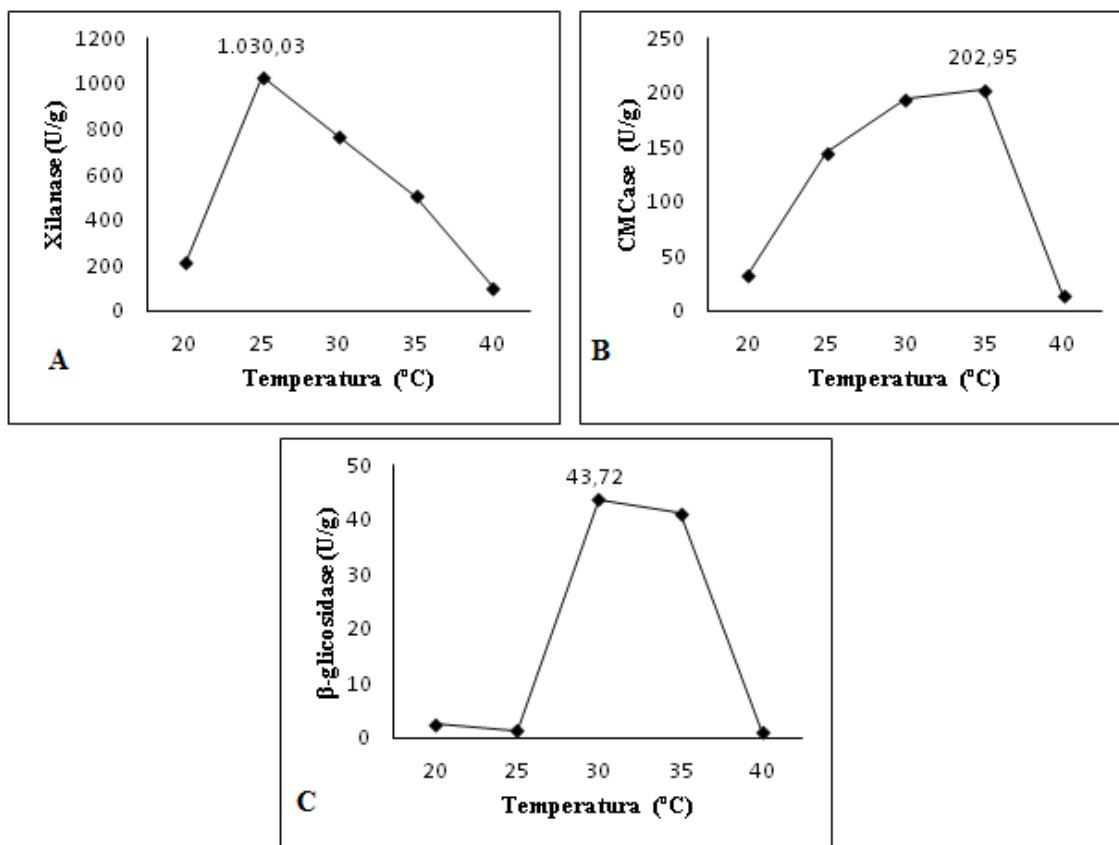


Figura 1 – Produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase pelo fungo *Penicillium* sp. em função da temperatura em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido, em 60% de umidade por 96 horas de cultivo.

Cultivos efetuados em temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento microbiano, como consequência, ocorre redução na produção enzimática. Temperaturas altas afetam a formação de produtos e podem alterar a estrutura tridimensional de moléculas protéicas, ocorrendo a desnaturação de enzimas. A temperatura que provoca desnaturação varia para cada enzima, mas, geralmente, está pouco acima de sua temperatura ótima (BORZANI et al., 2001).

Durante o processo de cultivo uma grande quantidade de calor é produzida devido à atividade metabólica do microrganismo, mas a heterogeneidade do meio dificulta o controle da temperatura (PARIS et al., 2010). Assim, o calor produzido durante o processo é acumulado no meio devido à baixa dissipação no substrato sólido, isto reduz a viabilidade do crescimento microbiano, o que pode interferir no rendimento do produto. Além disso, algumas vezes o acúmulo de calor pode degradar o produto de interesse, principalmente enzimas (PANDEY, 2003).

3.1.3. Variação da umidade inicial do meio de cultivo

Na avaliação da umidade do meio, ocorreu maior produção da enzima xilanase nos cultivos com 60% de umidade inicial, alcançando cerca de 1.047 U/g (Figura 2A). Os cultivos realizados em farelo de trigo contendo 55% de umidade inicial apresentaram maiores produções enzimáticas para CMCase, cerca de 256,1 U/g e para β -glicosidase 31,4 U/g (Figura 2B e 2C).

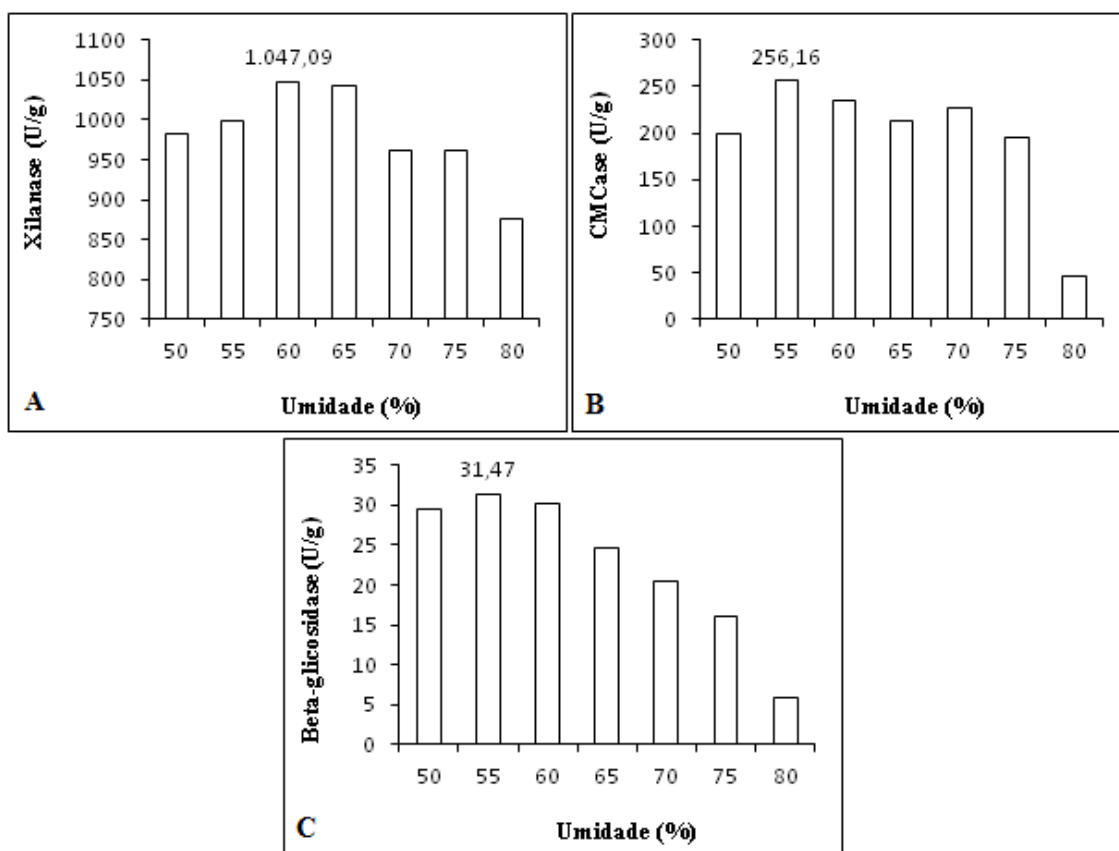


Figura 2 – Produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase pelo fungo *Penicillium* sp. em função da umidade inicial do meio em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido por 96 horas de cultivo nas temperaturas (A) 25°C (B) 35°C (C) 30°C.

Os resultados mostraram que a umidade necessária para o crescimento e produção enzimática variou de 55 a 60%. Os fungos geralmente precisam de 40 a 60% de umidade, esses valores simulam as condições encontradas na natureza (SINGHANIA et al., 2009).

A quantidade de água presente no meio de cultivo é um dos parâmetros que mais influenciam no sucesso do CES. A natureza do substrato, as necessidades do

microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar (PARIS et al., 2010).

Dentre as diversas funções da água em um bioprocessamento está a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio, bem como a remoção de metabólitos; e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado, isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, podem ocasionar desequilíbrio nas vias, afetar os processos de germinação, esporulação, formação de metabólitos e causar uma menor produção do produto desejado (BIANCHI, et al., 2001; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

De modo geral, baixas concentrações de água é uma boa vantagem para aplicação industrial, pois diminui os problemas com contaminação e geração de pequenas quantidades de água residual (BON et al, 2008).

3.1.4. Variação do tempo de cultivo

Na avaliação do tempo de cultivo, as amostras foram retiradas a cada 24 horas, perfazendo um total de 168 horas. A xilanase foi a enzima que teve sua máxima atividade em menor tempo, após 72 horas de incubação atingiu cerca de 1.094,8 U/g (109,48 U/mL), manteve-se constante de 96 a 144 horas, e reduziu significativamente sua produção em 168 horas de cultivo (Figura 3A). A maior produção da enzima CMCCase foi obtida no período de 96 a 120 horas, alcançou 213,4 U/g (21,34 U/mL), diminuindo a atividade ao longo do percurso fermentativo (Figura 3B) e a atividade de β -glicosidase se mostrou mais expressiva entre 120 e 144 horas de cultivo, atingiu cerca de 69,4 U/g (6,94 U/mL) após 144 horas e reduziu acentuadamente a atividade em 168 horas (Figura 3C).

