

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

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS NA
PRODUÇÃO DE CELULASES POR *PENICILLIUM* SP. IS-7 E
TRICHODERMA REESEI RUT-C30 E DE AMILASES POR
STREPTOMYCES SP. IGAR-01**

MARIZA ALVES FERREIRA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
NOVEMBRO - 2011**

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS NA
PRODUÇÃO DE CELULASES POR *PENICILLIUM* SP. IS-7 E
TRICHODERMA REESEI RUT-C30 E DE AMILASES POR
STREPTOMYCES SP. IGAR-01**

MARIZA ALVES FERREIRA

Engenheira Agrônoma
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

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

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
NOVEMBRO - 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

F383

Ferreira, Mariza Alves.

Utilização de resíduos agro-industriais na produção de celulases por *Penicillium sp. IS-7* e *Trichoderma reesei RUT-C30* e de amilases por *Streptomyces sp.IGAR-01* / Mariza Alves Ferreira. Cruz das Almas, BA, 2011.

112f.; il.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.

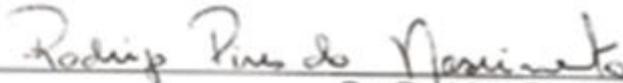
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Resíduos agro-industriais – Utilização. 2. Enzimas. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 579

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

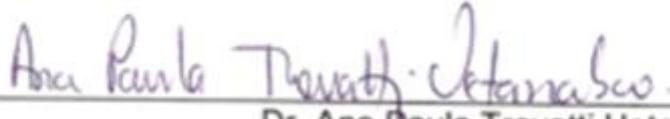
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARIZA ALVES FERREIRA**



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



Dr. André Luiz Grigorevski de Lima
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Dr. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
NOVEMBRO - 2011**

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, por sempre enviar pessoas iluminadas em meu caminho.

Ao Professor Rodrigo (orientador), pela oportunidade concedida.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBioM) Zozilene Teles, Aline Simões, Jackeline Pereira (Jack), Gabriel Lira, Vinicius Nunes, Josenilda Carlos (Josi), Fernanda Morbeck, Daniele Diniz, pela presença constante.

Em especial a Jack, por toda amizade, paciência, dedicação, cumplicidade, apoio e orientação nos trabalhos conduzidos. “Você é uma pessoa especial, jamais esquecerei seus gestos de carinho e incentivo.”

A Josi, pelo convívio, pela ajuda nos trabalhos, pela paciência e pela motivação. “Você é minha irmãzinha querida.”

A professora Márcia Cazetta (coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) e a Luana pelo incentivo e amizade.

Ao Professor Jorge Teodoro de Souza, pela colaboração para minha participação em cursos e eventos.

A minha mãe por cuidar, com amor e dedicação do Murilo em todos os momentos em que não pude estar com ele, devido às atividades acadêmicas.

Aos meus irmãos e marido. Em especial ao Ricardo pela admiração e amor.

A todos da Secretária da Pós-Graduação - UFRB, pelo constante apoio, atenção e dedicação nos trâmites burocráticos das documentações da dissertação.

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.

Dedico

*Ao Murilo, meu filho, minha luz, meu amor
que nasceu junto
com este projeto. E, hoje, com dois aninhos
de idade concretizamos juntos esta
etapa da minha vida.*

ÍNDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Biomassa Lignocelulósica	03
2.1.1. Celulose	04
2.1.2. Hemicelulose	05
2.1.3. Lignina	06
2.4. Resíduos lignocelulósicos	07
2.4.1. Cana-de-açúcar	08
2.4.2. Água de maceração de milho	10
2.4.3. Água de Manipueira	11
2.5. Micro-organismos Lignocelulolíticos	12
2.5.1. <i>Trichoderma sp.</i>	14
2.5.2. <i>Penicillium sp.</i>	14
2.5.3. <i>Streptomyces sp.</i>	15
2.6. Enzimas Lignocelulolíticas	16
2.6.1. Celulases	17
2.6.2. Amilases	21
2.7. Otimização e Planejamento Fatorial	23

CAPÍTULO 1

Produção e caracterização parcial de celulases por *Penicillium* sp. IS-07 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 utilizando palha de cana-de-açúcar e milhocina

Resumo	27
Abstract	28
Introdução	29
Material e Métodos	31
Resultados	36
Discussão	69

CAPÍTULO 2

Produção e caracterização parcial de amilase por *Streptomyces* sp. IGAR-01 utilizando água de manipueira.

Resumo	75
Abstract	76
Introdução	77
Material e Métodos	79
Resultados	83
Discussão	91

CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
-----------------------------	----

REFERÊNCIAS	95
--------------------	----

RESUMO

Ferreira, M. A. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *PENICILLIUM* SP. IS-7 E *TRICHODERMA REESEI* RUT-C30 E DE AMILASES POR *STREPTOMYCES* SP. IGAR-01

Os fungos e as actinobactérias têm sido estudados para produção de enzimas com as mais diversas aplicações biotecnológicas. A utilização de resíduos agro-industriais para a confecção dos diferentes meios de cultura se torna bastante conveniente, devido ao baixo custo e a importância da viabilidade do processo. Neste sentido, objetivou-se, através da utilização da palha de cana-de-açúcar, água de manipueira, extrato de levedura e milhocina, realizar a caracterização enzimática de celulases (*Penicillium* sp. IS-7, *Trichoderma reesei* RUT-C30) e de amilase (*Streptomyces* sp. IGAR-01), obtidas nas melhores condições de cultivo, determinando os seus ótimos de pH e temperatura por meio da fermentação submersa. Os resultados foram obtidos através de planejamentos experimentais com o auxílio do software STATSOFT 7.0[®]. As variáveis mais significativas para a otimização da produção de celulases foi a concentração de milhocina e inóculo (*Penicillium* sp. IS-7); concentração de palha de cana e agitação (*Trichoderma reesei* RUT-C30) e a agitação para produção de amilase por *Streptomyces* sp. IGAR-01. Assim obteve-se atividade máxima para a atividade CMCase de 1.179,19 U.L⁻¹ à 60°C, em pH 5,0 por *Penicillium* sp. IS-7 e o *Trichoderma reesei* RUT-C30 produziu 1.083,90 U.L⁻¹ a 60°C, em pH 7,0; para a atividade FPase os valores máximos de atividade foram 293,8 U.L⁻¹ à 80^o C, em pH 9,0 (*Penicillium* sp. IS-7) e 244,2 U.L⁻¹ à 60° C, em pH 6,0 (*Trichoderma reesei* RUT-C30); para a atividade da amilase produzida por *Streptomyces* sp. IGAR-01, o valor máximo observado foi 2.456,17 U.L⁻¹ em temperatura de 60°C, em pH 6,0. Os resultados mostraram a potencialidade do resíduo lignocelulósico como substrato de baixo custo para a produção de enzimas.

Palavras-chave: Carboximetilcelulose, palha de cana-de-açúcar, manipueira, FPase

ABSTRACT

Ferreira, M. A. USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE IN CELLULASE PRODUCTION BY *PENICILLIUM SP. IS-7* AND *TRICHODERMA REESEI RUT-C30* AND AMYLASE BY *STREPTOMYCES SP. IGAR-01*

Fungi and actinobacteria have been studied for the production of enzymes with a variety of biotechnological applications. The use of agro-industrial residues for the preparation of culture media is quite convenient, because of the importance of low cost and feasibility of the process. In this sense, the objective is, through the use of straw cane sugar, water manipueira, yeast extract and corn steep liquor, perform the enzymatic characterization of cellulase (*Penicillium sp. IS-7* e *Trichoderma reesei RUT-C30*) and amylase (*Streptomyces sp. IGAR-01*), obtained from the best growing conditions, determining their optimal pH and temperature by submerged fermentation. The results were obtained using experimental designs with STATSOFT 7.0 ® software. The most significant variables for optimizing the production of cellulases was the concentration of corn steep liquor and inoculum (*Penicillium sp. IS-7*); concentration of sugarcane straw and agitation (*Trichoderma reesei RUT-C30*) and agitation for production of amylase by *Streptomyces sp. IGAR-01*. Therefore, maximum activity was obtained for CMCase activity of 1179.19 UL⁻¹ at 60 °C at pH 5.0 by *Penicillium sp. IS-7* and *Trichoderma reesei RUT-C30* produced 1083.90 UL⁻¹ at 60° C, pH 7.0, for the activity FPase the maximum activity was 293.8 UL⁻¹ to 800° C at pH 9, 0 (*Penicillium sp. IS-7*) and 244.2 UL⁻¹ at 60° C, pH 6.0 (*Trichoderma reesei RUT-C30*) for amylase activity produced by *Streptomyces sp. IGAR-01*, the maximum observed value was 2456.17 UL⁻¹ at 60 °C, pH 6.0. The results showed the potential of lignocellulosic residues as low cost substrate for the production of enzymes.

Keywords: Carboxymethyl cellulose, straw cane sugar, manipueira, FPase, submerged fermentation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos e as actinobactérias são conhecidos por sua ampla utilização industrial, na produção de compostos bioativos úteis para o ser humano, não apenas substâncias antimicrobianas, como os antibióticos, antifúngicos e antivirais, como também de enzimas com as mais diversas aplicações biotecnológicas. Os gêneros *Streptomyces* (actinobactéria), *Trichoderma* e *Aspergillus* (fungos filamentosos), por exemplo, são os principais produtores destas enzimas, em especial as celulasas (endoglucanases e exoglucanases) e xilanases. Estas enzimas, juntamente com as beta-glucosidases, compreendem as principais enzimas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, que compõem os resíduos agro-industriais. Assim sendo, dentro do contexto etanol 2ª e 3ª gerações, tornou-se interessante realizar um estudo mais aprofundado sobre a produção de enzimas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, por fungos e actinobactérias isolados de ambientes brasileiros (NASCIMENTO, 2005).

Considerando a importância da viabilidade do processo, a utilização de meios de cultura de baixo custo para esta produção enzimática deve ser considerada, portanto, a utilização de resíduos agro-industriais para a confecção dos diferentes meios de cultura se torna bastante conveniente. Dentre os resíduos lignocelulósicos disponíveis em nosso país, destacamos o farelo de trigo, a palha e o bagaço de cana-de-açúcar e também o bagaço de sisal, que podem ser adicionados no meio de cultura como a principal fonte de carbono (DASHTBAN et al., 2009). Para um melhor aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, estes geralmente são submetidos a um pré-tratamento, que pode ser físico ou químico, onde um dos mais comuns são os tratamentos térmicos de explosão a vapor e explosão térmica. Neste tratamento ocorre um maior afrouxamento das fibras e o produto fica mais acessível ao ataque enzimático (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Além das fontes de carbono residuais, a milhocina também é bastante vantajosa para ser adicionada ao meio de cultura, como a principal fonte de nitrogênio, em substituição ao extrato de levedura, uma fonte mais onerosa. A milhocina é obtida a partir do processamento do milho, e corresponde à água de lavagem e embebição dos grãos quando do seu fracionamento em amido e

óleo, sendo rica em prolina. Compreende, portanto, um produto bem mais barato do que o extrato de levedura utilizado comercialmente (MADDIPATI, 2011).

Há de se considerar que além de produzir enzimas lignocelulolíticas a baixo custo, é interessante também que as enzimas produzidas, ou o extrato enzimático obtido, seja capaz de atuar na palha de cana-de-açúcar ou mesmo no resíduo de sisal, e liberar então açúcares redutores a serem utilizados por fim na fermentação alcoólica para a produção do álcool combustível chamado de segunda geração (2 G) (NASCIMENTO, 2009).

As celulasas são uma mistura complexa de enzimas necessárias à solubilização completa da celulose em açúcares que poderão servir, na natureza, como fonte de carbono para o metabolismo microbiano. Celulasas são produzidas, entre outros micro-organismos, por diferentes gêneros de fungos e actinobactérias, sendo os maiores produtores, identificados até agora, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, no caso dos fungos, e *Streptomyces* no caso de actinobactéria (KOVACS et al. 2009). Embora, de forma geral, os níveis deste complexo enzimático, secretado pelos micro-organismos, atendam, na natureza, às necessidades de decomposição da matéria lignocelulósica e disponibilização de açúcares fermentescíveis, o uso industrial das celulasas pressupõe a obtenção de preparações enzimáticas com altos níveis de atividade e estabilidade, sendo, em alguns casos a utilização de recursos da biologia molecular para melhorar linhagens naturais promissoras (NASCIMENTO, 2009).

A obtenção de preparações com alta atividade celulolítica relaciona-se também à otimização do processo fermentativo, principalmente em relação à composição do meio de cultivo (evitar fontes de carbono e nitrogênio repressoras), à forma de conduzir o processo e ao uso de indutores dos genes que codificam para o complexo celulolítico (BON et al. 2008).

Vários trabalhos vêm sendo realizados com celulasas e xilanasas no âmbito industrial, em especial na indústria de papel e celulose, têxtil, detergentes e biocombustível. Alguns trabalhos (NASCIMENTO et al., 2002, SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002, NASCIMENTO et al., 2003, GRIGOREVSKI et al., 2005, TABKA et al., 2006, CHEN et al., 2007) sobre

produção de xilanases e celulases em diferentes substratos indutores já foram realizados com estirpes de actinobactérias isolados de solos brasileiros.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo testar diferentes resíduos agro-industriais (palha de cana-de-açúcar e água de maceração do milho) como fontes de carbono e nitrogênio para a produção de celulases (CMCase e FPase) pela estirpe do fungo *Penicillium* sp. IS-07 em comparação ao *Trichoderma reesei* RUT-C30 e a produção de amilase por *Streptomyces* sp. IGAR-01 em água de manipueira. Realizando a caracterização enzimática parcial dos extratos obtidos nas melhores condições de cultivo, determinando os seus ótimos de pH e temperatura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa Lignocelulósica

Um dos principais componentes das plantas são comumente descritos como biomassa lignocelulósica, que representa uma importante fonte de matéria orgânica renovável. Os lignocelulósicos são constituídos por celulose (30-50%), hemicelulose (15-35%), lignina (10-30%) (DA COSTA SOUSA et al., 2009). Além disso, pequenas quantidades de outros materiais como cinzas, proteínas e pectinas podem ser encontrados em resíduos lignocelulosicos (SANCHEZ, 2009).

Os resíduos agrícolas têm sido alvo de estudos como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustível devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade, além disso, se constituem como excedente de produção (MARTÍN et al., 2007). Os materiais agrícolas, que por suas características naturais são suscetíveis de emprego como substrato para a fermentação, são dois: celulósicos (polpa de café, bagaços, palhas, cascas, cascas de frutas processadas, etc) e amiláceos (batata, milho, mandioca, banana e seus resíduos, entre outros) (SANTOS et al., 2006).

2.1.1. Celulose

A celulose é o maior carboidrato sintetizado pelos vegetais e sua biossíntese anual é estimada entre 10^{10} e 10^{11} toneladas (SAMIR et al., 2005). Além disso, é o principal constituinte da biomassa vegetal, sendo encontrada quase que exclusivamente na parede celular de vegetais. Entretanto, pode também ser sintetizada por alguns animais e algumas bactérias (LYND et al., 2002).

A celulose é constituída por regiões ordenadas, devido numerosas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, e regiões não ordenadas, onde esses domínios são caracterizados como cristalinos e amorfos, respectivamente (Figura 1). O índice de cristalinidade é determinado de acordo com a proporção da região cristalina presente nas fibrilas de celulose (PEREIRA JR., 1991). Estas fibrilas conferem elevada resistência à tensão tornando a celulose insolúvel a vários solventes, o que lhe confere resistência à degradação microbiana (DING e HIMMEL, 2006; MATTHEWS et al., 2006).

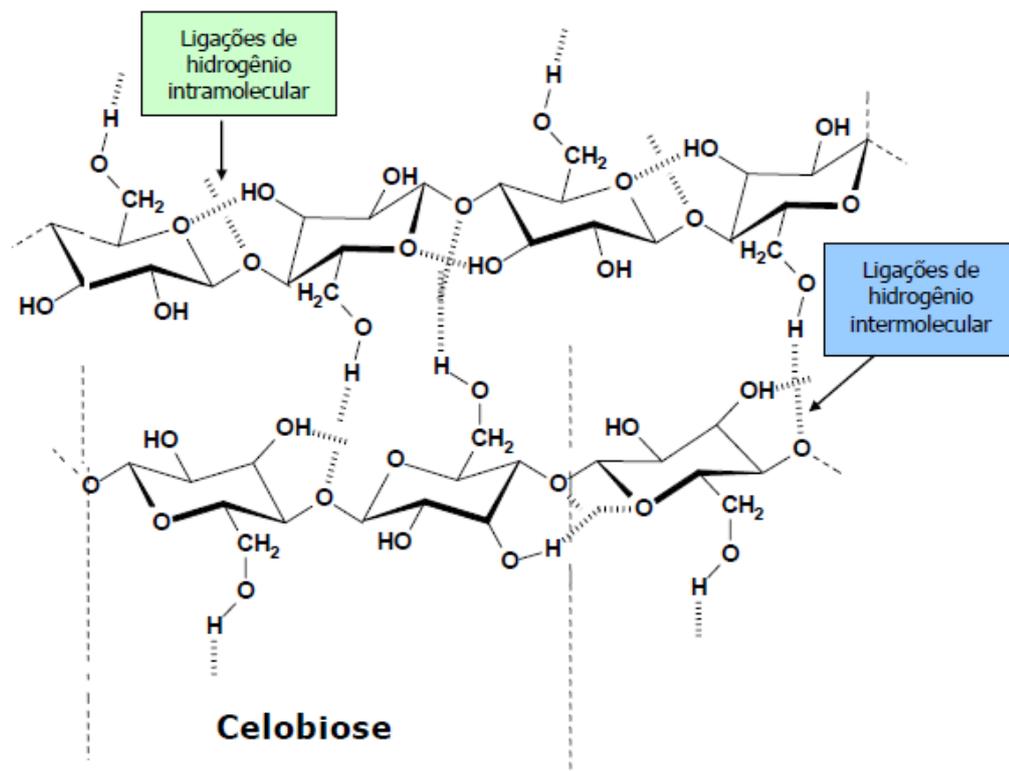


Figura 1 – Estrutura química da celulose (MORAES, 2005)

O tamanho da cadeia de celulose é expresso em relação ao seu grau de polimerização (GP), isto é, o número de unidades de D-glicose unidas por ligações β - (1 \rightarrow 4), que formam uma determinada cadeia celulósica. Podendo ser encontradas em sua estrutura até 15000 unidades de D-glicose conectadas por ligações β -1,4 (BON et al., 2008). O grau de polimerização da cadeia de celulose está diretamente relacionado à solubilidade desse polímero, uma vez que cadeias com 7 – 13 resíduos de anidroglicose ainda são pouco solúveis em água (FENGEL e WEGENER, 1989; ZHANG e LYND, 2004).

