

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA – UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DE FUNGOS
E ACTINOBACTÉRIAS ISOLADOS DE AMBIENTES BRASILEIROS**

LORENA BARBOSA VARJÃO

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO DE 2011**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS ISOLADOS DE AMBIENTES BRASILEIROS

LORENA BARBOSA VARJÃO

Engenheira Agrônoma
Universidade Estadual de Santa Cruz, 2008

Dissertação submetida ao colegiado do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador:

Rodrigo Pires do Nascimento, Dr. (CCAB/UFRB)

Nei Pereira Júnior, *PhD* (EQ/UFRJ)

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JULHO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

V299

Varjão, Lorena Barbosa.

Produção e caracterização de celulases de fungos e actinobactérias isolados de ambientes brasileiros / Lorena Barbosa Varjão. – Cruz das Almas, BA, 2011.

82f.; il.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.

Co-orientador: Nei Pereira Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Microorganismo do solo. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 631.46

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA – UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LORENA BARBOSA VARJÃO**

Dr. Rodrigo Pires do Nascimento
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
(Orientador)

Dr. Ricardo Sposina Sobral Teixeira
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dr. Helio Mitoshi Kamida
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

**Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia
Agrícola em _____**

Conferindo o Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1

CAPITULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES	4
1. Biomassa Lignocelulósica	5
1.1. Celulose	6
1.2. Hemicelulose	7
1.3. Lignina	7
2. Enzimas Lignocelulolíticas	8
3. Micro-organismos celulolíticos	11
3.1. Fungos celulolíticos	12
3.2. Actinobactérias celulolíticas	14
4. Aplicações Biotecnológicas das Celulases	16
5. Mercado Mundial de Enzimas	17
6. Resíduos Lignocelulósicos como Potencial Biotecnológico	19
7. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	21
8. Ambientes Brasileiros como Potencial Biotecnológico	23
8.1. Area de Proteção Ambiental do Pratigi (Ituberá/Ba)	23
8.2. Laguna de Araruama (RJ)	24
9. Fermentação submersa	25
10. Hidrólise enzimática	27
11. Otimização e Desenho experimental	28

CAPITULO 2

BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM SEDIMENTOS BRASILEIROS	31
RESUMO	32
ABSTRACT	33

Introdução	34
Materiais e Métodos	35
1. Isolamento e manutenção de fungos, leveduras e actinomicetos	35
2. Identificação Morfológica dos fungos filamentosos	36
3. Seleção dos micro – organismos celulolíticos	36
Resultados e Discussão	37

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DE CELULASES DAS ESTIRPES *PENICILLIUM* SP. SMFB -18 E *STREPTOMYCES ERYTHROGRISEUS* SP.....

RESUMO	48
ABSTRACT	49
Introdução	50
Materiais e Métodos	51
1. Manutenção dos micro-organismos	51
2. Preparo do Inóculo	51
3. Produção de Celulases em Fermentação Submersa em Frascos Agitados ..	52
4. Produção de Celulases em Fermentação Submersa em Bioreator	54
5. Pré-Tratamentos do bagaço de cana	55
5.1. Pré-Tratamento ácido do bagaço de cana	55
5.2. Pré-Tratamento alcalino do bagaço de cana	56
6. Ensaio Analítico	56
6.1. Atividade Carboximetilcelulase (CMCase)	56
6.2. Atividade β -glucosidase	57
6.3. Determinação do perfil ótimo de temperatura	57
6.4. Determinação do perfil ótimo de pH	57
Resultados e Discussão	58
1. Produção de Celulases em Fermentação Submersa em Frascos Agitados ...	58
1.1. <i>Penicillium</i> sp. SMFB 18	58
1.2. <i>Streptomyces erythrogriseus</i> IGAR 01	63
2. Caracterização Parcial dos Extratos Enzimáticos	66
2.1. Perfil ótimo de temperatura	66
2.2. Perfil ótimo de pH	67
3. Produção de Celulases em Bioreator	69

CONSIDERAÇÕES FINAIS 72

REFERÊNCIAS..... 74

AGRADECIMENTOS

A Deus, a minha família (a minha Mãe – Maria de Fátima Barbosa Varjão) e ao meu Amor, por serem essenciais em minha vida, por estarem comigo mesmo sem merecer, pelo apoio, sempre presente nas horas mais difíceis, pelo carinho e amor doados, pela paciência e cuidado.

Ao Professor Rodrigo Pires do Nascimento, meu orientador, pela paciência e orientação nos trabalhos conduzidos.

Aos colegas do Laboratório Zozilene, Aline, Jackeline e Mariza e todos do LABIOM, pela orientação, pelo convívio, pela ajuda nos trabalhos, pela paciência e pela motivação.

Ao Professor Jorge Teodoro de Souza, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela boa vontade de sempre e pela colaboração para minha participação em cursos e eventos.

Ao Prof. Nei Pereira Júnior e a todos do LADEBIO, pela orientação, pelos ensinamentos e ajuda nos trabalhos.

Ao Roberto Nobuyuki Maeda, Vanessa, Patrícia e ao Fernando pela amizade, orientação e ajuda nos trabalhos.

Ao Professor Francisco e sua esposa Carla, pela amizade, pela motivação e incentivo.

As irmãs Marilene, Elenilda, Nilvanice e a Ana Beatriz (Tia Aline), pela ajuda, sem a qual não teria conseguido finalizar meus trabalhos, obrigada.

A amiga Izabel e Sr. Jorge, pela a amizade e ajuda sempre.

As amigas Larissa e Elida, pela amizade.

Ao amigo Dr.Wenceslau, pelo incentivo e credibilidade.

A todos da Secretária da Pós-Graduação, Amália e Renata pela ajuda sempre.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por me conceder o título de Mestre.

RESUMO

Varjão, L. B. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS ISOLADOS DE AMBIENTES BRASILEIROS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial celulolítico de micro-organismos isolados de sedimento de mangue da Área de Proteção Ambiental de Pratigi, no município de Ituberá/BA e de sedimento arenoso da Lagoa de Araruama, Rio de Janeiro. Ao todo, foram isoladas 71 estirpes (31 fungos, 28 leveduras e 12 actinobactérias). Destes isolados, 22 fungos filamentosos, 11 leveduras e 8 actinobactérias apresentaram resultado positivo para atividade celulolítica (CMCase), detectada em placa de Petri após revelação com solução de Vermelho Congo 1%. A fermentação submersa foi conduzida utilizando como substratos indutores o bagaço de cana-de-açúcar e milhocina em meio de sais minerais. Foram utilizados dois micro-organismos para a produção de endoglucanases (CMCases): *Penicillium sp.* SMFB18 e *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01. A melhor atividade enzimática de CMCase produzida pelo *Penicillium sp.* SMFB18 foi de 5.500 U/L, obtida com 3,0% bagaço de cana e 0,5% milhocina ao fim de 4 dias de fermentação. A estirpe *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 apresentou 431 U/L de atividade CMCase em 3,4% bagaço de cana e 1,0% milhocina, ao fim de 2 dias de fermentação. De acordo com perfil de temperatura, a atividade enzimática do *Penicillium sp.* SMFB18 foi melhor na faixa de 50 a 60°C e para *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01, na faixa de 45°C a 50°C. Quanto a faixa de pH, foram obtidas as melhores atividades de CMCase em tampão citrato de sódio em pH 4,0 para os dois isolados em estudo. O micro-organismo mais promissor foi testado em biorreator a fim de obter uma melhora na produção de CMCase. A estirpe *Penicillium sp.* SMFB 18 foi inoculada em biorreator tipo Biostat Braun Biotech International de 4,0 L, contendo meio de cultivo de Mandels e celulignina semi deslignificada. Os ensaios ocorreram a 200 rpm e 30°C por 4 dias. A melhor atividade obtida de CMCase foi de 1.404 U/L após 92 h e 101U/L de atividade β -glucosidásica após 58h de fermentação em bioerator pelo *Penicillium sp.* SMFB 18. Ambos os micro-organismos apresentaram potencial para a produção de celulases.

Palavras-chave: *Penicillium sp.*, *Streptomyces erythrogriseus*, celulase, fermentação.

ABSTRACT

Varjão, L. B. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASES FROM FUNGI AND ACTINOMYCETES ISOLATED FROM BRAZILIAN ENVIRONMENTS

This study aimed to evaluate the potential of cellulolytic micro-organisms isolated from mangrove sediments of the Environmental Protection Area of the municipality of Pratigi Ituberá / BA and sandy sediment of Araruama Lagoon, Rio de Janeiro. In all, 71 strains were isolated (31 filamentous fungi, 28 yeasts and 12 actinobacteria). Of these isolates, 22 filamentous fungi, 11 yeasts and 8 actinobacteria were positive to cellulolytic activity (CMCase) detected in a Petri dish, after revelation with 1% Congo Red solution. The submerged fermentation was conducted using sugar cane bagasse and corn steep liquor as substrates inducing in the minerals middle. We used two micro-organisms for the production of endoglucanase (CMCase): *Penicillium* sp. SMFB18 e *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01. The best enzyme activity produced by *Penicillium* sp. SMFB18 was 5,500 U/ L of CMCase activity obtained with sugarcane bagasse 3.0% and corn steep liquor 0.5%, after 4 days of fermentation. The *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 strain showed 431 U/ L of CMCase activity with sugarcane bagasse 3.4% and corn steep liquor 1.0%, after 2 days of fermentation. According to the temperature profile of enzyme activity, *Penicillium* sp. was better in the range 50 to 60 °C and *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 in the range of 45 to 50 °C. The best pH range was obtained to CMCase activities in sodium citrate buffer pH 4.0 for both isolates in the study. The most promising micro-organism was tested in a bioreactor. The strain *Penicillium* sp. SMFB 18 was inoculated pre-plated in bioreactor Biostat Braun Biotech International (4.0 L) with culture medium containing Mandels and semi cellulignin at 200 rpm, 30 °C during 4 days. The best activity obtained to CMCase was 1,404 U/ L after 92 h and 101U/ L of β -glucosidase activity after 58h of fermentation in bioerator. Both microorganisms has potential for the production of cellulases.

Keywords: *Penicillium* sp., *Streptomyces erythrogriseus*, cellulase, fermentation.

INTRODUÇÃO

O constante crescimento da conscientização mundial sobre a limitação das fontes fósseis e áreas cultiváveis de alimentos tem estimulado diferentes linhas de investigação de novas tecnologias utilizadas na conversão de materiais lignocelulósicos renováveis em etanol combustível e/ou outros compostos. Diante deste panorama de busca de novas tecnologias energéticas limpas, os micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) surgem como potencial fonte de enzimas que podem ser utilizadas na geração de açúcares fermentáveis para a produção de etanol a partir de substratos como bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de sisal e outros substratos lignocelulósicos gerados pela agroindústria.

As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram positivas que apresentam uma imensa diversidade morfofisiológica e desempenham funções cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de ciclos. Eles têm sido descritos como os principais produtores de compostos bioativos no ambiente, entre os quais se destacam os antibióticos e as enzimas de interesse industrial e ambiental. Os fungos e as leveduras constituem uma classe de micro-organismos que apresentam uma ampla diversidade morfológica e bioquímica, capazes de assimilar um grande número de compostos orgânicos, o que amplia sua capacidade de dispersão e ocupação de diferentes nichos ecológicos, com ampla capacidade de utilização de diferentes substratos. Através de diferentes condições combinadas estatisticamente serão realizados estudos visando o melhoramento da produção de enzimas por micro-organismos.

As enzimas têm atraído uma crescente atenção devido ao seu potencial para o uso em diversas aplicações. Desta forma, estudar a produção de celulasas, objetivando a minimização dos custos de processo e visando sua comercialização é de grande valia para o mercado mundial de enzimas. Vários trabalhos vêm sendo realizados com estas enzimas no âmbito industrial, ambiental e agrícola, em especial na indústria de papel e celulose, têxtil, detergentes, biocombustível, aproveitamento de resíduos agro-industriais e promoção de crescimento em culturas agrícolas de importância econômico-social para a região. Um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações são as celulasas, que degradam a celulose, o maior carboidrato sintetizado pelos vegetais. As enzimas celulolíticas

são produzidas por uma gama de micro-organismos, principalmente os actinomicetos. Estes são importantes no processo de bioconversão, pois são capazes de colonizar diferentes substratos complexos e hidrolisar vários polímeros.

A produção de enzimas por processos fermentativos vem se destacando nas ultimas décadas, e muitas das enzimas comerciais são produzidas por fermentação submersa. Assim sendo, o presente trabalho visa o isolamento, a seleção e o cultivo de micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) de dois diferentes ambientes brasileiros, capazes de utilizar resíduos agroindustriais para produção de enzimas voltadas à geração de biocombustíveis a partir de processos fermentativos.

Desta forma, o primeiro capítulo deste trabalho faz um levantamento bibliográfico sobre a situação das estratégias de produção de celulasas, seleção de micro-organismos celulolíticos e a complexidade do material lignocelulósico.

No segundo capítulo deste trabalho, apresentam-se a importância de realizar a bioprospecção de micro-organismos em sedimentos de diferentes regiões, e avaliar o potencial biotecnológico com relação à produção de enzimas de interesse industrial e ambiental como as celulasas.

Dando continuidade, no terceiro capítulo foi selecionada a estirpe mais promissora quanto a produção de celulasas utilizando 2 substratos diferentes em fermentação submersa em biorreator através do planejamento fatorial completo 2^2 , com duas variáveis. Em seguida, foi feita a otimização do processo de produção enzimática para conduzir ao processo de caracterização enzimática obtendo, assim, as melhores condições de atividade da enzima, com relação a temperatura e pH.

Objetivo Geral:

Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de celulasas. E obtenção de celulasas utilizando resíduo agro-industrial (bagaço de cana de açúcar e celulignina semi-deslignificada) que possam ser usadas para a geração de açúcares para a produção de bioetanol de segunda geração.

Objetivos Específicos:

- Bioprospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico em diferentes sedimentos;
- Caracterização morfológica dos micro-organismos isolados;
- Estudo da produção de enzimas (celulasas) por micro-organismos (actinobactéria e fungo);
- Utilização de resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana-de-açúcar e celulignina semi-deslignificada);
- Uso do planejamento fatorial completo com duas variáveis para a avaliação do efeito de diferentes substratos de baixo custo, em diferentes concentrações, para produção de enzimas por duas estirpes de micro-organismo
- Determinação das melhores condições de temperatura e pH para as atividades enzimáticas no extrato bruto.

Capítulo 1

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E MICRO-
ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES**

1. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o principal recurso renovável disponível no meio ambiente (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). A lignocelulose forma a parede celular dos vegetais e é constituída de celulose (polímero de glicose com cerca de 44 % da biomassa lignocelulósica), hemicelulose (heteropolímero formado por pentoses, correspondendo cerca de 30 % da biomassa lignocelulósica) e lignina (macromolécula de origem fenólica) (BASTOS, 2007), como pode ser observado na Tabela 1. As propriedades químicas dos componentes da lignocelulose fazem dos substratos compostos de um enorme valor biotecnológico (MALHERBE e CLOETE, 2003), o que tem incetivado seu uso como fontes promissoras na produção de enzimas.

Tabela 1 – Conteúdo lignocelulósico de resíduos agrícolas e resíduos comuns.

Material Lignocelulósico	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Madeira “Hardwood”	40-55	24-40	18-25
Madeira “Softwood”	40-50	25-35	25-35
Sabugo de Milho	45	35	15
Palha de Trigo	30	50	15
Palha de Arroz	32.1	24	18
Semente de Algodão	80-95	5-20	0
Resíduo de Papel de Polpas Químicas	60-70	10-20	5-10
Gramíneas	25-40	25-50	10-30

Fonte: HOWARD et.al. (2003).

A celulose é muito rígida e podem ser encontrados em sua estrutura cerca de 8000–12000 moléculas de glicose conectadas por ligações β -1,4 (ARISTIDOU e PENTTILÄ, 2000; SAHA et al., 2004). As hemiceluloses são polissacarídeos não-celulósicos que são encontrados em tecidos vegetais, compostos de polímeros complexos de carboidrato, onde as xilanas e as glucomananas são os principais componentes (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997). Os polímeros de carboidratos que

fazem parte das hemiceluloses são compostos principalmente pelos açúcares D-glicose, D-xilose, D-manose, D-galactose, D-arabinose e D-ácido glicurônico (ROWELL et. al., 2005).

A lignina é um polímero altamente ramificado, composta basicamente de unidades de fenilpropano, acoplados de forma irregular, formando assim uma molécula tridimensional e amorfa. Esta estrutura cobre a celulose e hemicelulose (Figura 1), dando origem a uma barreira física que previne a penetração de soluções e enzimas (HOWARD et al., 2003).

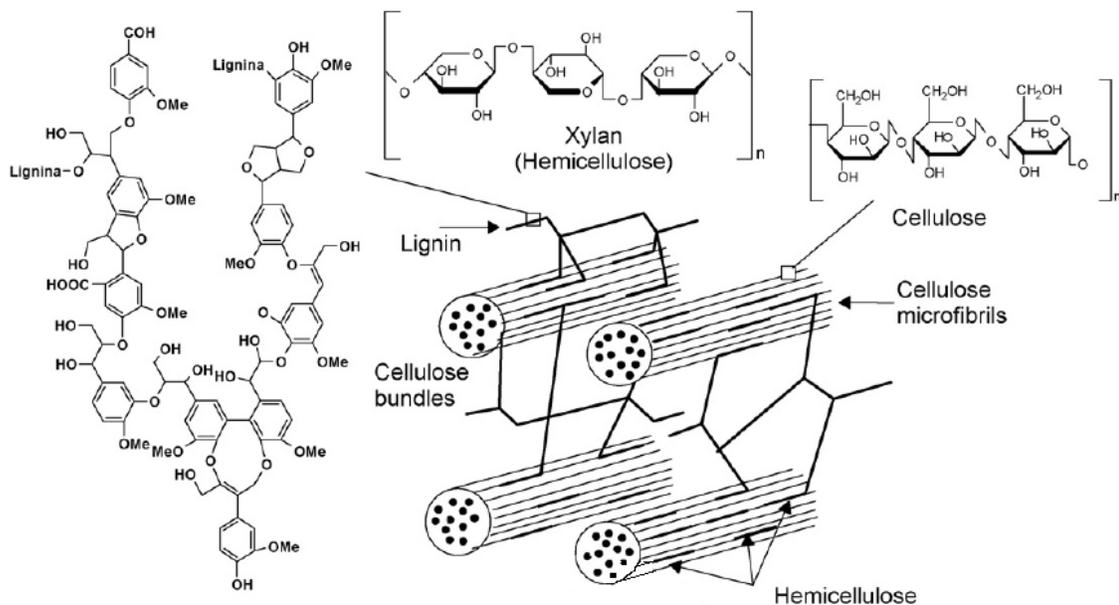


Figura 1 –Representação das fibras e seus componentes, microfibrilas de celulose, hemicelulose, e lignina. (Adaptado de Graminha et al., 2007).

1.1. Celulose

A celulose, o maior carboidrato sintetizado pelos vegetais, é um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-glicose, que interagem entre si por ligações β -1,4 mantendo uma estrutura linear e plana, sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose, a unidade repetitiva do polímero. A celulose é muito rígida, e podem ser encontrados em sua estrutura cerca de 4000–8000 moléculas de glicose. (ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

A decomposição da celulose parece depender da habilidade das enzimas responsáveis em penetrar entre as cadeias adjacentes da fibra. O ataque às fibras de celulose é realizado pelos micro-organismos celulolíticos por intermédio das celulases, que agem em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra perdeu seu aspecto reticulado (cristalino), em proveito de um aspecto mais frouxo e amorfo (BÉGUIN & AUBERT, 1994).