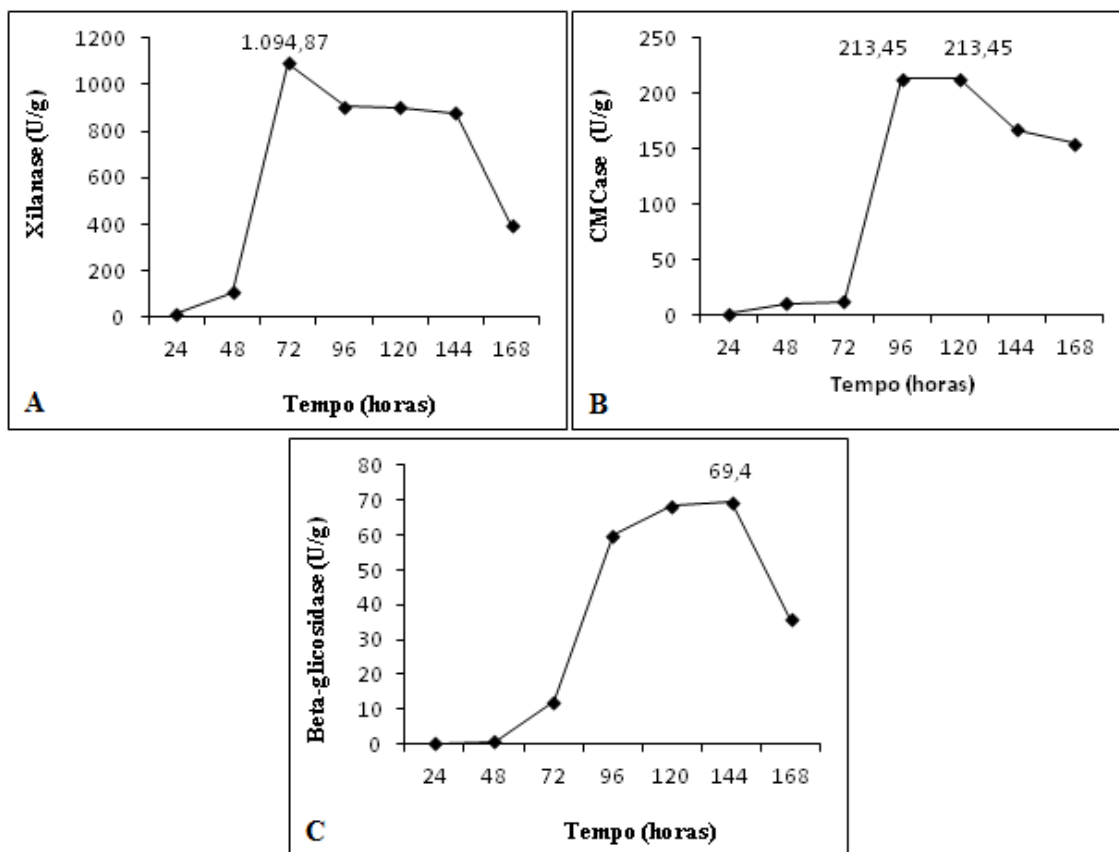


Figura 3 – Produção de xilanase, CMCase e β -glicosidase pelo fungo *Penicillium* sp. em função do tempo de cultivo em farelo de trigo por Cultivo em Estado Sólido (A) 25°C em 60% de umidade (B) 35°C em 55% de umidade (C) 30°C em 55% de umidade.

Os resultados mostraram que o tempo de cultivo necessário para as máximas produções das enzimas foram de dois dias para xilanase, quatro dias para CMCase e seis dias para β -glicosidase. A tendência de utilizar enzimas de origem microbiana está relacionada com menor tempo necessário para sua obtenção, principalmente quando comparado com enzimas de origem vegetal e animal (OLIVEIRA et. al., 2006)

Neste último parâmetro os resultados permitem concluir que a presença das xilanases no extrato enzimático foi fundamental para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose com a celulose, sendo assim possível o acesso das celulases na fibra de celulose, primeiramente a CMCase que vai reduzindo a cadeia de celulose e a ação da β -glicosidase que completa o processo (FARINAS, 2008).

Valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima necessários para o desenvolvimento do microrganismo. Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para geração de açúcares

simples (SANTANA et al., 2012). Quedas nas produções enzimáticas podem ser atribuídas ao esgotamento de nutrientes, ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática ou do crescimento celular, que podem resultar em morte celular e posteriormente a desnaturação das enzimas. Os produtos finais de uma dada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *feedback* negativo ou autoalimentação (BON et al., 2008; FERREIRA et al., 2011). A diminuição da água no meio também pode influenciar na diminuição da atividade enzimática pela redução na porosidade do sistema fermentativo, conseqüentemente a redução na difusão de oxigênio e a dificuldade de eliminação de dióxido de carbono pelo fungo (SANTANA et al., 2012).

As enzimas xilanase, CMCase e β -glicosidase também foram estudadas por vários autores e produzidas por diversos microrganismos. Munir et al. (2007) obtiveram com microrganismo *Trichoderma harzianum* em farelo de arroz, a máxima atividade de CMCase com 4 dias de incubação, cerca de 1,9 U/mL, com *Trichoderma* sp. e 1,5 U/mL e com *Phanerochaete* 2,4 U/mL. Senthilkumar et al. (2005) obtiveram uma atividade máxima de 1.024,0 U/g de xilanase usando farelo de trigo como substrato por *Aspergillus fischeri*. Hiden et al. (2011) obtiveram maior produção de celulases pelo fungo *Acremonium cellulolyticus* em cultivo submerso utilizando palha de arroz, cerca de 19,73 U/g de CMCase e 1,25 U/g de β -glicosidase, com a palha molhada moída em disco. Soni et al. (2010) alcançaram maior produção de CMCase com o fungo *Aspergillus fumigatus* em farelo de trigo, cerca de 98,5 U/g. Leite et al. (2008) relatam a produção de 13 U/g de β -glicosidase após 120 horas de Cultivo em Estado Sólido pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans* utilizando farelo de trigo como substrato. Silva et al. (2013) utilizando o microrganismo *Lichtheimia ramosa* relatam produção de β -glicosidase (0,061 U/mL) utilizando pequi como substrato após 48 horas a 30°C; CMCase (0,787 U/mL) em guavira após 96 horas a 35°C e xilanase (1,802 U/mL) em substrato à base de bocaiúva após 144 horas a 35°C. Golçalves et al. (2013) obtiveram com o microrganismo *Lichtheimia ramosa* produção de 2,41 U/mL de xilanase e 2,13U/mL de CMCase quando cultivados em farelo de trigo e produção de β -glicosidase de 17,26U/mL em farelo de trigo a 35°C após 120 horas. Stroparo et al. (2012) obteve com *Aspergillus niger* J4 maiores níveis de produção de xilanase utilizando bagaço de

malte como substrato, 9,80 U/mL e com o *Penicillium miczynskii* produziu índices mais elevados de atividade endoglucanásica na presença de casca de abacaxi, $0,18 \pm \text{U/mL}$.

3.2. Caracterização físico-química das enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium* sp.

3.2.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividades das enzimas

Os testes para a caracterização físico-química das enzimas obtidas foram realizados utilizando o extrato bruto obtido pelo cultivo do fungo *Penicillium* sp. por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, nos parâmetros ótimos de cada enzima.

A enzima xilanase apresentou atividades mais altas em pH ácidos, na faixa de 3,0 a 5,5, sendo o pH 4,0 o melhor e a partir do pH 6,0 a atividade começa a cair, (Figura 4A). A temperatura ótima para essa enzima foi de 55°C (Figura 4B).

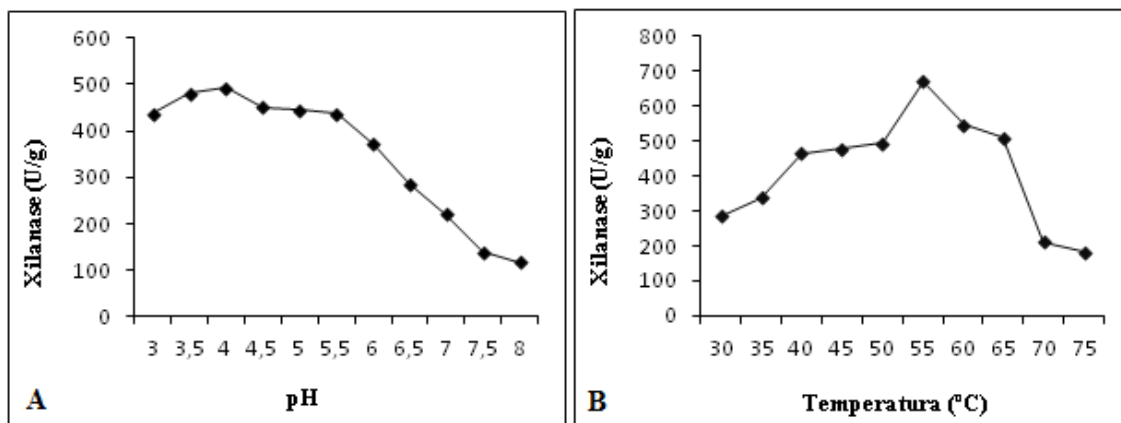


Figura 4 – (A) Atividade de xilanase em função da variação do pH. (B) Atividade de xilanase em função da variação da temperatura.

Segundo Kulkarni et al. (1999) a temperatura ótima de xilanase de fungos varia entre 40 a 60°. Shah e Madamwar (2005) obtiveram temperatura ótima de 30°C para produção de xilanase utilizando extrato enzimático do fungo *Aspergillus foetidus*. Cysneiros et al. (2013) obtiveram 50°C como temperatura ótima para produção de xilanase como o fungo *Humicola grisea* var. *Thermoidea*.

Assim como a xilanase o melhor pH para a enzima CMCase foi 4,0, caindo significativamente sua atividade a partir do pH 5,5 (Figura 5A). A melhor temperatura para a enzima foi de 55°C (Figura 5B).

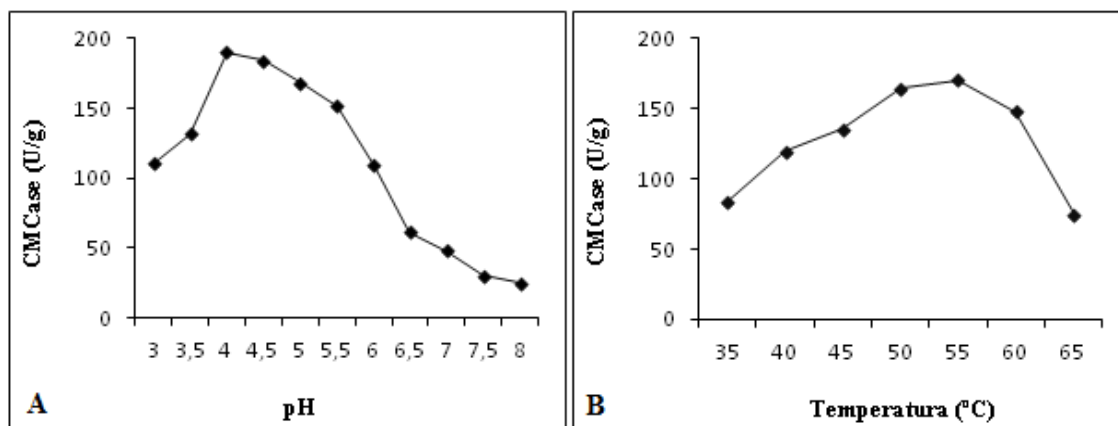


Figura 5 – (A) Atividade de CMCase em função da variação do pH. (B) Atividade de CMCase em função da variação da temperatura.