2.1.2. Hemicelulose

Conhecidas como polioses, diferem da celulose por serem amorfas, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses) (Figura 2). As hemiceluloses são polissacarídeos não-celulósicos que são encontrados em tecidos vegetais, compostos de polímeros complexos de carboidrato, sendo as xilanas e as glucomananas são os principais componentes (FENGEL e WEGENER, 1989). Em paredes celulares de plantas terrestres, a xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum, representando 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 e AUBERT, 1994; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

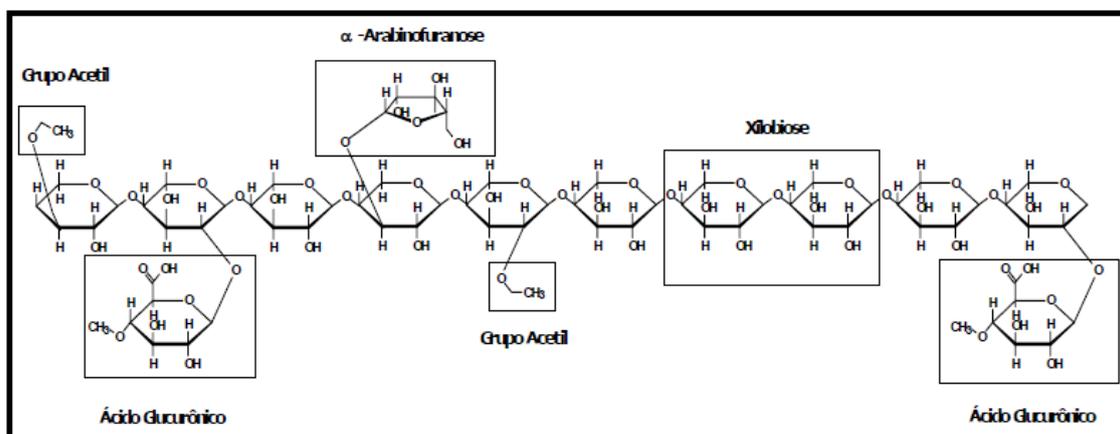


Figura 2 – Estrutura química da hemicelulose (MUSSATO, 2002)

As hemiceluloses são divididas em xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas (CASTRO, 2006), que apresentam suas unidades monoméricas unidas por ligações do tipo 1,3, 1,4 e 1,6 (SZENGYEL, 2000). Dessas, as presentes em maiores proporções são as xilanas (BISSOON et al., 2002), que consistem em moléculas de xilose unidas por ligação β -1,4 (DAMASO et al., 2004). 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 e 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).

2.1.3. Lignina

A lignina, junto com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular. A lignina, depois dos polissacarídeos, é a macromolécula mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos, constituída a partir de unidades de *p*-propilfenol (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico), formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, representando de 20 a 30 % da massa total do material lignocelulósico (BON et al., 2008). Estes compostos fenólicos podem também estar envolvidos nas ligações cruzadas entre moléculas de xilana e na ligação da xilana a outros polissacarídeos (TUNCER et al., 1999).

A estrutura da lignina varia com a espécie vegetal. 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).

De estrutura rígida, é encontrada na parede celular de vegetais, predominantemente nos tecidos vasculares especializados para o transporte de líquidos em vegetais superiores (HIGUCHI, 1990). Apesar de ser um composto macromolecular aromático, a lignina difere dos outros componentes presentes na biomassa do vegetal, na medida em que sua estrutura tridimensional não possui ligações repetitivas entre os resíduos monoméricos constituintes da macromolécula (BON et al., 2008). Tais constituintes, sintetizados a partir da fenilalanina, são secretados para a parede, onde são oxidados no local apropriado pelas enzimas peroxidase e lacase. Como a lignina se forma na parede, ela remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica, que se liga firmemente à celulose e impede a expansão da parede.

A lignina acrescenta uma resistência mecânica significativa às paredes celulares e reduz a sua suscetibilidade ao ataque enzimático e de patógenos; reduz também a digestibilidade do material vegetal por animais (TAIZ e ZEIGER, 2004). A lignina é sem dúvida o grande problema para a hidrólise, fazendo com que o material lignocelulósico seja recalcitrante para hidrólise (GOMEZ et al., 2008).

2.4. Resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos da agroindústria são produzidos em grandes quantidades por diversas indústrias, incluindo, celulose e papel, da silvicultura, da agricultura e alimentos, além dos diferentes tipos de resíduos sólidos urbanos e animais (DASHTBAN et al., 2009). Estes materiais potencialmente valiosos foram tratados como lixo em vários países no passado, e ainda hoje em alguns países em desenvolvimento, o que levanta muitas preocupações ambientais (PALACIOS, 2005). Esforços significativos, muitos dos quais têm sido bem sucedidos, têm sido empenhados para converter esses resíduos em produtos valiosos tais como os biocombustíveis, produtos químicos e alimentos para animais (HOWARD, 2003).

De acordo com a *Renewable Fuels Association*, em 2008, aproximadamente 90% da produção mundial de álcool combustível (15.472,2

de 17.335,2 milhões de litros) estava concentrada em dois países, Brasil (6.472,2), e os Estados Unidos da América (9000). No Brasil, o etanol é geralmente produzido à partir do caldo de cana, enquanto que nos EUA, culturas como o milho são geralmente utilizados para a produção de etanol (SANCHEZ, 2009).

2.4.1. Cana-de-açúcar

Com uma produção de 1,5 bilhões de toneladas, o Brasil é o maior produtor de cana de açúcar, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. As regiões de cultivo são Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. Portanto, durante todo o ano o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo (UNICA, 2010). Ela é composta por 19-24% de lignina, hemicelulose 27-32% de, 32-44% de celulose e 4,5-9,0% de cinzas (JACOBSEN e WYMAN, 2002). A Tabela 1 mostra projeções de produção até a safra de 2012/13 juntamente com a quantidade de bagaço, palha e pontas de cana produzidas, onde cada tonelada de cana produz como resíduo 276 kg de bagaço (OLIVERIO, 2007) e 204 kg de palha/pontas (KITAYAMA, 2008).

Tabela 1 – Produção nacional de cana, e seus derivados residuais (bagaço, palha e pontas), expresso em milhões de ton., para as safras de 2006 à 2013

Safra	Cana	Bagaço	Palha e Pontas
2006/07	430	120	88
2007/08	478	132	98
2008/09	514	142	105
2009/10	558	154	114
2010/11	601	166	123
2011/12	647	179	132
2012/13	696	192	142

Fonte: Adaptado de KITAYAMA (2008); OLIVERIO (2007); SILVESTRIN (2009)

A palha representa até 30% da biomassa total, metade desta costuma ser deixada no campo, sendo usada como adubo, e a outra metade por não ter uma destinação adequada, são queimados, perdendo assim seus componentes (Tabela 2), indispensáveis para a produção de etanol 2ª geração

(RAMOS, 2011). Além disto, na safra de 2004/2005, estimou-se que o potencial de lançamento anual na atmosfera, foi de aproximadamente, 30 milhões toneladas de C; 94 milhões de toneladas de CO₂; 325 mil toneladas de nitrogênio; 65 mil toneladas de S; 89 µg particulados/m³ de ar nas regiões de prática da queimada (máximo permitido pelo CONAMA 50 µg/m³) (FALZETTA, 2006).

Tabela 2. Composição da biomassa da cana-de-açúcar. (RAMOS, 2011)

Componente	Bagaço (%)	Palha (wt%)
Extraíveis orgânicos totais	2,88 ± 0,03	3,50 ± 0,06
Extraíveis em água	1,23 ± 0,05	3,52 ± 0,01
Anidroglicose	38,39 ± 0,13	37,41 ± 0,01
Anidroxilose	19,11 ± 0,06	20,40 ± 0,13
Anidroarabinose	3,38 ± 0,02	4,29 ± 0,03
Grupo Acetil	3,53 ± 0,02	2,32 ± 0,01
Lignina solúvel em ácido	0,23 ± 0,04	0,77 ± 0,03
Lignina insolúvel em ácido (Klason)	20,81 ± 0,26	17,70 ± 0,23
Cinzas	6,60 ± 0,20	6,20 ± 0,20
Total	96,16	96,11

O custo de recuperação da palha da cana é um fator importante na avaliação da viabilidade do seu uso para obtenção de biocombustíveis de segunda geração. As enfardadoras são a melhor opção para a realização da colheita deste resíduo, uma vez que reúnem as etapas de corte, coleta, compactação e transformação em fardos em uma única passada. Os fardos apresentam alta densidade e o custo da palha coletada por estas máquinas é menor quando comparado às outras, sendo de US\$ 9,60/tonelada. Para a palha colhida por forrageiras, este valor chega a US\$ 30,00/tonelada. Uma vez que a maioria das plantações de cana-de-açúcar estaria próxima às usinas, conclui-se que o gasto com o transporte da palha até estas para geração de bioenergia e biocombustíveis de segunda geração não seria muito dispendioso, já que não seriam percorridas grandes distâncias para o traslado (PEREIRA, 2006). A Tabela 3 apresenta a composição de alguns materiais lignocelulósicos, expressa em suas três principais frações. De uma forma geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina.

Tabela 3. Composição química (teor de celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes) de alguns resíduos lignocelulósicos.

Material	Composição química (%)				Referência
	Lignocelulósico	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Bagaço de cana	42,8	25,9	22,1	7,5	Silva, 2009
Palha de cana	39,8	28,6	22,5	8,6	Oliveira, F.,2010
Palha de milho	54,4	16,2	23,8	8,0	Bianchi,1995
Sabugo de milho	41,0	36,0	6,0	14,0	Goldestein,1981
Palha de trigo	30,0	24,0	18,0	10,0	Kuhad; Singh,1993
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	Mussato; Roberto, 2002
Madeira de Eucalipto	49,4	21,4	27,8	1,5	Junior,2007
Casca de amendoim	38,0	36,0	16,0	5,0	Kuhad;Singh,1993

2.4.2. Água de Maceração do Milho (Milhocina)

Milhocina é um subproduto da indústria de milho. É um componente importante de alguns meios de crescimento. Foi usado no cultivo de *Penicillium* durante a pesquisa inicial da penicilina. É uma excelente fonte de nitrogênio orgânico (LIGGETT e KOFFLER, 1948).

O processo de refinamento para a obtenção dos inúmeros produtos derivados do milho inicia-se pela moagem úmida, que separa o grão nos seus componentes básicos: germe, fibra, amido e proteína. O principal objetivo deste processo é a máxima recuperação possível do amido, com alta qualidade para uso industrial geral (LOPES FILHO, 1999).

O primeiro e mais importante estágio da moagem úmida é a maceração dos grãos em solução de dióxido de enxofre sob condições controladas. As mudanças físicas, químicas e bioquímicas induzidas durante este período são responsáveis pela qualidade e rendimento dos produtos obtidos pós-moagem. O milho é primeiro encharcado e mergulhado em tanques abertos de madeira a 45 - 52°C por 48 horas (LIGGETT e KOFFLER, 1948). As condições de processo permitem o desenvolvimento de *Lactobacillus* sp. que, através da utilização dos açúcares solúveis na água de maceração, produzem ácido láctico, reduzindo o pH do meio e promovendo condições favoráveis para a separação dos componentes do grão. Outros fenômenos que ocorrem são o amolecimento das sementes, a liberação dos grânulos de amido das matrizes de proteínas através da quebra das pontes de enxofre e inibição do

crescimento de microorganismos de deterioração (ROUSHDI, 1981; ECKHOFF, 1991).

A principal desvantagem do milhocina em microbiologia é por apresentar composição variável. Esta variabilidade pode depender do tipo e condição do milho, ou período e condições durante o processamento do amido. Por outro lado, milhocina é uma alternativa barata, substituindo materiais de custo elevado tais como extrato de levedura e peptona. A milhocina apresenta um pH de 3,7-4,1, em média 6,9% dos sólidos de milho e 30% do nitrogênio do milho encontram-se neste resíduo líquido, além de conter vitaminas e minerais (LIGGETT e KOFFLER, 1948).

A viabilidade da substituição de extrato de levedura pela água de maceração do milho como fonte de nutrientes de baixo custo, durante os processos de fermentação têm sido estudada para produzir etanol (MADDIPATI, 2011).

2.4.3. Água de Manipueira

Mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) é considerada uma importante fonte de calorias na alimentação humana e para uma grande população em países tropicais da Ásia, África e América Latina (SOCCOL, 1994). Cerca de 60% da mandioca produzidos em todo o mundo é usado para consumo humano. Outro grande consumidor de mandioca é a indústria de alimentação animal, utilizando cerca de 33% da produção mundial (LAUKEVICS et al., 1985).

A água de manipueira é um líquido de cor amarelada que sai da mandioca no processo de prensagem da produção de farinha. Quando este rejeito é desprezado de forma inadequada provoca a poluição do solo e das águas (rios, riachos e açudes), causando grandes prejuízos ao meio ambiente e ao homem, que dele necessita para viver. Este despejo pode ser evitado com a utilização de técnicas corretas de manejo da casa de farinha (SEBRAE, 2008). Cada vez mais produtores descobrem que a manipueira é uma boa fonte de nutrientes para o solo no cultivo da mandioca, pois ela é rica em potássio, nitrogênio, magnésio, fósforo, cálcio e enxofre e pode ser aplicada no

solo ou direto na planta. É um adubo orgânico, ecologicamente correto, reaproveitado no processo produtivo da mandioca (EMBRAPA, 2011).

Outra utilização deste resíduo é seu potencial como substrato nitrogenado para produção de amilase em fermentação submersa (DE AZEREDO et al. 2006). Lira et al. (2011) citam que as amilases têm conquistado um papel importante na conversão do amido em álcool utilizando, simultaneamente, a sacarificação e a fermentação (SINGH et al., 1995). A aplicação das amilases na produção de etanol tem solucionado, em parte, os problemas que alguns países apresentam em função da escassez de reservas de combustível. O amido presente no meio fermentativo é convertido, através da ação conjunta das amilases, em glicose que posteriormente é convertida por fermentação em etanol (RAJOKA et al., 2004).

A manipueira (resíduo aquoso da mandioca) apresenta quantidades elevadas de amido, podendo ser uma fonte potencial para a produção de bioetanol (LACERTA et al., 2008).

2.5. Micro-organismos Lignocelulolíticos

A biodegradação de materiais lignocelulósicos constitui um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza, e o entendimento deste processo representa uma grande contribuição para as ciências naturais (FERRAZ, 2010). Existem uma variedade considerável de micro-organismos, destacando-se principalmente fungos e actinobactérias, que apresentam diferentes capacidades em degradar os diferentes componentes da massa lignocelulósica. Contudo, ainda não foi isolado um micro-organismo capaz de degradar todos os componentes da biomassa vegetal, sendo necessário um consórcio de micro-organismos para se atingir a total hidrólise da massa lignocelulósica. As principais enzimas responsáveis pela degradação dos componentes lignocelulósicos são as xilanases, celulasas e as lignina-peroxidases (NASCIMENTO, 2009).

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 (VOBIS, 1997). As

enzimas produzidas pelas actinobactérias são capazes de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteróides como colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros. Estudos recentes vêm apontando as actinobactérias como fontes emergentes promissoras de uma ampla faixa de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental, como àquelas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos (GOODFELLOW et al., 1988; FLORES et al., 1997).

A decomposição dos resíduos lignocelulósicos pelas actinobactérias as fazem potenciais fontes para a bioconversão de resíduos em substâncias químicas de interesse industrial (PIRET e DEMAIN, 1988). As celulases, por exemplo, são capazes de degradar a celulose, podendo ser úteis nas indústrias têxteis e de detergentes, mas também possuem aplicações na área ambiental, auxiliando no tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose. Podemos citar ainda as xilanases que são responsáveis pela degradação das xilanas, utilizadas em indústrias de alimento e papel, para a fabricação de produtos dietéticos e clareamento de polpas de papel, respectivamente (STUTZENBERGER e BODINE, 1998; BRECCIA et al., 1995). Além disso, estas desempenham um papel importante na decomposição de hemicelulose em solos e na recuperação de açúcares fermentáveis a partir de hemiceluloses (BELFAQUIH e PENNINGKX, 2000; STUTZENBERGER e BODINE, 1998; GARG et al., 1996).

Vários micro-organismos têm sido estudados quanto a sua capacidade em degradar substratos celulósicos em monômeros de glicose, porém, isoladamente, não apresentam potencial elevado quanto a produção de celulases (DAS et al., 2007; YU et al., 2007). Apenas os organismos que produzem adequados níveis de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, seriam eficientes degradantes da lignocelulose (KUMAR et al., 2008). A degradação da lignocelulose é atribuída a um complexo de enzimas, as lignocelulases, visto que somente pequenos compostos podem ser absorvidos pela parede celular dos fungos (FERRAZ, 2010).

2.5.1. *Trichoderma* sp.

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é um organismo hospedeiro importante para a produção de enzimas industriais. Adaptado a ambientes pobres em nutrientes, no qual é capaz de produzir grandes quantidades de enzimas hidrolíticas (JOUHTEN et al, 2009). Segundo Schuster e Schmoll (2010), este micro-organismo representa um biocatalizador promissor para aplicações industriais.

O *Trichoderma reesei* QM9414 e o *Trichoderma reesei* RUTC30 são cepas mutagenizadas desenvolvidas com sucesso a partir do *Trichoderma* QM 6a, com a finalidade de obter um micro-organismo com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas (MENDELS, 1975). As celulases têm sido produzidas por fermentação utilizando *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30 em diferentes substratos como farelo ou palha de arroz, bagaço ou palha de cana-de-açúcar, farelo de trigo, sabugo de milho e resíduo de sisal. Este micro-organismo, por ser um bom produtor de celulase, tornou-se importante para estudos desta natureza (BASSO, 2010).

Na verdade, *T. reesei* é capaz de secretar mais de 30 g / L de proteína no meio extracelular (CONESSA et al., 2001). Tem sido relatado que o *T. reesei* possui dois CBH (cellobiohidrolase) genes, *cbh1-2*, e oito EG (endoglucanase) genes, *eg1-8*, e que CBH I-II e EG I-VI proteínas são secretadas (FOREMAN et al., 2003).

2.5.2. *Penicillium* sp.

O fungo *Penicillium* foi descrito em 1809 na Alemanha. A sua forma anamórfica pertence ao Reino Fungi, de divisão insertae sedis, grupo dos fungos mitospóricos, sub-grupo hifomicetos. *Penicillium* sp. apresenta célula conidiogênica do tipo fialídica, que é um dos mais comuns, sendo caracterizado pela produção de conídios em sucessão basipetal (conídio mais jovens são produzidos na base a partir da extremidade aberta de uma célula conidiogênica, denominada fiálide. (BERGAMIN FILHO et al.,1995). Multiplica-se vegetativamente por conídios produzidos em cadeia em conidióforos que se

ramificam na extremidade, lembrando uma vassoura. Estes conídios, após disseminados, produzem novo micélio (KIMATI et al., 1978).

A sua forma teleomórfica pertence à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, sub-classe Eurotiomycetidae, Classe Eurotiomycetes, Divisão Ascomycota, Reino Fungi (Index Fungorum, 2010). Os gêneros *Eurotium* sp., *Sartorya* sp. e *Emmerilia* sp. pertencem a família do Eurotiaceae e representam os genes mais importantes da fase sexual. As espécies de *Penicillium* sp. têm fases teleomórficas dos gêneros *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. (KIMATI et al., 1978). Existem registrados cerca de 1107 espécies, variedades e *formae speciales* de táxons pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. presentes e descritos em literatura. Foram observadas 182 variedades e duas *formae speciales* associadas ao gênero (Index Fungorum, 2010). *Penicillium* sp. é o agente causal dos bolores de coloração azul ou verde em frutos cítricos e podem causar podridões de frutos muito comuns nas condições de pós-colheita (KIMATI et al., 1978).