1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos não-celulósicos que são encontrados em tecidos vegetais, compostos de polímeros complexos de carboidrato, onde as xilanas e as glucomananas são os principais componentes. Em paredes celulares de plantas terrestres, a xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum, representando cerca de 20–40% do peso seco do vegetal sendo, depois da celulose, o polissacarídeo renovável mais abundante na natureza, com um alto potencial para a degradação em produto final utilizável (BÉGUIN & AUBERT, 1994; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

A maioria das xilanas ocorre como heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substitutos na cadeia do esqueleto principal e em cadeias ramificadas. As homoxilanas, por outro lado, consistem-se exclusivamente de resíduos de xilosil. Este tipo de xilana não é muito comum em ambientes naturais e tem sido isolada de alguns tipos de grama, em caule de tabaco e em casca da semente guar (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam numa abundância de enzimas xilanolíticas com variações na especificidade, nas seqüências primárias e tamanho, além das limitações destas enzimas pela especificidade ao substrato (COLLINS et al., 2005).

1.3. Lignina

A lignina, depois dos polissacarídeos, é a macromolécula mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É composta basicamente de unidades

fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, representando de 20 a 30 % da massa total do material lignocelulósico. O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular ou repetitiva e é sintetizada a partir da reação de três álcoois cinamílicos precursores, álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas (FENGEL e WEGENER, 1989).

A estrutura da lignina varia com a espécie. Certamente, sua estrutura randômica tem como objetivo, além da resistência mecânica, neutralizar ataques enzimáticos. A lignina, de fato, é extremamente difícil de dissociar, reflexo disso é o pouco conhecimento que se tinha a respeito da estrutura química da lignina até a década de 80 (FENGEL e WEGENER, 1989).

2. Enzimas Lignocelulolíticas

Nos últimos anos, têm-se observado um crescente interesse em sistemas enzimáticos microbianos que degradem o principal componente hemicelulósico em vegetais, a xilana. Os organismos procariotos hemicelulolíticos têm um papel fundamental na decomposição de materiais de origem vegetal, em especial as bactérias do gênero *Bacillus*, que têm sido frequentemente isoladas de solos, feno e adubos, dentre outros (DAHLBERG, et. al., 1993). Além disso, tanto bactérias aeróbicas quanto anaeróbicas podem degradar hemiceluloses presentes em efluentes de indústrias de papel e de celulose (CHEN et.al., 1997).

Na natureza, a conversão enzimática da celulose em glicose por microrganismos é um desafio que exige a produção de um complexo sistema enzimático composto por celulasas. Estas enzimas que coletivamente apresentam especificidade para as ligações glicosídicas β -1,4 são necessárias para a solubilização completa da celulose, existindo sinergismo na sua forma de atuar (MAEDA, 2010). As celulasas pertencem ao grupo das hidrolases O-glicosídeos (EC 3.2.1), que é um grupo comum de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre carboidrato e um composto não carboidrato. Na Tabela 2 estão apresentados os códigos das celulasas de acordo com a *Enzyme Commission* (E.C.), seus nomes oficiais, alternativos e especificidade da reação (NC - IUBMB, 2008).

Tabela 2 - Códigos e respectivas enzimas de acordo com *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*.

Código E.C	Nome oficial	Nomes alternativos	Reação catalisada
3.2.1.4	Celulase	Beta-1,4-endoglucan hidrolase; Beta-1,4-glucanase; Carboximetil celulase; Celodextrinase; Endo-1,4- β -D-glucanase; Endo-1,4- β -D-glucanohidrolase; Endo-1,4- β -glucanase; Endoglucanase.	Endohidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose e beta-glucanas.
3.2.1.21	β -glucosidase	Amigdalase; β -D-glucoside glucohidrolase; Celobiase; Gentobiase.	Hidrólise do terminal, β -1-4-D-glicosídeo com liberação de glicose
3.2.1.74	Glucan 1,4- β -glucosidase	1,4- β -D-glucan glucohidrolase; Exo-1,4-beta-D-glucosidase; Exo-1,4-beta-glucanase; Exo-1,4-beta-glucosidase.	Hidrólise de ligações 1-4 em β -D-glicanas com remoção sucessiva de unidades de glicose.
3.2.1.91	Celulose 1,4- β -celobiosidase.	1,4- β -celobiohidrolase; 1,4- β -D-glucan celobiohidrolase; Avicelase; Exo-1,4- β -D-glucanase; Exocelobiohidrolase; Exoglucanase.	Hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas em celulose e celotetraose, liberando celobiose

A degradação da celulose pelos micro-organismos depende da capacidade de produção de uma mistura complexa de enzimas: celulasas. Estas enzimas, que coletivamente apresentam especificidade para as ligações glicosídicas β -1,4, são necessárias para a solubilização completa da celulose, mesmo das regiões cristalinas, existindo sinergismo na sua forma de atuar (Figura 2) (BON, GÍRIO e PEREIRA Jr., 2008). Elas estão presentes em 13 dos 82 glicosídeos da família hidrolase identificadas pela análise da seqüência. As celulasas hidrolisam as ligações β -1,4-d-glucana em celulose e produzem como produtos primários celobiose a glicose e oligossacarídeos (SCHULEIN, 2000).

Esta é a hidrolase mais estudada devido ao complexo múltiplo enzimático composto de endo-glucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glucosidases (BGL). As endo-glucanases produzem polímeros de celulose expondo regiões redutoras e não - redutoras, as celobiohidrolases atuam sobre essas regiões redutoras liberando unidades de celo-oligossacarídeos e celobiose, as β -glucosidases clivam a celobiose para liberar glicose e, assim, completam o processo de hidrólise. O sistema completo, incluindo celulasas CBH, EG e

componentes BGL, portanto, atuam em sinergia para converter a celulose cristalina em glicose (SUKUMARAN et al., 2005).

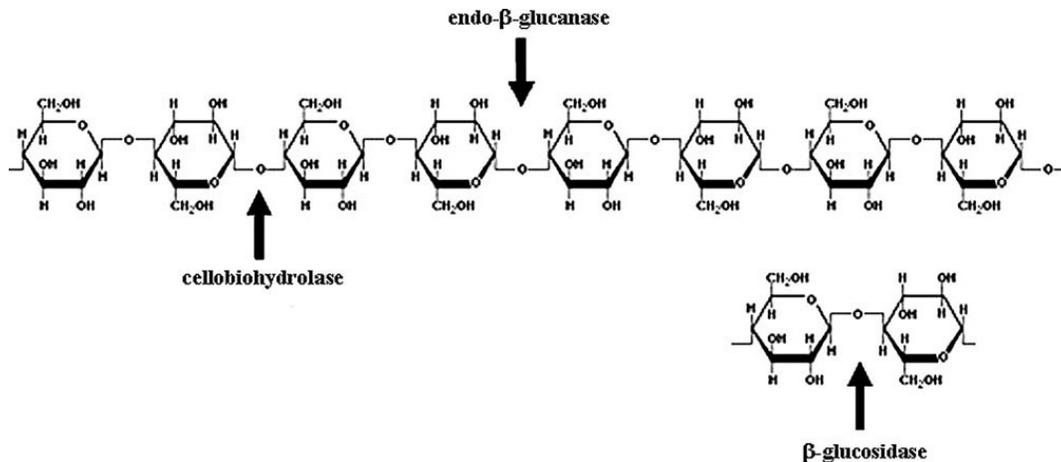


Figura 2 - Estrutura molecular da celulose e os sítios de ação da endoglucanase, cellobiohidrolase e β-glicosidase. Fonte: KUMAR et al., 2008.

As celulases usadas para a conversão de biomassa podem ser uma mistura de enzimas ou coquetel contendo endo e exo-celulases, xilanases, β-glicosidases, pectinases, etc, que podem variar para diferentes substratos, com base em sua composição. A eficiência hidrolítica de um complexo multi-enzimático para sacarificação da lignocelulose depende tanto de propriedades de enzimas individuais e sua relação no coquetel multi-enzima (GUSAKOV et al., 2007).

As celulases são, atualmente, as terceiras maiores enzimas produzidas na indústria mundial, por volume de dólares, devido às suas amplas aplicações em processamento de algodão, reciclagem de papel, na extração de suco, detergente, aditivos para alimentação animal. No entanto, as celulases podem se tornar o maior volume de enzima industrial, se o etanol de biomassa lignocelulósica obtido através da via enzimática tornar-se um grande combustível (NOVOZYME, 2010).

O complexo celulase ideal deve ser altamente ativo na matéria-prima da biomassa a qual se destina, completamente capaz de hidrolisar a biomassa, funcionar bem em pH levemente ácido, suportar processo de estresse, e ter uma boa relação custo-benefício (KNAUF, 2004). A produção de enzimas como

amilases, celulasas e as xilanases a baixo custo é de extrema importância para processos que requeiram sua utilização em larga escala. Estudos vêm sendo realizados com substratos indutores de baixo custo, visando minimizar o impacto dos custos da matéria-prima e do processamento na produção de enzimas (GODFREY & WEST, 1996; GODFREY, 2003).

Tem havido um crescente interesse mundial por um combustível suplente, fonte de energia sustentável, devido às reservas limitadas de combustíveis fósseis. A produção de etanol de biomassa lignocelulósica, através da rota biológica, parece muito atraente e sustentável devido a várias razões, entre as quais a natureza renovável e onipresente da biomassa e sua não competitividade com as culturas alimentares são os principais (NOVOZYME, 2010).

O sucesso de qualquer projeto de etanol lignocelulósico dependerá da capacidade de desenvolver tais sistemas de celulase. Ambas as abordagens têm sido experimentados com o sucesso, coquetéis enzimáticos foram desenvolvidos por *Trichoderma reesei*, misturando celulase com outras enzimas, incluindo as xilanases, pectinases e β -glucosidases, e estes coquetéis foram usados para a hidrólise de diferentes resíduos (XIN et al., 1993; BERLIN et al., 2007).

A caracterização das celulasas foi atingida por mutagênese dirigida (HANG, 2006). No entanto, o entendimento do mecanismo de degradação do substrato celulose cristalina natural, continua sendo um grande desafio. Existem vários desafios que ainda precisam ser superados, por exemplo, a recalcitrância da biomassa lignocelulósica, que exige a etapa de pré-tratamento para abrir as fibras e diminuição da cristalinidade da celulose, que por sua vez aumentam o custo da tecnologia de etanol lignocelulósico (SUKUMARAN, 2005).

Embora vários fungos filamentosos sejam capazes de produzir celulasas, a produção das enzimas e os níveis de todos os componentes das celulasas muitas vezes não são satisfatórios para a comercialização. Melhorias nos níveis de produção de celulase, bem como a capacidade de adequar as proporções de endo e exo-glucanases e β -glucosidase produzidas por organismos são altamente desejados para a conversão de biomassa. Uma publicação sobre o estudo do genoma do *T. reesei* revelou que, apesar de ser o melhor produtor de celulasas conhecido, o genoma do fungo contém menos celulasas e hemicelulasas do que outros fungos seqüenciados (KUMAR et al., 2008).

3. Micro-organismos celulolíticos

As celulasas são produzidas por um espectro de fungos e bactérias, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulasas em quantidades suficientes para solubilizar a celulose cristalina (BHAT e BHAT, 1997).

A capacidade dos micro-organismos em degradar polissacarídeos como a celulose é uma característica de considerável interesse, tanto em termos de ecologia microbiana como do ponto de vista da microbiologia industrial (TEATHER e WOOD, 1982).

De acordo com Bon et.al. (2008), o micro-organismo a ser considerado ideal para um processo de produção enzimática, deve apresentar as seguintes características:

- Ser seguro sob o ponto de vista biológico;
- Apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima;
- Suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica e a temperatura;
- Ser tolerante a presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

Vários micro-organismos são avaliados quanto à sua capacidade de degradar substratos celulósicos em monômeros de glicose; porém, são poucos os que apresentam potencial quanto à produção de celulasas (DAS et.al., 2007; YU et.al., 2007). Além disso, alguns micro-organismos secretam tanto endoglucanase ou β -glicosidase (componentes do complexo celulase). Apenas os organismos que produzem adequados níveis de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, seriam eficientes degradantes da lignocelulose (KUMAR et al., 2008).

3.1. Fungos celulolíticos

Fungos, actinobactérias e bactérias aeróbias, secretam celulasas principalmente como moléculas livres. A maioria das celulasas exploradas para aplicações industriais são aquelas de fungos filamentosos, tais como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, etc onde um grande número de celulasas é encontrado (LO et al., 2010; SIQUEIRA, 2010).

Embora a forma de crescimento dos fungos filamentosos cause dificuldades quando comparados às leveduras ou crescimento bacteriano, tecnologias eficientes têm sido desenvolvidos para os ácidos e antibióticos naturais juntamente liberados com as enzimas pelos fungos filamentosos (WIEBE, 2005).

Estes fungos filamentosos produzem complexos celulolíticos com todas as três classes de enzimas em diferentes proporções necessárias para a completa hidrólise da celulose. O *Trichoderma reesei* é um dos mais potentes produtores de celulases estudadas em detalhes. Ele produz duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II) e duas endo-glucanases (GE1 e GE2), numa proporção aproximada de 60:20:10:10, que juntas podem compor até 90% do coquetel de enzimas. Embora os fungos filamentosos sejam a principal fonte de celulases e hemicelulases, as cepas mutantes de *Trichoderma* incluindo *T. reesei*, *T. viride* e *T. longibrachium* são os melhores produtores conhecidos da enzima, também é sabido que estas espécies de *Trichoderma* têm um baixo nível de atividade β -Glucosidase (DUFF & MURRAY, 1996).

As celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos micro-organismos para que estes cresçam em celulose (KUBICEK *et al.*, 1993). Grande parte da produção industrial de celulases é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, os quais são eficientes produtores de enzimas hidrolíticas.

Entre os fungos que produzem celulases, a linhagem *Penicillium echinulatum* 2HH tem sido submetida a um programa de melhoramento genético com o intuito de aumentar sua capacidade secretora de celulases, tendo sido isolados mutantes com elevada capacidade celulolítica, equiparando-se às melhores linhagens relatadas na literatura (DILLON *et al.* 1992; ROCHA *et al.* 1999).

Existem micro-organismos que secretam sistemas enzimáticos com atividades balanceadas como no caso do fungo filamentoso *Penicillium funiculosum* (CASTRO, 2006; CARVALHO, 2007). Jorgensen e Olsson (2006) reportam que diversas espécies do gênero *Penicillium* têm previamente mostrado a habilidade de produzir sistemas enzimáticos completos e melhor relação entre as atividades FPásica e β -glucosidásica do que *Trichoderma reesei*, que é o micro-organismo mais utilizado em escala industrial.

Espécies de *Pleurotus* são relatados como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração de enzimas como celulases, β -glucosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (QINNGHE et al., 2004; PALMIERI et al., 2000).

Muitos destes micro-organismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo. As enzimas hidrolíticas têm papel fundamental nessa bioconversão e agem conjunta e sinergisticamente na formação de um complexo com várias enzimas, destacando-se: celobiohidrolases, endoglucanases, beta-glucosidases e xilanases (VALASKOVÁ & BALDRIAN, 2006).

Cada organismo ou estirpe tem o seu próprio requerimento de condições especiais para uma máxima produção de enzimas. *Stress* ambiental, tal como a depleção de nutrientes, composição do meio de cultivo, oxigênio dissolvido, íons H^+ , bem como a fase da cultura do inóculo, podem ter profundos efeitos na produção de qualquer enzima, inclusive as xilanases. Atualmente, estas enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente (BEG et al., 2003).

3.2. Actinobactérias celulolíticas

As actinobactérias são bactérias Gram positivas que apresentam um DNA rico em guanina e citosina (G+C > 72%, no gênero *Streptomyces* e G+C de 64 a 72% no gênero *Nocardia*) possuindo a capacidade de formar filamentos em algum estágio de seu desenvolvimento (LEBLOND & DECARIS, 1994).

As colônias de actinobactérias são formadas por uma massa de hifas, constituindo o micélio. Essa massa é formada a partir do desenvolvimento inicial de esporos, esporângios ou fragmentos de hifas em meio sólido, constituindo primeiramente o micélio vegetativo, de caráter hidrofílico. Crescendo verticalmente, algumas estirpes de actinobactérias diferenciam seu micélio vegetativo em micélio

aéreo, de caráter hidrofóbico, o que provoca uma alteração nas características morfogênicas, fisiológicas e ultraestruturais (VOBIS, 1997).

Estes micro-organismos se encontram distribuídos no solo, águas e outros ambientes, porém o solo é o seu habitat mais comum (GOODFELLOW & CROSS, 1984). Eles têm sido descritos como os principais produtores de antibióticos no solo e também como um dos principais grupos microbianos produtores de enzimas de interesse comercial.

Além disso, exercem um papel importante na ciclagem de compostos orgânicos nos ambientes naturais e desempenham um papel promissor na agricultura, visto que alguns gêneros como *Frankia* são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico em plantas não-leguminosas (GOODFELLOW et al., 1988).

A instabilidade genética é uma característica bastante encontrada nas actinobactérias, podendo a frequência de mutação chegar a pelo menos 1 em cada 10^3 células no gênero *Streptomyces*. Assim sendo, a maioria das características fenotípicas relacionadas à diferenciação e metabolismo secundário são geneticamente instáveis, tais como: formação de micélio aéreo, pigmentação, esporulação, resistência a agentes genotóxicos e resistência e/ou produção de antibióticos e enzimas (LEBLOND & DECARIS, 1994).

Por muitos anos, as actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*, foram conhecidos como sendo os principais micro-organismos produtores de antibióticos (SANGLIER et al., 1993, KIM et al., 2000). A heterogeneidade bioquímica das actinobactérias, sua diversidade ecológica e sua capacidade para a produção de metabólitos secundários os fazem um bom alvo para a produção de enzimas.

Os *Streptomyces* fazem parte do gênero mais importante no grupo Actinobacterial, e são capazes de produzir e excretar uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na degradação da celulose, hemicelulose e lignina. A microbiologia de solos tropicais do Brasil é praticamente desconhecida, oferecendo excelentes habitats inexplorados para a bioprospecção de novas espécies e enzimas pertencentes a este grupo muito promissor. Atividade endoglucanásica foi encontrada em várias espécies de *Streptomyces* (SHREMPF & WALTER, 1995; JAN & CHEN, 2003; LIMA et. al., 2005). *Streptomyces* são actinobactérias produtores de um grande número de antibióticos e de outros

compostos como enzimas, incluindo aquelas que apresentam importância industrial na degradação de material lignocelulósico (JAN & CHEN, 2003).

4. Aplicações Biotecnológicas das Celulases

A utilização biotecnológica de celulases começou em 1980, primeiro na indústria de ração animal seguido de aplicações na indústria alimentícia. Posteriormente, estas enzimas foram utilizadas nas indústrias têxteis e lavanderia. Outras áreas incluem a indústria de papel e celulose, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT e BHAT, 1997). Hoje, estas enzimas são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas principalmente as produzidas pelos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000).

As celulases podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias em conjunto com as hemicelulases e pectinases, na extração e clarificação de sucos de fruta e vegetais. Após o prensamento, centrifugação e filtração das frutas, essas enzimas são utilizadas para clarear o suco e aumentar a liquefação através da degradação da fase sólida que é gerada. O processamento enzimático aumenta o rendimento do suco, reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade do produto (BHAT, 2000).

Na indústria têxtil, as celulases têm alcançado um sucesso mundial, devido sua capacidade de modificar fibras celulósicas em um ambiente controlado e de forma desejada, melhorando a qualidade dos tecidos (BHAT, 2000). Elas atuam eliminando microfibrilas superficiais, deixando os tecidos mais lisos, evitam a formação de *pilling* e atuam desbotando jeans, para que obtenham um aspecto de tecido usado (ANDREAUS e CAVACO-PAULO, 2008). Processos como bioestonagem e biopolimento são os mais conhecidos neste setor industrial (VYAS et. al., 2006). As celulases também estão sendo utilizadas em produtos de lavagens, auxiliando na remoção da sujeira, melhorando a aparência, brilho e cor dos tecidos (CAVACO-PAULO, 1998). Sobretudo, as celulases utilizadas com este fim, devem ser estáveis em valores extremos de pH e temperatura (GEORGE et.al., 2001). Atualmente, esse setor representa o maior mercado dessas enzimas em todo o mundo.