Os resultados de Sohail et al. (2009) corroboram com os resultados obtidos em relação ao pH utilizando o fungo *Aspergillus niger* MS82. Kaur et al. (2007) estudou duas endoglucanases do fungo *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, obtendo pH ótimo em 6,0 (EG I) e 5,0 (EG II). CMCase tem sido amplamente detectada em bactérias e fungos filamentosos. A maioria delas apresenta atividade ótima em temperaturas inferiores a 50°C, desta forma, CMCase ativa a temperaturas mais elevadas é de grande interesse para as indústrias (LEE et al., 2010). Siddiqui et al. (1997) obtiveram pelo fungo *Aspergillus niger* temperatura ótima de 40°C. Ali et al, (2008) estudaram os efeito da temperatura para produção de endoglucanase em *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*, obtendo temperatura ótima de 35 e 30°C para *A. niger* e *A. nidulans*, respectivamente .

Para β -glicosidase a melhor faixa de pH foi de 4,0 a 4,5, atingindo atividade máxima em pH 4,5 caindo a partir do pH 5,0 e sem produção em pH 8,0 (Figura 6A). A enzima apresentou máxima atividade na temperatura de 65°C e reduziu significativamente sua produção na temperatura de 70°C (Figura 6B).

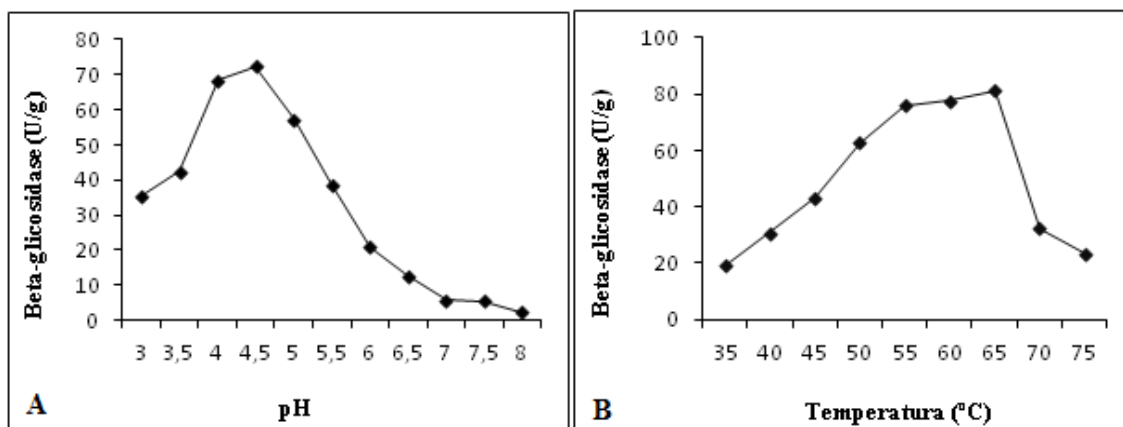


Figura 6 – (A) Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH. (B) Atividade de β -glicosidase em função da variação da temperatura.

Ferreira Filho (1996) verificou maior atividade de β -glicosidase de *Humicola grisea* em pH entre 4,0 e 4,5. Alguns microrganismos mesófilos podem produzir enzimas que atuam a 60°C ou maiores temperaturas (GOMES et al, 2007). Decker; Visser; Schreier (2000) avaliaram a produção de β -glicosidase de cinco espécies de *Aspergillus* (*A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. japonicus* e *A. tubingens*). Somente *A. foetidus* obteve temperatura ótima de 60°C, os outros tiveram sua temperatura entre 35 a 50°C. Cysneiros et al. (2013) obtiveram boa atividade na faixa de 50 a 60°C com a enzima β -glicosidase utilizando o fungo *Humicola grisea* var. *Thermoidea*.

3.2.2. Efeito da estabilidade ao pH e a temperatura

Após a determinação do pH e temperatura ótima de produção de cada enzima, foram realizados testes para determinar a estabilidade ao pH e a temperatura.

A xilanase produzida pelo fungo *Penicillium* sp. manteve sua atividade original após 24h de incubação entre os valores de pH 3,0 a 8,0, restando por volta de 65% de atividade em pH 10,0 e reduziu significativamente em pH 10,5 (Figura 7A). Essa enzima manteve-se estável de 35 a 40°C após 1 hora de incubação, restando cerca de 74% de sua atividade em 45°C e 20% em 60°C (Figura 7B).

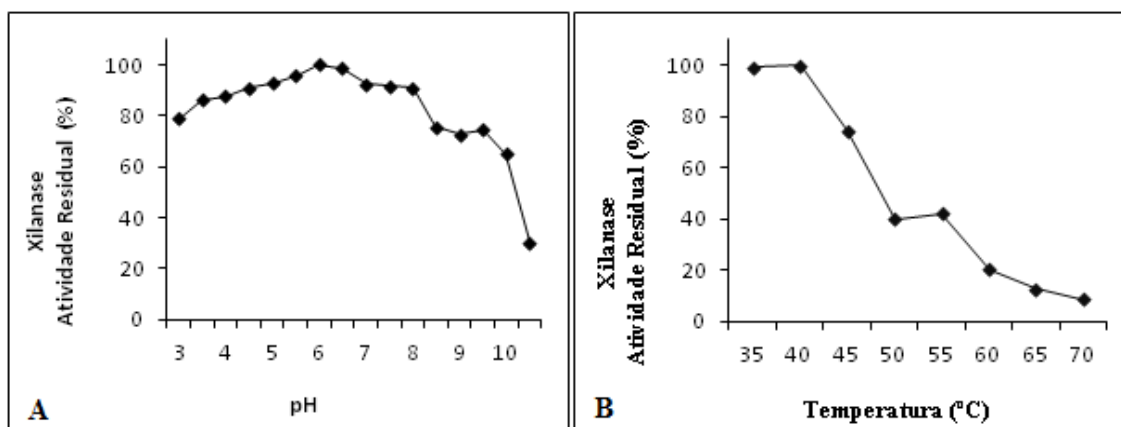


Figura 7 – (A) Estabilidade enzimática de xilanase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de xilanase em função da temperatura após 1 hora de incubação.

Segundo Kulkarni et al. (1999), geralmente as xilanases produzidas por fungos são estáveis na faixa de pH de 3,0 a 10,0. Estudos com o extrato produzido pelo fungo *Aspergillus foetidus* quando incubados a 60°C após uma hora também apresentou 20% da sua atividade original (SHAH; MADAMWAR, 2005).

A enzima CMCCase apresentou estabilidade estrutural em relação ao pH, mantendo sua atividade original após 24h de incubação entre os valores de pH 3,0 a 8,0, restando cerca de 62% de atividade em pH 9,5 e reduziu acentuadamente em pH 10,5 (Figura 8A). Quanto à estabilidade térmica, na temperatura de 50°C a enzima apresentou 100% da atividade após uma hora de incubação e 84% a 60°C e na temperatura de 70°C não apresentou atividade significativa (Figura 8B).

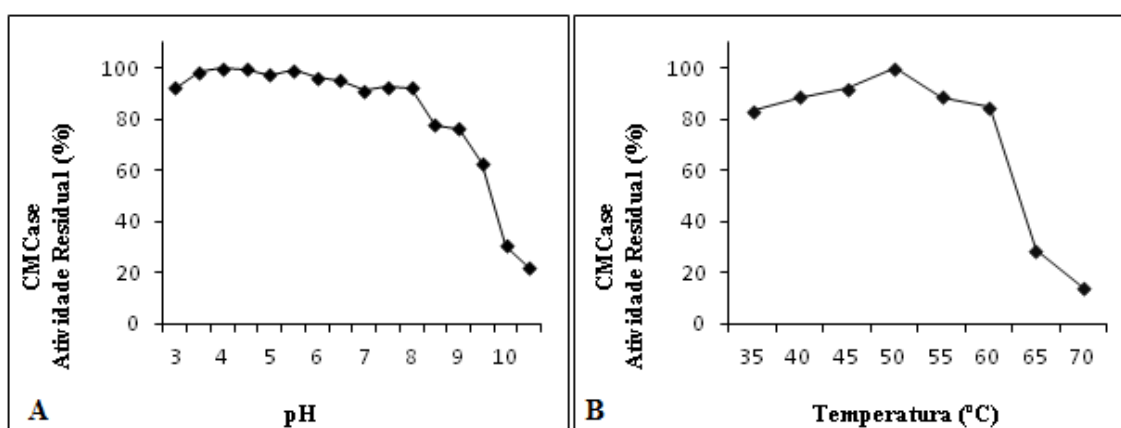


Figura 8 – (A) Estabilidade enzimática de CMCCase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de CMCCase em função da temperatura após 1 hora de incubação.

Kaur et al. (2007) estudou estabilidade ao pH e temperatura de duas endoglucanases do fungo *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, obteve da EG I uma faixa de pH de 5,0 a 8,0 e EG II de 4,0 a 7,0 nas temperaturas de 50 a 60°C durante 3 horas. Grigorevski-Lima et al. (2009) utilizando extrato enzimático bruto obtido por *Aspergillus niger* manteve cerca de 100% de atividade de CMCase original após uma hora em temperatura entre 50 e 60°C.

A enzima β -glicosidase manteve sua atividade original após 24h de incubação entre os valores de pH 4,0 a 8,0, restando 73,5% da atividade original em pH 8,0, reduzindo a partir do pH 8,5, sem produção em pH 10,5 (Figura 9A). A β -glicosidase manteve-se estável de 35 a 45°C, restando 46% da atividade original em 60°C e sem produção na temperatura de 65°C (Figura 9B).