Estudos comprovam seu potencial biotecnológico, uma vez que é descrito na literatura como produtor de componentes do sistema celulolítico, além de ser facilmente encontrado no solo e rápida esporulação em diferentes substratos, inclusive matéria-prima de baixo custo como fonte de C (PRASAD et al., 2007). Trabalhos indicam a capacidade desta espécie na produção de enzimas de interesse industrial (KROGH et al. 2004; CARVALHO, 2007; GOMES, 2007; HARGREAVES et al, 2008; OLISHEVSKA et al, 2009; ANDRADE, 2010; MOROZOVA et al, 2010; BAFFI et al, 2011; DILLON et al, 2011; LIU et al, 2011).

2.5.3. *Streptomyces* sp.

Streptomyces é o maior gênero de Actinobacteria, da família Streptomycetaceae (KAMPFER, 2006). Mais de 500 espécies de *Streptomyces* têm sido descritas. Tal como acontece com as Actinobacterias, estreptomicetos são gram-positivas, e apresentam DNA com alto conteúdo de guanina e citosina (G+C 72%) (VOBIS, 1997). Encontrado predominantemente no solo e na vegetação em decomposição, a maioria dos estreptomicetos produzem

esporos, e são conhecidos por seu odor de "terra" que resulta da produção de um metabólito volátil. Estreptomicetos são caracterizados por um complexo metabolismo secundário (BROCK, 2005), podendo digerir açúcares, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e compostos aromáticos. Isto é conseguido através da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. Há um grande interesse nestes organismos como agentes de biorremediação. Produzem, ainda, mais de dois terços dos antibióticos de origem natural (por exemplo, neomicina, cloranfenicol) (KIESER, 2000).

Os estreptomicetos têm grande importância biotecnológica por produzirem compostos com diferentes atividades biológicas. Assim, esses microrganismos sintetizam moléculas que atuam como antibióticos, antitumorais, imunomoduladores, antiinflamatórios, vasoconstritores e vasodilatadores, além de terem aplicação no tratamento da diabetes e como herbicidas. Algumas foram ainda identificadas como inibidores enzimáticos. Os antibióticos são os produtos mais importantes da biotecnologia microbiana, excetuando-se bebidas alcoólicas e queijos (PEREIRA JR., 2008).

Estes micro-organismos têm sido isolados para estudos biotecnológicos como produtores de enzimas amidolíticas, para produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. As enzimas produzidas por actinobactérias são capazes de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteróides como colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros. Estudos recentes vêm apontando as actinobactérias como fontes emergentes promissoras de uma ampla faixa de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental, como àquelas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos (NASCIMENTO, 2006).

2.6. Enzimas Lignocelulolíticas

Nos últimos 10 anos, têm-se observado um crescente interesse em sistemas enzimáticos microbianos que degradem os componentes lignocelulósicos. A produção de enzimas é um passo importante no processo de fabricação do etanol, pois o processo é altamente sensível ao custo da matéria-prima. O uso dos materiais lignocelulósicos como substrato para a obtenção de enzimas tem se configurado vantajoso para a indústria. O sistema

enzimático do *Trichoderma reesei* é extensivamente estudado, um vez que esta espécie produz alta concentração de enzimas que degradam celulose e hemicelulose. No entanto, a secreção β -glicosidase extracelular é baixa, levando à hidrólise incompleta da celulose (DASHTBAN, 2009). É importante para complementar a atividade do *T. reesei* o uso de enzimas produzidas por outras cepas, como por exemplo *Penicillium* sp. ou mutantes *T. atroviride* (KOVACS et al., 2009).

Entre as enzimas de alto interesse comercial estão as glicosidases como, por exemplo, amilases, celulasas, xilanases e quitinases, todas importantes na degradação da biomassa (NASCIMENTO et al., 2002; SEMEDO et al., 2004).

2.6.1. Celulasas

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). A estrutura da celulose pode ser hidrolisada por intermédio de um complexo enzimático que reconhece ligações β -1,4 entre moléculas de glucose, denominado celulasas. As celulasas são membros da família de glicosil hidrolases (EC 3.2.1) que hidrolizam oligossacarídeos e/ou polissacarídeos (BAYER et al., 1998).

Sendo a célula microbiana impermeável à molécula polissacarídica, esta deve ser clivada pela ação das celulasas, sintetizadas intracelularmente e liberadas para o meio extracelular (GHOSH e GHOSH, 1993). As celulasas são produzidas como um sistema multienzimático, compreendendo basicamente 3 enzimas que agem sinergisticamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), que clivam randomicamente o polímero de celulose, alterando rapidamente o grau de polimerização da celulose, as celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), que hidrolizam o polímero nos terminais não-redutores, liberando celobiose e as celobiasas (β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21) que são responsáveis pela clivagem de pequenas cadeias de celooligossacarídeos e celobiose a

glucose, utilizada nas vias metabólicas do micro-organismo (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990; PÉREZ PONS et al., 1995; ARISTIDOU e PENTTILÄ, 2000; CAO e TAN, 2002). Na tabela 4 estão apresentados os códigos das celulases de acordo com a *Enzyme Commission* (E.C.), seus nomes oficiais, alternativos e especificidade da reação (NC-IUBMB, 2008).

Tabela 4– 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

As celulases são enzimas modulares que são compostas independentemente do formato (α/β), unidades estruturais e funcionalmente discretas, referidas tanto como domínios como módulos (BAYER et al., 1998).

A hidrólise da celulose é acompanhada tanto pela inversão quanto pela retenção da configuração do carbono anomérico, onde em ambos os casos, é catalisada primariamente por 2 grupos carboxilas localizados no sítio ativo da enzima. As celulases bacterianas e fúngicas usualmente compreendem 2 ou mais domínios estruturais e funcionais, tal como um domínio catalítico associado ao domínio celulose-ligante (CBD) comumente organizados em enzimas de sistemas não complexados de organismos aeróbios, e um domínio catalítico associado a um domínio *dockerin*, responsável pelo complexo

celulosomo, comumente organizado em enzimas com sistemas complexados de alguns organismos anaeróbios (OHMIYA et al., 1997, BAYER et al., 1998). Em adição, muitas celulasas incluem um domínio homólogo a camada S (SLH), domínio fibronectina III, domínio *NodB-like* e várias regiões com funções desconhecidas. Estes domínios são frequentemente conectados por sequências ligantes enriquecidas em ácidos pro e hidroxiaminos (Treonina e Serina). Dentre os vários domínios, os domínios catalítico e celulose-ligante são geralmente reconhecidos por serem importantes para a hidrólise da celulose (TOMME et al., 1995, OHMIYA et al., 1997).

As endoglucanases (EG), ou 1,4- β -D-glucan-glucanohidrolase [EC 3.2.1.4], são caracterizadas pela sua capacidade em clivar derivados de celulose substituída, como a carboximetilcelulose (CMC), em uma forma randômica, produzindo uma mudança rápida no grau de polimerização. A taxa de hidrólise de cadeias longas de celo-oligossacarídeos é alta, e esta taxa aumenta com o grau de polimerização. A glucose e a celobiose são os produtos finais da reação. A transglicosilação é característica de algumas, mas não de todas as endoglucanases. A CMC é utilizada como substrato preferencial na atividade desse grupo enzimático (CAO e TAN, 2002).

As exoglucanases, também chamadas celobiohidrolases (CBH) ou 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolase [EC 3.2.1.91] são definidas por sua capacidade em liberar unidades de celobiose a partir do final não redutor da cadeia de celulose microcristalina. São encontradas como o maior componente de alguns sistemas de celulasas, mas estão ausentes em outros. A celulose microcristalina é utilizada como substrato preferencial nessa reação (CAO e TAN, 2002).

As β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) completam a hidrólise até glucose a partir de pequenas cadeias de celooligossacarídeos e celobiose, as quais são liberadas previamente pelas endoglucanases e exoglucanases. A hidrólise completa da celulose é o resultado combinado da ação sinérgica destas três enzimas (BON et al., 2008).

As EG hidrolisam primariamente celulose amorfa, como a carboximetilcelulose (CMC), produzindo açúcares redutores e baixando a viscosidade da CMC. As CBH agem sobre a celulose microcristalina, papel de

filtro e algodão, e além destes, outros substratos também são utilizados, como a xilana, por exemplo. Alguns substratos são degradados por mais de um tipo de celulase. O papel de filtro, por exemplo, apesar de sofrer grande parte da ação das CBH, sofre também ação das EG, embora em menor intensidade. A ação conjunta destas enzimas sobre o papel de filtro é conhecida como FPase. O peso molecular das CBH varia de 41 a 68 kDa, o qual é maior do que o peso molecular das EG, que varia de 12,5 a 50 kDa. As β -glucosidases agem sobre soforose (2-O- β -glucopiranosil-D-glucose) e celobiose, possuindo alto peso molecular (73 a 150 kDa).

Todas essas enzimas parecem ser glicosiladas, mas a quantidade relativa da porção glicídica é variável. Por exemplo, as β -glucosidases possuem mais açúcares do que as CBH e EG, que raramente têm sido relatadas com algum carboidrato. Possivelmente a glicosilação pode não ser essencial para a biossíntese ou secreção destas duas enzimas, porém na CBH existe uma região rica em prolina, serina e treonina que é altamente O-glicosilada, o que pode proteger contra ataques de enzimas proteolíticas (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990). As CBH parecem conter ainda ácidos aminados acídicos (GHOSH e GHOSH, 1993).

Na maioria dos organismos celulolíticos, a síntese de celulases é reprimida na presença de fontes de carbono solúveis, facilmente metabolizáveis, e induzida na presença de celulose. A indução de celulases parece ser afetada por produtos solúveis gerados pela degradação da celulose, realizada por enzimas celulolíticas sintetizadas constitutivamente em baixos níveis. Estes produtos são, presumivelmente, convertidos em verdadeiros indutores por reação de transglicosilação (BÉGUIN e AUBERT, 1994; PETROVA et al., 2002).

Enquanto várias bactérias e fungos podem metabolizar a biomassa celulósica como fonte de energia (MAHESHWARI et al., 2009), apenas algumas estirpes são capazes de secretar um complexo de enzimas celulolíticas, que poderiam ter aplicação prática na hidrólise enzimática da celulose. Além de *Trichoderma reesei*, outros fungos, como *Humicola*, *Penicillium* e *Aspergillus* têm a capacidade de produção de altos níveis de

celulases extracelular durante o estado sólido, bem como fermentação submersa (MISHRA E NAIM, 2010), (Tabela 5).

Tabela 5 – Micro-organismos importantes empregados na produção de celulases.

Micro-organismos		
Gênero	Espécie	Referências
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	Ong et al., 2004
	<i>A. nidulans</i>	Kwon et al., 1992
	<i>A. oryzae</i>	Takashima et al., 1998
<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i>	Wood e McCrae, 1977
	<i>F. oxysporum</i>	Ortega, 1990
<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i>	Schulein, 1997
	<i>H. grisea</i>	Takashima et al., 1996
<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>	Oinonen et al., 2004
<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i>	Jorgensen et al., 2003
	<i>P. occitanis</i>	Chaabouni et al., 1995
	<i>P. decumbans</i>	Mo et al., 2004
<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i>	Schulein, 1988
	<i>T. longibrachiatum</i>	Fowler et al., 1999
	<i>T. harzianum</i>	Galante et al., 1998
<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>	Tucker et al., 1989
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i>	Mawadza et al., 2000
	<i>Bacillus subtilis</i>	Heck et al., 2002
<i>Clostridium</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	Lopez-Contreras et al., 2004
	<i>C. thremocellum</i>	Nochure et al., 1993
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulosa</i>	Yamane et al., 1970
<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>	Hreggvidsson et al., 1996
<i>Cellulomonas</i>	<i>C. fimi</i>	Shen et al., 1996
	<i>C. bioazotea</i>	Rajoka e Malik, 1997
	<i>C. uda</i>	Nakamura e Kitamura, 1983 Grigorevski de-Lima et al., 2005
<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdowiczii</i>	2005
	<i>S. sp</i>	Okeke e Paterson, 1992
	<i>S. lividans</i>	Theberge et al., 1992
<i>Thermononospora</i>	<i>T. fusca</i>	Wilson, 1988
	<i>T. curvata</i>	Fennington et al., 1982

Fonte: Sukumaran et al. (2005). Adaptado Kumar (2010).

2. 6.2. Amilases

As enzimas amidolíticas compreendem as hidrolases que hidrolisam as moléculas de amido em dextrinas e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003). Conforme seu modo de ação pode ser dividido em endo ou exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise

das ligações glicosídicas do tipo α -1,4, de maneira aleatória, no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Já as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em pequenos produtos finais (GUPTA et al., 2003).

As amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismos. Entretanto, devido às vantagens que oferecem, como menor tempo de produção, as amilases microbianas têm a preferência do mercado de enzimas (OLIVEIRA, 2007). As amilases produzidas por microrganismos termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por serem termoresistentes e por possuírem características importantes como estabilidade à temperatura e ao pH, diminuindo o risco de contaminação, aumentando a taxa de difusão dos reagentes e diminuindo os custos com refrigeração externa. (SAJEDI et al., 2005).

Alguns micro - organismos produzem uma quantidade limitada de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático (CARVALHO et al., 2008). A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção (JOO; CHANG, 2005).

O maior mercado para a aplicação das α -amilases está na produção de amido hidrolisado na forma de glicose e frutose. O amido é convertido em xarope de milho com elevado teor de frutose. Devido a sua alta propriedade adoçante, a glicose e a frutose são usadas como adoçantes na indústria de refrigerantes. O processo de liquefação do amido requer o uso de α -amilase em conjunto com a glicoamilase que devem apresentar elevada termoestabilidade (PANDEY et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam maior volume e textura a massa. Estas enzimas podem, ainda, retardar o envelhecimento e dar melhor coloração aos pães. A α -amilase fúngica confere maior potencial fermentativo, já a amiloglicosidase confere melhor sabor e aroma de pães (NOVOZYMES, 2005).

2.7. Otimização e Planejamento Fatorial

A crescente necessidade da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos têm levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. Esta metodologia estatística foi inicialmente proposta por Box na década de 50, todavia somente nos últimos anos houve um aumento crescente e exponencial no uso das análises de superfície de resposta e, conseqüentemente, planejamentos fatoriais (Figura 3) (RODRIGUES E IEMMA, 2009).

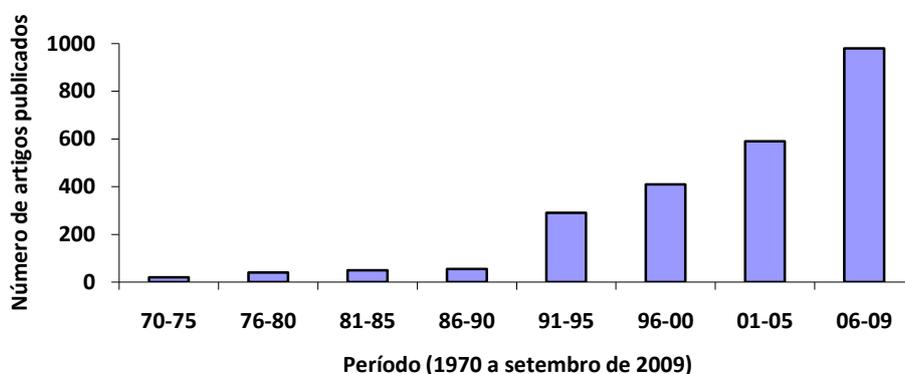


Figura 3. Quantidade de artigos publicados, a cada quinquênio, que utilizaram planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta (Base de dados Food Science and Technology Abstracts – FSTA)

No entanto, para que o uso dessa metodologia atinja os objetivos desejados, é necessário haver uma interação entre o processo, a estatística e o bom senso, tanto da equipe responsável por montar os experimentos quanto da equipe incumbida pela análise estatística e estratégia dos resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Em um experimento de caracterização, usualmente determina-se as variáveis do processo que afetam a resposta. A etapa mais lógica a seguir será a otimização, para a qual é necessário determinar a região de importância em que os fatores podem dar uma melhor resposta (MONTGOMERY, 1997). A otimização pode ser dividida em estágios que caracterizam-se por: (i) definição da função objetivo (resposta), podendo ser observado um ou mais critérios; (ii) determinação dos fatores (variáveis) que apresentam influências significativas sobre a resposta que deseja-se otimizar; (iii) otimização propriamente dita, isto é, procurar a combinação dos valores dos fatores selecionados que resultem na melhor resposta (maximização ou minimização) (NASCIMENTO, 2006).

Haaland (1989) propôs de maneira esclarecedora e interessante três caminhos que poderíamos adotar para resolução de um problema experimental. Onde para três variáveis independentes em cinco situações diferentes, o primeiro procedimento necessitaria de 13 ensaios para obtenção da resposta desejada, todavia não seria possível detectar a interação entre elas, logo, o melhor resultado obtido ficaria muito aquém do valor otimizado. Podemos perceber que no segundo caso, seria necessária uma grande quantidade de ensaios (125) para explorar todas as combinações dos três fatores, tornando-se demorado, de custo inviável e impossível de calcular o erro padrão, visto que não há nenhum ensaio repetido. No caso do planejamento fatorial completo, são necessários 17 ensaios, neste caso a região de estudos é maior, sendo possível calcular o erro padrão, uma vez que os ensaios subdividem-se em 8 fatoriais (representados pelos vértices do cubo), 6 nos pontos axiais para testar o modelo de 2ª ordem e 3 ensaios repetidos na condição central. É possível, ainda, elaborar um modelo matemático para determinar as condições otimizadas, conhecendo-se as condições estatísticas das respostas (Figura 4) (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

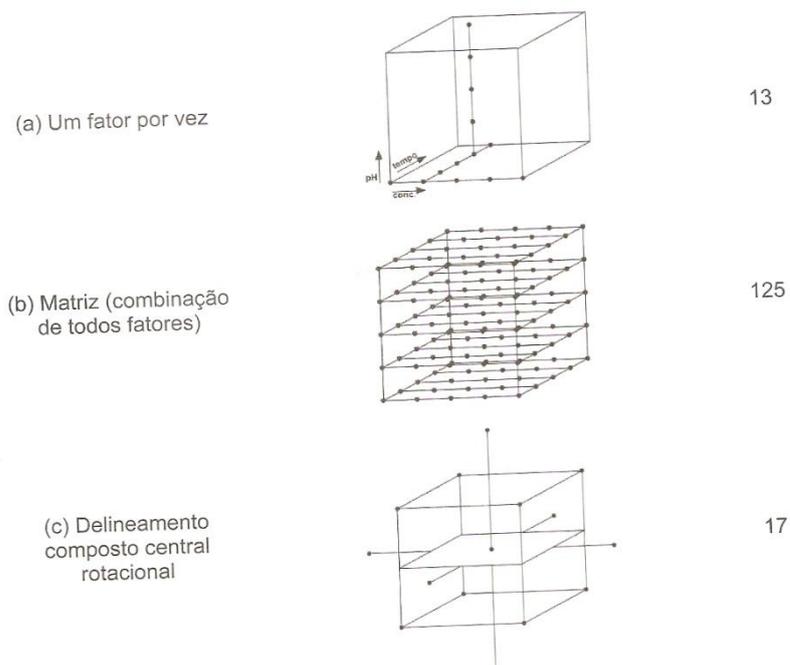


Figura 4. Possibilidades de conduzir experimentos para 3 variáveis estudadas. Análise de uma variável por vez, (b) Matriz com todas as combinações possíveis e (c) Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR (HAALAND, 1989).