Outra importante área é a de tratamento de resíduos lignocelulósicos, que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de etanol, fabricação de papel, preparo de adubo para o cultivo de cogumelos comestíveis e diretamente na alimentação animal (SÁNCHEZ, 2009). A bioconversão destes por ação de enzimas tem sido mais utilizada para conversão em glicose e posterior fermentação na produção de combustíveis (HOWARD et.al., 2003). Muitas pesquisas têm sido feitas na busca de um combustível alternativo que utiliza métodos biológicos por causa dos seus benefícios ambientais.

5. Mercado Mundial de Enzimas

Historicamente, a demanda por enzimas tem-se concentrado em mercados mais desenvolvidos devido ao alto valor agregado das enzimas, e aos recursos técnicos necessários para a produção, desenvolvimento e aplicação das enzimas. No entanto, nota-se que existem mercados emergentes em países em desenvolvimento, que poderão apresentar as maiores taxas de crescimento (FREEDONIA, 2005).

O mercado mundial de enzimas industriais está dividido em dois grandes segmentos: enzimas (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, para diagnóstico, para química quiral e para pesquisa). Em termos percentuais, as enzimas de uso industrial representam mais de 60 % do mercado mundial de enzimas (BON, et.al., 2008).

A demanda mundial de enzimas cresceu a um ritmo de quase dois dígitos de 2003 para 2008, com ajuda, em grande parte, do aumento rápido dos preços mundiais de energia (produzida por processos enzimáticos e produtos relacionados com melhor custo-benefício e facilitou a legislação de uma rápida expansão do mercado de etanol combustível (sobretudo nos Estados Unidos) e o sucesso do lançamento de vários produtos farmacêuticos que contêm enzimas. O mercado de enzimas tem se tornado muito mais desafiador, desde então, e o crescimento será moderado daqui para frente. (FREEDONIA, 2009).

A procura de celulasas está consistentemente em alta, devido à suas diversas aplicações. Existem várias empresas envolvidas na produção de celulasas

para indústrias de detergente, têxtil, indústrias de papel etc (Tabela 3). Globalmente, existem duas grandes empresas conhecidas para produção de celulases para a conversão da biomassa "Genencor" e "Novozyme". Ambas as empresas tem desempenhado um papel significativo na redução do custo de celulase pelas suas diversas finalidades (GENENCOR, 2010).

Tabela 3 – Celulases comerciais produzidas por empresas e suas fontes

ENZIMAS	EMPRESA	FONTE
Cellubrix	Novozymes, Denmark	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>A. niger</i>
Novozymes 188	Novozymes	<i>A. niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco (Vinay, France)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Rohament CL	Rohm – AB Enzymes (Rajamaki, Finland)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic (Jupiter, USA)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Multifect CL	Genencor Intl. (S. San Francisco, CA)	<i>T. reesei</i>
Bio – feed beta L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Energex	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Ultraflo L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Viscozyme L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Cellulyve	50L Lyven (Colombelles, France)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
GC 440	Genencor-Danisco (Rochester, USA)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
GC 880	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Spezyme CP	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
GC220	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Accelerase ® 1500	Genencor	<i>T. reesei</i>
Cellulase AP30K	Amano Enzyme	<i>A. niger</i>
Cellulase TRL	Solvay Enzymes (Elkhart, IN)	<i>T. reesei</i> / <i>T. longibrachiatum</i>
Econase CE	Alko – EDC(New York, NY)	<i>T. reesei</i> / <i>T. Longibrachiatum</i>
Cellulase TAP106	Amano Enzyme (Troy, VA)	<i>T. viride</i>
Biocellulase TRI	Quest Intl. (Sarasota, FL)	<i>T. reesei</i> / <i>T. Longibrachiatum</i>
Biocellulase A	Quest Intl.	<i>A. niger</i>
Ultra – low microbial (ULM)	logen (Ottawa, Canadá)	<i>T. reesei</i> / <i>T. Longibrachiatum</i>

Fonte: R.R. SINGHANIA et al.

A pesquisa ativa continua a reduzir o custo por adoção de tecnologias inovadoras. Recentemente, a Genencor lançou a Accelerase 1500 ®, um complexo

de celulases especificamente destinadas às indústrias lignocelulósicas de transformação de biomassa (GENENCOR, 2010). Alega-se ser mais custo-efetiva e eficiente para a indústria de bioetanol do que a sua predecessora a Accelerase® 1000. A Accelerase® 1500 é produzida por uma cepa geneticamente modificada de *T. reesei*. Esta preparação enzimática contém níveis mais elevados de atividade β -glucosidase que todas outras celulases comerciais hoje disponíveis, de modo a assegurar quase a conversão completa de celobiose em glicose (GENENCOR, 2010).

A Genencor também lançou a Accelerase® xilanase XY um complexo enzimático acessório que melhora a conversão da xilana em glucana, quando misturados com outros produtos enzimáticos (GENENCOR, 2010). Além disso, a Accelerase® BG é um acessório da enzima β -Glucosidase que aumenta a conversão da glucana quando misturado com produtos da celulase (GENENCOR, 2010).

6. Resíduos Lignocelulósicos como Potencial Biotecnológico

Anualmente, o uso da biomassa (alimentos, combustíveis, fibras, materiais de construção e muitos outros produtos) gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, tais como resíduos agrícolas, resíduos de madeira florestal, obtidos após processamento em indústrias madeireiras, resíduos da indústria papelreira, restos e resíduos do processamento alimentar e resíduos urbanos sólidos. Uma variedade de problemas ambientais e sociais e a compreensão de que fontes fósseis são limitadas, têm estimulado investigações adicionais de novas tecnologias para converter materiais lignocelulósicos renováveis em etanol combustível e/ou outros substituintes do petróleo, levando em consideração ser essa uma fonte alternativa de energia (INGRAM & DORAN, 1995; ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

Cerca de $2,9 \times 10^3$ milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos estão disponíveis a partir de culturas de cereais e 3×10^3 milhões de toneladas de produção de óleo a partir de sementes. Também $5,4 \times 10^2$ milhões de toneladas

são produzidas anualmente a partir de lavouras em todo o mundo (FAOSTAT, 2006).

A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem e, no caso de materiais agro-industriais, depende também da idade, do período do ano no momento da colheita do material e da região. Na Tabela 01, apresentam-se algumas fontes de material lignocelulósico e sua composição básica.

O bagaço é o resíduo sólido remanescente após o esmagamento da cana para extrair o suco a ser usado para o açúcar ou produção de etanol. O açúcar é extraído para produção de etanol no Brasil, gerando uma enorme quantidade de bagaço. Durante a safra 2008/2009 mais de 629 milhões de toneladas de cana foi esmagada, o que gerou cerca de 229 milhões toneladas de resíduos sólidos (CONAB, 2009).

O bagaço de cana é utilizado atualmente como a principal fonte da energia necessária para usinas de açúcar e destilarias de etanol e também para a geração de eletricidade a ser vendida para as redes. No entanto, uma parte importante da produção do bagaço é subutilizada. É bem relatado que, com os melhoramentos tecnológicos realizados nas caldeiras, é possível satisfazer as necessidades energéticas das plantas com apenas metade do bagaço produzido. O excedente de bagaço pode ser usado em mais de quarenta diferentes aplicações, como produção de etanol, de celulose e papel, painéis, ração animal e furfural (GÁLVEZ, 2000).

A utilização integral dos componentes do bagaço é desejável tanto para as razões econômicas quanto as ambientais. O bagaço de cana, bem como outros tipos de biomassa vegetal, é composto por celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de sais minerais. Os componentes estruturais são distribuídos em uma estrutura lamelar (FENGEL et al., 1989).

A hidrólise é crucial para a conversão do bagaço de polissacarídeos, principalmente de celulose em produtos valiosos. No entanto, o forte arranjo cristalino de celulose e os efeitos protetores da lignina e hemiceluloses dificultam o acesso das enzimas e catalisadores ácidos para a β 1-4 ligações glicosídicas, que constitui um sério obstáculo à hidrólise (CANETTIERI et al., 2007).

A fim de facilitar a hidrólise da celulose, diferentes tipos de pré-tratamentos

físicos, químicos e físico-químicos têm sido propostos. O pré-tratamento e processos de deslignificação são destinados a romper o complexo celulose–hemicelulose–lignina, e eles são importantes etapas tecnológicas para o fracionamento de materiais lignocelulósicos em seus componentes principais para a sua utilização de acordo com os processos da biorefinaria (SAAD; USAMA 2008).

A conversão da maioria dos materiais lignocelulósicos a álcool a partir da celulose requer pré-tratamento antes da hidrólise deste polissacarídeo ser realizada. O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os microorganismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subseqüentes. Dentre os vários métodos de pré-tratamento, os mais comumente utilizados são pirólise, Steam explosion, Amomnia fiber explosion, CO₂ explosion, ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organosolv (SUN & CHENG, 2002).

7. Pré–tratamento da biomassa lignocelulósica

O desenvolvimento de processos de pré-tratamentos fortes o suficiente, como separar o arranjo da parede celular, e leves o suficiente como para evitar uma degradação significativa química dos componentes da biomassa é um desafio para a indústria química de hoje. Para utilização de métodos de pré-tratamento é aconselhável usar produtos químicos baratos e facilmente recuperáveis e equipamentos de baixo custo. O uso de tecnologias ambientalmente amigáveis e de baixo consumo energético é altamente desejado. Processos de pré-tratamento tradicionais são intensivos, destrutivos e não suficientemente eficientes (CANETIERI, 2007).

Recentemente, métodos inovadores capazes de separar os três principais componentes poliméricos da biomassa lignocelulósica e celulose como decristalinização, alteração química mínima de hemicelulose e lignina tem sido investigado (YANG & WYMAN, 2006).

O ácido sulfúrico é o ácido mais utilizado no pré-tratamento do bagaço de cana (LAVARACK et al., 2002), mas outros reagentes, tais como clorídrico, os ácidos nítrico e fosfórico também podem ser usados. (RODRÍGUEZ et al., 2004; GÁMEZ et al., 2006).

Métodos de pré-tratamento também necessitam variar a partir de biomassa com base em sua composição característica (HENDRIKS, 2009). Para o desenvolvimento de uma economia viável, o uso de matérias-primas mais baratas como substrato para produção de celulases poderia diminuir os custos de produção (SUKUMARAN, 2005). Também eliminando as etapas de processamentos posteriores da enzima para bioconversão podem ajudar a reduzir o custo das celulases, com a melhoria das atividades específicas, temperatura e tolerância a pH baixo. A maioria das celulases comerciais disponíveis é produzida a partir *T. reesei* e *Aspergillus niger*, mas falta quantidade suficiente de β -glucosidase do *T. reesei* para realizar uma hidrólise adequada e completa (GUSAKOV, 2007). Assim, a celobiose acumulada devido a uma conversão incompleta causada pela limitação de β -glucosidase inibe as exo e endo-glucanases. As β -Glucosidases também estão sujeitas ao produto de inibição da glicose para além de certos níveis, que variam entre diferentes preparações e as fontes da enzima (SUKUMARAN et al., 2005).

Uma forma para resolver este problema é adicionar uma quantidade de glicose tolerável a β -glucosidase a mistura da reação contendo celulase e outros componentes e empregar este coquetel para a hidrólise da biomassa, aumentando a eficiência de hidrólise (SUKUMARAN, 2005). Há vários relatos disponíveis onde um coquetel de enzimas tem sido empregado com sucesso para conversão de biomassa (ZHANG et al., 2006; PARK et al., 2009; SINGH 2009; SUKUMARAN, 2009).

As características desejáveis do preparado de celulase para a bioconversão, são características como maior eficiência catalítica na insolubilidade de substratos celulósicos, maior estabilidade a temperaturas elevadas e a um determinado pH e tolerância mais elevada até o produto final da inibição, para a conversão de biomassa (MAKI et al., 2009).

Celulases ácidas são geralmente mais desejáveis para a bioconversão, desde que em situações em que o pré-tratamento ácido da biomassa seja empregado ou quando a enzima tem que trabalhar em um coquetel com enzimas

de *T. reesei* cuja atividade ótima é próximo de 5, sendo a faixa de pH de 4-6 preferencial. A maioria das celulases descritas apresenta maior desempenho na faixa de pH de 4-6. A maioria dos fungos filamentosos, tais como *T. reesei* e *A. niger* produzem celulases ácidas, que são adequadas para a hidrólise da biomassa (SUKUMARAN et al., 2009).

8. Ambientes Brasileiros como Potencial Biotecnológico

8.1. Area de Proteção Ambiental do Pratigi – Ituberá – Bahia

A Área de Proteção Ambiental (APA) do Pratigi está localizada no bioma Mata Atlântica e, como tal, tem estado à mercê dessa degradação. Criada através do Decreto nº 7.272, de 02 de abril de 1998, a APA é formada por extensa área, que abrange praias, restingas, manguezais e floresta ombrófila densa, bem como, representatividade da fauna e da flora das regiões litorâneas, formando expressivo conjunto dos ecossistemas associados da Mata Atlântica, de importante valor ambiental (MMA, 2004).

Os sedimentos do manguezal possuem características variáveis, de acordo com a sua origem. Podem ser originados no próprio ambiente, pela decomposição de folhas, galhos, restos de animais, contendo produtos de decomposição de rochas de diferentes naturezas, associados aos materiais vulcânicos, graníticos, gnáissicos, ou sedimentares; associados aos restos de plantas e animais trazidos de fora do ambiente por ondas, ventos, correntes litorâneas ou fluxo dos rios (SCHAEFFER & NOVELLI, 1995).

O substrato do manguezal é lodo-arenoso podendo, às vezes, chegar a semi-líquido, geralmente com muita matéria orgânica, alto conteúdo de sal, pouco consistente e apresenta cor cinza escuro (SCHAEFFER & NOVELLI, 1995).

A sobrevivência da micobiota é influenciada isoladamente ou em combinação, por um número de fatores abióticos. A concentração de hidrogênio é um dos maiores fatores abióticos influenciando a capacidade de crescimento e a composição dos fungos; além deste, temperatura, salinidade, disponibilidade e diversidade de substratos e quantidade de propágulos na água são fatores que também podem influenciar a composição de fungos num ambiente específico

(JAITLEY, 1987; JONES & ALIAS, 1997). Costa (2003) isolou e identificou fungos endofíticos do manguezal do Rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco.

Conforme estabelece a Lei n 9.985/2000 (SNUC), a Área de Proteção Ambiental é extensa, com certo grau de ocupação humana, cujo objetivo básico é a proteção da diversidade biológica, disciplinando o processo de ocupação e assegurando a sustentabilidade com o uso dos recursos naturais. Para atender a tais premissas é fundamental que o processo de definição e demarcação dos limites da APA esteja em consonância com o disposto pela mesma lei: “[...] a criação de uma unidade de conservação deve ser precedida de estudos técnicos e de consulta pública que permitam identificar a localização, a dimensão e os limites mais adequados” (SNUC, 2000).

8.2. Laguna de Araruama – Rio de Janeiro

Situada no norte fluminense, perto de Cabo Frio, a cerca de 100 km da cidade do Rio de Janeiro, a lagoa de Araruama tem área de 210 km² e uma característica especial: apresenta salinidade em torno de 52‰, uma vez e meia a do oceano. Muitas lagunas do litoral brasileiro são maiores que a de Araruama, mas em nenhuma outra desse tamanho o teor de sal é tão alto. A causa está na elevada evaporação, no baixo índice de chuvas e na pequena descarga de água doce na lagoa. Como são poucos os riachos que chegam a ela, também é mínimo o depósito de sedimentos e boa a transparência da água (BARROSO, 1987).

O sedimento do fundo é de origem Quaternária costeira, compostas por areias quartzosas marinhas com pouco silte, possuem esporões arenosos, processos erosivos expõem o horizonte de arenitos, enquanto que nas porções da restinga voltadas para o leste, observam-se grupos de dunas submersas prolongando-se em direção ao centro da laguna que suavizam o gradiente de profundidade. O sedimento inclui areias mistas flúvio-lagunares, sílticas ou síltico-argilosas, e proporções variáveis de carapaças de moluscos e de algas diatomáceas (SLACK-SMITH et al., 1977a e 1977b; COUTINHO et al., 1998).

Nas áreas com profundidade superior a 6 m estão depositados sedimentos de vasa orgânica de enseada, matéria orgânica em estado coloidal, argilas caulínicas e esmectitas, carapaças de diatomáceas e algas cianofíceas em

abundância (AZEVEDO, 1984; BARROSO, 1987). Na Lagoa de Araruama predomina o nanoplâncton, composto principalmente por fitoflagelados, indicadores de oligotrofia. A deficiência de nutrientes na água impede o desenvolvimento de uma cadeia trófica baseada na luz e em nutrientes inorgânicos. Por outro lado, verifica-se um aumento significativo do bacterioplâncton do oceano para o interior do corpo lagunar, sugerindo que a principal fonte de energia do sistema lagunar seja a matéria orgânica dissolvida, provavelmente fornecida pelo sedimento e pelos produtos de excreção (INSTITUTO ACQUA/ PETROBRAS, 1996).

9. Fermentação submersa (FSm)

A Fermentação submersa foi definida como a fermentação em presença de excesso de água. Quase todas as enzimas produzidas em grande escala estão sendo produzidas utilizando a tecnologia da fermentação submersa (FSm) devido ao melhor acompanhamento e facilidade de manuseio. Embora as bactérias e actinobactérias sejam relatadas para a produção de celulase, os níveis são muito baixos para tornar a tecnologia economicamente viável. A maioria das celulases comerciais é produzida por fungos filamentosos *T. reesei* e *A. niger* em FSm (CHERRY ; FIDANTSEF, 2003; KUMAR et al.,2008).

A produção de celulases pelas culturas é fortemente influenciada por diversos parâmetros, incluindo a natureza do substrato de celulose, pH do meio, disponibilidade de nutrientes, a suplementação de indutor, temperatura de fermentação, etc, e uma produção em grande escala de celulases requer compreensão e bom controle do crescimento e da capacidade de produção da enzima. As celulases produzidas por organismos de compostagem, como os fungos filamentosos *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola*, etc, podem ser executadas em escalas diversas de pH e temperatura (BELGHITH et al., 2001; WEN et al., 2005).

A composição do meio de fermentação é de significativa preocupação uma, vez que não se consegue fornecer a composição ideal para o ótimo crescimento e produção de celulases. As celulases microbianas estão sujeitas a mecanismos de indução e repressão. Embora a maioria dos processos descritos seja de batelada, tem havido tentativas de produzir celulases em batelada alimentada com a

produção de enzimas melhoradas (XU et al., 2009), ou do modo contínuo (JU et al., 1999; SCHAFNER et al., 1992; BAILEY et al., 2003) que supostamente ajuda a substituir a repressão causada pelo acúmulo de açúcares redutores.

Maior tempo de fermentação com uma baixa produtividade tem sido uma limitação técnica importante na produção fermentativa de celulasas desde há muito. Um processo de duas fases contínuas para produção de celulasas poderia ser empregado em que a fase de crescimento e produção fosse separada por diferentes valores de pH e temperatura ótimos (RYU et al., 1979).

Repressão por glicose e celobiose são características conhecidas dos sistemas de celulase e várias tentativas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de mutantes resistente à repressão catabólica (FENNINGTON, 1984; KAWAMORI, 1985).

As fontes de carbono para obtenção da maioria das celulasas comerciais são biomassa celulósica variando de celulose pura a palha, passando por casca de cereais e leguminosas, arroz ou farelo de trigo, bagaço de cana, resíduo da indústria de papel, esterco e de vários outros resíduos lignocelulósicos (WEN et al., 2005; SZABO et al., 1996; BELGHITH et al., 2001; RECZEY et al., 1996; HECK et al., 2002; ROMERO et al., 1999).

O aumento da produção de celulasas em fermentadores pode ser obtida por um gradiente de alimentação adequado e a manutenção das condições do processo em seu ideal (XU et al., 2009).

Em condições naturais, é necessária a secreção de enzimas e crescimento apical das hifas dos fungos para a absorção de nutrientes. Os fungos filamentosos podem crescer de forma significativa na ausência de água livre. Considerando que a flutuação na fermentação submersa não é natural para o crescimento de fungos, os substratos sólidos são fundamentalmente relacionados com a adesão celular (GAO et al., 2008).