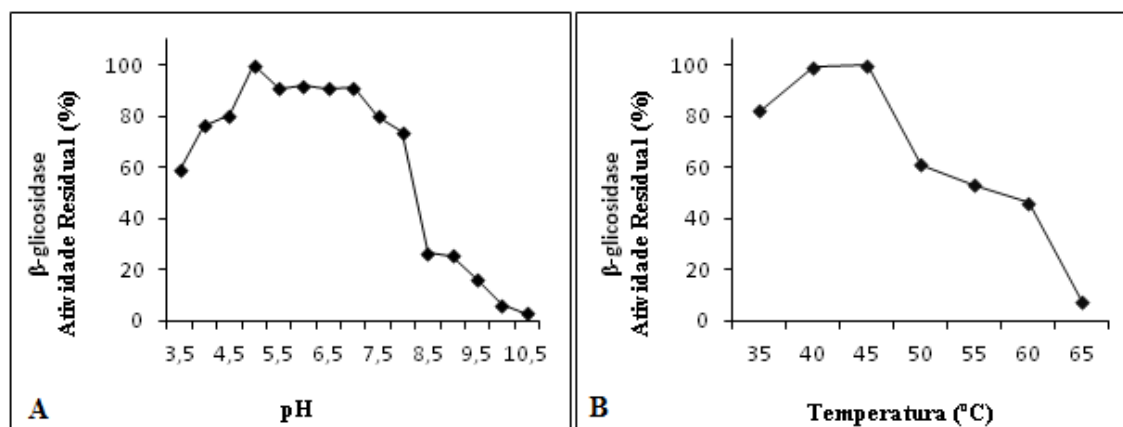


Figura 9 – (A) Estabilidade enzimática de β -glicosidase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de β -glicosidase em função da temperatura após 1 hora de incubação.

Yan et al. (1998) estudou a β -glicosidase extracelular de *Aspergillus niger* que permaneceu estável em temperaturas abaixo de 60°C por uma hora, ainda mantendo 50% da atividade original após 10 minutos a 70°C. Já a β -glicosidase de *Aspergillus sojae* foi inativada após 15 minutos a 65°C (KIMURA et al., 1999), enquanto que em *Cladosporium resinae* foi inativada 30 minutos a 60°C, mantendo aproximadamente 40% da atividade original após 30 minutos a 55°C (OH et al., 1999).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitem concluir que o fungo *Penicillium* sp. apresenta potencial para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em Cultivo em Estado Sólido tendo como substrato o farelo de trigo. O tempo para produção das enzimas foi relativamente baixo, entre 72 e 120 horas, características muito apreciáveis para a redução do custo de produção. Os resultados de estabilidade ao pH e temperatura demonstram que o conjunto de enzimas produzidas pelo fungo, apresentam características satisfatórias para aplicação em processos industriais, como na hidrólise da celulose para obtenção de etanol de segunda geração, sendo semelhantes ou melhores aos encontrados na literatura.

5. REFERENCIAS

- ALI, F. H; SAAD EL-DEI, H.S. Production and Partial Purification of Complex by *Aspergillus Níger* and *Aspergillus nidulans* on Water Hyacinth Blend. **Journal of Applied Sciences Research**, p. 875-891, 2008.
- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 161, p. 333–346, 2010.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba. v. 11, n. 2, p. 15-28, jul/dez. 2011.
- BASSO, T. P.; GALLO ,C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.
- BENTO, C. B. P.; CASARIL, K. B. P. B.. Bioconversão de resíduos agroindustriais ligninocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos. **Revista Faz Ciência, Unioeste**, v. 20, p. 151-180, jan/jun. 2012
- BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher LTDA, v. 3, p. 247-276, 2001.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação**

e mercado: Bioprocessos para produção de enzimas. Cap. 5. Interciência, Rio de Janeiro - RJ, 2008.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 1, 2001.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CYSNEIROS, C. S. S.; FERREIRA, R. N.; OLIVEIRA, M. A.; FAVORETTO, A. O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p. 426-435, out./dez. 2013.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87,

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P. β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: Study of their physic-chemical and biocatalytic properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 4929-4946, 2000.

DI LENA, G.; PATRONI, E.; QUAGLIA, G. B. Improving the nutritive value of wheat bran by a White rot fungi. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p.513-519, 1997.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, São Carlos, SP, p.15, 2008.

FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. C.; ROCHA, T. J.O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-213, abr./jun. 2011.

FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a β -glucosidase from solid state cultures of *Hemicola grisea* var. *thermoidea*. **Canadian Journal Microbiology**. v. 42, p. 1-5, 1996.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

- GONÇALVES, F. A.; LEITE, R. S. R.; RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E. J. S.; FONSECA, G. G. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.
- GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; DA VINHA, F. N.; SOUZA, D. T.; BISPO, A. S.; BON, E. P.; COELHO, R. R.; NASCIMENTO, R. P. *Aspergillus fumigates* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, v. 155, p. 321-329, 2009.
- HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 453-62, 2002.
- HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S., Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 48, p. 162-168, 2011.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZER, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3519-3525, 2005.
- KABEL, M. A.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; KLIP, G.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. B. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulose preparations towards plant materials. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 93, p. 56-63, 2005.
- KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.
- KAUR, J; CHADHA, B. S; KUMAR, B. A; SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v.98, p. 74-81, 2007.
- KIMURA, I.; YOSHIOKA, N. TAJIMA, S. Purification and characterization of a β -glucosidase with β -xylosidase activity from *Aspergillus sojae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, p. 538-541, 1999.
- KULKARNI, NEETA; SHENDYE, ABHAY; RAO, MALA. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

- LEE, K.; JEYA, M.; JOO, A.; SINGH, R.; KIM, I.; LEE, J. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p.206–211, 2010.
- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391–395, 2008.
- LI, ET AL. Individual roles of cellulose components derived for *Trichoderma viride*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 111, p.439-447, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.
- MUNIR, M. D.; KHAN, H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, M. D. Z. Use off fungi for the bioconversion of Rice straw into cellulose enzymes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. New York, v. 42, p. 381-386, 2007.
- NIEVES, R. A.; EHRMAN, C. I.; ADNEY, W. S.; ELANDER, R. T.; HIMEEL, M; E. Thechnical communication: survey and analysis of commercial cellulose preparations suitable for biomass conversion to ethanol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p. 301-4, 2009.
- OH, K. B.; HAMADA, K.; SAITO, M.; LEE, H. J.; MATSUOKA, H. Isolation and properties of na extracellular β -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 281-287, 1999.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.
- PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M.. Estudo do crescimento de *Aspergillus asiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. **Estudos Tecnológicos**, v. 6, n. 1, p. 22-35, jan/abr. 2010.
- SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z S.; FRANCO, M. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14; p. 1982, 2012.
- SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; ABREU FILHO, G.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau

(*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n.1, p.65-71, jan./mar. 2013.

SENTHILKUMAR, S. R.; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K.C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* FXN in solid state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1380-1386, 2005.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Processe Biochemistry**, v. 40, p. 1763-1771, 2005.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial Hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.219-228, 2003.

SHEN, F.; KUMAR, L. ; HU, J.; SADDLER J. N. Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8945–8951, 2011.

SIDDIQUI, K. S.; AZHAR, M. J.; RASHID, M. H.; RAJOKA, M. I. Stability and identification of the active-site residues of carboxymethylcellulases from *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica** v. 42, p. 312-318, 1997.

SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Improved cellulose production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.142, p.60-70, 2007.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD A.; SHAKEEL A.K. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437–441, 2009.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 277–283, 2010.

STROPARO, E. C., BEITEL, S. M., RESENDE, J. T. V., KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, nov./dez. 2012.

XIN, F.; HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 309–315, 2013.

YAN, T. R.; LIAU, J. C. Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, p. 591-594, 1998.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE OBTIDA PELO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Gongronella* sp. ISOLADO DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

RESUMO

As β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose liberando monômeros de glicose, podendo ser convertida em combustíveis não fósseis, como o etanol. Essas enzimas podem ser empregadas em diversos processos industriais, tais como, na hidrólise enzimática da celulose para a obtenção de açúcares fermentáveis, na indústria de vinhos e sucos, na obtenção de alimentos funcionais derivados de soja. O trabalho visou avaliar a produção e caracterização de β -glicosidase do fungo filamentosso *Gongronella* sp., recentemente isolado do solo do Cerrado sul-mato-grossense. Foram avaliados diferentes parâmetros de Cultivo em Estado Sólido, como: umidade, temperatura e tempo de cultivo. Os resultados apresentaram que o farelo de trigo foi o melhor substrato para produção β -glicosidade. As condições de cultivo contendo 55% de umidade inicial na temperatura de 30°C após 96 horas de inoculação foram mais expressivos para produção de β -glicosidase, apresentando cerca de 215,4 U/g (21,5 U/mL). A β -glicosidase apresentou maior atividade catalítica em pH 4,5 na temperatura de 65°C. A atividade enzimática original foi recuperada na faixa de pH 3,0-8,0 após 24 horas de incubação. A enzima manteve-se estável de 35 a 40°C, no período de uma hora de incubação. A β -glicosidase foi inibida significativamente em concentrações superiores a 10 mM de glicose e 25% de etanol. Os resultados permitem concluir que o microrganismo isolado é de interesse biotecnológico, principalmente por apresentar alta produção da enzima em meio de baixo valor agregado.

Palavras-chave: Enzima microbiana, resíduos agroindustriais, farelo de trigo.

ABSTRACT

The β -glycosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of cellobiose to glucose by releasing monomers, which can be converted to non-fossil fuels such as ethanol. These enzymes can be used in various industrial processes, such as the enzymatic hydrolysis of cellulose to obtain fermentable sugars in the wine and juice industry, to obtain functional foods derived from soy. The study evaluated the production and characterization of β -glucosidase from the filamentous fungus *Gongronella* sp. Recently isolated from soil of Cerrado sul-mato-grossense. Cultivation different parameters were evaluated in solid state, such as humidity, temperature and time of cultivation. The results showed that wheat bran was the best substrate for β -glucosidase production. The culture conditions containing 55% of water content in the temperature of 30°C after 96 hours of inoculation were more significant for the production of β -glucosidase, with about 215.4 U/g (21.5 U/mL). The β -glucosidase showed higher catalytic activity at pH 4.5 at 65°C. The original enzyme activity was recovered in the pH range 3.0-8.0 after 24 hours of incubation. The enzyme was stable 35 to 40°C within one hour incubation. The β -glucosidase was significantly inhibited at concentrations exceeding 10mM glucose and 25% ethanol. The results indicate that the isolated microorganism is of biotechnological interest, mainly due to high enzyme production amid low added value.

Keywords: Microbial enzyme, agro-industrial residues, wheat bran.

1. INTRODUÇÃO

A intensa atividade agrícola que o Brasil desempenha o torna um dos países que mais produzem resíduos agroindustriais (VILLAS BÔAS; ESPOSITO, 2000). A biomassa lignocelulósica tem sido considerada promissora devido à sua abundância, disponibilidade e baixo custo, considerada valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis (GALBE; ZACCHI, 2002; GOMEZ et al., 2008). O material que compõe toda parede celular vegetal constitui a biomassa lignocelulósica, que inclui três frações principais, celulose, hemicelulose e lignina (SOUSA, et al., 2009).