Para cinco fatores, um DCCR necessita de no mínimo 45 ensaios, como na maioria das vezes o processo ainda está longe das condições otimizadas é inviável investir diretamente num completo, por isso deve-se explorar as variáveis num planejamento 2^{5-1} com 3 ou mais repetições no ponto central, analisando seus efeitos sobre as respostas e prosseguir com outros planejamentos com um número reduzido de fatores fixados estatisticamente (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Em vista disso, ressalta-se que, independente do substrato utilizado, as metodologias de quantificação de enzimas, devem ser desenvolvidas respeitando-se condições cineticamente indispensáveis para a validação dos métodos, como por exemplo, a concentração e tratamento do substrato, as condições e tempo de incubação e a devida análise e seleção das variáveis que interferem no processo (COPELAND, 2000).

Capítulo 1

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES
POR *PENICILLIUM* SP. IS-07 e *TRICHODERMA REESEI* RUT-
C30 UTILIZANDO PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E MILHOCINA**

RESUMO

FERREIRA, M. A. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CELULASES POR *PENICILLIUM* SP. IS-07 E *TRICHODERMA REESEI* RUT-C30 UTILIZANDO PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR E MILHOCINA

Dentre os resíduos lignocelulósicos disponíveis no Brasil, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar constituem-se como fontes de Carbono e podem ser adicionados no meio de cultura para produção de celulases fúngicas. Além disso, a milhocina também é bastante vantajosa para ser adicionada ao meio de cultura, como a principal fonte de Nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização enzimática de CMCase e FPase obtidas nas melhores condições de cultivo, determinando os seus ótimos de pH e temperatura, utilizando palha de cana-de-açúcar e milhocina pela estirpe *Penicillium* sp. IS-07 em comparação ao *Trichoderma reesei* RUT-C30, que é uma estirpe mutante altamente produtora de enzimas, através da fermentação submersa, seguindo um planejamento experimental com o auxílio do software STATSOFT 7.0[®]. Os resultados obtidos para a atividade CMCase de 1.179,19 U.L⁻¹ à 60°C, em pH 5,0 por *Penicillium* sp. IS-7 em comparação ao *Trichoderma reesei* RUT-C30 (1.083,90 U.L⁻¹ a 60°C, em pH 7,0); e, para a atividade FPase de 293,8 U.L⁻¹ à 80⁰ C, em pH 9,0 (*Penicillium* sp. IS-7) e 244,2 U.L⁻¹ à 60° C, em pH 6,0 (*Trichoderma reesei* RUT-C30), mostraram a potencialidade dos resíduos lignocelulósicos como substrato de baixo custo para a produção de celulase pela estirpe *Penicillium* sp. IS-07.

Palavras-chave: Carboximetilcelulase, papel de filtro, Endoglucanase

ABSTRACT

Ferreira, M. A. PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF CELLULASES BY *PENICILLIUM* SP. IS-07 AND *TRICHODERMA REESEI* RUT-C30 USING OF SUGAR CANE STRAW AND CORN STEEP LIQUOR

Among the lignocellulosic residues available in Brazil, bagasse and sugar cane straw are sources of C and can be added in culture media for the production of fungal cellulases. In addition, corn steep liquor is also quite advantageous to be added to the culture media, as the main source of N. The objective of this study was to characterize enzyme CMCase and FPase obtained the best growing conditions, determining their optimal pH and temperature, using sugar cane straw and corn steep liquor by the strain *Penicillium* sp. IS-07 compared to *Trichoderma reesei* RUT-C30, a mutant strain that is highly producing enzymes by submerged fermentation, following an experimental design with STATSOFT 7.0 ® software. The results obtained for the CMCase activity of 1179.19 U.L⁻¹ at 60 °C at pH 5.0 by *Penicillium* sp. IS-7 compared to *Trichoderma reesei* RUT-C30 (1083.90 UL⁻¹ at 60 °C, pH 7.0), and for the activity of 293.8 FPase UL⁻¹ to 80° C at pH 9,0 (*Penicillium* sp. IS-7) and 244,2 U.L⁻¹ at 60° C, pH 6,0 (*Trichoderma reesei* RUT-C30) showed the potential of lignocellulosic residues as low cost substrate for the production of cellulase by *Penicillium* sp strain. IS-07.

Keywords: Carboximetilcelulase, filter paper, endoglucanase

INTRODUÇÃO

Uma das principais áreas de pesquisa em biotecnologia com lignocelulose tem sido impulsionada pela necessidade de isolar e identificar microrganismos que sejam hiper-produtores e / ou suficientemente eficientes para suportar as condições da aplicação pretendida, ou ainda, que sejam bons produtores de enzimas lignocelulolíticas. Estudos visam não apenas enzimas que possam quebrar lignocelulose rapidamente, mas também enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas para aplicações industriais (HOWARD, 2003).

Na natureza, existe uma variedade de microrganismos que produzem celulasas, entretanto apenas alguns são conhecidos como celulolíticos, ou seja, capazes de degradar a celulose natural. Em geral, os fungos que decompõem substâncias lignocelulósicas ocorrem no solo, colonizando raízes e resíduos vegetais, reciclando, assim, os nutrientes (AGUIAR FILHO, 2008). Em condições de laboratório diversos substratos são utilizados com o objetivo de se induzir e/ou medir a atividade do complexo lignocelulolítico total, tais como: algodão, papel de filtro, carboximetilcelulose (CMC) e resíduos agrícolas (AGUIAR e MENEZES, 2000). Para obtenção de elevada produção da atividade enzimática, os resíduos agrícolas podem ser triturados e enriquecidos com fontes extras de nitrogênio, vitaminas e minerais (AGUIAR FILHO, 2008). Os indutores da síntese enzimática lignocelulolítica dos fungos variam a depender da concentração em que se encontram, ou pela presença de açúcares no meio de crescimento (GONG e TSAO, 1975).

Os processos submersos são aqueles em que a célula produtora se desenvolve no interior do meio de cultivo, geralmente agitado e, no caso de fermentações aeróbicas, o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido, através de um compressor, por borbulhamento de ar no líquido. Estes processos exibem uma série de vantagens em relação aos processos em superfície, tais como: manipulação de maior volume de meio; a massa de células responsáveis pela transformação fica, uniformemente, submersa no meio nutriente, que pode ser ajustado para fornecer as condições ideais de crescimento e produção; absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são realizadas com maior eficiência (PEREIRA JR., 2008).

Atualmente, a maioria das fermentações industriais importantes é realizada por processo submerso, possibilitando um sistema de cultivo homogêneo, com facilidade de controle das variáveis físico-químicas e maior eficiência de adsorção e excreção de metabolitos secundários pela célula, levando a menores tempos de processo e consequentemente, a ganhos de produtividade (BON et al., 2008).

O maior desafio para aplicações biotecnológicas de celulasas em grande escala permanece sendo o da sua utilização para obtenção de glucose a partir da grande massa renovável de resíduos celulósicos disponíveis durante todo o ano. A fermentação da glucose em solventes e combustíveis, particularmente etanol e butanol, poderão vir a fornecer uma substituição parcial para os combustíveis fósseis (BON et al., 2008).

Comumente, os parâmetros mais importantes quando se avalia a produção enzimática para hidrólise são as atividades enzimáticas de FPase (*Filter paper activity*) e de β -glicosidase. A atividade FPase representa a atividade total de celulasas na degradação de uma fita de papel de filtro (GHOSE, 1987). Como o papel de filtro apresenta um alto índice de cristalinidade, acredita-se que a atividade mais expressiva para a degradação do papel seja a de exoglucanase. Assim, ao se dosar as atividades FPase e β -glicosidase, seria possível balancear as atividades necessárias para degradação total da celulose à glucose. Alguns trabalhos relatam que para que haja a hidrólise completa da celulose uma relação de exoglucanases: β -glicosidases de 1:1 é necessária (JUHÁSZ et al., 2005).

Um dos microorganismos comerciais que apresentam produção eficiente de enzimas com atividades específicas elevadas é o *T. reesei*, liderando, assim as pesquisas no mercado de enzimas lignocelulolíticas (LEVY et al., 2002). Um mercado promissor que apresentou um faturamento em 2004 de US\$ 2,3 bilhões, estimando-se um crescimento para os próximos dez anos de 5,7% ao ano, em valor transacionado, podendo atingir US\$ 4 bilhões no ano de 2014 (FREEDONIA[®], 2005).

Material e Métodos

Microrganismos estudados

Os microrganismos utilizados foram a estirpe *Penicillium* sp. IS-07, e a estirpe *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ATCC: 56765) utilizada para efeito de comparação.

O fungo *Penicillium* sp. IS-07 já havia sido isolado de sedimento de restinga na Área de Proteção Ambiental de Guaibim, município de Valença, BA e o *T. reesei* RUT-C30 adquirido em forma de suspensão de esporos na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Sendo mantidas na forma de suspensão de esporos padronizada ($5,2 \times 10^8$ UFC/mL) em glicerol 20%, a -30° C, obtida à partir do crescimento em meio sólido de ágar batata, conforme o Esquema 1.

Produção de Celulase em Fermentação Submersa

Para a produção de FPase (*Filter paper activity*) e CMCases (carboximetilcelulose) em fermentação submersa, as células foram cultivadas em meio de sais mineirais (BRECCIA et al., 1995) modificado contendo (g/L): 2,0 NaCl; 3,0 KH_2PO_4 ; 6,0 K_2HPO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1 mL de Solução de elementos traços (0,64g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,15g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,11g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,79g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), variando as concentrações de palha de cana e milhocina, agitação, temperatura e concentração de inóculo de acordo com a matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , como descrito nas Tabelas 6 e 7. O fungo *Penicillium* sp. IS-07 foi cultivado em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de sais (pH 6,8), sendo inoculado com suspensão de esporos padronizada ($5,2 \times 10^8$ UFC/mL), obtida de acordo com Hopwood et al. (1985). Os frascos foram durante 6 dias, coletados diariamente (foi escolhido o melhor dia para a utilização das matrizes do planejamento fatorial). Os sobrenadantes brutos, obtidos através da centrifugação a $2.086 \text{ g} / 15 \text{ min}$, foram filtrados em filtros de fibra de vidro (Whatman) e congelados (-20°C) para análises posteriores.

Esquema 1 – Preparação e padronização da suspensão de esporos (Hopwood et al, 1985).

Inocular o microrganismo em 12 garrafas de Roux contendo meio de ágar batata e incubar à 30° C por 7 dias (formação do micélio aéreo)



Lavar as garrafas com 20 mL solução salina estéril (formação da suspensão de esporos)



Retirar os 20 mL de suspensão e passar em filtro contendo lã de vidro previamente esterilizado por autoclavagem, transferindo o filtrado para Tubos de Falcon (Separação dos esporos do micélio)



Centrifugar (3.000 rpm / 15 min)



Desprezar o sobrenadante e ressuspender o "pellet" formado (esporos) em 5 mL de solução salina 0,85%



Retirar 1 mL e diluir em 9 mL de salina 0,85%,
repetindo-se este procedimento até perfazer
10 diluições (10^{-10})



Determinar a concentração de esporos através do
plaqueamento das várias diluições em meio de
ágar batata (28° C / 7 dias), seguido da
contagem de colônias



Centrifugar e desprezar o sobrenadante



Ressuspender o "pellet" formado em 4mL
de solução glicerol 20%
e estocar a -20° C

Tabela 6 – Valores utilizados para composição da matriz do delineamento fatorial fracionado para produção de celulasas por *Penicillium* sp. IS-7 e *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Nível	-1	0	+1
Agitação	100	150	200
Temperatura	25	30	35
% Fonte de C	0,8	1,6	2,4
% Fonte de N	0,3	0,9	1,5
Inóculo (μ L)	25	50	75

Tabela 7 – Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} para produção de celulases por *Penicillium* sp. IS-7 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Ensaio	Agitação	Temperatura	% Fonte C	% Fonte N	Inóculo (μL)
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0

Após análise destas variáveis, foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com as variáveis significativas.

Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A otimização das condições de produção de CMCase e FPase, foi realizada por um 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 8 (RODRIGUES e IEMMA, 2009). A variável dependente selecionada para este estudo foi a atividade enzimática, expressa em U.L^{-1} , enquanto que as variáveis independentes foram a concentração das fontes de carbono e nitrogênio.

Como fontes de carbono, foram utilizadas palha de cana-de-açúcar, carboximetilcelulose e papel de filtro, 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, bem como, o dia que apresentou maior atividade enzimática, foram analisados, afim de definir faixas mais adequadas para cada resposta. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATSOFT 7.0®.

Tabela 8 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (valores codificados) para determinação da atividade enzimática das estirpes *Penicillium* sp. IS-7 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

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

Ensaio Analítico

Medida dos açúcares redutores

A quantidade de açúcares redutores presentes nos sobrenadantes foi determinada através da metodologia DNS - ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

Atividade de Endoglucanase (CMCase): Foi determinada através da medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação de 1,0 mL do extrato enzimático com 1,0 mL de solução 2,0% (p/v) CMC em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, a 50° C durante 20 min (GHOSE, 1987). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm e para a confecção da curva padrão, foi utilizada solução de glicose 0,04 M (MILLER, 1959).

Atividade de Endo e exoglucanase (FPase): Foi determinada através da medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação de 1,0 mL do extrato enzimático diluído em 0,5 mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 contendo uma tira de papel de filtro (aproximadamente 50 mg), a 50° C durante 60 min (GHOSE, 1987), o produto da reação foi medido espectrofotometricamente a 550 nm (MILLER, 1959).

Determinação do perfil ótimo de temperatura

O estudo foi realizado sob as mesmas condições descritas no item anterior. As temperaturas de incubação variaram numa escala de 10 em 10 graus de 20 a 90° C. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a pH 4,8, nas respectivas temperaturas (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005), e após o tempo de reação, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após a atividade enzimática foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Determinação do perfil ótimo de Ph

Para o estudo do efeito do pH, a atividade 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 e 3,0), Citrato de sódio 50mM (pH 3,0;4,0;5,0 e 6,0), Fosfato 50mM (pH 6,0; 7,0 e 8,0), Tris-HCl 50mM (pH 8,0 e 9,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0).

Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por Colowick e Kaplan (1955). A mistura reacional foi incubada em banho-maria, nos respectivos pH e após o tempo de reação 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

O estudo foi realizado, inicialmente, avaliando a capacidade da estirpe fungica *Penicillium* sp. IS-07 na produção das enzimas CMCase e FPase em fermentação submersa, utilizando diferentes concentrações de palha de cana, milhocina e inóculo, bem como, diferentes variações da agitação e temperatura. Para efeito comparativo o mesmo estudo foi realizado para a estirpe *Trichoderma reesei* RUT-C30. Através do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} foi possível determinar as variáveis para compor o DCCR para produção de celulase.

Fermentação por *Penicillium* sp. IS-07

Assim, foi constatada maiores atividades no quarto dia de fermentação tanto para CMCase quanto para FPase. A tabela 9 mostra que a maior atividade CMCase ($346,85 \text{ U.L}^{-1}$) foi obtida quando se utilizou agitação de 100 rpm à 35°C em 2,4% de palha de cana e 1,5% de milhocina, acrescido de 25 μL de inóculo. O resultado gerado pelo programa estatístico demonstra que esta atividade estava próxima ao predito ($330,20 \text{ U.L}^{-1}$).

Enquanto para a atividade FPase as melhores condições foram em agitação de 200 rpm à 25°C com 0,8% de palha de cana e 1,5% de milhocina, acrescido de 50 μL de inóculo, o dado predito pelo programa ($117,29 \text{ U.L}^{-1}$) corrobora com a maior atividade obtida (120 U.L^{-1}).

Tabela 9: Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} (valores reais), com resultados obtidos e preditos para a estirpe *Penicillium* sp. IS-7

Ensaio	Valores Reais				Atividade CMCCase		Atividade FPase		
	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Palha de cana (%)	Milhocina (%)	Inóculo (µL)	Observado (U.L ⁻¹)	Predito	Observado (U.L ⁻¹)	Predito
1	100	25	0,8	0,3	75	24,00	7,34	20,00	17,29
2	200	25	0,8	0,3	25	76,00	59,34	16,00	13,29
3	100	35	0,8	0,3	25	139,00	122,34	16,00	13,29
4	200	35	0,8	0,3	75	101,30	84,64	6,00	3,29
5	100	25	2,4	0,3	25	80,00	63,34	24,00	21,29
6	200	25	2,4	0,3	75	93,00	76,34	78,00	75,29
7	100	35	2,4	0,3	75	130,00	113,34	22,00	19,29
8	200	35	2,4	0,3	25	91,00	74,34	42,00	39,29
9	100	25	0,8	1,5	25	48,08	31,42	60,00	57,29
10	200	25	0,8	1,5	75	182,01	165,36	120,00	117,29
11	100	35	0,8	1,5	75	250,70	234,04	80,00	77,29
12	200	35	0,8	1,5	25	180,30	163,64	52,00	49,29
13	100	25	2,4	1,5	75	137,37	120,71	80,00	77,29
14	200	25	2,4	1,5	25	63,00	46,34	10,00	7,29
15	100	35	2,4	1,5	25	346,85	330,20	48,00	45,29
16	200	35	2,4	1,5	75	303,93	287,27	70,00	67,29
17 (C)	150	30	1,6	0,9	50	29,19	123,75	28,00	43,79
18 (C)	150	30	1,6	0,9	50	53,23	123,75	30,00	43,79
19 (C)	150	30	1,6	0,9	50	22,32	123,75	30,00	43,79

De acordo com os resultados obtidos na estimativa dos efeitos selecionou-se, com níveis de significância (*p* - valor) inferiores a 5% as variáveis temperatura e milhocina para realização do estudo DCCR para a atividade CMCCase (Tabela 10).

Tabela 10 - Estimativa dos efeitos para a Atividade CMCCase do *Penicillium* sp. IS-7.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(13)	<i>p</i> - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	140,408	14,299	9,819	0,0000	109,253	171,563
Curvatura	-210,988	71,970	-2,932	0,0126	-367,797	-54,179
Agitação (rpm)	-8,183	28,598	-0,286	0,7797	-70,492	54,127
Temperatura (° C)	104,952	28,598	3,670	0,0032	42,642	167,261
Palha de cana (g / L)	30,471	28,598	1,065	0,3076	-31,839	92,780
Milhocina (g / L)	97,242	28,598	3,400	0,0053	34,932	159,551
Inóculo (µL)	24,759	28,598	0,866	0,4036	-37,550	87,069

A tabela 11 demonstra que para a atividade FPase, a variável milhocina também foi significativa juntamente com a concentração do inoculo. Estes resultados podem ser visualizados com melhor exatidão na figura 5A e 5B, diagrama de Pareto, gerado com base nos resultados anteriores, tanto para CMC quanto para FPase.

Foi necessário checar a curvatura, uma vez que os pontos centrais apresentaram valores inferiores aos outros ensaios, tornando o erro padrão muito alto. Desta forma foi possível adequar os resultados ao modelo fatorial fracionado.