A morfologia de crescimento dos fungos filamentosos é um parâmetro importante relacionado com a produtividade de diversos processos industriais. Embora aspectos favoráveis fisiológicos sejam compartilhados com fermentação em estado sólido, os biofilmes de fungos apresentam melhores possibilidades de controle de processo e aumento de escala (VILLENNA, 2007).

A importância da morfologia na produtividade de fungos em procesos submersos coloca os biofilmes em uma categoria preferencial segundo Villena e

Gutierrez-Correa, 2007. Biofilmes fúngicos são sistemas morfológicamente eficientes para a produção da enzima. Em várias espécies de fungos, principalmente aqueles que aderem através de um adesivo produzido, a adesão pode ser considerado como um processo metabolicamente ativo (OSHEROV et al., 2001; TUCKEY et al., 2001), envolvendo mecanismos de sinalização e expressão gênica diferencial (GUTIÉRREZ et al., 2003). Uma clara relação entre a morfologia e a produtividade não foi ainda estabelecida

Uma vez que, a morfologia dos fungos influencia a produtividade das fermentações fúngicas, é da maior importância conhecer o comportamento da cultura do fungo para a produção de celulase. Na fermentação os componentes do meio, como fatores físico-químicos, podem ser responsáveis pela variação na morfologia (GRIMM et al., 2005).

10. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é realizada por celulasas, cujos diferentes grupos (exoglucanase, endoglucanase e β -glucosidase) agem sinergicamente. Esta etapa do processo da fermentação e sacarificação simultânea (SSF) pode ser influenciada pelo produto da fermentação. O etanol pode inibir a hidrólise enzimática, porém, em menor extensão, quando comparado à inibição pelos produtos da ação enzimática, glicose ou celobiose (HOLTZAPPLE et al., 1990).

Além da inibição pelo produto final, pode ocorrer perda de atividade das enzimas que compõem o pool celulásico, com o tempo de exposição à elevada temperatura na fase de pré-hidrólise enzimática, que antecede o processo SSF; adsorção improdutiva da enzima à lignina remanescente, ou diminuição da disponibilidade de cadeias celulósicas acessíveis, devido à própria cinética enzimática, na qual a velocidade de reação é dependente da concentração de substrato (ZHANG e LYND, 2004; HOLTZAPPLE et al., 1990).

Os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose em matérias-primas lignocelulósicas podem ser divididos em dois grupos: fatores relacionados à enzima e fatores relacionados ao substrato, sendo que os dois grupos estão interrelacionados durante o processo de hidrólise (ALVIRA et al., 2010).

A redução da severidade do pré-tratamento é muitas vezes necessária para reduzir os custos econômicos. Entretanto, baixo fator de severidade resulta em menor liberação de açúcares e, conseqüentemente, altas quantidades e diferentes tipos de enzimas podem ser necessários para alcançar altos rendimentos de açúcares (ALVIRA et al., 2010).

11. Otimização e desenho experimental

O método de desenho experimental pode ser amplamente encontrado em diversas áreas, sendo uma ferramenta criticamente importante na engenharia para aumentar o desempenho de processos de produção (MONTGOMERY, 1997). A pronta aplicação de técnicas de desenho experimental pode resultar em: (i) rendimento do processo aumentado; (ii) tempo de desenvolvimento reduzido; (iii) custos totais reduzidos; (iv) variabilidade reduzida e conformidade mais próxima do requerimento alvo (MONTGOMERY, 1997).

A escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes ou fatores que desejamos estudar e do conhecimento inicial que temos sobre o processo. Quando o número de fatores é muito grande, é mais conveniente escolher um primeiro planejamento. Isto porque muitas vezes estamos longe das condições ótimas. Portanto, a análise dos efeitos como informação inicial pode nos dirigir sequencialmente, através de novos fatoriais fracionados até se chegar no completo, atingindo-se as condições desejadas. Com certeza há diversos caminhos para se atingir um objetivo partindo-se da condição distante da otimizada. O número de planejamentos experimentais fatoriais necessários depende principalmente do número de variáveis independentes a serem estudadas inicialmente (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Os delineamentos em esquema fatorial 2^k , ocorrem quando temos k fatores, todos com dois níveis +1 e -1. São do tipo inteiramente casualizados, sempre que cada um dos 2^k tratamentos for atribuído aleatoriamente às unidades experimentais, sem a formação de blocos, de quadrados latinos e assim por diante. Delineamentos desse tipo são muito utilizados em laboratórios e/ou locais onde as fontes externas de variação são, geralmente, muito bem controladas. Eles apresentam uma vantagem incontestável: fornecem o maior número possível de graus de liberdade para o resíduo (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

O cálculo dos efeitos e análise de superfície de resposta que ocorrem num primeiro planejamento podem não ser suficientes para determinar a condição otimizada e seja necessário um outro planejamento alterando-se a faixa de estudo de cada variável. Quando os delineamentos centrais compostos rotacionais (DCCR) têm a função de screening dos fatores, os pontos axiais podem ou não ser incluídos pelos pesquisadores. No entanto, no final da sequência de delineamentos, ou seja no delineamento utilizado para a construção da superfície de resposta e para a definição das condições otimizadas os pontos axiais devem ser incluídos (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Um procedimento criterioso para a otimização deve envolver as seguintes etapas de: (i) realização de experimentos de varredura para caracterizar as variáveis do sistema, usando um planejamento fatorial; (ii) localização da região ótima ou ideal; (iii) certificação e/ou ajuste fino da região ótima, usando planejamento fatorial e/ou superfície de respostas, dependendo de quão apurados se desejam os resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Muitos experimentos envolvem o estudo de efeitos de 2 ou mais fatores. Geralmente, os desenhos fatoriais são mais eficientes para este tipo de experimento. O planejamento fatorial tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, no qual as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos com diferentes valores destes fatores (MONTGOMERY, 1997).

Nos planejamentos experimentais em que as variáveis são exploradas em 2 níveis, é comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). A atribuição destes sinais aos níveis superiores ou inferiores é feita de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir esquematizar o planejamento na forma de matrizes. Os efeitos são definidos como "a mudança ocorrida na resposta quando se move do nível baixo (-) para o nível alto (+)" e podem ser classificadas em duas categorias: efeitos principais e efeitos de interação. Para o cálculo dos efeitos, além da codificação das variáveis utilizando os sinais (+) e (-), é necessário incluir mais colunas na matriz de planejamento. O conteúdo das novas colunas representa o efeito de interação entre as variáveis e é obtido levando-se em consideração os sinais já atribuídos às

variáveis envolvidas, como se fosse uma operação matemática de multiplicação.

O planejamento fatorial não determina valores ótimos em uma única etapa, porém este procedimento indica satisfatoriamente o caminho a ser tomado para que se possa atingir o objetivo proposto.

Capítulo 2

BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS DE AMBIENTES BRASILEIROS

RESUMO

Varjão, L. B. BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS DE AMBIENTES BRASILEIROS

Devido à grande variedade de atividades catalíticas e a possibilidade da produção de enzimas por processos fermentativos em grande escala, os micro-organismos são considerados as principais fontes de enzimas industriais, como celulasas e xilanasas. Nos diferentes biomas brasileiros como a Caatinga e o Manguezal, podemos encontrar micro-organismos desempenhando papel ecológico importante na reciclagem da matéria orgânica. Os fungos filamentosos são considerados grandes produtores de enzimas lignocelulolíticas, destacando-se as celulasas e as xilanasas, sendo os gêneros *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* e o *Penicillium* os mais estudados. As actinobactérias, em especial do gênero *Streptomyces*, são consideradas grandes produtoras de celulasas e xilanasas. O presente trabalho teve por objetivo isolar micro-organismos celulolíticos de sedimento de manguezal da Área de Proteção Ambiental de Pratigi no município de Ituberá na Bahia e de sedimento arenoso da Lagoa de Araruama no Rio de Janeiro. Foram realizados isolamentos em diferentes meios de cultura: Ágar Amido caseína com pH 7,0 (actinobactérias), Batata Dextrose Ágar com pH 5,5 (fungos filamentosos) e Ágar Malte Levedura com pH 6,0 (leveduras). As estirpes isoladas de sedimento de mangue e sedimento arenoso de lagoa foram testadas quanto à produção de celulasas em meio de sais minerais modificado, contendo carboximetilcelulose (1% p/v). A detecção da atividade celulolítica em placa de Petri foi conduzida através da adição de solução 0,1% (p/v) de Vermelho Congo, sendo observadas zonas de hidrólise circunscrevendo o crescimento microbiano. Foram isoladas 31 estirpes de fungos filamentosos, 28 de leveduras e 12 de actinobactérias. Destes, 22 fungos filamentosos, 11 leveduras e 8 actinobactérias foram promissoras quanto a produção de CMC_{Case}. A análise morfológica dos fungos mostraram similaridade com os gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp. e *Botrytis* sp. Através do sequenciamento do RNAr 16S a actinobactéria IGAR 01 foi classificada como pertencente ao gênero *Streptomyces erythrogriseus*.

Palavras-chave: Bioprospecção, solos, celulasas, morfologia.

ABSTRACT

Varjão, L. B. BIOPROSPECTING CELLULOLYTIC MICROORGANISMS IN BRAZILIAN ENVIRONMENTS

Due to the wide variety of catalytic activities and the possibility of enzymes production by fermentation processes on a large scale, micro-organisms are considered the main sources of industrial enzymes such as cellulases and xylanases. In the different biomes such as mangroves and Caatinga, we can find micro-organisms play important ecological role in recycling organic matter. The filamentous fungi are considered major producers of lignocellulolytic enzymes, especially cellulases and xylanases, and the genera *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* and *Penicillium* the most studied. The actinobacteria, in particular the genus *Streptomyces*, are considered major producers of cellulases and xylanases. This study aimed to isolate cellulolytic micro-organisms in the sediment of the mangrove area of Environmental Protection Pratigi Ituberá in the Bahia State and sandy sediment of Lake Araruama, in Rio de Janeiro. Isolations were performed on different culture media: starch casein agar pH 7.0 (actinobacteria), Potato Dextrose Agar pH 5.5 (filamentous fungi) and Yeast Malt Agar pH 6.0 (yeast). The strains isolated from mangrove sediments and sandy sediment ponds were tested for cellulase production in the middle of modified minerals containing carboxymethylcellulose (1% w/ v). The detection of cellulolytic activity in a Petri dish was conducted by adding 0.1% solution (w/ v) of Congo red, with zones of hydrolysis observed circumscribing the microbial growth. We isolated 31 strains of filamentous fungi, 28 yeasts and 12 of actinobacteria. Of these, 22 filamentous fungi, yeasts and 11 8 actinobacteria were promising as the production of CMC_{Case}. The fungus showed morphological similarity to the genera *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* *Paecilomyces sp.* and *Botrytis sp.* By sequencing the 16S rRNA and actinobacteria IGAR 01 was classified as belonging to the genus *Streptomyces erythrogriseus*.

Keywords: Bioprospecting, soils, cellulases, morphology.

INTRODUÇÃO

Dentre os principais produtos representantes dos processos biotecnológicos estão as enzimas, as quais são produzidas comercialmente principalmente a partir de micro-organismos, devido à sua diversidade, facilidade de controle operacional e maior rendimento em relação aos processos biotecnológicos. Investimentos em pesquisa e no desenvolvimento de novas aplicações e de bioprocessos no setor industrial de produção de enzimas têm sido realizados recentemente.

As actinobactérias são micro-organismos de grande versatilidade metabólica e podem ser isolados de diversos ambientes, sendo o solo o seu reservatório mais comum. Durante muito tempo, as actinobactérias têm sido descritas como importantes fontes de fatores bioativos, de alto valor comercial, tais como inibidores imunodepressivos, agentes anti-tumorais e substâncias antimicrobianas, bem como várias enzimas de interesse comercial e ambiental. Dentre as enzimas secretadas por estes micro-organismos, estão as celulases, xilanases e amilases, que têm sido bastante estudadas, devido ao seu potencial biotecnológico e importância na degradação da biomassa.

Os fungos são micro-organismos muito bem adaptados a crescerem em superfícies sólidas e em compostos de difícil degradação. São notoriamente conhecidos por produzirem diversas enzimas hidrolíticas e oxidativas, destacando os complexos celulolíticos com todas as três classes de enzimas em diferentes proporções necessárias para a completa hidrólise da celulose. Dentre os fungos celulolíticos, destacam-se os do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Os solos tropicais, em particular os solos brasileiros como os da Mata Atlântica sob vegetação de floresta e costeira (restinga e manguezal), e os solos sob vegetação de cerrado, são habitats bastante peculiares, com características próprias e únicas, cuja atividade biológica é extremamente rica. Estes solos possuem uma ampla biodiversidade e as actinobactérias e os fungos, que englobam vários gêneros com diferentes características morfofisiológicas podem ser isolados.

Trabalhos realizados comprovam a abundância destes micro-organismos no solo, e a partir de então, surgiu a idéia de isolar e selecionar estirpes com potencial para produção de celulases e xilanases, visando aplicações biotecnológicas. A

utilização destas enzimas em diversas áreas da indústria faz com que os micro-organismos sejam estudados e suas enzimas caracterizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolamento e manutenção de fungos, leveduras e actinobactérias

O isolamento dos micro-organismos das amostras de sedimento de mangue (Ituberá/BA) foi realizado através da técnica convencional das diluições seriadas em placas, onde 10 g de amostra de sedimento foram homogeneizadas em 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl) estéril em frascos de Erlenmeyer de 250 mL (diluição 10^{-1}). A suspensão foi misturada em agitador rotatório, a 150 rpm por 30 minutos, em temperatura ambiente. A segunda diluição (10^{-2}) foi realizada transferindo-se 1 mL da diluição 10^{-1} para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85 % NaCl), e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . As amostras foram plaqueadas em 3 diferentes meios de cultivo: (i) Ágar Amido Caseína (AAC – pH 7.0) suplementado com 150 mg.L^{-1} do antifúngico Fluconazol, (ii) Batata Dextrose Ágar (BDA – pH 5.0) e (iii) Ágar Malte Levedura (YMA – pH 6.0), ambos suplementados com 100 mg.L^{-1} do antibiótico Clorotetraciclina.

As diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram utilizadas para o isolamento, sendo retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição e inoculada, em triplicata, na superfície do meio solidificado, espalhando homogeneamente com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em BOD a 28°C , por 10 dias. As colônias com características morfológicas distintas de actinobactérias, leveduras ou fungos filamentosos foram transferidas para os meios de manutenção: Ágar-Extrato de Malte-Extrato de Levedura (ISP-2), para actinobactérias pH 7.0 e Agar Batata-Dextrose (BDA), para fungos filamentosos, pH 5.0 pela técnica de esgotamento por estrias em placa para posterior obtenção das culturas puras. As estirpes purificadas de actinobactérias e leveduras foram mantidas na forma de suspensão de células/ esporos em glicerol 30%, em temperatura de -20°C (HOPWOOD et. al, 1985), enquanto que as estirpes de fungos filamentosos foram mantidas na forma de

suspensão de células/ esporos em água destilada estéril de acordo com Método de Castellanni (CASTELANNI, 1967).

2. Identificação Morfológica dos Fungos Filamentosos

A identificação morfológica dos fungos foi realizada pela técnica do microcultivo em lâmina, método de Riddall (LACAZ et al., 2002), a qual preserva a integridade das estruturas fúngicas e proporciona o estudo detalhado da disposição de diferentes estruturas ao longo das hifas.

As culturas foram montadas mediante o corte, com bisturi, de blocos de cerca de 2cm² de BDA, os quais foram transferidos para lâminas de microscopia. O bloco de ágar foi então depositado e foi raspada a superfície de uma placa contendo esporos dos fungos a serem estudados e identificados. Os blocos foram cobertos com uma lamínula e o conjunto colocado dentro de uma placa de Petri com tampa, sob condições assépticas, sendo a umidade mantida com bolas de algodão umedecidas, autoclavadas e mantido em uma estufa BOD de crescimento, por um período de tempo que variou de 3 a 15 dias. Quando houve crescimento suficiente, a lamínula, com o micélio aderido, foi removida do bloco de ágar e montada sobre uma lâmina de vidro para microscopia contendo o corante Azul de Amann. As estruturas fúngicas foram examinadas ao microscópio óptico e realizado o registro fotográfico. As estruturas observadas foram identificadas de acordo com Barnett & Hunter, 1999.

3. Seleção dos Micro-organismos Celulolíticos

Para seleção de estirpes celulolíticas, os micro-organismos foram cultivados em meio de sais minerais (BRECCIA et.al., 1995) modificado (NaNO₃, 1,2 g.L⁻¹; KH₂PO₄, 3,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄, 6,0 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,2 g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O, 0,05 g.L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O, 0,001 g.L⁻¹; MnSO₄.7H₂O, 0,01 g.L⁻¹; Agar, 15,0 g.L⁻¹) suplementado com 1 % (p/v) de carboximetilcelulose sal sódico de baixa viscosidade. As estirpes foram inoculadas sob forma de pontos, três por placa, com auxílio de uma alça de platina. A incubação foi conduzida a 28 °C durante 12 dias para actinobactérias, 2 dias para leveduras e 5 dias para fungos filamentosos. Após este período, para a visualização da formação de zonas de hidrólise, foi adicionado à superfície das placas, solução de Vermelho Congo 0,1 % (p/v), permanecendo

em contato com o meio por 10 minutos. Após este período, foram realizadas lavagens sucessivas com solução NaCl 1M até a visualização de zonas de hidrólise circunscrevendo o crescimento das colônias.

Para estudos comparativos, foi utilizada a estirpe *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01, previamente selecionada como celulolítica e xilanolítica, isolada de sedimento arenoso da laguna de Araruama, RJ. Esta estirpe foi identificada através do seqüenciamento do 16S RNAr. Através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), verificou-se que a maior similaridade encontrada foi com a estirpe *Streptomyces erythrogriseus* LMG 19406 T (AJ781328.1), apresentando 99% de similaridade com a mesma (PEREIRA, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram isolados 31 fungos filamentosos, 28 leveduras e 12 actinobactérias. Foram observadas nas placas, por esgotamento, o crescimento de colônias de leveduras, após 24 h, com aspecto e cheiro característico de fermento de pão; os fungos filamentosos cresceram após 3 dias; só houve crescimento de actinobactérias após 7 dias. Através da observação de fungos ao microscópio foram identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Botrytis* e *Penicillium sp.* (Figuras 3 A e 3 B). A relação dos fungos filamentosos identificados está descrita na Tabela 4. Após a identificação, as actinobactérias e leveduras obtidas foram armazenadas em suspensão de células e de esporos em glicerol 30% e temperatura de -20°C (HOPWOOD et al., 1995). Os fungos filamentosos foram colocados em água destilada estéril pelo método Castellani (CASTELANNI, 1967).

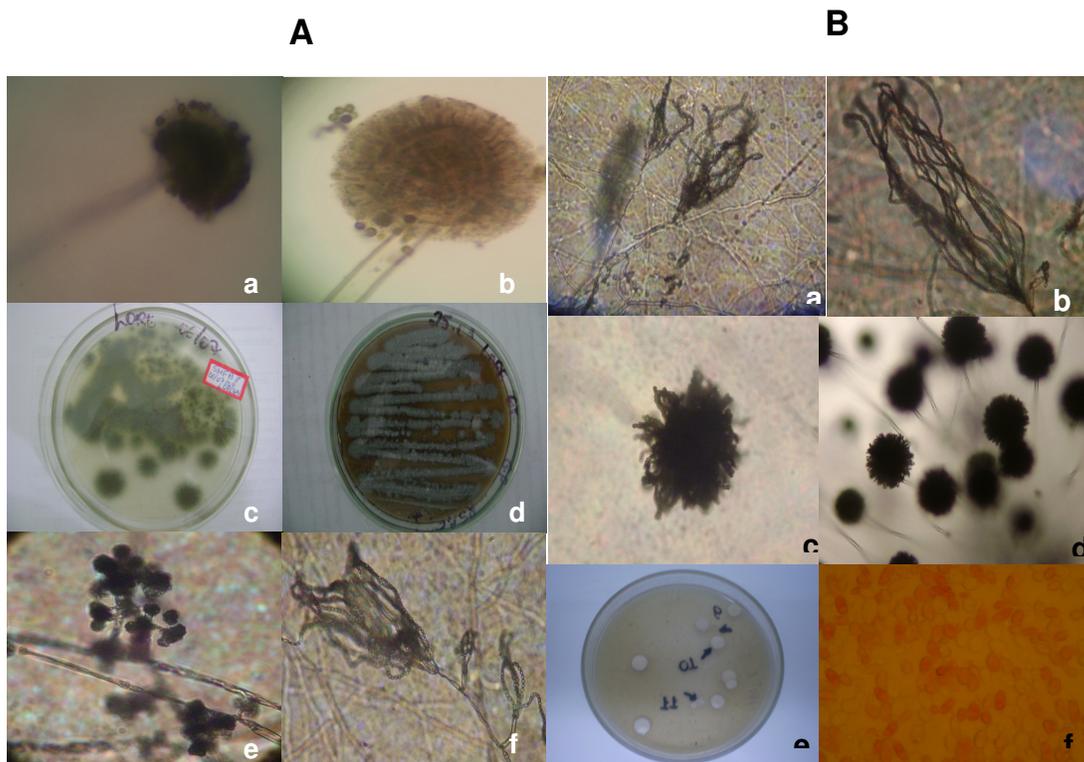


Figura 3 – Estruturas de fungos filamentosos, leveduras e actinobactérias observadas por meio de microscopia em placa de Petri.