Devido à quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais, estes podem ser utilizados como matérias-primas para processos secundários. Neste contexto o Cultivo em Estado Sólido (CES) pode ser utilizado no aproveitamento desses resíduos visando a síntese de diversos compostos de valor agregado e de interesse industrial. Enzimas microbianas podem ser obtidas através do CES, os fungos filamentosos apresentam-se como os microrganismos mais promissores, pois possuem crescimento rápido e em baixos níveis de água, o desenvolvimento das hifas permite que eles colonizem e penetrem no substrato e na região porosa entre as partículas do substrato e baixo custo de cultivo (SANTOS et al., 2013).

A celulose é o principal constituinte da biomassa vegetal e a mais abundante na biosfera (SANCHEZ, 2009). É um homopolissacarídeo linear constituído por moléculas de glicose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), que resultam da perda de uma molécula de água. Sendo assim, as celulasas são as enzimas responsáveis pela hidrólise dos materiais celulósicos. Para liberação de açúcares fermentescíveis a partir da celulose é necessário um sistema enzimático celulolítico que consiste em pelo menos três grandes grupos de enzimas: a endoglucanase (EC 3.2.1.21) hidrolisa as cadeias de celulose internamente, principalmente nas regiões amorfas, resultando em uma rápida redução grau de polimerização da cadeia, a exoglucanase (EC 3.2.1.91) hidrolisa ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, liberando dímeros de glicose (celobiose) e a β -glucosidase (EC 3.2.1.21) tem propriedade de hidrolisar celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose (CARVALHO et al., 2009), reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA et al., 2002).

A β -glicosidase aumenta o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008). Por reduzir o efeito inibidor da celobiose sobre as outras enzimas celulolíticas, desempenha o controle da velocidade da reação, fazendo que esta enzima apresente grande potencial para a indústria de etanol (PARRY et al., 2001). Outra utilidade desta enzima é a sua capacidade de degradar antocianinas produzindo antocianidinas e açúcar livre. A aglicona resultante tem pouca cor e é menos solúvel que a antocianina, tendendo a ser rapidamente precipitada e facilmente removível durante a filtração. Isto é importante na indústria de sucos, porque evita a alteração na cor que ocorreria com a presença de antocianinas durante o processo de pasteurização do suco. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas β -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína). Estudos feitos mostraram que estas agliconas possuem possíveis ações benéficas à saúde humana, podendo contribuir no controle e prevenção de muitas doenças crônicas, tais como: câncer (mama, próstata e cólon), osteoporose, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras (LEITE et al., 2007; ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

A determinação das condições ótimas de cultivos são fatores importantes que afetam a produção de enzimas, e devem ser avaliados para a otimização de processos biotecnológicos. No entanto, o custo elevado de uma enzima é um dos principais fatores que determinam a economia de um processo. Aumentar a produtividade e reduzir os custos é fundamental para aplicações industriais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial para a produção de β -glicosidase em Cultivo em Estado Sólido a partir do fungo filamentoso *Gongronella* sp. isolado do solo do Cerrado Sul-mato-grossense, utilizando diferentes resíduos agroindustriais. Alguns parâmetros de cultivo foram variados, como: umidade, temperatura e tempo de cultivo, com o intuito de otimizar o processo. As características físico-químicas da β -glicosidase também foram avaliadas. O potencial catalítico do extrato enzimático foi testado com o objetivo de conhecer o perfil enzimático produzido pelo microrganismo e avaliar as possíveis aplicações industriais.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo utilizado

Neste trabalho foi utilizado um fungo filamentosamente recentemente isolado de amostras de solo do Cerrado Sul-mato-grossense identificado como *Gongronella* sp. pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da UNESP/Rio Claro, por técnicas de morfologia e biologia molecular. O microrganismo foi cultivado a 28°C em meio ágar Sabouraud Dextrose. Posteriormente ao crescimento foi mantido a 4°C.

2.2. Otimização da produção de β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES)

2.2.1. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agrícolas) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão.

2.2.2. Seleção do substrato para produção de β -glicosidase

Para produção da enzima foram testados diferentes substratos agrícolas: farelo de trigo, farelo de soja, casca e arroz, sabugo de milho e palha de milho. Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Todos os substratos foram umedecidos a 60% com solução nutriente (descrita anteriormente). Após a inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos a 28°C por 96 horas. O substrato que apresentou melhor produção da enzima foi adotado para a avaliação de outros parâmetros.

2.2.3. Temperatura ótima para a produção da enzima

Foram testadas cinco temperaturas: 20, 25, 30, 35 e 40°C. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g do substrato esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Os substratos foram umedecidos a 60% com solução nutriente. Após o período de inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos nas diferentes temperaturas por 96 horas. A temperatura ótima de produção da enzima foi adotada para a avaliação do próximo parâmetro.

2.2.4. Variação da umidade inicial do meio de cultivo

As umidades testadas foram de 50% a 80%, variando a cada 5%. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Os substratos foram umedecidos com solução nutriente. Após a inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos na temperatura ideal da enzima por 96 horas. A melhor umidade para a produção da enzima foi adotada para a avaliação do próximo parâmetro de cultivo.

2.2.5. Variação do tempo de cultivo

O tempo foi variado de 24 horas a 168 horas. A fermentação ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos esterilizados a 121°C durante 20 minutos. Os substratos foram umedecidos com solução nutriente. Após a inoculação do microrganismo, os frascos de erlenmeyer foram mantidos na temperatura ideal da enzima e retirados de 24 a 24 horas para extração enzimática.

2.3. Extração enzimática

Para a extração da enzima foi adicionado 50 mL de água destilada nos meios fermentados e mantidos em agitação em incubadora de agitação orbital (Shaker) por 1 hora a 160 RPM, em seguida foram filtrados utilizando tecido tipo voal para separar o meio sólido do extrato enzimático, e posteriormente centrifugados (15,000 x g/5 min). O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

2.4. Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela adição de 50 μ L do filtrado enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP β G, Sigma), reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação (LEITE et al., 2008).

2.5. Caracterização físico-química da β -glicosidase

2.5.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 a 8,0), nesta etapa foi utilizado tampão McIlvaine a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em temperaturas de 35 a 70°C, no pH ótimo da enzima. A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando-a por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH (3,0 a 10,5). Os tampões utilizados para o pH foram: McIlvaine 0,1M (3,0 a 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 a 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 a 10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura de 30 a 70°C. As atividades residuais foram mensuradas nas condições ótimas da enzima.

2.5.2. Efeito da glicose e etanol sobre a atividade da enzima

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de glicose e etanol, em diferentes concentrações na mistura de reação (0-35mM de glicose e 0-30% de etanol). Os ensaios foram realizados a 65°C para glicose e 45°C no etanol, em tampão acetato de sódio 0,1 M, no pH 4,5.

2.5.3. Avaliação do potencial catalítico do extrato enzimático

A atividade catalítica do extrato enzimático produzido pelo microrganismo foi testada em diferentes substratos aril-glicosídeos (p-NP- β -D-glicopiranosídeo, p-NP- β -D-xilopiranosídeo), dissacarídeos (celobiose) e polissacarídeos (carboximetilcelulose, xilana).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Otimização da produção de β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES)

3.1. Seleção do substrato para produção de β -glicosidase

Foram testados diferentes resíduos agroindustriais para produção de β -glicosidase pelo fungo *Gongronella* sp. A maior produção foi obtida nos cultivos em farelo de trigo em 60% de umidade na temperatura de 28°C, atingindo cerca de 221,7 U/g, após 96 horas de inoculação. Todos os outros resíduos agroindustriais não apresentaram significância comparados ao farelo de trigo, não sendo bons indutores para a produção de β -glicosidase, como visto na Tabela 1

Tabela 1 - Produção de β -glicosidase pelo fungo *Gongronella* sp. em diferentes substratos por Cultivo em Estado Sólido, em 60% de umidade, 28°C por 96 horas de cultivo.

Substratos	β -glicosidase (U/g)
Casca de arroz	0,13
Farelo de trigo	221,78
Farelo de soja	9,65
Palha de milho	2,26
Sabugo de milho	2,00

O farelo de trigo apresenta um suporte de nutrientes balanceado, rico em sais inorgânicos, nitrogênio e carbono, sendo considerado bom substrato para estudos de CES (CASTILHO et al., 2000; COURY et al., 2000; SINGH et al., 1999). Possui em sua composição cerca de 14% de proteínas, 27% de carboidratos, 6% de lipídeos, 5% de minerais e vitaminas do complexo B, esses valores podem variar, mas a complexidade

nutricional deste tipo de resíduo favorece o crescimento de muitos microrganismos e a produção de diversas enzimas de interesse industrial (HAQUE et al., 2002). Outros autores utilizaram o farelo de trigo como substrato em CES para produção de β -glicosidase (LEITE et al., 2008; SONI et al., 2010; GOLÇALVES et al., 2013.).

A produção de enzimas microbianas é diretamente dependente da natureza do substrato. O substrato considerado ideal é aquele que fornece tanto a fonte de carbono (energia) como a fonte de nitrogênio para o microrganismo, deve ser barato, disponível em ampla quantidade, facilmente processável e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas, bem como para uma possível hidrólise comercial posterior (PANDEY et al., 2003; KANG et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2005).

3.2. Temperatura ótima para a produção da enzima

O fungo *Gongronella* sp. apresentou maior produção de β -glicosidase quando cultivado na temperatura de 30°C, atingindo cerca de 220,6 U/g. Não apresentou crescimento microbiano e produção da enzima nos cultivos na temperatura de 40°C, como ilustrado na Figura 1. Esses dados indicam que tanto para crescimento quanto para produção da enzima, a melhor temperatura para o cultivo é 30°C, indicando a mesofilia do microrganismo.