Tabela 11 - Estimativa dos efeitos para a Atividade FPase do *Penicillium* sp. IS-7

Fatores	Efeito (U/L)	Erro Padrão	t(12)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	46,500	6,227	7,468	0,0000	32,933	60,067
Curvatura	-34,333	31,341	-1,095	0,2948	-102,620	33,954
Agitação (rpm)	5,500	12,454	0,442	0,6666	-21,635	32,635
Temperatura (°C)	-9,000	12,454	-0,723	0,4837	-36,135	18,135
Palha de cana (g/L)	0,500	12,454	0,040	0,9686	-26,635	27,635
Milhocina (g/L)	37,000	12,454	2,971	0,0117	9,865	64,135
Inóculo (µL)	26,000	12,454	2,088	0,0588	-1,135	53,135

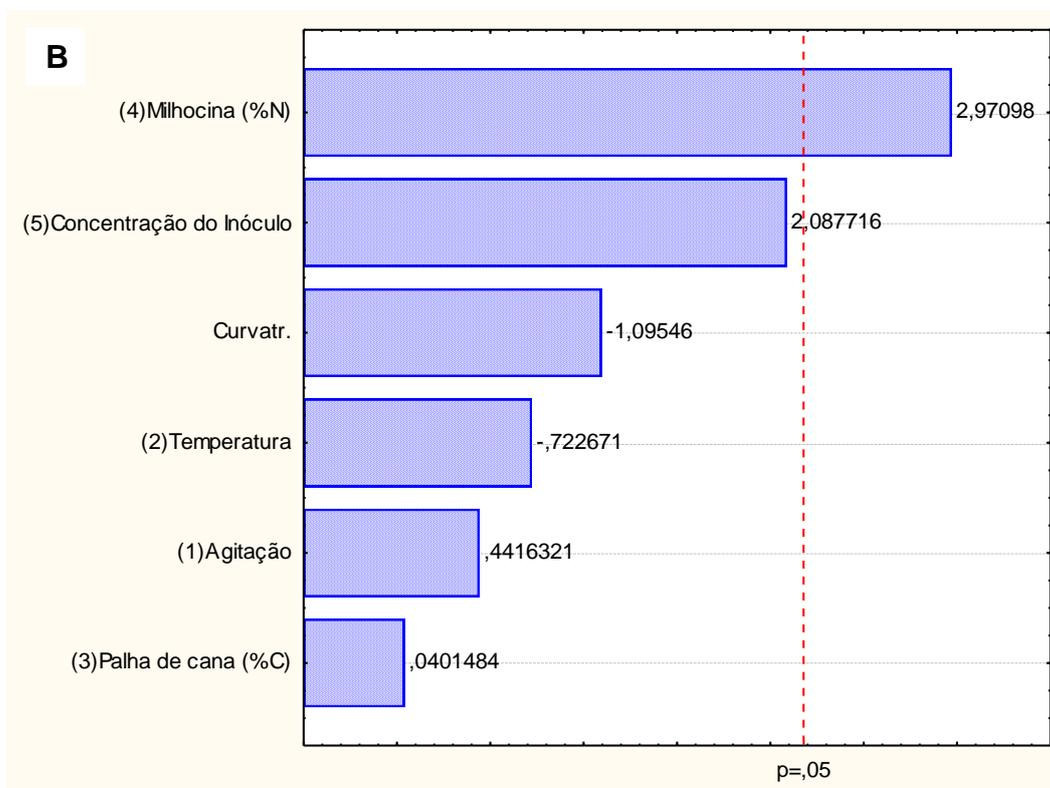
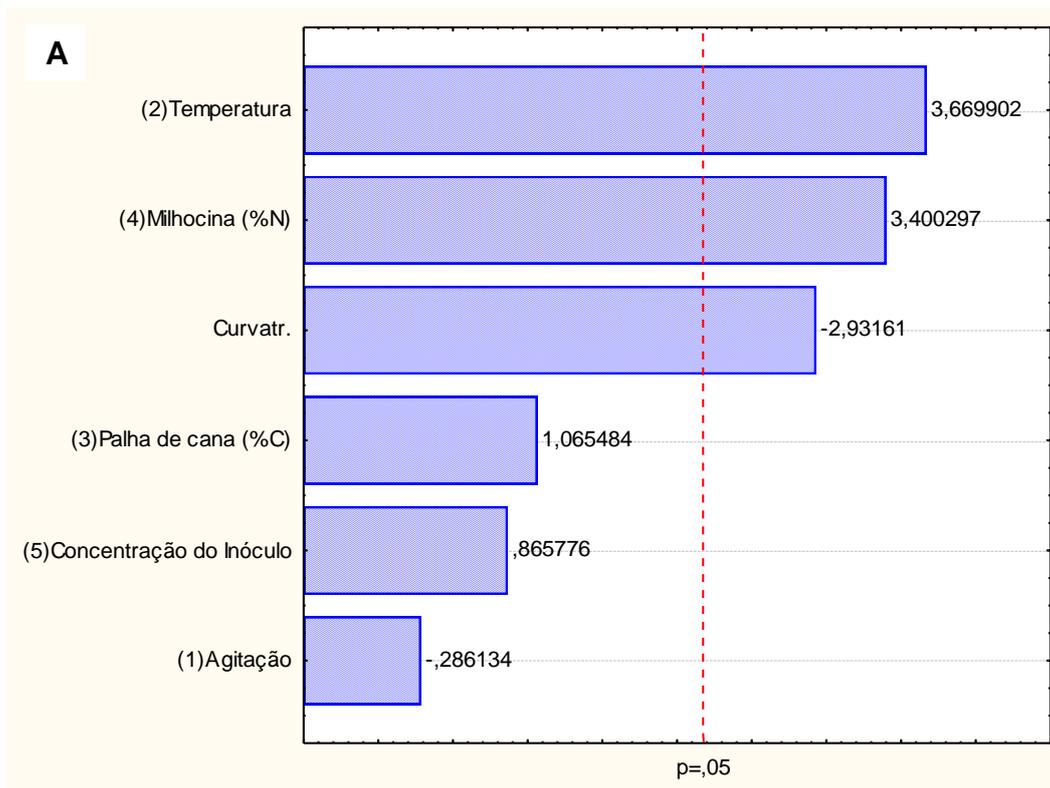


Figura 5. Diagrama de Pareto para atividade CMCase (A) e FPase (B) . Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} do *Penicillium* sp. IS-7

Otimização da produção de celulase por *Penicillium* sp. IS-07

Atividade de Endoglucanase (CMCase)

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial foram selecionados o melhor tempo de fermentação e as melhores condições para construção da superfície de resposta e através desta análise definir as condições otimizadas, com base na significância da resposta. Para o estudo de otimização da celulase realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para cada uma das respostas obtidas para que os principais efeitos das variáveis pudessem ser avaliados.

A tabela 12 apresenta a matriz do DCCR com os valores reais e as respostas para a atividade observada e predita pelo modelo estatístico para a CMCase. As variáveis agitação (200 rpm) e fonte de carbono [2,4% (p/v)] foram fixadas nos pontos máximos e a concentração do inóculo foi de 75 µL. Nota-se que os resultados para atividade CMCase variaram entre 19,85 e 718,63 U.L⁻¹, sendo que o maior valor obtido ocorreu com a temperatura maior axial de 37,05° C e a milhocina no ponto central [1,0% (p/v)]. Analisando os resultados pode-se perceber que com uma temperatura entre 30° C e 37,05° C obteve - se maiores valores de atividade enzimática, bem como valores fixados acima de 1,0% de milhocina. Comprovando, portanto, a importância das duas variáveis (temperatura e milhocina) no processo de otimização.

Tabela 12. Matriz do DCCR (valores reais), com resultados obtidos e preditos na atividade CMCase para o fungo *Penicillium* sp. IS-7.

Ensaio	Valores Reais		Atividade CMCase (U.L ⁻¹)	
	Temperatura (°C)	Milhocina (%)	Observado	Predito
1	25	0,50	206,46	141,85
2	35	0,50	27,79	159,54
3	25	1,50	242,19	210,91
4	35	1,50	432,77	597,85
5	22,90	1,00	154,84	243,57
6	37,05	1,00	718,63	528,84
7	30	0,30	19,85	-7,04
8	30	1,70	424,83	350,65
9 (C)	30	1,00	551,88	524,49
10 (C)	30	1,00	551,88	524,49
11 (C)	30	1,00	468,50	524,49

Para os resultados experimentais da atividade enzimática em função da relação entre temperatura e milhocina analisou-se através do coeficiente de regressão os valores de p . Estão representados na tabela 13 os parâmetros lineares (L), a interação e o termo quadrático (Q) das duas variáveis estudadas com um coeficiente de correlação de (R^2) de 0,86 e nível de significância (p) inferiores a 5% para a atividade CMCase. Com um p -valor de 0,034, a milhocina em termo quadrático forneceu subsidio para proceder com a validação deste resultado.

A Equação 1 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para as respostas da atividade CMCase. O valor de R^2 indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 86% da variabilidade dos dados.

Tabela 13. Coeficiente de regressão para a resposta atividade CMCase do *Penicillium* sp.IS-7.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor	Limite de Coeficiente	
					- 95%	+ 95%
Média	524,487	83,472	6,283	0,002	309,914	739,060
(1) Temperatura (L)	101,158	51,193	1,976	0,105	-30,438	232,754
Temperatura (Q)	-69,555	61,087	-1,139	0,306	-226,583	87,473
(2) Milhocina (L)	126,843	51,193	2,478	0,056	-4,753	258,439
Milhocina (Q)	-177,396	61,087	-2,904	0,034	-334,424	-20,368
1 (L) X 2 (L)	92,311	72,290	1,277	0,258	-93,517	278,138

$$\text{Equação 1: } Y = 524,5 + 101,1x_1 - 69,5x_1^2 + 126,8x_2 - 177,4x_2^2 + 92,31x_1x_2$$

De acordo com o Diagrama de Pareto apresentado na figura 6, para a atividade da celulase, somente a milhocina (Q) apresentou efeito significativo ($p = 0,034$) para o nível de confiança de 95% e a milhocina (L) poderia ser considerado marginalmente significativo devido ao p -valor (0,056) estar próximo do valor considerado para este parâmetro (0,05).

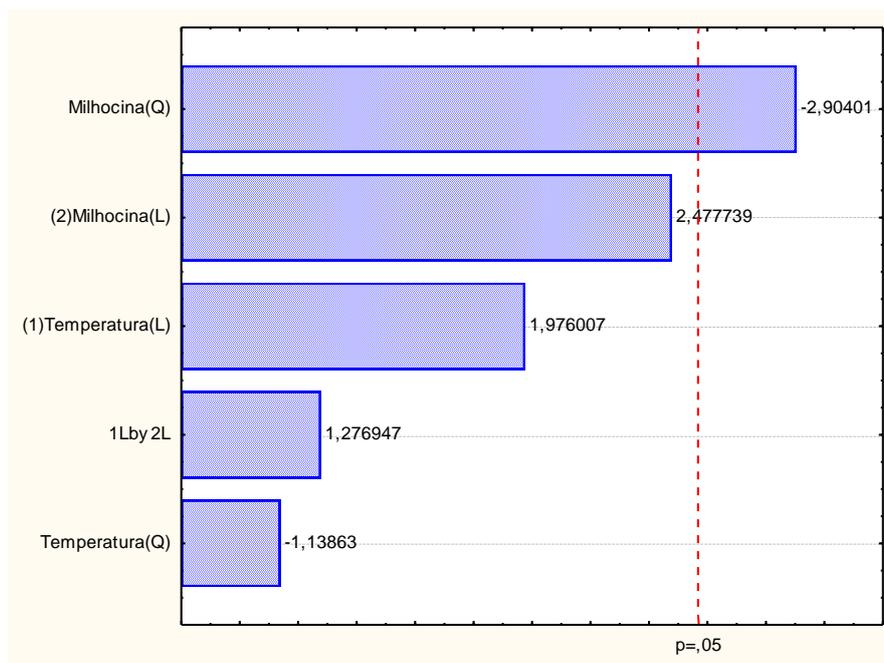


Figura 6. Diagrama de Pareto para atividade CMCásica do *Penicillium* sp.IS-7 para o Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade CMCase, são apresentadas as superfícies de resposta e curvas de contorno na Figura 7 (A e B), mostrando a região de otimização das variáveis em relação a resposta da atividade celulásica. Verifica-se que as regiões de otimização (em vermelho escuro) apresentaram valores de 1,3% de milhocina, todavia, com o objetivo de encontrar o ponto correspondente de maximização para a atividade, dentro da região de otimização, as escalas foram implementadas de acordo com seus valores reais, logo este corresponde a 1,5% de milhocina. Estes dados sugeriram, portanto, fixar a temperatura em 37,05° C e variar os valores da milhocina para proceder com a validação dos resultados.

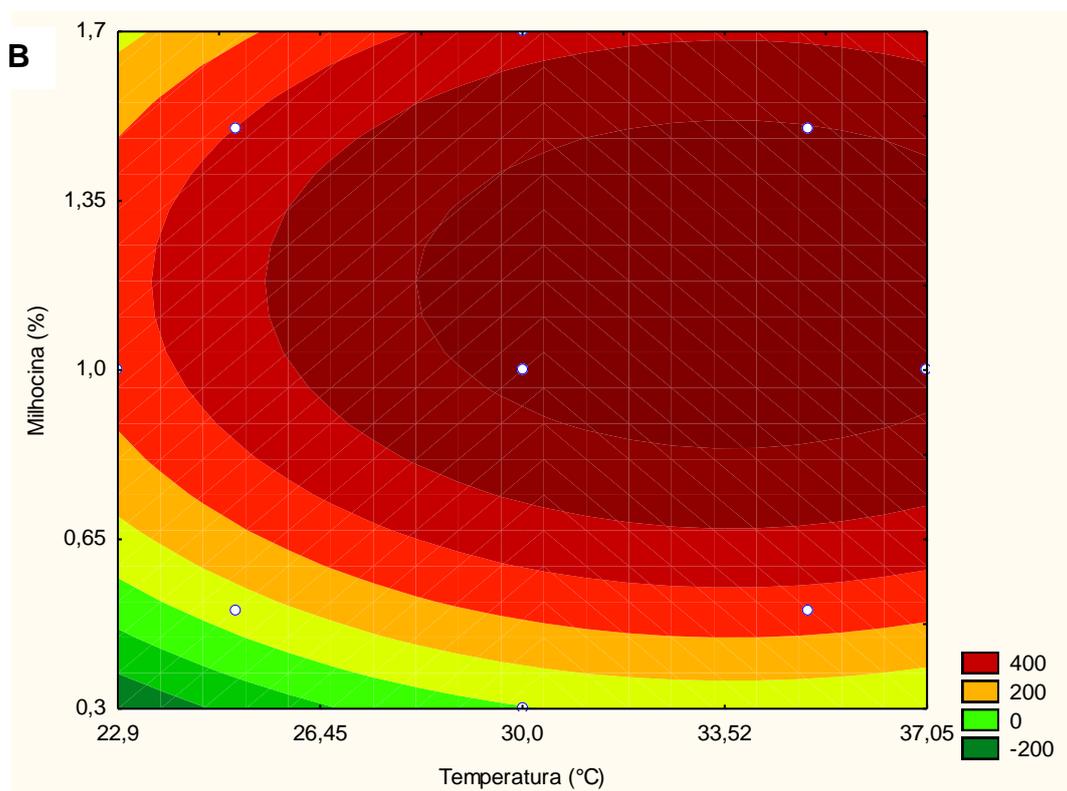
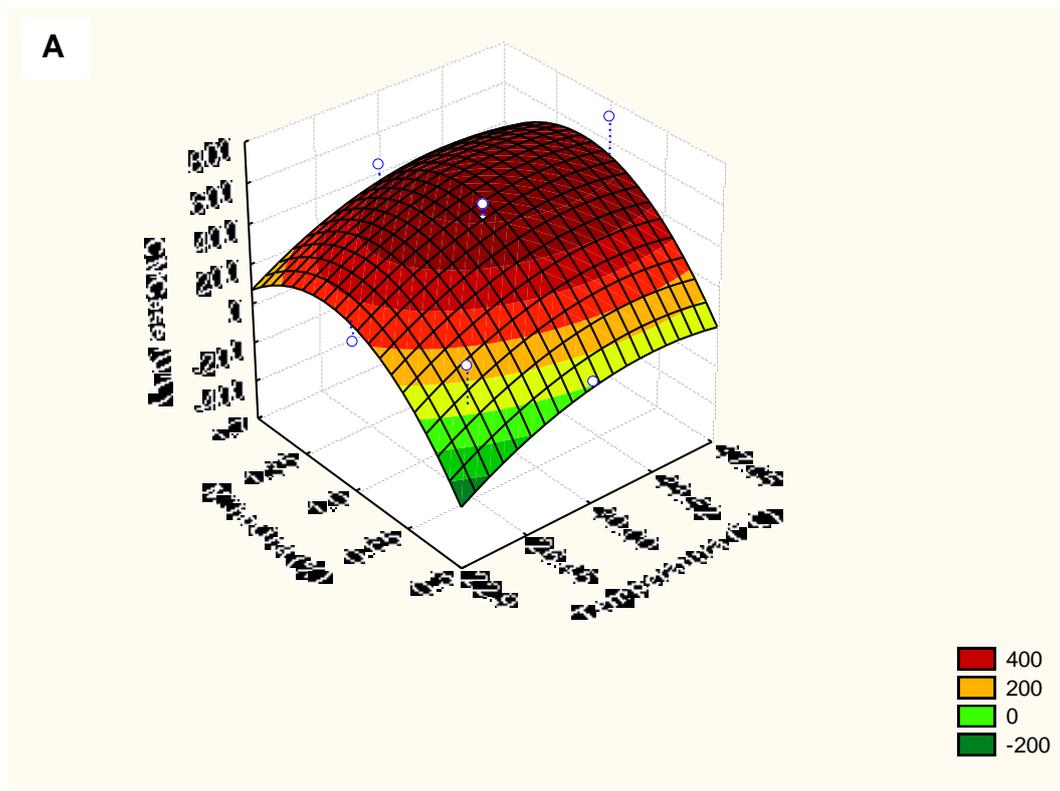


Figura 7. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade CMCase do *Penicillium* sp.IS-7 em função da temperatura e milhocina.

De acordo com ANOVA (tabela 14) verifica-se que o $F_{\text{calculado}}$ (3,28), foi inferior ao F_{tabelado} (5,05), com coeficiente de determinação de 80 %, o teste F não foi significativo para descrever os resultados através da superfície de resposta.

Tabela 14. ANOVA para atividade CMCase no quarto dia de fermentação com palha de cana e milhocina

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_c	F_{tab}
Regressão	342903,10	5	68580,62	3,28	5,05
Resíduos	104517,10	5	20903,42		
Total	447420,20	10	89484,04		

% variação explicada (R^2) = 0,8016 $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Atividade de FPase

Com base nos resultados adquiridos no planejamento fatorial fracionado para atividade FPase, selecionou-se o quarto dia de fermentação, definindo – se as melhores condições para o DCCR. A tabela 15 consiste dos valores reais e as respostas para a atividade FPase, bem como os valores preditos pelo Statistica 7.0.

As variáveis foram fixadas em agitação (100 rpm), fonte de carbono [2,4% (p/v)] e temperatura de 25° C, concentração do inóculo foi de 75 μL . Pode-se perceber que os resultados para atividade FPase variaram entre 1,99 e 123,08 U.L^{-1} , sendo que o maior valor obtido ocorreu quando foi acrescido 1,7% de milhocina (maior axial) e concentração de inóculo de 50 μL , valor utilizado no ponto zero do planejamento. Uma análise criteriosa destes resultados permite inferir que valores de concentração de inóculo abaixo de 50 μL , ocorre uma queda bastante significativa na atividade independente da quantidade de milhocina, com a concentração de esporos utilizada ($5,2 \times 10^8$).