(A) a / b – *Penicillium* sp., micélio e conidióforos; c / d – *Aspergillus* sp.; e / f – levedura em placa e em objetiva de 40x.

(B) a / b – *Aspergillus* sp.; c – *Penicillium* sp.; d – actinobactéria; e – *Botrytis* sp.; f – *Paecilomyces* sp.

Tabela 4 - Classificação dos fungos isolados dos diferentes ambientes baianos.

Estirpes Fúngicas	Identificação em nível de gênero (aspectos morfológicos)
SMFY 3	<i>Paecilomyces</i> sp.
SMFY 2	NI*
SMFY 1	<i>Aspergillus</i> sp.
SMFY 4	<i>Aspergillus</i> sp.
SMFY 5	<i>Aspergillus</i> sp.

SMFB 7	<i>Penicillium</i> sp.
SMFB 6	<i>Penicillium</i> sp.
SMFY5	<i>Penicillium</i> sp.
SMFB 8	<i>Penicillium</i> sp.
SMFB 19	<i>Penicillium</i> sp.
SMFB 18	<i>Penicillium</i> sp.
SMFB 13	NI*
SMFY 6	<i>Penicillium</i> sp.
SMFB 17	<i>Paecilomyces</i> sp.
SMFY 14 –	<i>Botrytis</i> sp.
SMFB 12	NI*
SMFY 6	NI*

NI* – Não identificado por estruturas reprodutivas.

Ribeiro (2009) isolou micro-organismos de amostras de areias provenientes de parques escolares, sendo identificados os gêneros *Aspergillus* do grupo *flavus*, *Emonsia parva*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp. *Penicillium* subgênero *Biverticillium* e *Penicillium* subgênero *Penicillium*. Basso et al. (2010) isolaram fungos filamentosos de bagaço de cana e madeira em decomposição e as principais espécies identificadas também foram de *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, além de outras espécies.

KULKARNI (1999) enfatiza que, apesar da produção comercial das celulasas e xilanases se concentrar principalmente nos fungos *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp., novos micro-organismos estão sendo alvo de estudos devido a demanda por cepas produtoras de enzimas com maior rendimento, alta estabilidade em condições extremas de temperatura e pH. Com este raciocínio, neste estudo foram estudadas 71 estirpes de diferentes ambientes baianos, no intuito de avaliar seu potencial quanto à produção de celulasas para futuras aplicações biotecnológicas.

Nas amostras coletadas foram encontrados fungos filamentosos, leveduras e actinoactinobactérias. Outras literaturas citam o isolamento de fungos filamentosos de diferentes ambientes e hospedeiros: fungos filamentosos causadores de doenças em animais e no homem (CANO; GUARRO; GENÉ, 2004;

BOSCO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VILELA *et al.*, 2009), estudos de pragas e doenças em plantações (CASTLE *et al.*, 1998; KISS, 2002; CHOI *et al.*, 2010), de micorrizas em florestas (AMICUCCI *et al.*, 2001; NOUHRA *et al.*, 2005; HONTI *et al.*, 2008), de fungos filamentosos produtores de enzimas (CARDOSO *et al.*, 2007) e fungos filamentosos contaminantes de sistemas de água (HAGESKAL *et al.*, 2006) e até mesmo em uma estação espacial (MAKIMURA *et al.*, 2000)

A identificação de fungos filamentosos pode ser realizada pela observação das características morfológicas macroscópicas, microscópicas e por técnicas de biologia molecular. A verificação das características macroscópicas como cor, aspecto, presença de exsudados, difusão de pigmentos, odor e quantidade de micélio aéreo é realizada pelo estudo da colônia do fungo filamentoso crescido em diferentes meios de cultura e, muitas vezes, esta técnica já é suficiente para identificar o micro-organismo. Outra técnica é o estudo das características microscópicas, por meio da técnica de micro-cultivo, através da qual é possível a visualização das estruturas reprodutivas, as quais auxiliam na distinção taxonômica em nível de gênero (LARONE, 2002; WATANABE, 2002; ANVISA, 2004).

A verificação da formação de zonas de hidrólise foi evidenciada através da adição de solução do corante vermelho congo às placas de Petri contendo meio de saís, até o aparecimento de zonas de hidrólise circunscrevendo o crescimento microbiano (Figuras 4A e 4B). A relação dos micro-organismos degradadores de CMC está demonstrada nas Tabelas 5 .

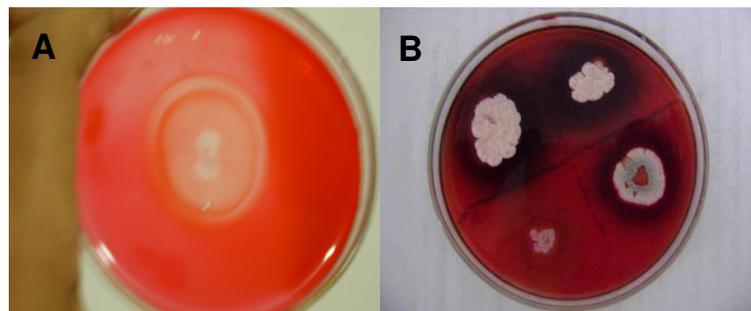


Figura 4 – Detecção da atividade celulolítica em placa de Petri contendo meio de saís suplementado com carboximetilcelulose 1% (p/v). **(A)** *Penicillium sp.* e **(B)** *Streptomyces erythrogriseus* .

Tabela 5 – Relação das estirpes celulolíticas positivas em meio de carboximetilcelulose (1% p/v), após 10 dias de incubação a 28°C.

MICRO-ORGANISMO FUNGO FILAMENTOSO	DIÂMETRO DA COLÔNIA (CM)	DIÂMETRO DA ZONA DE HIDROLISE (CM)	ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)
SMFY 5	2,10	3,00	1,42
SMFY 14	1,61	2,25	1,39
SMFY 16	2,00	3,20	1,60
SMFB 12	1,80	2,55	1,41
SMFB 13	1,65	2,35	1,43
SMFB 17	1,50	2,10	1,40
SMFB18	2,98	5,00	1,70
SMFB 19	2,00	3,15	1,58
RSFB 24	2,00	2,60	1,30
RSFB 25	1,80	2,40	1,33
RSFA 28	1,95	2,11	1,08
RSFA 29	2,89	4,75	1,64
SMFY 1	1,55	2,43	1,57
SMFY 2	1,44	2,05	1,42
SMFY 4	1,98	2,33	1,17
SMFB 5	1,58	2,15	1,36
SMFB 10	2,75	4,50	1,63
SMFB 11	2,00	2,65	1,33
RSFB 20	2,20	2,90	1,31
RSFB 21	1,61	1,98	1,22

RSFA 30	1,80	2,40	1,33
SMFY6	2,45	4,00	1,63
SMFB 10	2,55	4,20	1,64
MICRO-ORGANISMO LEVEDURA	DIÂMETRO DA COLÔNIA (CM)	DIÂMETRO DA ZONA DE HIDROLISE (CM)	ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)
SMLY 25	1,70	3,00	1,8
RSLB9	2,10	3,00	1,43
RSLY17	2,22	3,47	1,56
RSLB III	2,76	3,68	1,33
RSLA7	1,99	3,15	1,58
RSLY 19	1,80	2,40	1,33
RSLB 12	1,82	2,50	1,38
RSLB 8	1,88	2,70	1,43
SMLY 25	1,85	2,65	1,43
RSLA 8	1,77	2,40	1,35
MICRO-ORGANISMO ACTINOBACTÉRIA	DIÂMETRO DA COLÔNIA (CM)	DIÂMETRO DA ZONA DE HIDROLISE (CM)	ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)
IGAR 01	1,60	3,40	2,1
ACTINO 2	1,80	3,60	2
ACTINO 1	2,10	3,50	1,7
ACTINO 3	1,05	1,89	1,8
RSAGP 1	2,05	3,03	1,47

RSAAGS 1	1,05	1,89	1,8
RSAAGS 2	1,50	2,80	1,86
RSAAGS 3	1,80	2,40	1,33
RSAGP 4	1,85	2,50	1,35

A natureza dos testes aplicados neste estudo impede qualquer comparação quantitativa da atividade enzimática. Variações na taxa de crescimento entre as cepas, os meios de cultivo utilizados e, no caso da técnica em placas, torna possíveis as variações na taxa de produção da enzima (TEATHER e WOOD, 1982). No entanto, o tamanho do halo produzido no teste qualitativo, ou o índice enzimático, pode não corresponder, necessariamente, à maior produção da enzima em fermentação, provavelmente porque as condições utilizadas para a fermentação podem não ser as melhores para todas as cepas (temperatura, tempo, nutrientes, etc.). Porém, de uma forma geral, o teste qualitativo auxilia na escolha das cepas que produzem a enzima de interesse e, dentre os que produzem os maiores halos, poderão ser encontrados aqueles que produzem as maiores quantidades de enzima (TEN et al., 2004).

O índice enzimático obtido pelas cepas de *Penicillium* ficaram em torno de 1,75 (Tabela 5). Este índice está abaixo do que o citado por Ruegger et al. (2003), segundo o qual fungos filamentosos do gênero *Penicillium* apresentam índices enzimáticos em torno de 2,6. Os isolados identificados como *Aspergillus* apresentaram índices enzimáticos em torno de 1,2, apresentando bom resultado quando comparado com a literatura que é de 1,6 para o gênero *Aspergillus* (RUEGGER et al., 2003).

A maioria das actinobactérias isoladas foram positivas para a produção de celulase, apresentando um índice enzimático de 1,71, em média. A produção de celulase por actinobactérias é comum na natureza. Sousa (2006) obteve resultado positivo para celulase para a maioria das actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Santos (2010) obteve resultados positivos para celulase em mais de 50% dos actinomicetos isolados de resíduos de sisal.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que várias espécies apresentaram elevada atividade em celulase. Entretanto, o isolado que apresentou maior produção foi o *Penicillium* SMFB18 entre os fungos filamentosos. Com relação às actinobactérias, a maioria dos isolados apresentou índices enzimáticos similares, próximos a 2,0. Porém, o único isolado identificado em nível molecular entre as actinobactérias foi o IGAR01, como sendo o *Streptomyces eritrogriseus*. Assim, estas duas cepas, *Penicillium* sp. SMFB18 e *Streptomyces eritrogriseus* IGAR01, foram as escolhidas para os ensaios fermentativos.

Capítulo 3

**PRODUÇÃO DE CELULASES PELAS ESTIRPES *PENICILLIUM* SP.
SMFB-18 E *STREPTOMYCES ERYTHROGRISEUS* IGAR-01**

RESUMO

Varjão, L.B. PRODUÇÃO DE CELULASES PELAS ESTIRPES *PENICILLIUM* SP. SMFB-18 E *STREPTOMYCES ERYTHROGRISEUS* IGAR-01

As enzimas microbianas, notoriamente as celulases e xilanases apresentam alto valor agregado podendo ser aplicadas em diferentes áreas tecnológicas. As actinobactérias e os fungos filamentosos são considerados grandes produtores de enzimas microbianas, destacando-se as celulases, xilanases e amilases, sendo os fungos mais estudados *Trichoderma reesei*, *Humicola* sp., *Aspergillus* sp. e o *Penicillium* sp. e entre as actinobactérias o gênero *Streptomyces*. A produção de enzimas por processos fermentativos vem se destacando nas últimas décadas, e muitas das enzimas comerciais são produzidas por fermentação submersa. O principal objetivo deste trabalho foi estudar a produção de CMCases pela estirpe *Streptomyces erythrogriseus* e *Penicillium* sp. SMFB-18 em fermentação submersa realizada em frascos Erlenmeyers com o meio de sais minerais a pH 7,0, com suspensão de esporos padronizadas, rotação de 200 rpm em temperatura 30 °C por 6 dias. A melhor produção foi de 5.500 U/L obtida com 3,0% bagaço de cana e 0,5% milhocina ao fim de 4 dias de fermentação pelo isolado *Penicillium* sp. SMFB 18. O melhor resultado obtido pela *Streptomyces erythrogriseus* para produção de CMCCase (431 U/L) na condição de 3,4% bagaço de cana e 1,0% milhocina após 2 dias de fermentação. A análise dos dados foi realizada por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. A estirpe *Penicillium* sp. SMFB 18 foi inoculada na forma de pré-inóculo (40 mL), em biorreator tipo Biostat Braun Biotech International 4,0 L contendo meio de cultivo Mandels e celulignina semi deslignificada, a 200 rpm / 30°C / 4 dias, obtendo – se 1.404 U/L de celulase após 92 h e 101U/L de atividade β-glucosidásica após 58h de fermentação em bioerator.

Palavras-chave: celulases, endoglucanases, *Penicillium* sp, *Streptomyces erythrogriseus* e fermentação submersa.

ABSTRACT

Varjão, LB PRODUCTION OF CELLULASES BY STRAINS *PENICILLIUM SP. SMFB-18* AND *STREPTOMYCES ERYTHROGRISEUS* IGAR-01

The microbial enzymes, notably cellulases and xylanases have a high added value can be applied in different technological areas. The actinobacteria and filamentous fungi are considered major producers of microbial enzymes, especially cellulases, xylanases and amylases, and the most studied fungus *Trichoderma reesei*, *Humicola sp.*, *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* and among the actinobacteria *Streptomyces* genus. The production of enzymes by fermentation processes has been highlighted in recent decades, and many of the commercial enzymes are produced by submerged fermentation. The main objective was to study the production of CMC_{ase} by strain *Streptomyces erythrogriseus* and *Penicillium sp. SMFB-18* in submerged fermentation carried out in Erlenmeyer flasks with the medium of mineral salts at pH 7.0, with standard spore suspension, rotation of 200 rpm at room temperature 30 ° C for 6 days. The best production was 5500 U / L obtained with 3.0% sugar cane bagasse and corn steep liquor 0.5% after 4 days of fermentation by isolated *Penicillium sp. SMFB 18*. The best result obtained by *Streptomyces erythrogriseus* for the production of CMC_{ase} (431 U / L) in the condition of 3.4% sugar cane bagasse and corn steep liquor 1.0% after 2 days of fermentation. Data analysis was performed by a Central Composite Rotational Design (DCCR) 2² test conditions including 4 axial and 3 repetitions at the central point, totaling 11 trials. The strain *Penicillium sp. SMFB 18* was inoculated in the form of pre-inoculum (40 mL), Braun Biotech Biostat bioreactor International 4.0 L culture medium containing Mandels and semi cellulignin deslignificada, 200 rpm / 30 ° C / 4 days, getting if U 1404 / L after 92 h of cellulase 101U / L β-glucosidase activity after 58h of fermentation in bioerator.

Keywords: cellulase, endoglucanase, *Penicillium sp*, *Streptomyces erythrogriseus* and submerged fermentation.

INTRODUÇÃO

Anualmente, o uso da biomassa vegetal gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, tais como resíduos agrícolas, resíduos de madeira florestal, obtidos após processamento em indústrias madeireiras, resíduos da indústria papelreira, restos e resíduos do processamento alimentar. Uma variedade de problemas ambientais e sociais e a compreensão de que fontes fósseis são limitadas, têm estimulado investigações adicionais de novas tecnologias para converter materiais lignocelulósicos renováveis em etanol combustível e/ou outros substituintes do petróleo, levando em consideração ser essa uma fonte alternativa de energia barata. Cada vez mais existe a necessidade de utilizar matérias primas renováveis, bem como criar um uso adequado para a utilização de resíduos agroindustriais, derivados de milho, cana, trigo, arroz e outros cereais, bem como os resíduos da indústria de papel e celulose, consideradas para conversão de lignocelulose em açúcares fermentáveis.

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma gama de micro-organismos, principalmente as actinobactérias e os fungos filamentosos, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, *Trichoderma* e *Aspergillus*. Estes micro-organismos são muito importantes no processo de bioconversão, pois são capazes de colonizar substratos complexos e hidrolisar vários polímeros. O meio de cultivo deve atender à demanda nutricional do micro-organismo produtor, bem como os objetivos do processo e da escala de operação. Sua seleção depende, para a maioria dos processos em larga escala, do custo, disponibilidade e características dos seus componentes. Os substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento. As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: glicose (pura ou de amido hidrolisado), lactose (pura, soro de leite ou de queijo), amido ou fécula de cevada, centeio, trigo, aveia, farinhas e farelos diversos, soja, amendoim, algodão, batata, batata-doce, mandioca, sorgo e sacarose (melaço de cana, de beterraba ou açúcar refinado).

As fontes nitrogenadas podem ser: cevada, melação de beterraba, água de maceração de milho (milhocina), farinha de aveia, farinha de centeio, farelo de soja e soro de leite. Os sais minerais são adicionados, especialmente como fontes suplementares de nitrogênio, fósforo, enxofre ou cálcio. A maioria dos fatores de crescimento necessários pertence ao grupo de vitaminas do complexo B, certos aminoácidos ou ácidos graxos.

Sendo assim, este trabalho objetivou estudar a produção de celulasas, por *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 e *Penicillium* sp. SMFB-18 em diferentes substratos lignocelulósicos sob fermentação submersa, devido à possibilidade de obtenção de melhor racionalização e padronização do processo, o que é fundamental para a indústria, além de permitir um sistema de cultura homogêneo. Em seguida, caracterizar a enzima quanto a melhor atividade no perfil ótimo de temperatura e pH.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção dos Micro-organismos

As suspensões de esporos das estirpes celulolíticas *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 e *Penicillium* sp. SMFB-18 foram mantidas em glicerol 30 % a -20 °C.

2. Preparo do Inóculo

Para realizar a suspensão de esporos, os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri, cada um, contendo o meio ISP-2 (actinobactéria) e BDA (fungo), e incubado a 30 °C por 12 dias (formação de estruturas reprodutoras). Após este período, foi realizada a lavagem das placas com solução salina 0,85%, seguida de raspagem com auxílio de pipeta. Foi realizada a filtração dos esporos em lã de vidro estéril, seguida de centrifugação (CIENTEC-CT 4000) a 3000 rpm por 15min em tubos tipo Falcon. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" formado (esporos) foi ressuspendido em 5 mL de glicerol 30 %, e agitado em Vortex (BIOMIXER, QL-901) por, aproximadamente, 2 minutos. Em seguida,

determinou-se a concentração através do método de diluições seriadas, onde retirou-se 1 mL da suspensão e adicionou em 9 mL de solução salina 0,85 %, repetindo-se este procedimento até obtenção de 8 diluições (10^{-8}). O plaqueamento foi feito em meio ISP-2 e BDA, das diluições 10^{-6} a 10^{-8} , em triplicata. As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias, para posterior contagem das colônias (HOPWOOD et.al., 1985).