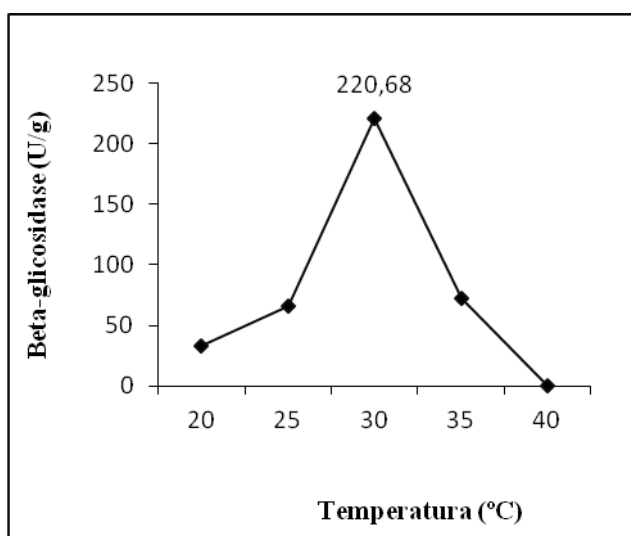


Figura 1 – Produção de β -glicosidase pelo fungo *Gongronella* sp. em função da temperatura por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, com 60% de umidade por 96 horas de cultivo.

Durante o processo de CES, uma grande quantidade de calor é gerado, no qual é diretamente proporcional as atividades metabólicas do microrganismo. Os materiais sólidos utilizados têm baixa condutividade térmica, portanto, a remoção de calor do processo pode ser muito lento. Às vezes, o acúmulo de calor é elevado, o que desnatura o produto formado. Nas fases iniciais, a temperatura e a concentração de oxigênio são as mesmas no meio, mas ao longo do processo, a transferência de oxigênio ocorre, resultando na geração de calor, mas a heterogeneidade do meio dificulta o controle da temperatura. Os cultivos efetuados em alta temperatura afetam o crescimento do microrganismo, a germinação dos esporos e a formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos e a outras reações bioquímicas, assim como a produção enzimática (PANDEY et al., 2003; PARIS et al., 2010).

Na maioria das vezes, a temperatura ótima para produção enzimática é a que corresponde à temperatura do habitat natural de onde o microrganismo foi isolado, não sendo regra, pois nem sempre a melhor temperatura de crescimento de um fungo é a melhor para produção enzimática (KHENG; IBRAHIM, 2005).

3.3. Variação da umidade inicial do meio de cultivo

Figura 2 apresenta a produção de β -glicosidase variando as concentrações de umidade, as maiores produções enzimáticas foram obtidas nos cultivos realizados em farelo de trigo contendo 55 e 60% de umidade, com pico de produção em 55% de umidade, cerca de 212,6 U/g, a medida que foi aumentada as concentrações da umidade, a atividade enzimática foi caindo, não apresentando produção significativa nos cultivos com 80% de umidade

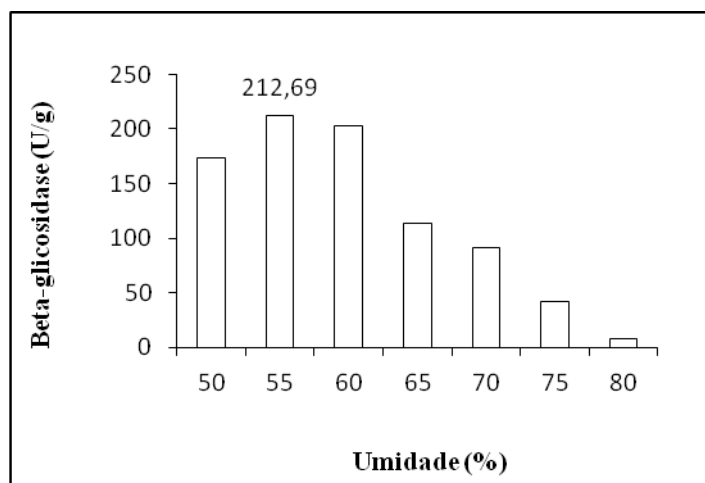


Figura 2 – Produção de β -glicosidase pelo fungo *Gongronella* sp. em função da umidade inicial do meio por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, por 96 horas de cultivo, em 28°C.

Dentre todos os parâmetros que mais influenciam o processo de CES, a água apresenta papel fundamental. A água é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular, o nível de umidade no meio são fatores importantes para o crescimento microbiano e a formação do produto de interesse (PANDEY, 2003; GERVAIS; MOLIN, 2003).

O nível de umidade varia de acordo com o ecossistema formado entre o microrganismo e o substrato, exercendo influência sobre o crescimento do microrganismo, sendo a umidade ótima dependente da natureza do substrato utilizado, das exigências do microrganismo e do produto final (KALOGERIS et al., 2003).

Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, à ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

3.4. Variação do tempo de cultivo

Na avaliação do tempo de cultivo, a atividade de β -glicosidase produzida pelo fungo *Gongronella* sp. se mostrou mais expressiva após 96 horas de cultivo, atingindo

cerca de 215,4 U/g (21,5 U/mL), caindo rapidamente a atividades após esse período, como visto na Figura 3.

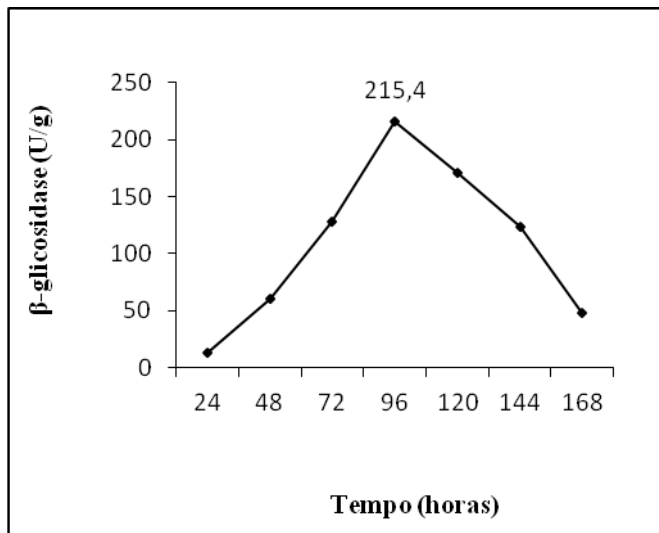


Figura 3 – Produção de β -glicosidase pelo fungo *Gongronella* sp. em função do tempo por Cultivo em Estado Sólido em farelo de trigo, com 55% de umidade, em 30°C.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura, mostrando que a enzima atingiu o máximo da produção em apenas quatro dias. A tendência de utilizar enzimas microbianas está relacionada com o baixo tempo necessário para sua produção, principalmente quando comparado com enzimas de origem vegetal e animal (OLIVEIRA et. al., 2006).

A queda na produção enzimática pode estar relacionada nas alterações do metabolismo do fungo durante o crescimento, juntamente com a limitação da quantidade de nutrientes que podem resultar em morte celular e posteriormente a desnaturação das enzimas (BON et al., 2008). Para Haq et al. (2004) a queda brusca da atividade enzimática pode ser devido ao rápido consumo do substrato na fase exponencial que resulta em falta do mesmo para manutenção da síntese enzimática.

Outros autores produziram a enzima β -glicosidase com outros microrganismos em diferentes substratos. Em seus estudos Gutierrez-Correa; Tengerdy (1998) obtiveram 55 U/g de β -glicosidase em CES utilizando farelo de trigo e bagaço de cana com *Trichoderma reesei* LM-UC4. No trabalho de Leite et al. (2008) relatam a produção de 13 U/g de β -glicosidase após 120 horas de Cultivo em Estado Sólido pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans* utilizando farelo de trigo como substrato.

Silva et al. (2013) utilizando o microrganismo *Lichtheimia ramosa* relatam produção de 0,061 U/mL de β -glicosidase utilizando pequi como substrato após 48 horas a 30°C. Golçalves et al. (2013) obtiveram com o microrganismo *Lichtheimia ramosa* produção de β -glicosidase de 17,26U/mL em farelo de trigo na temperatura de 35°C após 120 horas de cultivo. Na avaliação de Kang et al. (2004) a máxima atividade da enzima foi atingida quando cultivando em palha de arroz com o fungo *Aspergillus niger* KK2, 100 U/g e Gao et al. (2008) obteve 119 U/g de β -glicosidase produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* M11 utilizando como substrato resíduos de milho.

3.2. Caracterização físico-química da β -glicosidase pelo fungo *Gongronella* sp

3.2.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

Os testes para a caracterização físico-química da β -glicosidase obtida foram realizados utilizando o extrato bruto obtido pelo cultivo do fungo *Gongronella* sp. em farelo de trigo, em 55% de umidade na temperatura de 30°C por 96 horas de cultivo.

A enzima β -glicosidase apresentou um perfil típico de enzima acidofílica, o pico da atividade foi em pH 4,5, a partir do pH 5,0 sua função catalítica foi reduzindo drasticamente (Figura 4A). Em relação à temperatura ótima para a enzima, as melhores condições foram a 65°C (Figura 4B).

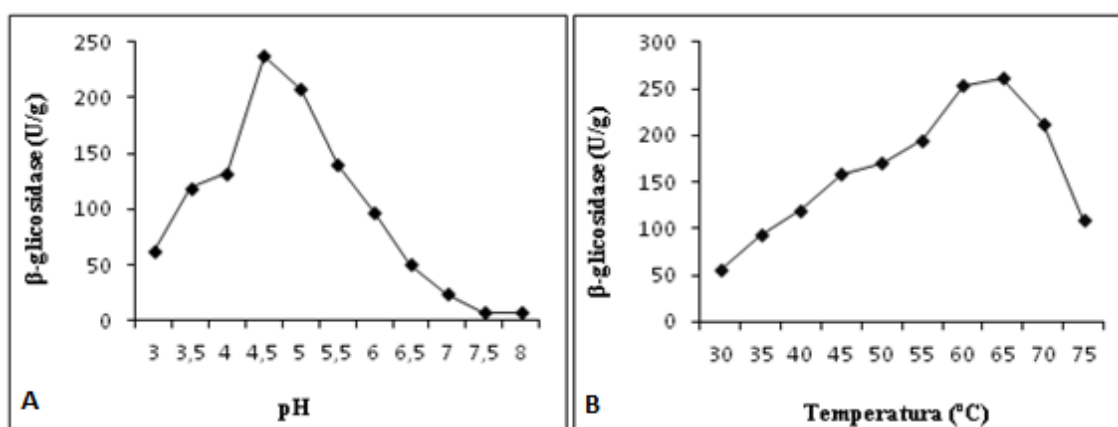


Figura 4 – (A) Atividade de β -glicosidase em função da variação do pH. (B) Atividade de β -glicosidase em função da variação da temperatura.