Tabela 15. Matriz do DCCR (valores reais), com resultados obtidos e preditos na atividade FPase para o fungo *Penicillium* sp. IS-7.

Ensaio	Valores Reais		Atividade FPase	
	Milhocina (%)	Inóculo (μL)	Observado (U.L^{-1})	Predito
1	0,5	25	13,90	1,80
2	1,5	25	13,90	45,67
3	0,5	75	115,10	81,68
4	1,5	75	71,47	81,91
5	0,3	50	29,78	61,72
6	1,7	50	123,08	92,81
7	1,0	14,7	1,99	-12,31
8	1,0	85,3	53,60	69,56
9(C)	1,0	50	83,40	83,39
10 (C)	1,0	50	81,40	83,39
11 (C)	1,0	50	85,40	83,39

A análise estatística dos resultados, através do coeficiente de regressão permite relatar uma estimativa de efeitos, conforme a tabela 16, onde a concentração de inóculo, em termo quadrático foi positivo e significativo, pois apresentou p – valor (0,045) menor que 5% ($p < 0,05$)

A equação 2 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para as respostas da atividade FPase. O índice de correlação (R^2) foi de 0,72. Observa-se pela equação que a atividade FPase foi influenciada positivamente pelas variáveis x_1 e x_2 , mostrando que sua atividade aumenta com o aumento de suas concentrações.

Tabela 16. Coeficiente de regressão para a resposta atividade FPase do *Penicillium* sp. IS-7.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Limite de Coeficiente	
					- 95%	+ 95%
Média	83,393	17,861	4,669	0,005	37,481	129,306
(1) Milhocina (L)	11,024	10,954	1,006	0,360	-17,134	39,181
Milhocina (Q)	-3,084	13,071	-0,236	0,823	-36,683	30,516
(2) Inóculo (L)	29,030	10,954	2,650	0,045	0,872	57,187
Inóculo (Q)	-27,548	13,071	-2,108	0,089	-61,147	6,052
1 (L) X 2 (L)	-10,909	15,468	-0,705	0,512	-50,671	28,852

Equação 2: $Y = 83,4 + 11,02x_1 - 3,1x_1^2 + 29,0x_2 - 27,5x_2^2 - 11,0x_1x_2$

Para a atividade FPásica, apresentada pelo Diagrama de Pareto na figura 8, nota-se que apenas a concentração de inoculo com efeito linear foi estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95%.

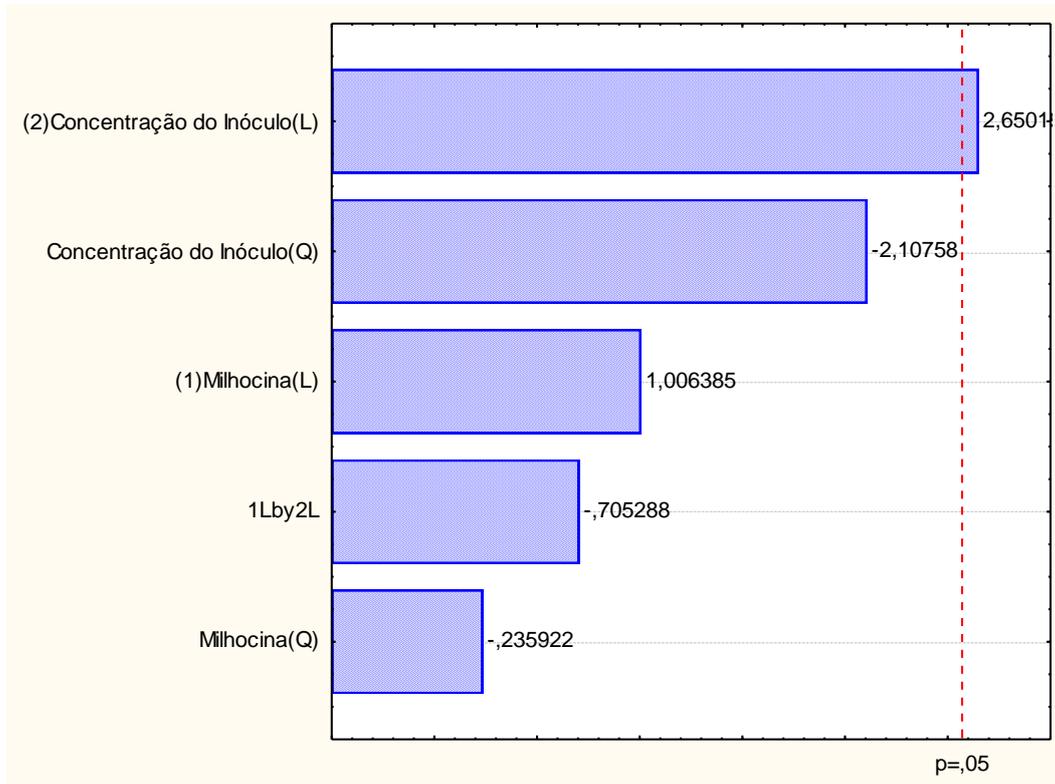


Figura 8. Diagrama de Pareto para atividade FPásica do *Penicillium* sp. IS-7. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

A figura 9 ilustra os efeitos das variáveis na atividade FPase, por meio das curvas de contorno e superfície de resposta, mostrando a região de otimização. As curvas de contorno mostram que o máximo de atividade FPásica se encontra na faixa de 0,50% (valor 0,65 na superfície) em proporção de milhocina e acima de 50 µL de inoculo, indicando que o aumento da concentração do inoculo ($p= 0,045$) resultará em maiores valores na atividade, devendo, a milhocina, ser fixada em [1,0% (p/v)], para validação da resposta FPásica.

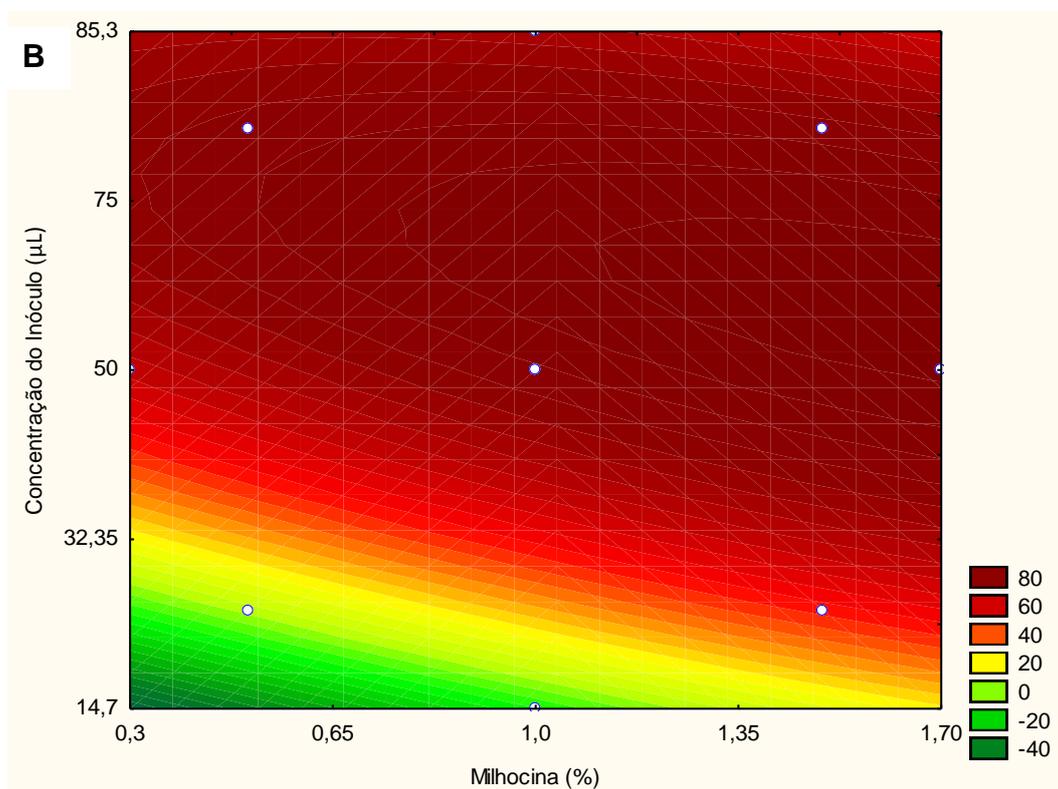
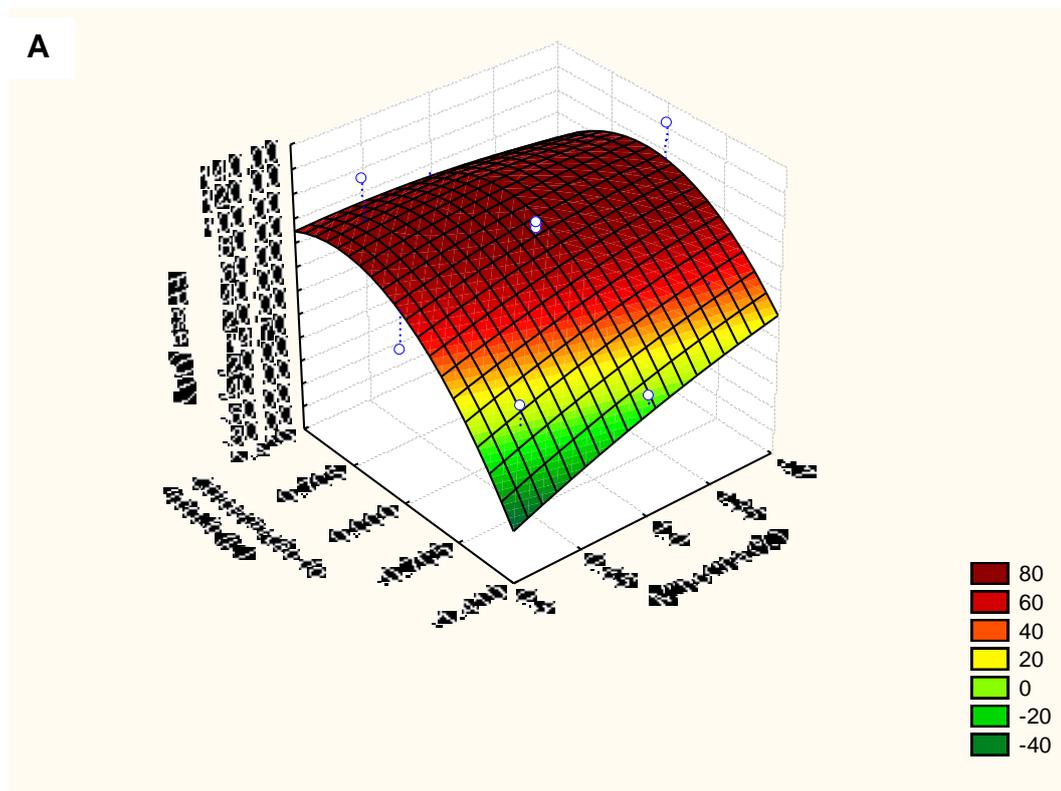


Figura 9. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade FPase do *Penicillium* sp. IS-7 em função da milhocina e concentração de inóculo.

Para verificar a significância do modelo foi calculada a análise de variância (ANOVA), baseado no teste F. Assim, com um valor $F_{\text{calculado}}$ (1,60)

menor que o F_{tabelado} (5,05), o modelo não foi adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta (TABELA 17).

Tabela 17. ANOVA para atividade FPase no quarto dia de fermentação

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	7686,22	5	1537,24	1,60	5,05
Resíduos	4785,16	5	957,03		
Total	12471,38	10	2494,27		

% variação explicada (R^2) = 0,72; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Confirmação experimental das condições otimizadas

Em um planejamento experimental, é importante realizar, após a otimização, ensaios em triplicata para verificar a dinâmica de produção da enzima para validar experimentalmente as condições estabelecidas pela análise de superfície de resposta.

Assim, para validação da atividade, foram mantidas as condições a otimização, variando, somente, a milhocina que foi estatisticamente significativa a 95% de confiança. Desta forma o processo foi realizado com uma agitação de 200 rpm e concentração de palha de cana em [2,4% (p/v)] e de inóculo 75 μL , sendo a temperatura fixada em 37,05° C e variando –se a concentração de milhocina à partir do valor codificado (+1), em: [1,5; 1,7; 1,9 e 2,1% (p/v)]. O resultado destes ensaios pode ser conferido na tabela 18.

De acordo com a tabela 18, obteve-se máxima atividade CMC_{Case} (1056,1 U.L⁻¹), quando foi utilizado 1,9% de milhocina. Com base nestes resultados foi possível selecionar o extrato enzimático das condições do ensaio três para fazer a determinação do perfil ótimo de temperatura e pH.

Tabela 18. Validação dos resultados obtidos com a atividade CMC_{Case} por *Penicillium* IS-7.

Ensaio	Milhocina (%)	Atividade CMC _{Case} (U.L ⁻¹)
1	1,5	397,0
2	1,7	357,3
3	1,9	1056,1
4	2,1	627,3

Na tabela 19, pode-se observar os resultados validados para a atividade FPase, onde as condições utilizadas no ensaio 3, foram favoráveis para obter uma atividade de 157,50 U.L⁻¹. Foram mantidas a agitação de 100 rpm, temperatura de 25° C e concentração de palha de cana de [2,4% (p/v)] e milhocina [1,0% (p/v)], variando-se a concentração do inoculo conforme exposto na tabela mencionada. Assim este extrato enzimático foi selecionado para determinação do perfil ótimo de temperatura e pH.

Tabela 19. Validação dos resultados obtidos com a atividade FPase por *Penicillium* IS-7.

Ensaio	Inóculo (µL)	Atividade FPase (U.L ⁻¹)
1	85	73,46
2	90	125,03
3	100	157,50
4	105	83,36

Determinação do perfil ótimo de Temperatura

A figura 10, representa graficamente o efeito da temperatura na atividade CMCase do *Penicillium* sp. IS-7. O ótimo de temperatura ocorreu à 60° C, atingindo atividade máxima de 1147,4 U.L⁻¹. Observa-se que à 40° C a atividade já é superior à 50% da atividade máxima; à 50° C a atividade atinge 73% e à 70° C, mantém 89 % em relação ao valor máximo atingido, a partir daí a atividade sofre um brusco decréscimo. Todavia à 90° C, foi possível observar uma atividade em torno de 20%.

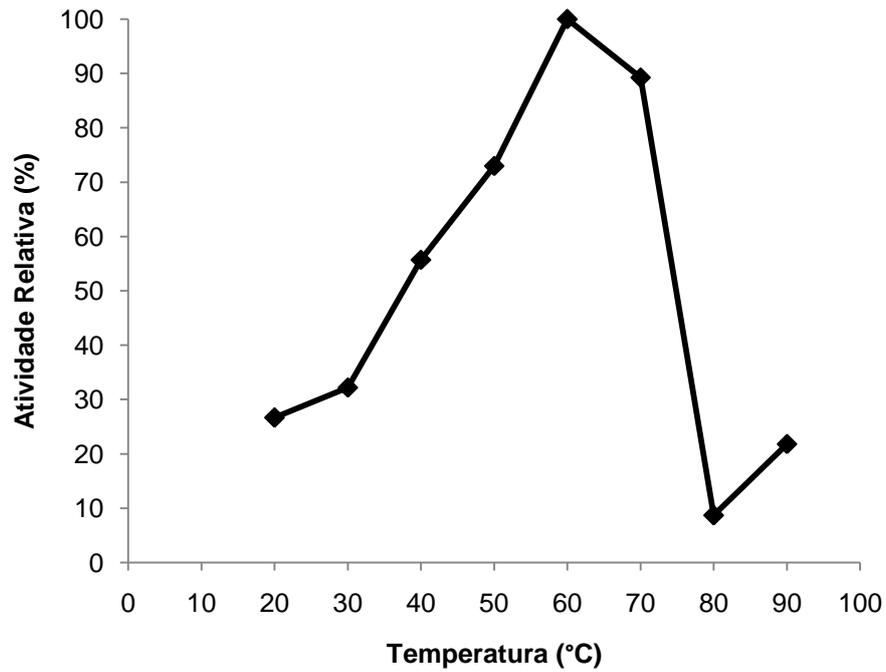


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade CMCCase produzida por *Penicillium* sp. IS-7. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

Na figura 11 observa-se, esquematicamente, o perfil ótimo de temperatura para a atividade FPase. Nota-se que, entre 20 e 70° C a atividade se mantém em torno de 34 a 48 % do valor máximo que é atingido com uma temperatura de 80° C (293,8 U.L⁻¹), sofrendo uma queda acentuada aos 90° C.

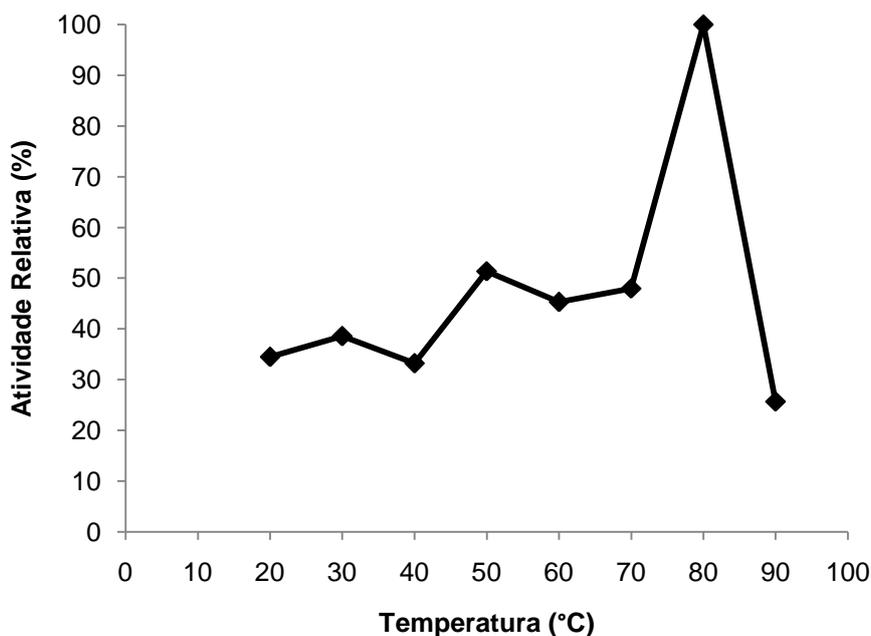


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade FPase produzida por *Penicillium* sp. IS-7. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

Determinação do perfil ótimo de pH

Em relação ao perfil ótimo de pH, foi possível observar (Figura 12), que a atividade manteve-se acima de 50% quando utilizado o tampão citrato de sódio pH 3,0 – 6,0, atingindo máxima atividade CMCásica ($1179,19 \text{ U.L}^{-1}$) em pH 5,0. Para o tampão fosfato pH 6,0 – 8,0, a atividade ficou entre 28 e 52 % em relação ao valor máximo obtido. Em pH acima de 8,0 ocorreram valores baixo na atividade CMCase.