A diluição escolhida para contagem das colônias baseou-se no critério das placas que continham entre 20 a 200 colônias. E o cálculo para quantificação do inóculo, foi feito segundo a Equação abaixo, e o resultado expresso em UFC.mL⁻¹.

$$C = MC \times FCP \times FD \quad \left\{ \begin{array}{l} C = \text{contagem em UFC/mL} \\ FD = \text{Fator de diluição (titulação)} \\ FCP = \text{Fator de correção do plaqueamento (10)} \\ MC = \text{Média da contagem das colônias} \end{array} \right.$$

$$C = 1,11 \times 10^2 \times 10 \times 10^6$$

$$C = 1,11 \times 10^9 \text{ UFC/ mL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$10^9 \times V_i = 10^6 \times 50 \text{ mL}$$

$$V_i = 0,05 \text{ mL}$$

3. Produção de Celulases em Fermentação Submersa em Frascos Agitados

Para a produção de CMCases em fermentação submersa, as células foram cultivadas em meio de sais mineirais (BRECCIA et al., 1995) modificado contendo (g.L⁻¹): 2,0 NaCl; 3,0 KH₂PO₄; 6,0 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,02 CaCl₂.2H₂O e 1 mL de Solução de Elementos traços (0,64 g CuSO₄.5H₂O; 0,15 g ZnSO₄.7H₂O; 0,11 g FeSO₄.7H₂O; 0,79 g MnCl₂.4H₂O em 100 mL de água destilada), suplementado com diferentes concentrações de bagaço de cana de açúcar e fonte de nitrogênio orgânica (milhocina), de acordo delineamento composto central rotacional (DCCR), como descrito na Tabela 6.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL do meio descrito previamente (pH 7,0), sendo inoculada com 50 μ L de suspensão de esporos padronizada (5×10^6 UFC/mL). Os frascos foram incubados em agitador orbital, a 180 rpm / 30°C / 6 dias, sendo retirados frascos em intervalos de 24 horas. Os sobrenadantes brutos foram obtidos através da centrifugação a 3000 rpm/15 minutos, filtrados e congelados (-20°C) para análises posteriores.

Tabela 6 – Valores codificados e reais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 para produção de celulases.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Fonte de Carbono (%)	0,59	1,0	2,0	3,0	3,41
Fonte de Nitrogênio (%)	0,29	0,5	1,0	1,5	1,71

O desenho experimental para a produção de CMCase, foi realizada por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), ou seja, um 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, como mostra a Tabela 7 (Rodrigues e lemma, 2009). A variável dependente selecionada para este estudo foi a atividade enzimática, expressa em $U \cdot mL^{-1}$, enquanto que as variáveis independentes foram a concentração das fontes de carbono e nitrogênio.

Como fonte de carbono, foi utilizado bagaço de cana de açúcar, enquanto que a fonte de nitrogênio utilizada foi a milhocina. O sistema foi conduzido em frascos de Erlenmeyers (250 mL), por fermentação submersa, e a melhor combinação entre as fontes de cada experimento, além do melhor dia de produção, foram analisados no intuito de definir faixas mais adequadas para cada resposta.

Tabela 7 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (valores reais e codificados) para determinação da atividade enzimática

ENSAIO	Fonte de C	Fonte de N	Fonte de C% (valores reais)	Fonte de N% (valores reais)
1	- 1	- 1	1,0	0,5
2	+ 1	- 1	3,0	0,5
3	- 1	+ 1	1,0	1,5
4	+ 1	+ 1	3,0	1,5
5	- 1,41	0	0,6	1,0
6	+ 1,41	0	3,4	1,0
7	0	- 1,41	2,0	0,3
8	0	+ 1,41	2,0	1,7
9	0	0	2,0	1,0
10	0	0	2,0	1,0
11	0	0	2,0	1,0

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATISTICA 7.0® (StatSoft).

4. Produção de Celulases em Fermentação Submersa em Bioreator

A estirpe *Penicillium sp.* SMFB-18 foi inoculada, com um pré-inoculo de 40 mL, em Biorreator instrumentado tipo Biostat Braun Biotech International 4,0 L (Fig 3) contendo meio de cultivo Mandels (MANDELS, 1971) em rotação de 200 rpm a 30°C por 6 dias.

A agitação é o parâmetro que tem maior influência na transferência de oxigênio. A agitação aumenta a área de contato gás-líquido por dispersar o ar sob a forma de pequenas bolhas, aumentando o tempo de permanência das bolhas no seio da cultura e evitando a coalescência das bolhas de ar (PEREIRA JR., 2003).

A produção de compostos bioativos ou mesmo biomassa por micro-organismos em laboratórios de escala piloto é um grande desafio. A manutenção das condições ideais de crescimento e produção destes compostos, mantendo o

sistema livre de contaminação, representa um outro desafio para qualquer indústria. Para manter estas condições sob controle, a produção é conduzida em sistemas fechados, altamente controlados, conhecidos por fermentadores ou biorreatores (ROSEIRO, 2003).



Figura 5 - Biorreator instrumentado tipo Biostat Braun Biotech International 4,0 L.

5. Pré-Tratamentos do bagaço de cana

5.1. Pré-tratamento ácido do bagaço de cana

O bagaço de cana previamente lavado com água destilada, seco e peneirado manualmente (excluindo as fibras mais grosseiras) foi embebido em uma solução aquosa de ácido sulfúrico 3% (v/v) e mantido em repouso por 24h a temperatura ambiente. Após esse período o material embebido foi exposto a um tratamento térmico por 40 minutos, a 121 °C (1 atm), sendo rapidamente resfriado após a redução da pressão no equipamento, em bandejas contendo água gelada. O licor contendo glicídeos provenientes da hidrólise foi recuperado por prensagem manual, obtendo-se assim o material parcialmente hidrolisado ainda úmido.

Para a remoção da xilose e de outros compostos ainda adsorvidos no bagaço hidrolisado, este material foi lavado cinco vezes com água destilada, na proporção sólido: líquido de 1:4 (g/mL), sendo o licor de cada lavagem extraído por filtração com papel Whatman n°5 em funil de Büchner. Após o esgotamento do teor

de xilose e neutralização do material, este foi seco em estufa a 90°C por cerca de 2 horas, sendo então nomeado celulignina. Este termo foi adotado, visto que o material não mais continha a fração hemicelulósica (CASTRO et al., 2005).

5.2. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana

A deslignificação da celulignina é um pré – tratamento posterior ao pré – tratamento ácido para a remoção parcial da lignina. A celulignina foi adicionada a uma solução de NaOH 4% em um frasco Erlenmeyer, com uma relação sólido:líquido de 1:20(g/mL). Levado a autoclave por 30 minutos a 1 atm. Depois de retirado do tratamento térmico, a solução foi filtrada em prensa. O sólido foi colocado em repouso e o pH ajustado em torno de 5 – 6 com HCl (PA) por 1 hora. Logo que atingiu o pH alvo 5,5, o material foi lavado com água destilada e levado a estufa a 60°C. a celulignina foi denominada após o tratamento alcalino de celulignina semi – deslignificada (CSD) (VÁSQUEZ et al., 2006).

6. Ensaio Analíticos

Para as quantificações enzimáticas, as atividades foram expressas em unidades por litro de extrato enzimático (U/L), definida pela quantidade de enzima necessária para liberar 1µM de açúcar por minuto.

6.1. Atividade Carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de CMCase foi determinada através da medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação do extrato enzimático com solução CMC de baixa solubilidade em tampão citrato de sódio 50mM pH 4.8, a 50°C durante 20 min (Ghose, 1987). A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540nm. Pelo método de DNS, segundo Miller (1959).

6.2. Atividade β–glucosidase

Em tubos microcentrifuga de 2 mL foram adicionados o extrato enzimático diluído (50µL) em tampão citrato de sódio 50 mM a pH 4,8, 50µL de solução de celobiose 2% e logo após incubados a 50°C por 30 minutos. Após decorrido o tempo reacional (100°C por 10 minutos), foi acrescentado o reativo enzimático para dosagem de glicose GOD (glicose oxidase) seguido de incubação a 37°C por 15

minutos. A absorbância foi registrada a 505 nm. Glicose comercial foi utilizada como padrão.

6.3. Determinação do perfil ótimo de temperatura

As temperaturas de incubação variaram de 20 a 100 °C. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a pH 4,8, nas respectivas temperaturas segundo GRIGOREVSKI-LIMA et. al. (2005), e após o tempo de reação de 20 minutos, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após atividade enzimática foi determinado pelo método DNS (MILLER, 1959).

6.4. Determinação do perfil ótimo de pH

Para o estudo do efeito do pH, a atividade CMC_{Case} foi determinada na temperatura ótima obtida a partir do item anterior. A mistura reacional foi incubada em banho-maria, com as faixas de pH variando de 2,0 a 10,0, utilizando como tampões: Glicina-HCl 50mM (pH 2,0–3,0), Citrato de sódio 50mM (pH 3,0–6,0), Fosfato 50mM (pH 6,0–8,0), Tris-HCl 50mM (pH 8,0–9,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0–10,0). Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Colowick & Kaplan (1955). A mistura reacional foi incubada em banho-maria, nos respectivos pH e após o tempo de reação de 20 minutos, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após atividade enzimática foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Produção de Celulases em Fermentação Submersa em Frascos Agitados

1.1. *Penicillium* sp. SMFB 18

Para padronização do inóculo, a diluição 10^{-8} foi escolhida por estar dentro da faixa de 20 a 200 colônias como é recomendado pela literatura. Após o cálculo de obtenção do inóculo padrão, as fermentações foram realizadas inoculando-se 50 µl da suspensão de esporos em cada Erlenmeyer.

A Figura 6 mostra a cinética de produção de endoglucanases pela estirpe *Penicillium* sp. SMFB-18 em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana, como fonte de carbono e milhocina (CSL), como fonte de nitrogênio. A atividade enzimática máxima obtida nessas condições foi de 5.551,0 U.L⁻¹, no ensaio 2, quando se utilizou 3,0 % (p/v) de bagaço e 0,5% (p/v) de CSL, após 4 dias de fermentação. Entretanto, quando a mesma concentração da fonte de carbono foi utilizada com a concentração máxima da fonte de nitrogênio (CSL), 1,5 % (p/v), a atividade máxima foi de 791,0 U.L⁻¹, ao fim de 5 dias de fermentação. Nos ensaios 1 e 7, com produções de 2110,0 U/ L e 2049,0 U/L, pode-se observar que baixas concentrações de milhocina são melhores para a atividade enzimática. Entretanto, há um declínio da atividade enzimática com o aumento da concentração da fonte de milhocina a partir de 1%, mostrando a influência da fonte de nitrogênio (Tabela 8).

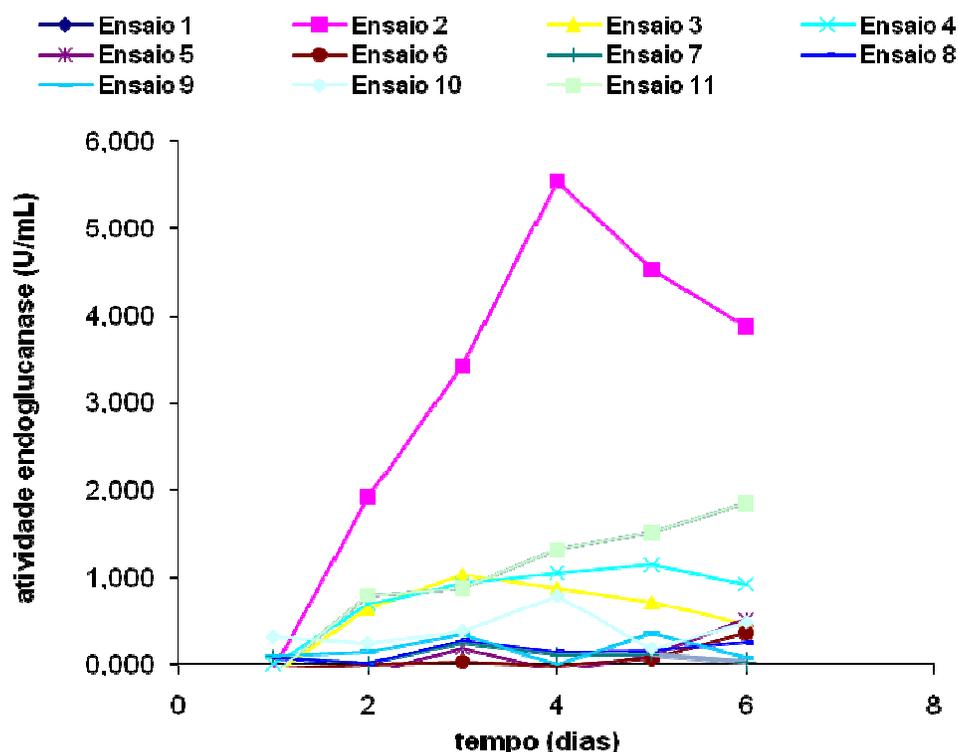


Figura 6 – Cinética da produção de endoglucanases (CMCases) por *Penicillium* SMFB 18 em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio.

Tabela 8 – Matriz do delineamento Central Composto para o *Penicillium* sp. SMFB 18 após 4 dias de fermentação submersa.

ENSAIO	Valores Decodificados		Atividade CMC _{Case} (U.L ⁻¹)
	X ₁ Fonte de Carbono (%)	X ₂ Fonte de Nitrogênio (%)	4 dias
1	1,0	0,5	2110,0
2	3,0	0,5	5551,0
3	1,0	1,5	1762,0
4	3,0	1,5	791,0
5	0,6	1,0	0,00
6	3,4	1,0	0,00
7	2,0	0,3	2049,0
8	2,0	1,7	1321,0
9	2,0	1,0	146,0
10	2,0	1,0	0,00
11	2,0	1,0	0,00

Com o fungo filamentoso *P. funiculosum*, em fermentação submersa utilizando como fonte de carbono celulignina de bagaço de cana, Castro (2006) obteve 1800 UI endoglucanase/L e 800 UI β – glucosidase em 120h. O isolado *Penicillium* SMFB 18 apresentou resultados 67% maiores em bagaço não tratado (5.551,0 U/ L⁻¹), mostrando o potencial deste micro-organismo. Carvalho (2007) obteve uma melhor produção de endoglucanases e β–glucosidase pelo *P. funiculosum* ao utilizar Avicel como fonte celulósica, obtendo 9.204,0 UI EG/ L e 2.395,0 UI BG/ L.

De acordo com os resultados obtidos, o tempo de 4 dias, onde se obteve a melhor atividade, foi escolhido para construção da superfície de resposta e através desta análise foi possível determinar as condições otimizadas, conhecendo a significância estatística da resposta (Tabela 9).

Tabela 9 - Coeficientes de regressão para a resposta atividade CMCase após 4 dias de fermentação, utilizando bagaço de cana e milhocina como substratos.

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p	Limite de Confiança - 90%	Limite de Confiança +90%
Média	0,05	0,76	0,1	0,95157	-1,49	1,58
Fonte de C(L)	0,31	0,47	0,7	0,53811	-0,63	1,25
Fonte de C (Q)	0,40	0,56	0,7	0,50018	-0,72	1,52
Fonte de N (L)	-0,77	0,47	-1,6	0,16106	-1,71	0,17
Fonte de N(Q)	1,25	0,56	2,2	0,07497	0,13	2,37
C X N	-1,10	0,66	-1,7	0,15588	-2,43	0,23

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão, onde pode-se observar que somente o termo quadrático da concentração da fonte de nitrogênio ($p = 0,075$) foi significativo. Estes resultados foram confirmados pelo Diagrama de Pareto, mostrando que o efeito do nitrogênio quadrático (Q) foi significativo, enquanto os outros fatores, inclusive o efeito da interação entre C:N, não apresentaram significância estatística em 90% (Figura 7).

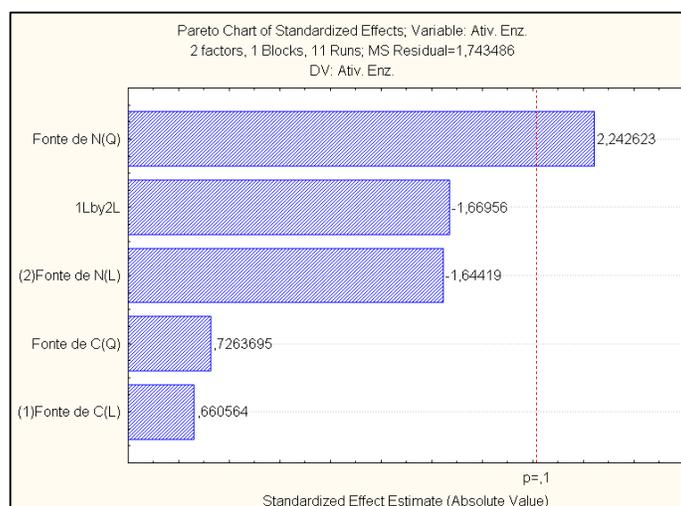


Figura 7 - Diagrama de Pareto para a Atividade Endoglucanásica do *Penicillium* sp. SMFB 18, em fermentação submersa. Mostrando a variável significativa com $p \geq 0,10$ (milhocina para o *Penicillium* sp.)

Através destes resultados foi possível elaborar uma equação deste modelo (Equação 1), com as variáveis codificadas:

$$\text{Equação 1: } Y = 0,05 + 0,31x_1 - 0,40x_1^2 - 0,77x_2 + 1,25x_2^2 - 1,10 x_1 x_2$$

De acordo com a análise de variância (ANOVA), mostrada nas Tabelas 10 e 11, verifica-se que o F calculado (2,30) foi cerca de 5 vezes menor que o F tabelado (10,97). Além disso, o valor de R^2 foi muito baixo (68,7%), mostrando que o modelo não foi significativo em nível de 90%, na faixa estudada.

Entretanto, analisando os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno (Figuras 8A e 8B), foi possível observar que o aumento da concentração da fonte de carbono e nitrogênio, levará ao aumento na produção de celulase.

Tabela 10 - ANOVA para atividade CMCase com bagaço de cana de açúcar e milhocina produzida pelo fungo *Penicillium* sp. SMFB 18.

Fator	ANOVA QMR = 1,7434				
	SQ	GL	QM	F _{calc}	P
Fonte de C (L)	0,76	1	0,76	0,43635	0,538106
Fonte de C (Q)	0,92	1	0,92	0,52761	0,500178
Fonte de N (L)	4,71	1	4,71	2,70337	0,161057
Fonte de N (Q)	8,77	1	8,77	5,02936	0,074967
C x N	4,86	1	4,86	2,78742	0,155876
Erro	8,72	5	1,74		
Total SS	27,83	10			

Tabela 11 - ANOVA para atividade CMCase no 4° dia de fermentação com bagaço de cana de açúcar e milhocina produzida pelo fungo *Penicillium* sp. SMFB 18

Fontes de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	20,02	5	4,00		
Resíduos	8,72	5	1,74	2,30	10,97
Total	28,74	10	2,78		

% variação explicada (R^2) = 68,7 %; $F_{5;5;0,01} = 10,97$

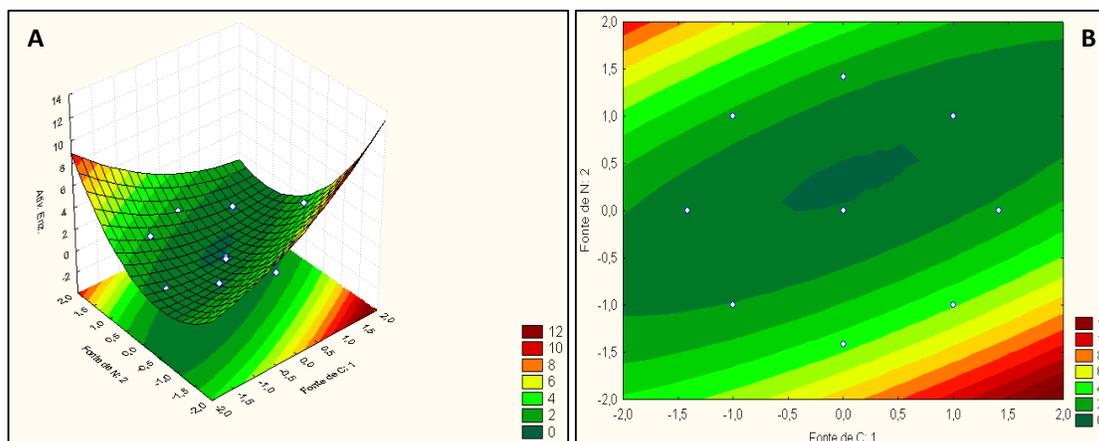


Figura 8: A) Superfície de resposta e B) curvas de contorno para produção de CMCases pela estirpe *Penicillium* sp. SMFB 18 em diferentes concentrações de bagaço de cana e milhocina, após 4 dias de fermentação.