Zhang et al. (2006) obtiveram na avaliação enzimática do fungo *Aspergillus phoenicis* maiores produções em pH ácido (5,0) e em *Aspergillus niger* em pH entre 4,5 e 5,0 e com o fungo *Aspergillus oryzae* a maior atividade ocorreu quando o extrato foi incubado em pH 5,0. Lin et al. (1999) obteve a mesma temperatura ótima da β -glicosidase com o fungo *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. Workman; Day (1982) obtiveram atividade máxima de β -glicosidase em torno de 50°C em CES utilizando o extrato enzimático do fungo *Aspergillus terreus*. Camassola et al. (2004) obteve maior atividade de β -glicosidase entre 55 e 60°C.

A enzima β -glicosidase apresentou estabilidade estrutural em função do pH, mantendo sua atividade original após 24h de incubação entre os valores de pH 3,0-7,5, caindo significativamente em pH 8,0, como visto na Figura 5A. A β -glicosidase manteve-se estável até 45°C por 1 hora de incubação, restando somente 57,3% da atividade original na temperatura de 55°C e inativada a 70°C (Figura 5B).

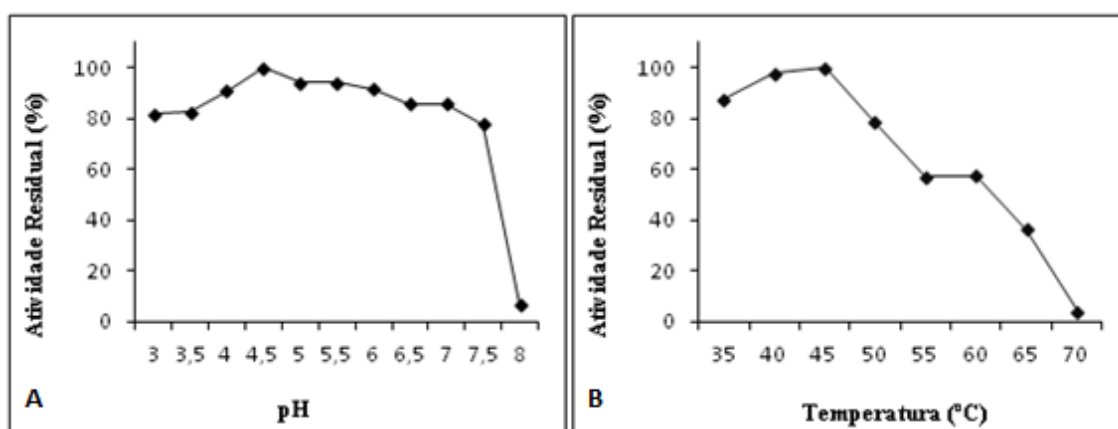


Figura 5 – (A) Estabilidade enzimática de β -glicosidase ao pH após 24 horas de incubação. (B) Estabilidade enzimática de β -glicosidase em função da temperatura após 1 hora de incubação.

Em dados da literatura a β -glicosidase produzida pelo microrganismo *Xylaria regalis* manteve aproximadamente 78% da atividade após 30 minutos a 50°C, com rápida inativação quando da pré-incubação por 30 minutos em temperaturas iguais ou superiores a 60°C (WEI et al., 1996). A β -glicosidase extracelular de *Aspergillus niger* permaneceu estável em temperaturas abaixo de 60°C por uma hora, ainda mantendo 50% da atividade original após 10 minutos a 70°C (YAN et al., 1998). A β -glicosidase extracelular de *Thichoderma harzianum* apresentou-se estável em temperaturas inferiores a 55°C por 15 minutos, mantendo 36% da atividade inicial após 15 minutos a

60°C (YUN et al., 2001). Já em *Trichoderma reesei* duas β -glicosidases extra celulares (I e II) mostraram-se estáveis em temperaturas de 55 e 60°C. Entretanto, após uma hora a 65°C, a β -glicosidase I reteve aproximadamente 40% da atividade inicial, enquanto que a β -glicosidase II foi inativada (CHEN et al., 1992). Lin et al. (1999) observaram que β -glicosidase do fungo *Thermomyces lanuginosus* manteve sua atividade total depois de 30 minutos de incubação a 50°C e inativada a 70°C.

3.2.2. Efeito do etanol sobre a atividade da enzima

A Figura 6 apresenta o efeito de diferentes concentrações de etanol (0-30%) sobre a atividade enzimática. A atividade observada sem adição de etanol foi tomado como 100% (controle). As concentrações próximas de 5% de etanol estimularam a atividade enzimática em relação ao controle, aumentando em cerca de 39% a atividade inicial da amostra. Com a presença de 15% etanol na mistura de reação, a enzima apresentou atividade catalítica relativamente idêntica ao controle, ou seja, não apresentou perda de sua atividade funcional. Quando a concentração foi aumentada para 25% de etanol foi recuperado 62% da atividade inicial, e com 30% de etanol restava 44% da atividade inicial.

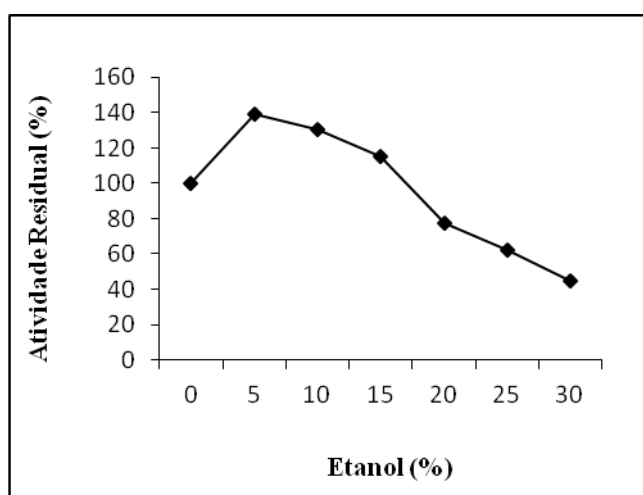


Figura 6 - Efeito da concentração de etanol sobre a atividade de β -glicosidase.

A inibição por alcoóis é estudo na avaliação de β -glicosidases, pois essas enzimas podem ser expostas a concentrações substanciais durante diversas aplicações industriais (SUN; CHENG, 2002). As características dessa enzima contribuem para seu

emprego em processos fermentativos para a produção de etanol, considerando que as concentrações finais de etanol dos caldos fermentados obtidos em processos tradicionais giram em torno de 10% (GUY et al., 2001).

O aumento da atividade enzimática pelo etanol pode estar associado com a atividade glicosil transferase. O etanol pode aumentar as taxas de reação atuando como aceptores preferenciais dos resíduos glicosil durante a catálise enzimática, substituindo a água na reação e dando origem a outros glicosídeos (VILLENA et al., 2006; LO et al., 1990; PÉREZ-PONS et al., 1995; BARBAGALLO et al., 2004). A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum, diferindo apenas na natureza do acceptor final (água ou outra molécula) (ZOROV et al., 2001; BHATIA et al., 2002), sendo que etanol parece associar-se melhor ao sítio ativo dessas enzimas do que a água (KURASHIMA et al., 2003). Por outro lado, o efeito contrário sobre a atividade enzimática em concentrações elevadas, deve-se, possivelmente, a decorrências na estrutura da enzima, ocasionando desnaturação ou modificações conformacionais devido a alteração na polaridade do meio (YAN et al., 1998; SUN; CHENG, 2002; BARBAGALLO et al., 2004).

3.2.3. Efeito da glicose sobre a atividade da enzima

Como ilustra a figura 7, a glicose mostrou ter efeito inibitório sobre a atividade da β -glicosidase, a enzima manteve 44,5% de sua atividade original em concentração de 15mM de glicose, sendo que em 25mM sua atividade apresentava-se em 31,6%. A maioria das β -glicosidasas microbianas é fortemente inibida por glicose (SONIA et al., 2008).

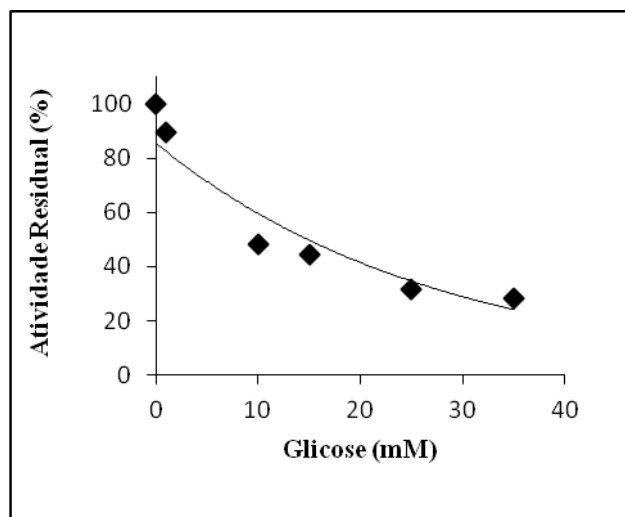


Figura 7 - Efeito da concentração de glicose sobre a atividade da β -glicosidase.

A tabela 2 mostra a atividade residual da enzima em diferentes concentrações de substrato, a atividade de β -glicosidase sem adição de glicose e utilizando pNP β G a 2mM foi tida como 100%. O resultado anterior, visto na figura 7, mostrou que a atividade da β -glicosidase foi inibida em concentração de 10mM de glicose, entretanto, quando a concentração do substrato (pNP β G) foi elevada para a mesma concentração do inibidor (glicose), a inibição da β -glicosidase foi completamente revertida, sendo assim, o tipo de inibição desta é competitiva, pois a enzima compete pelo mesmo sítio ativo do inibidor.

Tabela 2 - Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNP β G) e inibidor.

Enzima	At. Residual (%)	At. Residual (%)	At. Residual (%)	Tipo de Inibição
	pNP β G – 2mM	pNP β G – 2mM Glicose-10mM	pNP β G – 10mM Glicose – 10mM	
<i>Gongronella sp.</i>	100	48,68	107,78	Competitiva

A inibição competitiva pela glicose é uma característica comum das β -glicosidases, tanto vegetais quanto microbianas (YANG et al., 2004). A inibição competitiva pode ser revertida pelo aumento da concentração do substrato, no qual não pode ser visto na inibição não competitiva. Na inibição competitiva o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação da enzima (neste caso o sítio ativo), dessa forma, o aumento da concentração de substrato para valores iguais ou superiores

aos do inibidor, favorece a ligação da enzima ao substrato, refletindo na reversibilidade da inibição enzimática (CAMPBELL, 2000).