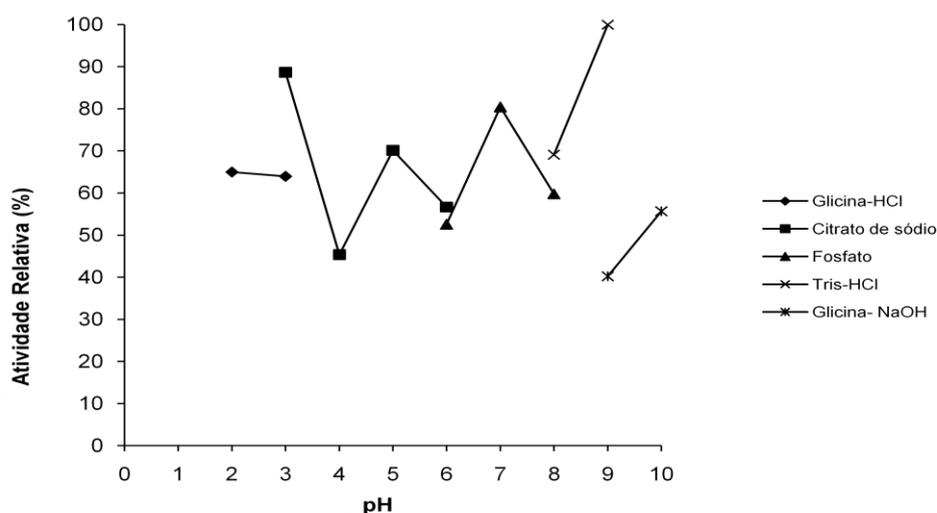


Figura 12. Efeito do pH na atividade CMCCase produzida por *Penicillium* sp. IS-7. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

A enzima FPase apresentou atividade ótima em pH 9,0 (tampão Tris), mantendo sua atividade acima de 40% em todas as faixas de pH testadas. Valores acima de 80% em relação à atividade máxima foi observado tanto em pH 3,0 (tampão citrato de sódio), quanto em pH 7,0 (tampão fosfato) (Figura 13).

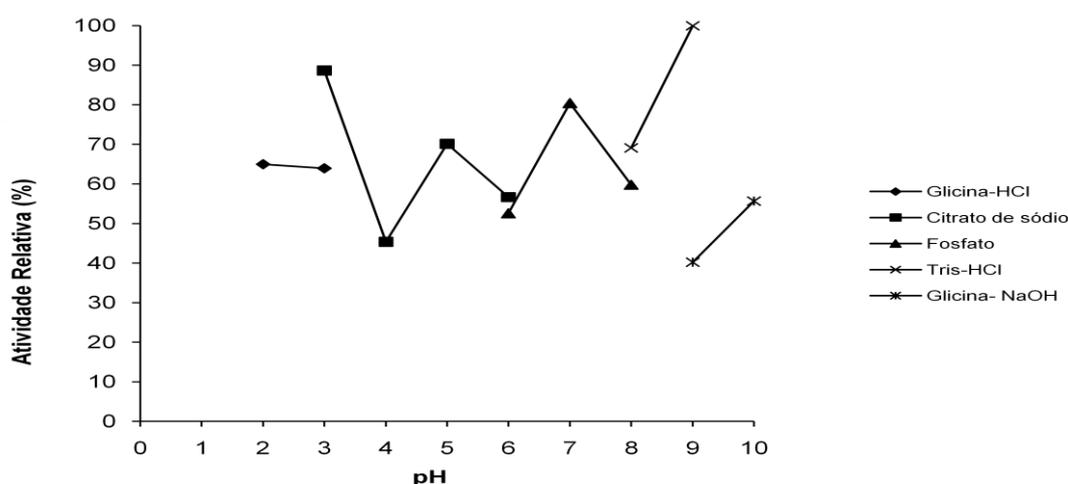


Figura 13. Efeito do pH na atividade FPase produzida por *Penicillium* sp. IS-7. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

Fermentação de *Trichoderma reesei* RUT – C30

A estirpe *T. reesei* RUT C30, descrita várias vezes na literatura como boa produtora de enzimas do complexo lignocelulolítico, foi utilizada para efeito de comparação com a produção de enzimas realizada pela estirpe de *Penicillium* sp. IS-7.

Através da tabela 20 pode-se observar as atividades CMC e FPase para o quarto dia de fermentação e as condições em seus valores reais utilizados durante o planejamento fatorial fracionado. As mesmas concentrações utilizadas para o *Penicillium* sp. IS-7, uma vez, que se trata de um estudo comparativo.

A atividade máxima obtida para CMCase ocorreu no ensaio 14 (635,00 U.L⁻¹), onde foram utilizadas uma agitação (200 rpm), o dobro da utilizada para o *Penicillium* à uma temperatura de 25° C. As concentrações de palha de cana [2,4% (p/v)]; milhocina [1,5% (p/v)] e 25 µL de inóculo foram as mesmas do primeiro experimento. Nestas condições foi observado que este fungo obteve atividade CMCase 55% maior que o *Penicillium* sp. IS-7.

Para a atividade FPase, o melhor valor adquirido foi no ensaio 15 (204,47 U.L⁻¹), o qual foram usadas as mesmas condições da máxima adquirida na atividade CMCase do *Penicillium* sp. IS-7, sendo agitação de 100 rpm à 35° C, concentração de palha de cana [2,4% (p/v)], milhocina [1,5% (p/v)] e 25 µL de inoculo.

Tabela 20. Matriz do delineamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹ (valores reais), com resultados obtidos e preditos para o fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Ensaio	Valores Reais					Atividade CMCase		Atividade FPase	
	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Palha de cana (%)	Milhocina (%)	Inóculo (µL)	Observado (U.L ⁻¹)	Predito	Observado (U.L ⁻¹)	Predito
1	100	25	0,8	0,3	75	262,00	238,54	60,72	56,66
2	200	25	0,8	0,3	25	12,00	-11,46	38,08	34,02
3	100	35	0,8	0,3	25	294,00	270,54	77,42	73,37
4	200	35	0,8	0,3	75	54,00	30,54	42,19	38,14
5	100	25	2,4	0,3	25	422,00	398,54	48,37	44,31
6	200	25	2,4	0,3	75	282,00	258,54	73,07	69,01
7	100	35	2,4	0,3	75	606,00	582,54	177,72	173,67
8	200	35	2,4	0,3	25	113,00	89,54	64,83	60,78
9	100	25	0,8	1,5	25	574,00	550,54	55,57	51,52
10	200	25	0,8	1,5	75	550,00	526,54	82,33	78,27
11	100	35	0,8	1,5	75	246,00	222,54	103,23	99,18
12	200	35	0,8	1,5	25	63,00	39,54	52,48	48,43
13	100	25	2,4	1,5	75	607,00	583,54	63,80	59,75
14	200	25	2,4	1,5	25	635,00	611,54	137,90	133,85
15	100	35	2,4	1,5	25	397,00	373,54	204,47	200,42
16	200	35	2,4	1,5	75	103,00	79,54	103,94	99,89
17 (C)	150	30	1,6	0,9	50	156,00	302,79	77,27	82,58
18 (C)	150	30	1,6	0,9	50	159,00	302,79	44,64	82,58
19 (C)	150	30	1,6	0,9	50	218,00	302,79	60,96	82,58

Com base na estimativa dos efeitos, exposta na tabela 21, nota-se que a agitação ($p = 0,0272$) e temperatura ($p = 0,0394$) foram estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%. Desta forma foi realizado um planejamento experimental para duas variáveis independentes.

Tabela 21 - Estimativa dos efeitos para a Atividade CMC_{Case} do *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Fatores	Efeito (U/L)	Erro Padrão	t(13)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	302,789	36,778	8,233	0,0000	223,336	382,243
Agitação (rpm)	-199,500	80,156	-2,489	0,0272	-372,666	-26,334
Temperatura (°C)	-183,500	80,156	-2,289	0,0394	-356,666	-10,334
Palha de cana (g/L)	138,750	80,156	1,731	0,1071	-34,416	311,916
Milhocina (g/L)	141,250	80,156	1,762	0,1015	-31,916	314,416
Inóculo (μL)	25,000	80,156	0,312	0,7601	-148,166	198,166

Na tabela 22, encontra-se a estimativa dos efeitos para a atividade FPásica do *T. reesei* RUT C30. Os parâmetros significativos selecionados com $p < 0,05$, a palha de cana que apresentou $p = 0,0353$, utilizando o bom senso através da análise dos valores reais, testamos a variável temperatura ($p = 0,1076$) na otimização do processo.

Tabela 22 - Estimativa dos efeitos para a Atividade FPase do *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Fatores	Efeito (U/L)	Erro Padrão	t(13)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	82,579	8,842	9,339	0,0000	63,476	101,682
Agitação (rpm)	-24,561	19,272	-1,274	0,2248	-66,194	17,073
Temperatura (°C)	33,308	19,272	1,728	0,1076	-8,326	74,942
Palha de cana (g/L)	45,260	19,272	2,349	0,0353	3,627	86,894
Milhocina (g/L)	27,667	19,272	1,436	0,1747	-13,967	69,300
Inóculo (μL)	3,484	19,272	0,181	0,8593	-38,150	45,117

O parâmetro temperatura apresentou efeito significativo para a atividade CMCásica para ambos micro-organismos estudados, bem como para a atividade FPásica do *T. reesei* RUT-C30, demonstrando sua importância para os processos de otimização.

A seguir estão sendo apresentados os Diagramas de Pareto ilustrando os efeitos significativos ao nível de 95% de confiança para as atividades CMC e FPase, conforme as figuras 14A e 14B, respectivamente.

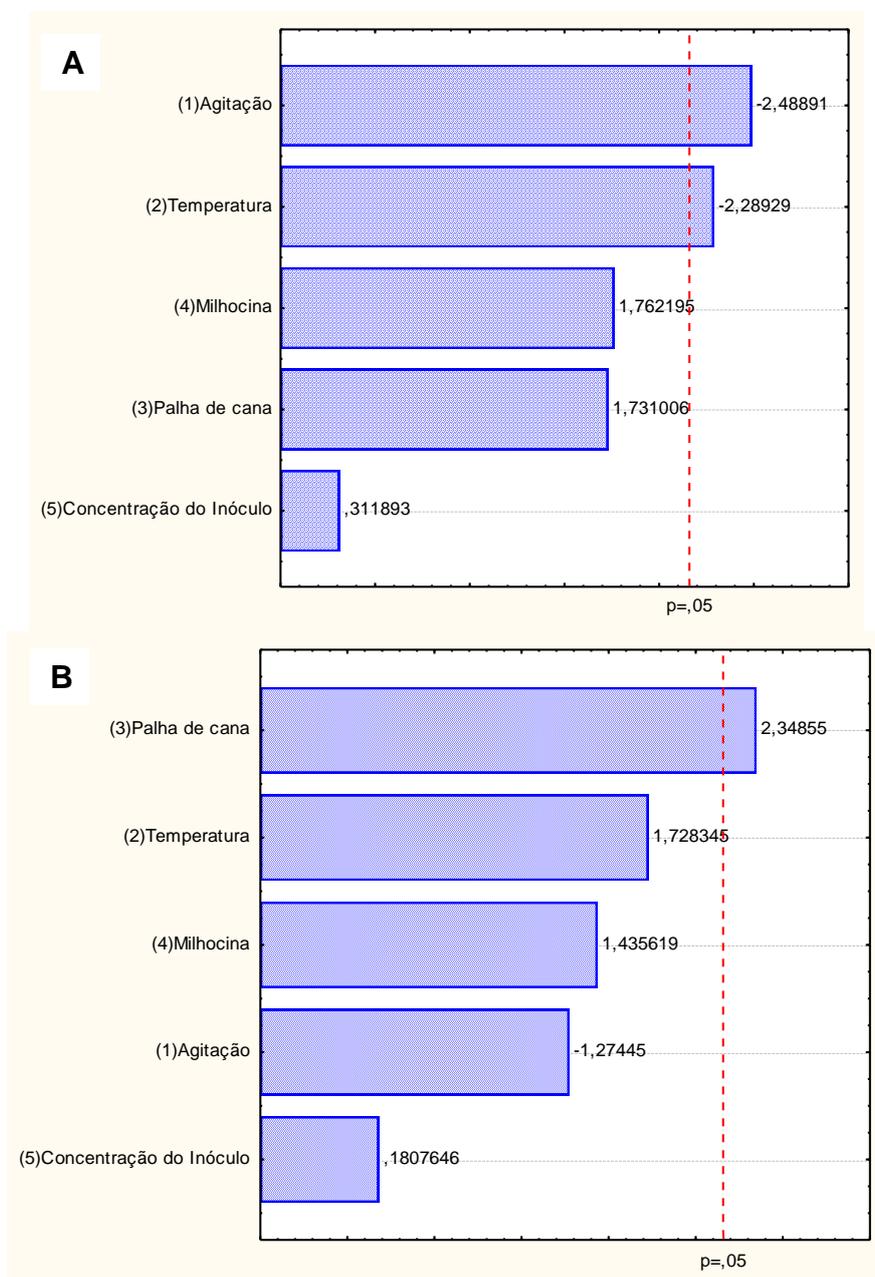


Figura 14. Diagrama de Pareto para atividade CMCCase **(A)** e FPase **(B)** do *Trichoderma reesei* RUT-C30. Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Otimização da produção de celulase por *Trichoderma reesei* RUT – C30

Atividade de Endoglucanase (CMCase)

Com base nas respostas obtidas com o planejamento fatorial, procedeu-se com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para obter valores ótimos de atividade celulásica. Assim, foram fixadas a concentração de palha de cana de açúcar [2,4% (p/v)], milhocina [1,5% (p/v)] e 75 μ L de inóculo, variando-se a agitação em entre 79,5 a 220,5 rpm e a temperatura de 23 a 35° C, de acordo com a tabela 23. Esta tabela exhibe, ainda, os valores reais do planejamento experimental com duas variáveis e os valores preditos pelo programa estatístico.

Tabela 23. Matriz do DCCR (valores reais), com resultados obtidos e preditos da atividade CMCase para o fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Ensaio	Valores Reais		Atividade CMCase (U.L ⁻¹)	
	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Observado	Predito
1	100	25	476,44	473,22
2	200	25	214,40	262,33
3	100	35	678,93	566,88
4	200	35	273,95	213,05
5	79,50	30	488,35	556,89
6	220,50	30	162,78	158,76
7	150	23	428,80	383,87
8	150	37	305,72	415,16
9 (C)	150	30	341,45	345,16
10 (C)	150	30	329,54	345,16
11 (C)	150	30	365,27	345,16

De acordo com a tabela 24 a atividade CMCase variou de 162,78 à 678,93 U.L⁻¹. A mínima atividade ocorreu ao utilizar-se o ponto axial superior da agitação (220,5 rpm), enquanto a máxima atividade foi atingida ao utilizar 100 rpm de agitação (ponto axial inferior), demonstrando ser um parâmetro importante no processo. Fazendo-se uma comparação paralela entre os ensaios 3 e 4, pode-se perceber que mesmo estando à 35° C os ensaios demonstraram valores absolutamente diferentes devido a variação na agitação.

Com os resultados experimentais da atividade enzimática em função da relação agitação e temperatura realizou-se uma regressão, afim de analisar os

valores de p . Estão representados na tabela 24 os parâmetros lineares (L), a interação e o termo quadrático (Q) das duas variáveis estudadas com um coeficiente de correlação de (R^2) de 0,82 e nível de significância (p) inferiores a 5% para a atividade CMCCase. Com um p -valor de 0,0059, a agitação em termo linear forneceu subsidio para proceder com a validação deste resultado.

A equação 3 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para as respostas da atividade CMCCase. O valor de R^2 indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 82% da variabilidade dos dados.

Tabela 24. Coeficiente de regressão para a resposta atividade CMCCase do *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Limite de Coeficiente	
					- 95%	+ 95%
Média	345,165	50,294	6,862	0,0010	215,879	474,4502
(1) Agitação (L)	-141,179	30,845	-4,577	0,0059	-220,469	-61,8889
Agitação (Q)	6,367	36,806	0,173	0,8694	-88,246	100,9809
(2) Temperatura (L)	11,095	30,845	0,359	0,7337	-68,195	90,3854
Temperatura (Q)	27,336	36,806	0,742	0,4910	-67,277	121,9500
1 L x 2 L	-35,733	43,556	-0,820	0,4493	-147,699	76,2329

$$\text{Equação 3: } Y = 345,2 - 141,2x_1 + 6,4x_1^2 + 11,1x_2 + 27,3x_2^2 - 35,7x_1x_2$$

Baseado no Diagrama de Pareto apresentado na figura 15, para a atividade CMCCase, somente a agitação (L) apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para o nível de confiança de 95%.

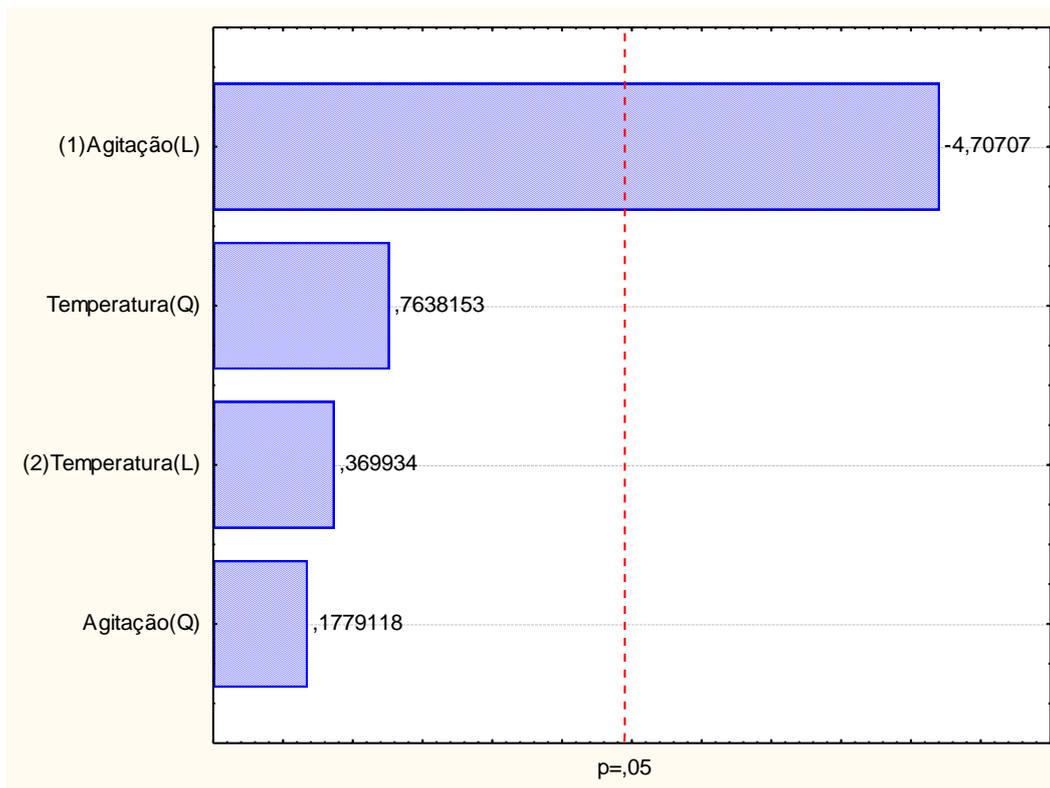


Figura 15. Diagrama de Pareto para atividade CMCásica do *Trichoderma reesei* RUT-C30. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade CMCase, são apresentadas as superfícies de resposta e curvas de contorno na figura 16 (A e B), mostrando a região de otimização das variáveis em relação a resposta da atividade obtida. Verifica-se que as regiões de otimização (em vermelho escuro) apresentaram valores de 114,75 rpm, que corresponde ao valor real 100 rpm. Para a temperatura observa-se que não há necessidade em ser aumentada, devendo ser fixada em 35° C. Estes dados sugeriram, portanto, fixar a temperatura em 35° C e variar os valores da agitação para a devida validação dos resultados.