1.2. *Streptomyces erythrogriseus* IGAR 01

O melhor resultado obtido pelo *Streptomyces erythrogriseus* para produção de CMCases (431 U/L) foi obtido no ensaio 6 com 3,4% bagaço de cana e 1,0% milhocina, ao fim de 2 dias de fermentação. A diminuição da concentração da fonte de carbono levou a uma queda da atividade enzimática, como mostram os outros ensaios do planejamento (Tabela 12). Da Vinha (2010) obteve resultados similares com a estirpe *Streptomyces viridobrunneus* em fermentação submersa, utilizando bagaço de cana de açúcar e milhocina, 440 U/L de atividade CMCásica, em dois dias de fermentação.

Santos (2010), analisando a produção de celulase em bagaço de cana por actinomiceto isolado de resíduos de sisal, também obteve baixa produção de CMCase, 230 U/L. Utilizando bagaço de sisal como fonte de carbono, entretanto, o mesmo autor conseguiu elevar a produção para 630 U/L. Isto indica que *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 tem potencial para produção de celulase, porém outras fontes de material lignocelulósico devem ser testadas.

Tabela 12 – Matriz do delineamento Central Composto para o *Streptomyces erythrogriseus* IGAR 01 aos 2 dias de fermentação submersa.

ENSAIO	Valores Decodificados		Atividade CMCase (U.L ⁻¹)
	X ₁ Fonte de C (%)	X ₂ Fonte de Nitrogênio (%)	2 dias
1	1,0	0,5	12,0
2	3,0	0,5	0,0
3	1,0	1,5	0,0
4	3,0	1,5	19,0
5	0,6	1,0	33,0
6	3,4	1,0	431,0
7	2,0	0,3	0,0
8	2,0	1,7	0,0
9	2,0	1,0	40,0
10	2,0	1,0	186,0
11	2,0	1,0	0,0

De acordo com as análises estatísticas, o planejamento não foi significativo para nenhum dos fatores (fonte de carbono ou fonte de nitrogênio) dentro das faixas estudadas (Tabela 13). No entanto, analisando os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno, é possível observar que as maiores produções de celulase foram obtidas nas maiores concentrações de bagaço de cana (Figuras 9A e 9B), indicando que um deslocamento da faixa estudada neste sentido, poderá levar a um aumento da atividade enzimática.

Tabela 13 – Análise dos coeficientes de regressão para a resposta atividade CMCCase após 2 dias de fermentação, utilizando bagaço de cana e milhocina como substratos

Fator	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p	Limite de Confiança	
					- 90%	+90%
Média	0,07	0,07	1,0	0,35294	-0,07	0,22
Fonte de C(L)	0,07	0,05	1,5	0,1748	-0,02	0,16
Fonte de C (Q)	0,05	0,05	0,9	0,38304	-0,06	0,16
Fonte de N (L)	0,00	0,04	0,0	0,98526	-0,09	0,09
Fonte de N(Q)	-0,06	0,05	-1,2	0,28149	-0,17	0,04
C X N	0,00	0,06	0,1	0,90795	-0,12	0,14

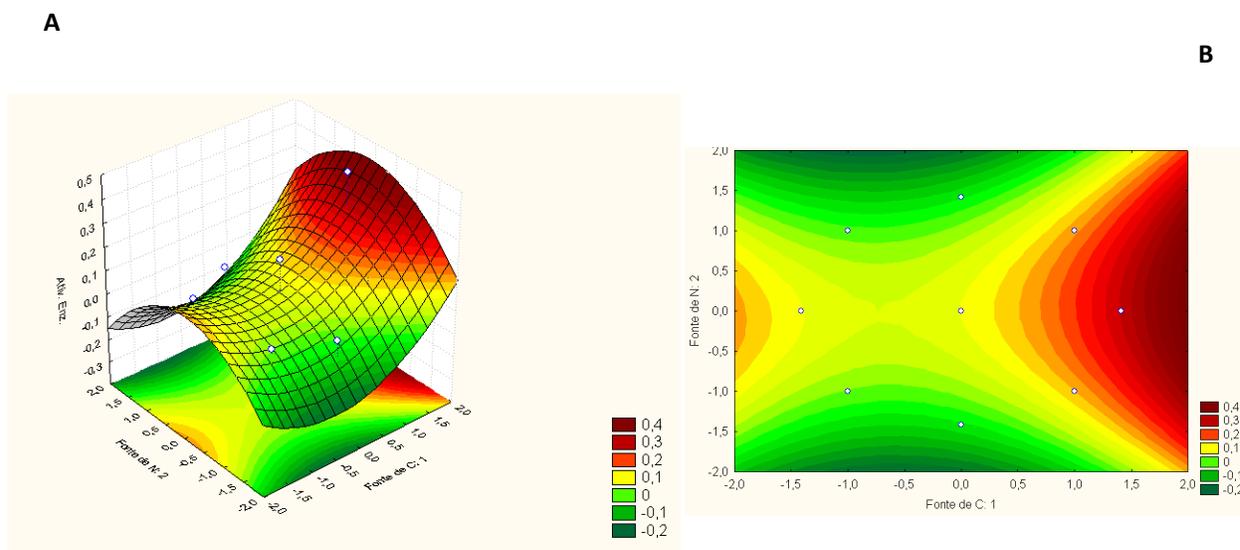


Figura 9: A) Superfície de resposta e B) curvas de contorno para produção de CMCases pela estirpe *Streptomyces erythrogriseus* IGAR 01 em diferentes concentrações de bagaço de cana e Milhocina , após 2 dias de fermentação.

2. Caracterização Parcial dos Extratos Enzimáticos

2.1. Perfil ótimo de temperatura

Foi observado que a temperatura ótima para a atividades enzimáticas de celulase para o fungo *Penicillium* sp. SMFB-18 foi a 60°C (Figura 10) e para actinobactéria *Streptomyces erythrogriseus* (Figura 11) foi a 50°C quando se utilizou o bagaço de cana. Em ambos os casos, foi possível observar uma queda acentuada na atividade a partir do ótimo de atividade para cada micro-organismo estudado. Os resultados obtidos neste trabalho com relação à temperatura ótima de endoglucanases das linhagens de *Streptomyces* estão de acordo com aqueles encontrados na literatura para outros gêneros de *Streptomyces*. Jan & Chen (2003) descreveram uma endoglucanase produzida por uma linhagem termofílica (*Streptomyces* T3-1), com temperatura ótima a 50°C, enquanto que Schrempf & Walter (1995) citaram uma endoglucanase de *Streptomyces reticuli* com temperatura ótima a 55°C.

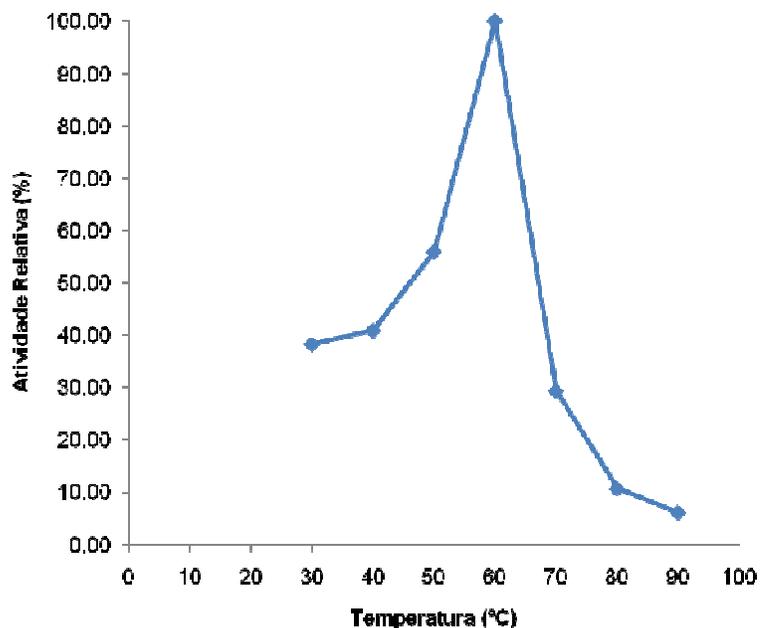


Figura 10 – Efeito da temperatura na atividade celulásica produzida pela estirpe *Penicillium* sp. SMFB 18, utilizando bagaço de cana e milhocina em fermentação submersa, após 4 dias de crescimento.

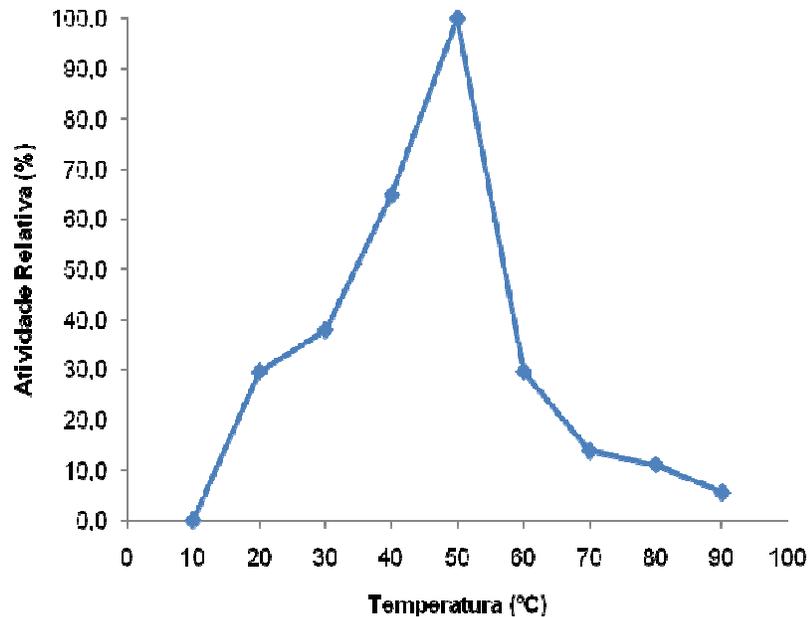


Figura 11 – Efeito da temperatura na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01, em bagaço de cana e milhocina, após 4 dias.

2.2. Perfil ótimo de pH

Quanto ao pH, a atividade celulásica dos sobrenadantes obtidos a partir da utilização de bagaço de cana e milhocina apresentou um ótimo em pH 4,0 tanto para o fungo *Penicillium* sp. SMFB-18 como para o *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01 (Figuras 12 e 13). Foi possível observar na Figura 12 (perfil de pH do fungo *Penicillium* sp. SMFB-18), que o máximo de atividade foi mantida acima de 60 % na faixa de pH 3,0-6,0, o que não foi observado para o extrato enzimático de *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01, cuja atividade enzimática ficou abaixo de 30% na mesma faixa de pH (Figura 13). Estas características podem ser importantes quando se pensa em aplicações industriais. Segundo Kyoung Lee et al., (2010) a endoglucanase produzida pelo *Penicillium purpurogenum* apresentou atividade significativa em pH entre 4 a 7, mostrando atividade máxima na faixa ácida de pH entre pH 4 a 6. A atividade endoglucanásica foi detectada a temperatura de 70°C, havendo um rápido decréscimo em temperatura superiores a 75°C. Esses resultados mostram coerência entre faixa de pH onde ocorreu melhor atividade pelo *Penicillium* sp. SMFB-18, demonstrando a existência de endoglucanases ácidas. Segundo Silva e Gouveia (2008) analisando o perfil de pH

de duas linhagens de *Streptomyces* observou que o pH ótimo ocorreu em 4,8 para ambas linhagens, ocorrendo um pico de atividade em pH 7,0.

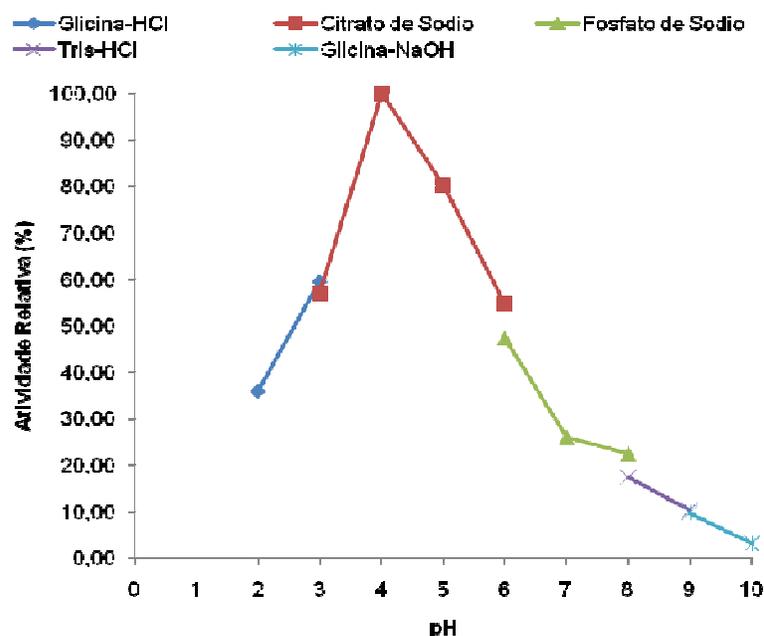


Figura 12: Efeito do pH na atividade celulásica produzida pela estirpe *Penicillium* sp. SMFB 18, utilizando bagaço de cana e milhocina, após 4 dias.

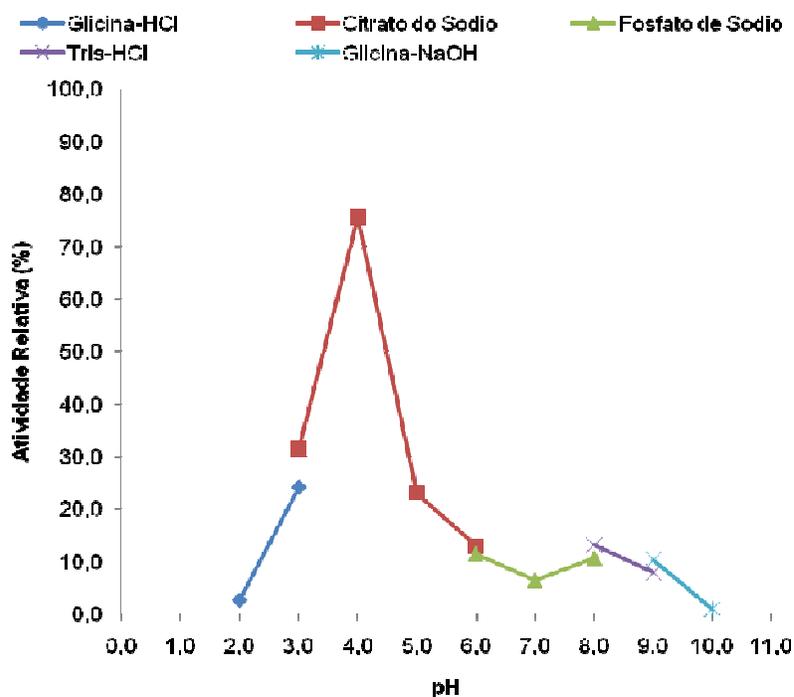


Figura 13: Efeito do pH na atividade celulásica produzida pela estirpe *Streptomyces erythrogriseus* IGAR-01, utilizando bagaço de cana e milhocina, após 4 dias.

2. Produção de Celulases em Bioreator

Os ensaios em bioreator de 4 litros foram realizados em meio de Mandels com celulignina semi deslignificada a 200rpm, temperatura de 30°C, durante 4 dias.

Ampliar a escala de produção de um sistema de fermentação corresponde a utilizar condições de reação que permitam manter o rendimento e produtividade do processo, aumentando a quantidade final do produto. Em escala de bancada, em que a operação tem como objetivo estudar a fisiologia microbiana, as culturas são desenvolvidas em condições de boa homogeneização, que é facilmente conseguida utilizando um volume pequeno (ROSEIRO, 2003).

A celulignina semi deslignificada trata-se do bagaço de cana que sofreu os pré-tratamentos ácido e básico. Este tratamento tem por finalidade a remoção da fração hemicelulósica e, conseqüentemente um aumento na acessibilidade da celulase a agentes microbianos, utilizados em futuras fermentações (BETANCUR, 2005). Segundo Rocha (2011), os elevados teores de celulose (acima de 45%) contidos no bagaço de cana, indicam um elevado potencial deste material para a sua conversão em precursores da sacarificação. Se o bagaço vai ser hidrolisado por enzimas, é necessário um pré-tratamento do material para remoção das hemiceluloses e reforçar a convertibilidade enzimática de celulose. O pré-tratamento ácido, usando principalmente o ácido sulfúrico, e métodos hidrotermais, com base na ação autocatalítica de ácido acético liberado pela clivagem hidrolítica de grupos acetil, têm se mostrado eficazes na melhoria da hidrólise enzimática da celulose.

No entanto, neste trabalho o aumento de escala, bem como o emprego da celulignina semi deslignificada resultou em melhores produções. Ao contrário levou à diminuição da produção da enzima. No bioreator as melhores atividades obtidas de CMcase foram 1.404U/L após 92 h de fermentação e 101 U/L de β -glicosidase em 58h de fermentação pelo *Penicillium sp.* SMFB 18 (Figura 14 e Tabela 14).

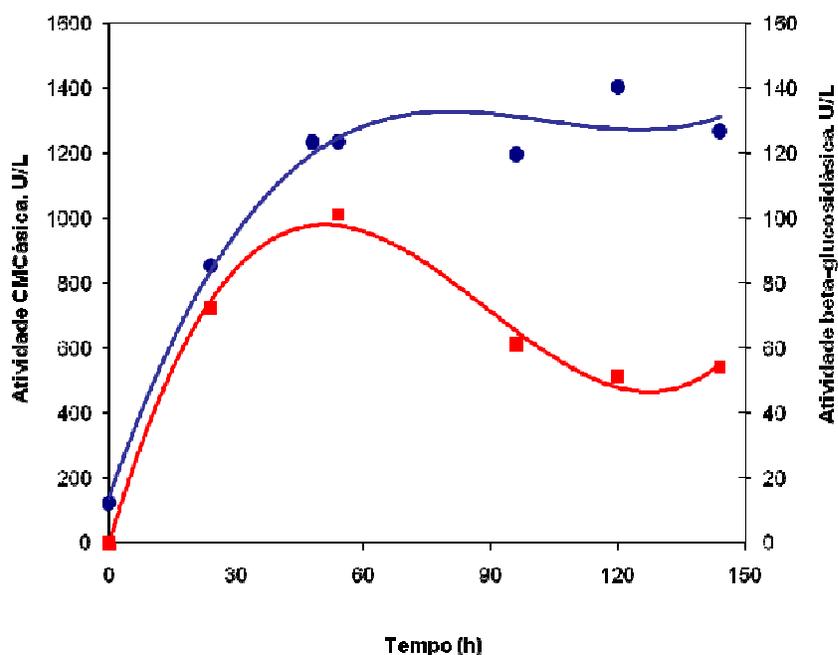


Figura 14 – Atividade CMCásica e β -glucosidásica do *Penicillium* SMFB 18 em bioreator.

Tabela 14 – Atividades CMCásicas obtidas em bioreator Biostat Braun Biotech International 4,0 L por 6 dias pelo micro-organismo *Penicillium* sp. SMFB 18.

Tempo em horas de Fermentação (h)	Atividade Enzimática CMCCase (U/L)	Atividade Enzimática β - Glucosidase
0	1,231	0
12	0,853	72
24	1,234	87
36	1,236	101
48	1,197	61
60	1,404	51
72	1,269	54

Esta produção foi cerca de 4 vezes menor do que a produção de celulase em frascos agitados, utilizando bagaço de cana in natura como fonte de carbono

em meio Breccia et al (1995). Isto mostra que o meio utilizado para o aumento de escala foi desfavorável para a produção da enzima.