A característica de reverter o efeito inibitório do produto é apreciável em processos industriais. Para contornar a inibição pode-se utilizar duas estratégias distintas: adição periódica de substratos para manter a concentração superior aos níveis do inibidor (produto da ação enzimática), ou ainda, remover o produto formado pela ação enzimática (inibidor) para mantê-lo em concentrações inferiores ao do substrato. Nesta última, baseia-se o princípio dos processos de Sacarificação e Fermentação Simultânea onde os monossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática são convertidos em etanol por microrganismos fermentadores (BON et al., 2008).

3.2.5. Avaliação do potencial catalítico do extrato enzimático

A tabela 3 apresenta o potencial catalítico do extrato enzimático produzido pelo fungo *Gongronella* sp. com o intuito de conhecer o perfil enzimático produzido pelo microrganismo para possíveis aplicações industriais.

Dentre as enzimas do extrato bruto obtido, a produção de xilanase foi a que mais se destacou, alcançado 4.303,9 U/g, sendo a enzima CMCase que menos produziu, comparado com a xilanase se mostrou irrelevante, atingiu atividade de 13,90 U/g. Para a enzima β -xilosidase o valor máximo de atividade foi 28,4 U/g. A β -glicosidase produzida apresentou potencial para hidrolisar celobiose (substrato natural), e atingiu cerca de 55,9 U/g, apesar de ser mais eficiente para a quebra do substrato sintético (pNP β G), que apresentou maior produção, cerca de 188,8 U/g, essa característica pode ser justificada pela otimização do substrato sintético para o encaixe perfeito no sítio ativo da enzima.

Tabela 3 - Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por *Gongronella* sp.

Enzima	Substrato	U/mL	U/g
CMCase	Carboximetilcelulose	1,390	13,90
β -glicosidase	p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G)	18,88	188,8
β -glicosidase	Celobiose	5,59	55,9
Xilanase	Xilana	430,396	4.303,96
β -xilosidase	p-nitrofenil- β -D xilopiranosídeo (pNPX)	2,84	28,4

Dados da literatura trazem outros estudos sobre produção de xilanases que evidenciam os resultados obtidos nesse trabalho. Gutierrez-Correa; Tengerdy (1998) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato e obtiveram atividade de xilanase de 2.600 U/g em um cultivo misto de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*. Ruegger e Tornisielo (2004) obtiveram produção de xilanase de 32,8 U/g por *Trichoderma harzianum* em CES utilizando farelo de trigo como substrato. Ximenes et al. (1997) utilizando o microrganismo *Fumigatus fraserius* produziu 1,2 U/mL em farelo de trigo.

Extratos enzimáticos com alta produção de xilanase e livres da presença de celulasas podem ser utilizados pela indústria de papel e celulose, sendo uma das principais aplicações das xilanases como agente branqueador de polpa Kraft. Nesse processo, as celulasas podem atacar as fibras da celulose, comprometendo a qualidade final do papel (RUEGGER; TORNISIELO, 2002; XIN; HE, 2013). Após o processo de polpação Kraft, a polpa de celulose apresenta coloração escura derivada da presença residual da lignina e seus derivados, sendo necessário um processo de branqueamento da polpa sem que o teor de celulose seja reduzido. A hidrólise da xilana facilita remoção da lignina da polpa, reduzindo a utilização de reagentes químicos convencionais, sendo ecologicamente e economicamente mais favorável, pois não gera efluentes líquidos e reduz custos com produtos clorados. Além da xilanase ser livre de celulasas, ela deve ser resistente a alcalinidade e a altas temperaturas, sendo importante a caracterização enzimática para conhecer seu perfil físico-químico (DURAN et al., 2008; XIN; HE, 2013).

Por hidrolisar a xilana, as xilanases tornam a fibra mais acessível ao ataque das outras enzimas que participam na conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis (ÖHGREN et al., 2007), sendo essa etapa fundamental para produção de biocombustíveis (SUNNA; ANTRANKIAN, 1997). A β -glicosidase desempenha o controle da velocidade da reação e reduz o efeito inibidor da celobiose sobre as outras enzimas celulolíticas, assim aumenta o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (PARRY et al., 2001; WILSON, 2008). Xilanases e celulasas em sinergia podem ser utilizadas em processos de extração de óleos vegetais (RUEGGER; TORNISIELO, 2002) e como aditivos em rações animais para aumentar a digestibilidade e absorção dos nutrientes (POLIZELI et al., 2005).

Dentre as enzimas produzidas pelo microrganismo *Gongronella* sp. está a β -xilosidase, entre as aplicações dessa enzima pode-se destacar a produção de xilitol, utilizado pela indústria de alimentos, como adoçante natural e pelas indústrias farmacêutica e odontológica (POLIZELI et al., 2005).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que o microrganismo *Gongronella* sp. apresentou potencial para produção de β -glicosidase em Cultivo em Estado Sólido em meio de baixo valor agregado (farelo de trigo). A melhor temperatura para produção da enzima foi 30°C em 55% de umidade, que implica em menor risco a contaminação por bactérias. A maior produção de β -glicosidase foi alcançada com reduzido tempo de cultivo (96 horas). As características apresentadas pela enzima permitem inferir que a β -glicosidase produzida pelo fungo *Gongronella* sp. pode ser aplicada em processos industriais, como na hidrólise da celulose para obtenção de etanol de segunda geração, ou ainda na indústria de alimentos e bebidas. O extrato enzimático apresentou ótima atividade de xilanase e reduzida atividade de CMCase (celulase), o que estimula a continuidade do trabalho, visando sua aplicação em processos de branqueamento de polpa de celulose. Considerando ainda, que há poucos relatos sobre produção de enzimas por fungos do gênero *Gongronella*, este estudo contribui para a descrição de novas linhagens microbianas com potencial biotecnológico, visando a produção de enzimas de interesse industrial.

5. REFERENCIAS

BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, p. 58-66, 2004.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. Enzimas na Produção de Etanol. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-272, 2008.

CAMASSOLA, M.; BITTENCOURT, L. R.; SHENEM, N. T.; ANDREAUS, J.; DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, London, v. 22, p. 391-396, 2004.

CAMPEBELL, M. K. **Bioquímica** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 752, 2000.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CHEN, H.; HAYN, M.; ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1121, p. 54-60, 1992.

COURI, S.; TERZI, S. da C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; da COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, jun. 2000.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.(Eds). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, Editora Interciência, p. 205-239, 2008,

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas, **Revista de Nutrição**, v.14, n.1, Campinas jan./apr. 2001.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p. 618-628, 2002.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M. GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v. 178, p. 473-485, 2008.

GONÇALVES, F. A.; LEITE, R. S. R.; RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E. J. S.; FONSECA, G. G. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -

glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulose on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 665-667, 1997.

GUY.; QIAO M.; ZHOU Q.; ZHOU Z.; CHEN G. Hyperproduction of Alcohol Using Yeast Fermentation in Highly Concentrated Molasses Medium. **Science and Technology**, Tsinghua University, China, v. 6, n. 3, p. 225-230, 2001.

HAQ, I.; TASNEEM, M.; RAANA, K.; KHAN, A.; MUKHTAR, H.; JAVED, M. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Xylanase by Chemically Mutated Strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, p.1115-1118, 2004.

HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 453-62, 2002.

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

KALOGERIS. E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207–213, 2003.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.

KHENG, P. P; IBRAHIM, C. O. Xylanase production via solid-state fermentation. Songklanakarin, **Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 332, 2005.

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

LEITE, R.S.R., BOCCHINI, D.A., MARTINS, E.S., SILVA, D., GOMES, E., SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137, p. 281 - 288, 2007.

LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391 – 395, 2008.

- LIN J.; NDLOVU, L. M.; SINGH, S.; PILLAY, B. Purification and biochemical characteristics of beta-D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* - SSBP. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 30, p. 73- 79, 1999.
- LO, A. C.; BARBIER, J. R.; WILLICK, G.E. Kinetics and specificities of two closely related β -glucosidases secreted by *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.192, p. 175-181, 1990.
- ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicelluloses and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503–2510, 2007.
- OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.
- PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M.. Estudo do crescimento de *Aspergillus casingii* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. **Estudos Tecnológicos**, v. 6, n. 1, p. 22-35, jan/abr. 2010.
- PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemistry Journal**, v. 353, p. 117-127, 2001.
- PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Properties of a novel glucose-enhanced β -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1251, p. 145-153, 1995.
- PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters** . v, 24, p. 2104-2111, 2002.
- POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, (Mini-Review), v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F; FARINAS, C. S; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.

RUEGGER, M. J. S.; TORNISIELO, S. M. T. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 205-211, 2004.

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

SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; ABREU FILHO, G.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n.1, p.65-71, jan./mar., 2013

SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.

SINGH, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 420-425, 1999.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 277–283, 2010.

SONIA, K. G., CHADHA, B. S., BADHAN, A. K., SAINI, H. S., BHAT, M. K. Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 599–604, 2008.

SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. “Cradle-to-gate” assessment of existing lignocelluloses pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 339-347, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v.83, p. 1-11, 2002.

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v. 17, p.39-67, 1997.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço da maçã. **Biociência**, v. 14, p. 38-42, 2000.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; GUNDLLAPALLI, S. B.; OTERO, R. R. C.; PÉREZ, A. I. B. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme Microbial Technology**, v.39, p. 229-234, 2006.

- WEI, D. L.; KIRIMURA, K.; USAMI, S.; LIN, T. H. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the Wood-grown fungus *Xylaria regalis*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, p. 297-301, 1996.
- WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1125, n. 1, p. 289-297, 2008.
- WORKMAN, W. E.; DAY, D. F. Purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus terreus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, p. 1289-1295, 1982.
- XIMENES, F. A.; FONSECA, A. S.; XIMENES, E. A.; SILVEIRA, F. Q. P.; SILVA, C. H. C.; LUCENA, S. A.; RIBEIRO, W. R. C.; FILHO, E. X. F. Xylan-degrading enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi. Review of *Microbiology*, v. 5, p. 22-28, 1997.
- XIN, F.; HE, J. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 309–315, 2013.
- YAN, T. R.; LIN, Y. H.; LIN, C. L. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 431-437, 1998.
- YANG, L.; NING, Z. S.; SHI, C. Z.; CHANG, Z. Y.; HUAN, L. Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -Glucosidase from endophytic bacterium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1940–1944, 2004.
- YUN, S. I. et al. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, p. 2028-2032, 2001.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.
- ZOROV, I. N.; GUSAKOV, A. V.; BARAZNENOK, V. A.; BEKKAREVICH, A. O.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P.; KONDRAT'EVA, E. G. Isolation and properties of cellobiase from *Penicillium verruculosum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.37, p. 587-592, 2001.