Maeda (2010), obteve uma atividade de β -glucosidase bastante elevada pelo *Penicillium funiculosum* (1.835 U/L) utilizando celulignina parcialmente deslignificada (CPD). Isto mostra que, no caso deste trabalho, provavelmente o meio teve influencia negativa na atividade de β -glucosidase.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os substratos se mostraram bons para a produção de enzimas por fermentação submersa, requerendo estudos complementares para ajuste dos parâmetros operacionais do processo fermentativo. Isto é muito comum, pois pode ocorrer que, num primeiro planejamento, não seja possível determinar a condição otimizada e sejam necessários outros planejamentos, alterando-se a faixa de estudo de cada variável, para otimizar as condições de fermentação.

As duas estirpes selecionadas para os ensaios fermentativos, o fungo filamentoso *Penicillium* sp. SMFB-18 e a actinobactéria *Streptomyces erythrogriseus* IGAR 01, mostraram-se promissoras para produção de celulasas em fermentação submersa em frascos agitados.

Além disso, o isolamento desses micro-organismos nos dois tipos de sedimentos, abre uma infinidade de possibilidades para o estudo de produção de enzimas de interesse industrial além das celulasas, como xilanases, amilases, lípases etc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMICUCCI, A.; ZAMBONELLI, A.; GUIDI, C.; STOCCHI, V.; Morfological and molecular characterization of *Pulvinula consellatio* ectomycorrhizae. **FEMS. Microbiology Letters**, vol. 194, p. 121 – 125, 2001.

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187-198, 2000.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Microorganismos endofíticas: uma revisão sobre o controle de insetos e os recentes avanços em plantas tropicais. **Revista Eletrônica da Biotecnologia**, vol.3, p.40-65, de 1984.

BAILEY, M. J.; TATHTIHARJU, J. Efficient cellulose production by *T. reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer – controlled feeding strategy. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 62, p. 156 – 162, 2003.

BARROSO, L.V. Diagnóstico ambiental da Lagoa de Araruama. **Boletim da Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza**, Rio de Janeiro, vol. 22, p. 30-65, 1987.

BARROSO, L.V.; BERNARDES, M.C. Um patrimônio cultural ameaçado: poluição, invasão e turismo sem controle ameaçam lagoas fluminenses, **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro vol. 19, nº110, p.70 - 74, 1995.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO L. C. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acucar e madeira em decomposição**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES- Setorial Rio de Janeiro**, n.25; p 35-38; 14-22, 2007.

BEG, Q.B., SAHAI, V. & GUPTA, R. Statistical model optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**. v. 39, pp. 203-209, 2003.

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

BELGHITH, H. ; ELLOUZ – CHAABOUNI, S. ; GARGOURI, A. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. **Journal Biotechnology**, vol 89, p. 257 – 262, 2001.

BERLIN, A., MAXIMENKO, V., GILKES, N., SADDLER, J.,. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioenginery**, vol. 97, p. 287–296. 2007.

BETANCUR, G. Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipítis*. 2005. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

BHAT, M.K. e BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620. 1997.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 241-271, 2008.

BOSCO M.C., et al. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. **Microbiology Letters**.vol 213:733–749. 2008.

BRECCIA, J. D.; CASTRO, G. R.; BAIGORÍ, M. D.; SIÑERIZ, F. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal Applied Bacteriology**, vol.78, p. 469-472, 1995.

CANETTIERI, E.V. et al., Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology, **Bioresource Tecnology**, vol 98, p. 422-428, 2007.

CANO, J. ; GUARRO, J. ; J. GENÉ. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum* Species of Clinical. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2450-2454, Vol. 42, No. 6, June 2004.

CARDOSO PG, QUEIROZ MV, PEREIRA OL E ARAÚJO EF Morfológicas e molecular diferenciação da pectinase produtor fungos *Penicillium expansum* e *Penicillium griseoroseum* . Brazilian Journal Microbiology.vol. 38, 71-77. 2007.

CARDOSO, V.M.G. et al . Effect of enzyme extracts isolated from White - rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 141, no. 3-4, p. 326-338. April 2008.

CARVALHO, M. L. A. Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa. 2007, 89 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)**. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

CASTELLANI, A. A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal Tropical Medical. Hygienic**. Vol. 70, p. 181-184, 1967.

CASTLE, A. et al. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. **Applied and Environ. Microbiology**, vol. 64 133-137. 1998.

CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), 2006. 212 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)**. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile processes. **Carbohydrate Polymers**, vol. 37, p. 273–277, 1998.

CHEN, C.; CHEN, J. L.; LIN, T. Y. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 21, p. 91-96, 1997.

CHERRY, J. R. & FIDANTSEF, A. L. Directed evolutions of industrial enzymes: an update. **Current Opin. Biotechnology**, v. 14, p. 438 – 443, 2003.

CHOI, H.; AL-ABED, S. R. Effect of reaction environments on the reactivity of PCB (2-chlorobiphenyl) over activated carbon impregnated with palladized iron. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 179(1-3), p.869-874. 2010.

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

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto/2009 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2009. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/> Acessado em 19 de agosto de 2009.

COSTA, I. P. M. W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do rio Paripe, ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil**. 2003. Dissertação. (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

COUTINHO, R. et al., In: Araruama: Uma lagoa, **Revista Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, vol 25, n^o 149, 1998.

DAHLBERG, L.; HOLST, O.; KRISTJANSSON, J. K. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 40, p. 63-68, 1993.

DAS, M.; ROYER, T. V.; LEV, L. G. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 73, p. 756–767, 2007.

DILLON, A.J.P.; PAESE-TORESAN, S.O. e BARP, L.P. Isolation of cellulase producing mutants from a *Penicillium* sp. strain denominated 3MUV24. **Revista Brasileira de Genética**, vol. 15, n. 3, p. 491-498., 1992.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**. Vol 55. p. 1-33. 1996.

FAOSTAT, bases de dados estatísticas da FAO, <http://faostat.fao.org/>.2006.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Woody chemistry, ultrastructure, reactions**. Editora Walter de Gruyter, 613 p. Berlin ,1989.

FENNINGTON, G.; NEUBAUER, D.; STUTZENBERGER, F. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. **Applied Environ. Microbiology**. Vol.47(1), p.201-204, January,1984.

FREEDONIA . The Freedonia Group Incorporated, 2005. World Enzymes to 2009. Endereço eletrônico: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf> Acessado em: 20/06/2006.

FREEDONIA- The Freedonia Group Incorporated, 2009. **World Enzymes to 2013**. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>. Acessado em: 18 de setembro de 2010.

GALVEZ, A. et al., Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis current and futuristic scenarios, **National Renewable Energy Laboratory**, 2000.

GÁMEZ, Sara; GONZÁLEZ-CABRIALES, Juan José; RAMÍREZ, José Alberto; GARROTE, Gil and VÁZQUEZ, Manuel. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, vol. 74, no. 1, p. 78-88. May 2006.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 7623-7629. 2008.

GENENCOR site: <http://www.genencor.com/wps/wcm/>. Acesso em 14/01/2010.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 171–175, 2001.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Applied Chemistry**, vol. 59, n. 2, p.257-268, 1987.

GODFREY et al. **The enzymes market for grain processing**, In: Recent Advances in Enzymes in Grain Processing. p. 401–406. 2003.

GODFREY, T.; WEST, S. Textiles. In: *Industrial Enzymology*, **Maxmilliam Press**, London. 2nd edition, p. 360-371. 1996.

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

GRIGOREVSKI, de AL et. al. Fermentação em estado sólido com *Aspergillus Niger* em Resíduos agrícolas – palha. In: Energia na Indústria de Açúcar e Álcool, Piracicaba – SP. **Curso Internacional**, Brasil. 2005.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity GUSAKOV, A.V., SALANOVICH, T.N., ANTONOV, A.I., USTINOV, B.B., OKUNEV, O.N., BURLINGAME, R., EMALFARB, M., BAEZ, M. and SINITSYN, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Bioengenhary**, vol. 97, p.1028–1038, 2007.

HAGESKAL G, et al., Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**. vol 72, p. 7586–7593. 2006.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, vol. 65, no. 3, pp. 251–253, 2006.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal Microbiology**. vol 33, p. 213-218. 2002.

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pré-tratamentos para melhorar a digestibilidade dos biomassa lignocelulósica, **Tecnologia Bioresource**, vol.100, p. 10-18. 2009.

HOLTZAPPLE, M.; COGNATA, M.; SHU, Y.; HENDRICKSON, C. Inibition of *Trichoderma reesei* by sugars and solvents, **Biotechnology Bioengeny**, vol. 36, p. 275 – 287, 1990.

HOPWOOD, D. A.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F.; KIESER, T.; BRUTON, C. J.; KIESER, H. M.; LYDIATE, D. J.; SMITH, C. P.; WARD, J. M.; SCHREMPF, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*. **A laboratory Manual**. The John Innes Institute, Norwich, United Kingdom, 1985.

HOWARD, R. L. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme

- production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.
- INGRAM, L. O. & DORAN, J.B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiol. Rev.** vol 16, p. 235-241, 1995.
- JAITLY, A. K. pH optim of the fungi isolated from mangroves soils in India. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 28, p. 137-143, 1987.
- JAN, H.D.; CHEN, K.S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 263–268, 2003.
- JONES, E.B.G.; ALIAS, S.A. Biodiversidade de fungos de manguezais. In: **Biodiversidade do Microfungos Tropical**. Ed. KD Hyde, Hong Kong University Press, Hong Kong, p.71-92. 1997.
- KAWAMORI, M; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Preparation of mutants resistant to catabolite repression, **Agriculture Biology Chemistry**, vol. 49, p. 2875 – 2879, 1985.
- KIM, B., AL-TAI, A.M., KIM, S. B., SOMASUNDARAM, P. & GOODFELLOW, M. *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase producing streptomycete. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, vol. 50, p. 505-509, 2000.
- KISS, J. Z.; MILLER K. M.; OGDEN L. A.; ROTH, K. K.; Phototropism and gravitropism in lateral roots of Arabidopsis. **Plant Cell Physiology**, vol 43, p. 35–43, 2002.
- KNAUF M, MONIRUZZAMAN M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, vol.106, p.147–50. 2004.

KUBICEK, C.P. et. al. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 90-99. 1993.

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

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008.

KYOUNG-MI Lee et. al. Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol 46, p 206–211, 2010.

LACAZ,C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI,ME.; MELO,NT. **Tratado de micologia médica Lacaz.**, editora Sarvier, 110p., São Paulo, 2002.
LARONE, D.H. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. Ed. 4th, ASM Press,Washington, DC. 2002.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J. and RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, vol. 23, no. 5, p. 367-380. November 2002.

LEBLOND, P.; DECARIS, B. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 123, p. 223-232, 1994.

LIMA, A. O. et al., Molecular characterization of a beta-1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol 68(1), p. 57-65. 2005.

LYND, L. R. et. al.. Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: an Update. **Biotechnology**, vol.16, p. 577–583. 2005.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V e PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. vol. 66, n. 3, p. 506–577. 2002.

MAEDA, Roberto Nobuyuki. Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração, 2010, 197 f., **Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

MAKI, M.; LEUNG, K.T.; QIN, W. The prospects of cellulase – producing bactéria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences** , vol 5, p. 500 – 516. 2009.

MAKIMURA, K. et al., Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal Medical Microbiology**. Vol 49, p. 29-35, 2000.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. **Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, p. 105-114, 2003.

MANDELS, M.; WEBER, J.; PARIZEK, R. **Applied Microbiology**, vol. 21, p. 152, 1971.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Plano de Manejo da APA do Pratigi**. Encarte II. Zoneamento e Plano de gestão. Ituberá, Set, 2004.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. Chapter 1, 6, 7. 4th edition. John Wiley & Sons, New York, 1997.

NOUHRA, E.R.; DOMÍNGUEZ, L.S.; BECERRA, A.G.; TRAPPE, J.M.; Morphological, molecular, and ecological aspects of the South American hypogeous fungus *Alpova austroalnicola* sp. nov. **Mycologia**, vol. 97, p.598–604. 2005.

OLIVEIRA, R.S. et al. Genéticos, variação fenotípica e funcional dentro de um *Glomus geosporum* isolado cultivada com ou sem o estresse de um sedimento altamente alcalinas antropogénicas. **Soil Aplicada Ecologia**, vol.45, p. 39-48. 2010.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. **Enzyme Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

OSHEROV N; MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS. Microbiology Letters**, vol. 199, p. 153–160. 2001.

PALMIERI, G. et al., Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**. vol . p. 920-924. 2000.

PARK S; JOHNSON DK; ISHIZAWA CI; PARILLA PA; DAVIS MF. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state C-13 nuclear magnetic resonance. **Cellulose**. vol 16(4), p.641–647. 2009.

PEREIRA Jr. et. al.. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, Rio de Janeiro, editora Amiga digital. v. 2, 46 p., 2008.

PEREIRA, R.E. Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para Produção de Etanol. 2006. **Tese de Dissertação (Mestrado) Escola de Química**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil, 2006.

PEREIRA. P. H. F. **Identificação de estreptomicetos produtores de enzimas de interesse industrial**. 2009. 76p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de

Microbiologia Prof. Paulo de Góes / Rio de Janeiro, 2009.

QINNGHE, C. et al., The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**. Vol 39, p. 561-1566. 2004.

RECZEY, E.; ZACCHI, G. Cellulase production by *Trichoderma reesei*, *Bioresource Technology*, vol. 57, p. 25 – 30, 1996. review. **Bioresource Technology**. v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

RESOLUÇÃO – RDC/ANVISA nº 220, de 21 de setembro de 2004.

RIBEIRO, T. P. S. Fungos Queratinofílicos em areia de parques escolares de Boa Vista. 2009. 48f. **Monografia (Especialização)** – Curso de Especialização em Recursos Naturais. Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

ROCHA, J.D.; PÉREZ, J.M.M.; CORTEZ, L.A.B. Aspectos Teóricos e Práticos do Processo de Pirólise de Biomassa, **Curso internacional “Energia na Indústria de Açúcar e Álcool”** UNIFEI, Itajubá, 12-16 de julho de 2011.

RODRIGUES, M. I. ; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**, segunda edição, Editora Casa do Pão, 2009.

RODRÍGUEZ-CHONGA, A.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic de avaliação. **Journal Food Engenery**. vol 61(2), p. 143-152. 2004.

ROMERO, M.D.; AGUADO, J.; GONZALEZ , L.; LADERO, M. 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme Microbiology Technology** ,vol. 25, p. 244-250, 1999.

ROSEIRO, J.C.P. **Tecnologia de Fermentações**. Art.9º, linha A, Decreto-Lei 301/72. Dep. Química, Universidade de Évora, Portugal, p. 86-133, 2003.

ROWELL M. R.; PETERSEN, R.; HAN J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALA, M. A. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. Chapter 3: Cell wall chemistry. CRC Press. 487p., 2005.

RYU et al., Studies on quantitative physiology of *T. reesei* with two-stage continuous culture for cellulose production, **Biotechnology Bioengineering**, vol. 21, p. 1887 – 1903, 1979.

SAAD, M.B.; OLIVEIRA, L.R.; CÂNDIDO, R.G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 43, p. 220-225, 2008.

SADDLER, J. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Exploded and Ethanol Organosolv-Pretreated Douglas-Fir by Novel and Commercial Fungal Cellulases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 219-230. 2005.

SAHA, B.C.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Produção, purificação e propriedades de endoglucanase de BEG, Q.B. Statistical model optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 203-209, 2003.

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

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANGLIER, J. J., HAAG, H., HUCCK, T. A. & FEHR, T. Novel bioactive compounds from actinomycetes (1988-1992). **Res. Microbiol.** vol. 144, pp. 633-642, 1993.

SANTOS, D.B. Bioprospecção de actinomicetos produtores de celulase de resíduos do sisal. 2010. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal do Recôncavo da

Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2010.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: Ecosistema entre a terra e o mar. **Caribbean Ecological Research**, 1ª Ed., p. 64. São Paulo.1995.

SCHAFNER, D.W.; TOLEDO, R.T. Cellulase production in continuous culture by *T. reesei* on xylose-base media, **Biotechnology Bioengeny**, vol. 39, p. 865 - 869, 1992.

SCHREMPF, H. ; WALTER, S. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol.17., p.353-355, 1995.

SINGH, S; SIMMONS,B.A. ; VOGEL, KP. Visualização de solubilização de biomassa sacarificação e fermentação. **Journal of Agriculture Food Chemistry** vol. 57. 2009.

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

SIQUEIRA, F.G. et al., Evaluation of holocellulase production by plant – degrading fungi grown on agro-industrial residues. **Biodegradation**, vol 21(5), p. 815 – 824, 2010.

Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza - SNUC, SNUC - LEI No 9.985, DE 18 DE JULHO DE 2000.

Site: www.novozymes.com., Novozymes has achieved great breakthroughs in cellulosic biofuel recently, but this does not mean we have forgotten about corn ethanol. We have delivered market-leading innovation to this industry for a long time and we will continue to do so both for corn and cellulosic ethanol. (Source: Novozymes, June 10, 2010).

SLACK-SMITH, P.; PYKE, B.; SCHOENFISCH, M. 1997. Management of overwintering pupae. Research Review: CRC Newsletter for the Research Extension Education Program. **The Australian Cottongrower**, vol 3. No. 2., p. 53-54. May 1997.

SOUSA, C. da S. Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro. 2006. **Tese de Dissertação (Mestrado)**. 113f. Universidade Federal da Bahia, Curso de Mestrado em Ciências Agrárias. 2006.

SUKUMARAN R.K. et. al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. **Journal Seek entry for Renewable Energy**, vol. 34(2), p 421–4, 2009.

SUKUMARAN R.K; SHINGHANIA, R.R; PANDEY, A. Microbial cellulases, production and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, vol. 64, p. 832 – 844, November 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

SZABO I. J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Optimized cellulose production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed – batch cultivation, **Journal Biotechnology**, vol. 48, p. 221 – 230, 1996.

THEATER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 43, p. 777-780, 1982.

TUCKEY, S.L.; TALBOT, N.J. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, vol. 39, p. 385–417. 2001.

VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, vol. 157(2), p. 119-124. 2006.

VÁSQUEZ, M. P. et al. **Evaluación del potencial biotecnológico del follaje de caña de azúcar para la producción de etanol**, 2006, Tese de Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.

VILLELA, G.R., et al. Activity of essential oil and its major compound, 1.8- cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill, against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, vol. 45, p. 1–4. 2009.

VILLENA, G.K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 45, p.231–237, 2007.

VYAS, A.; VYAS, D.; VYAS, K. M. Microbial cellulases for industrial application. **Everyman's Science**, vol. 40, n. 6, p. 411-416, 2006.

WALTER, S.; SCHREMPF, H. A síntese do complexo de Golgi para celulose(Avicelase) de *Streptomyces* regulado por mecanismos de ativação e de repressão. **Molecular Genetics and Genomics**. vol. 251, n 2, p. 186 – 195.1995.

WATANABE, H., et al. New endo – β -1,4-glucanases do parabasalian symbionts, *Pseudotriconympha grassii* e *Holomastigotoides mirabile* of Coptotermes. **Cell. Mol. Sci vida**. Vol. 59, p.1983-1992. 2002.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry Biotechnology**. Vol. 121-124, p. 93-104, 2005.

XIN, Z., YINBO, Q., PEIJI, G.,. Acceleration of ethanol production from paper mill

waste fiber by supplementation with b-glucosidase. **Enzyme Microbiology Technology**. vol.15, p. 62–65. 1993.

XU F. et. al. Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw. **Polymer Degradation and Stability**, vol 91, p 1880-1886, 2005.

XU F. SUN J.X., SUN R.C., FOWLER P., BAIRD M.S. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. **Industrial Crops and Products**, vol 23, p 180-193, 2005.

YANG B, WYMAN CE. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol 25, p. 56 – 64, 2008.

YU, H.; ZENG, G.; HUANG, H.; XI, X.; WANG, R.; HUANG, D.; HUANG, G.; LI, J. Microbial community succession and lignocelluloses degradation during agricultural waste composting. **Biodegradation**, vol. 18, p. 793–802, 2007.

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.

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