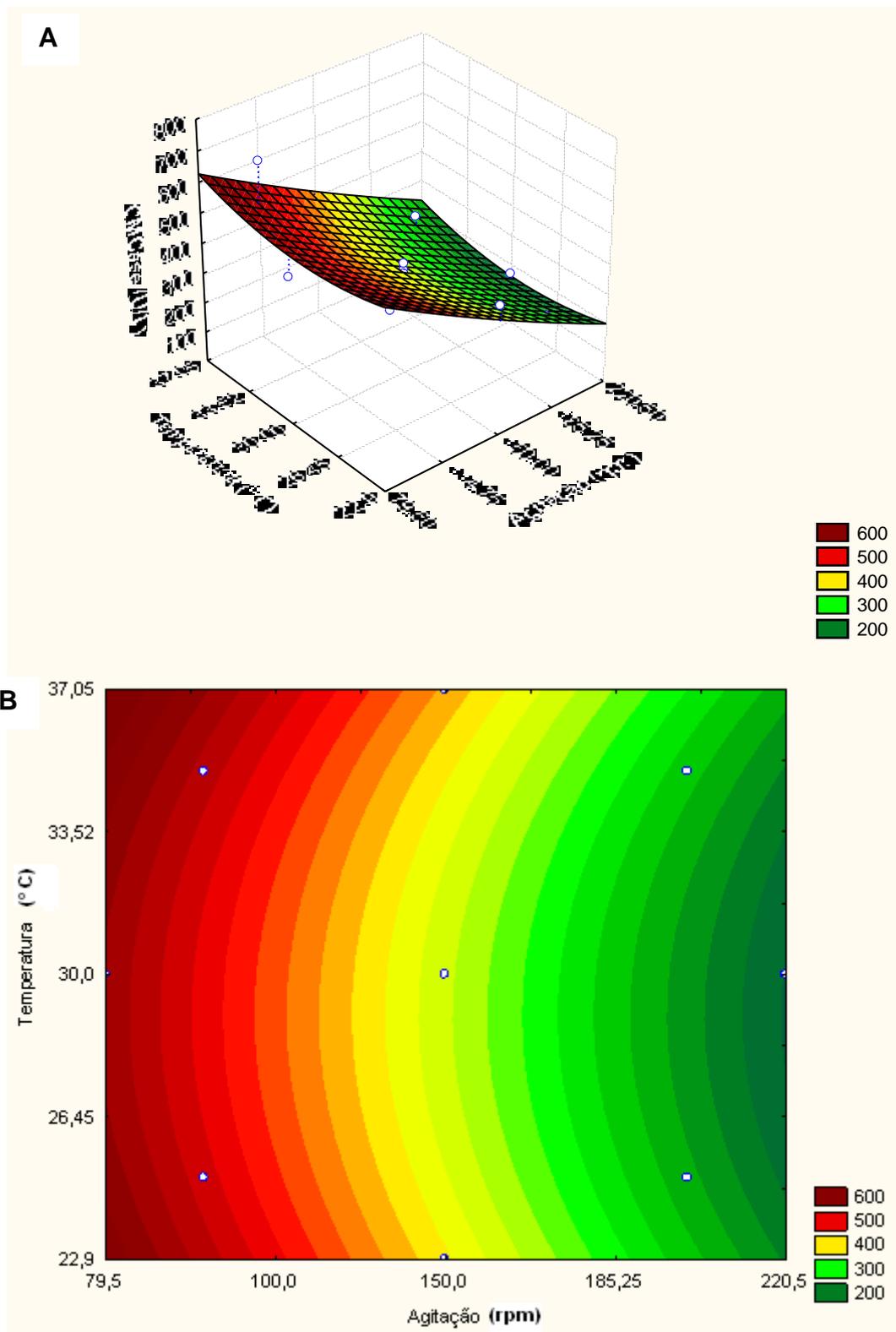


Figura 16. Superfície de resposta **(A)** e curva de contorno **(B)** para a atividade CMCase do *Trichoderma reesei* RUT-C30 em função da agitação e temperatura.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), apresentada na tabela 25, verifica-se que o $F_{\text{calculado}}$ (3,47), foi inferior ao F_{tabelado} (5,05), mostrando que o modelo não foi estatisticamente significativo (Tabela 25).

Tabela 25- ANOVA para atividade CMCase no quarto dia de fermentação do *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	131536,2	5	26307,24		
Resíduos	37943,7	5	7588,74	3,47	5,05
Total	169479,9	10	33895,98		

% variação explicada (R^2) = 0,82; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Atividade de FPase

A tabela 26 consiste nos valores reais e nas respostas para a atividade FPase, bem como os valores preditos pelo Statistica 7.0. As variáveis foram fixadas em agitação (100 rpm), milhocina [0,9% (p/v)], concentração do inoculo de 75 μL . Sendo variada a temperatura entre 22,90 e 37,05° C. Pode-se observar que os resultados para atividade FPase variaram entre 39,70 e 222,30 U.L^{-1} , a máxima atividade foi conseguida utilizando 1,6 % de palha de cana à 30° C (valores que compunham o ponto central). Nota-se que valores semelhantes foram observados em outras faixas de temperatura quando se usou a mesma concentração de palha de cana.

Tabela 26. Matriz do DCCR (valores reais), com resultados obtidos e preditos na atividade FPase para o fungo *Trichoderma reesei* RUT C30.

Ensaio	Valores Reais		Atividade FPase (U.L^{-1})	
	Temperatura (°C)	Palha de cana (%)	Observado	Predito
1	25	0,80	136,98	142,50
2	35	0,80	39,70	61,44
3	25	2,40	111,17	147,81
4	35	2,40	47,64	100,50
5	22,90	1,60	220,35	202,49
6	37,05	1,60	152,86	111,99
7	30	0,47	61,54	54,25
8	30	2,73	136,98	85,54
9 (C)	30	1,60	220,40	198,10
10 (C)	30	1,60	150,90	198,10
11 (C)	30	1,60	222,30	198,10

Conforme a tabela 27, a análise estatística do coeficiente de regressão permite relatar uma estimativa de efeitos, onde a concentração de palha de cana (Q) foi significativo, pois apresentou *p – valor* (0,0289) menor que 5% ($p < 0,05$).

A Equação 4 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para as respostas da atividade FPase. O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,72. Observa-se pela equação que a atividade FPase foi influenciada positivamente por esta variável, mostrando que a atividade aumenta com o aumento de suas concentrações.

Tabela 27. Coeficiente de regressão para a resposta atividade FPase.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	p - valor	Limite de Coeficiente	
					- 95%	+ 95%
Média	198,100	29,027	6,825	0,0010	123,484	272,715
(1) Temperatura (L)	-32,092	17,802	-1,803	0,1313	-77,853	13,669
Temperatura (Q)	-20,551	21,242	-0,967	0,3778	-75,156	34,054
(2)Palha de cana (L)	11,095	17,802	0,623	0,5604	-34,666	56,856
Palha de cana (Q)	-64,486	21,242	-3,036	0,0289	-119,091	-9,881
1 L x 2 L	8,437	25,138	0,336	0,7508	-56,183	73,057

Equação 4: $Y = 198,1 - 32,1x_1 - 20,5x_1^2 + 11,1x^2 - 64,5x_2^2 + 8,4x_1x_2$

Confirmando a magnitude do Efeito Estimado das respostas anteriores pode-se visualizar o Diagrama de Pareto, na figura 16, onde, apenas a palha de cana (Q) foi estatisticamente significativo para o nível de confiança de 95%. Sendo, portanto o parâmetro que será testado para a validação dos resultados.

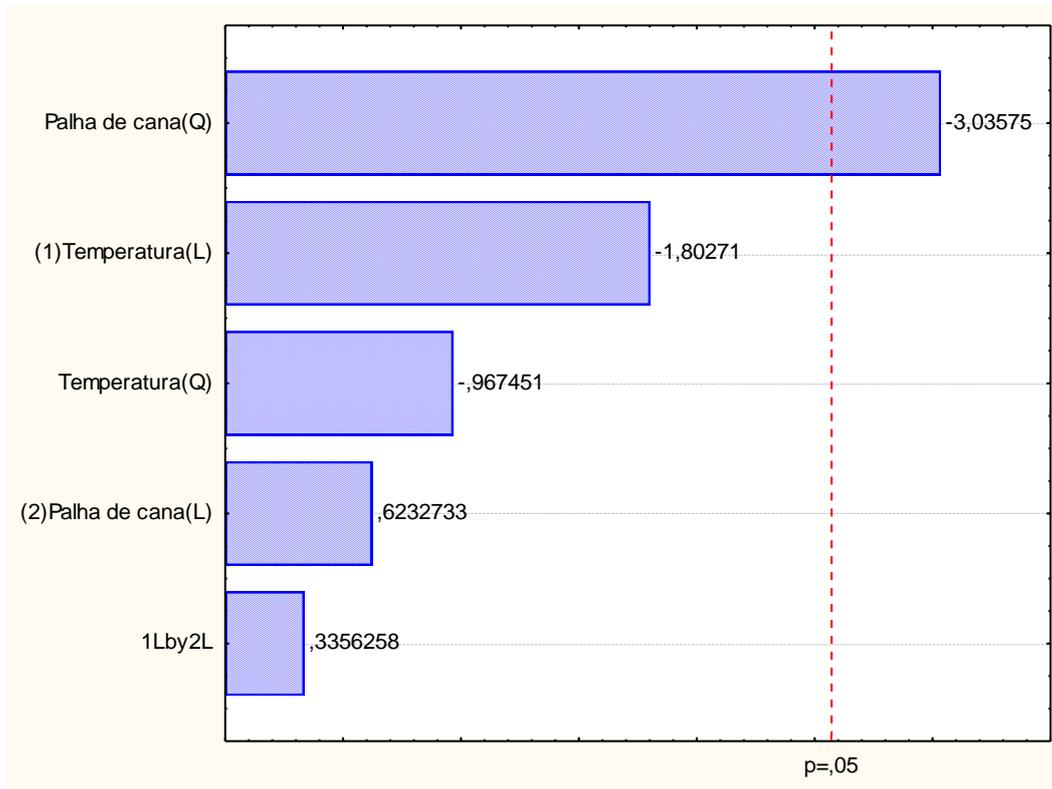


Figura 16. Diagrama de Pareto para atividade FPásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

A figura 17 ilustra os efeitos das variáveis na atividade FPase, por meio da superfície de resposta e da curva de contorno. As curvas de contorno mostram que o máximo de atividade FPásica se encontra na concentração de 1,6% de palha de cana à 30° C.

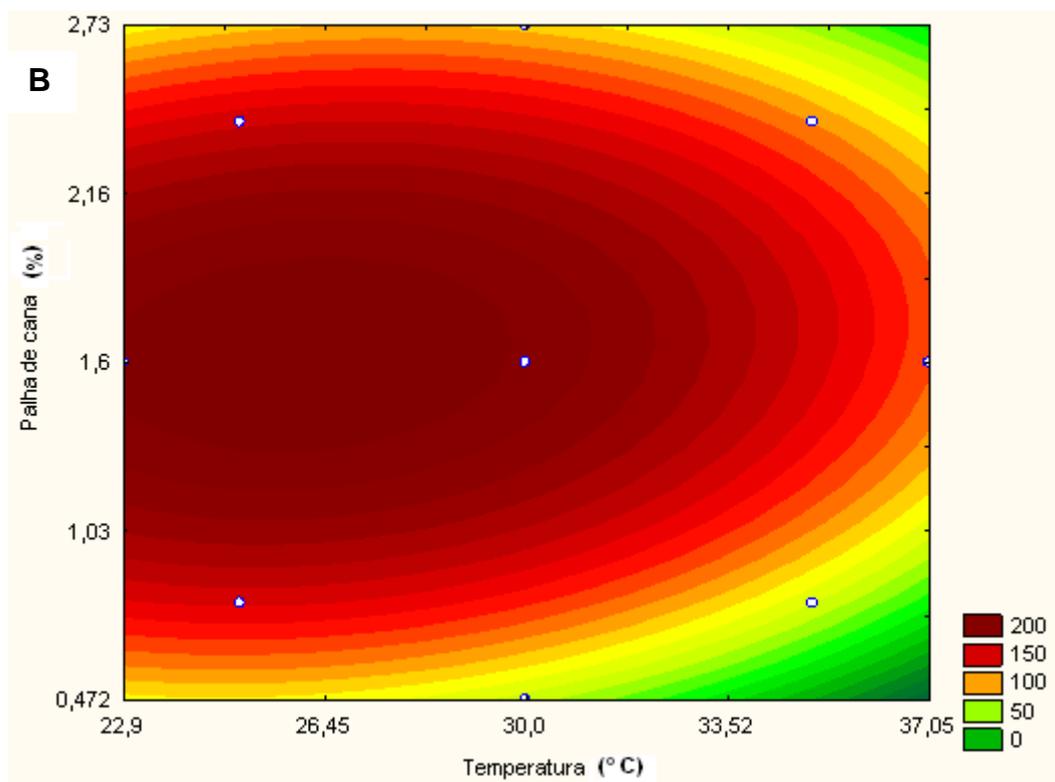
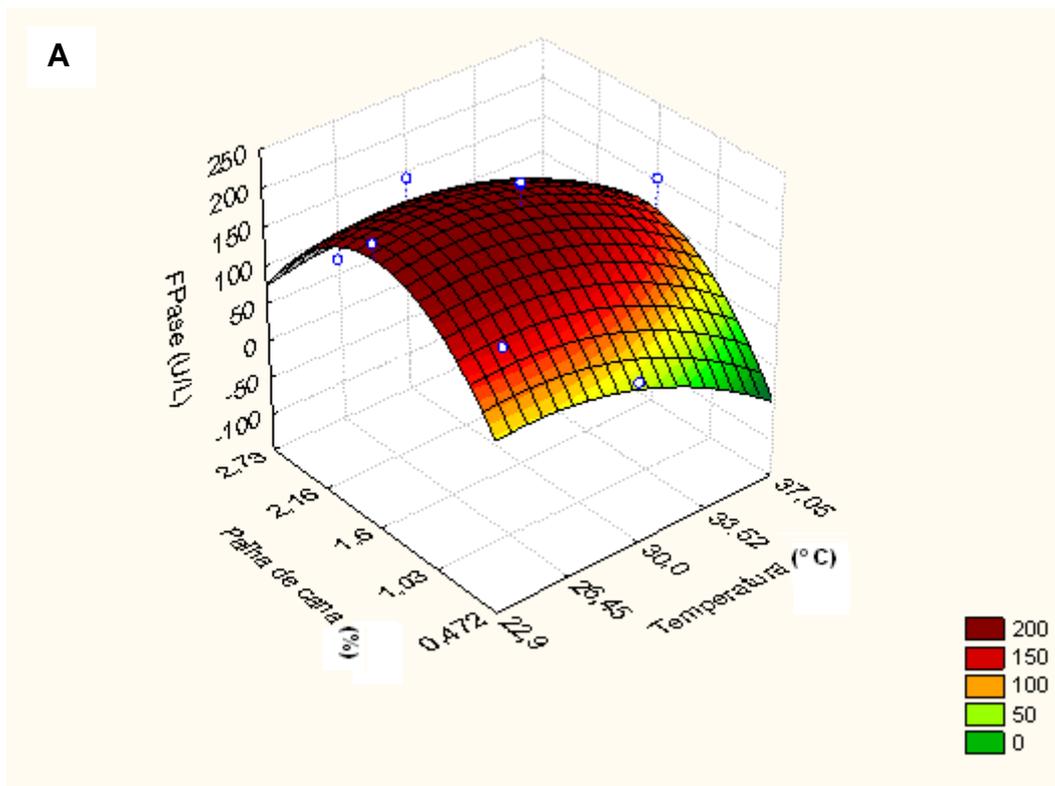


Figura 17. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade FPase do *Trichoderma reesei* RUT-C30 em função da temperatura e palha de cana-de-açúcar.

Para verificar a significância do modelo foi calculada a análise de variância (ANOVA), baseado no teste F. Assim, com um valor $F_{\text{calculado}}$ (1,78) menor que o F_{tabelado} (5,05), constatou-se que o modelo não foi estatisticamente significativo (Tabela 28).

Tabela 28- ANOVA para atividade FPase no quarto dia de fermentação do *Trichoderma reesei* RUT-C30

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fc	Ftab
Regressão	22503,14	5	4500,63	1,78	5,05
Resíduos	12638,48	5	2527,70		
Total	35141,62	10	7028,33		

% variação explicada (R^2) = 0,72; $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Confirmação experimental das condições otimizadas

Com o objetivo de validar a atividade CMCase do *T. reesei*, foram mantidas as condições da otimização, fixando-se a temperatura em 35°C, a concentração de palha de cana em [2,4% (p/v)], milhocina [1,5% (p/v)] e inóculo 75 μL , variando, somente, a agitação em intervalos de 50 rpm, numa escala de 50 à 150 rpm, conforme a tabela 15. De acordo com a tabela 29, obteve-se máxima atividade CMCase (829,8 U.L^{-1}), à uma agitação de 50 rpm. Com base neste resultado, o extrato enzimático do ensaio 1 foi selecionado para fazer a determinação do perfil ótimo de temperatura e pH.

Tabela 29. Validação dos resultados obtidos com a atividade CMCase por *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Ensaio	Agitação (rpm)	Atividade CMCase (U.L^{-1})
1	50	829,8
2	100	353,4
3	150	182,6

Na tabela 30, pode-se observar os resultados validados para a atividade FPase, onde as condições utilizadas no ensaio dois foram favoráveis para obter uma atividade de 230,3 U/L. Foram mantidas a agitação de 100 rpm, temperatura de 30° C e concentração de milhocina [0,9% (p/v)] e 75 μL do inóculo, variando-se a concentração da fonte de carbono conforme exposto na

tabela mencionada. Assim este extrato enzimático foi o selecionado para determinação do perfil ótimo de temperatura e pH.

Tabela 30. Validação dos resultados obtidos com a atividade FPase por *Trichoderma reesei* RUT-C30.

Ensaio	Palha de cana(%)	Atividade FPase (U.L ⁻¹)
1	1,6	81,4
2	1,9	230,3
3	2,1	174,7

Determinação do perfil ótimo de Temperatura

A figura 18, representa graficamente o efeito da temperatura na atividade CMCase do *T. reesei* RUT C30. O ótimo de temperatura ocorreu à 60° C, atingindo atividade máxima de 976,7 U.L⁻¹, semelhantemente ao *Penicillium* IS-7, que apresentou máxima atividade nesta temperatura. Observa-se que à 40° C a atividade representa 85% em relação à máxima e à 50° C a atividade atinge valor superior a 97%. Entre as temperaturas, as de 20 e 90° C foram as menos favoráveis à atividade desta enzima, ocorrendo atividades relativas abaixo de 20% do total.

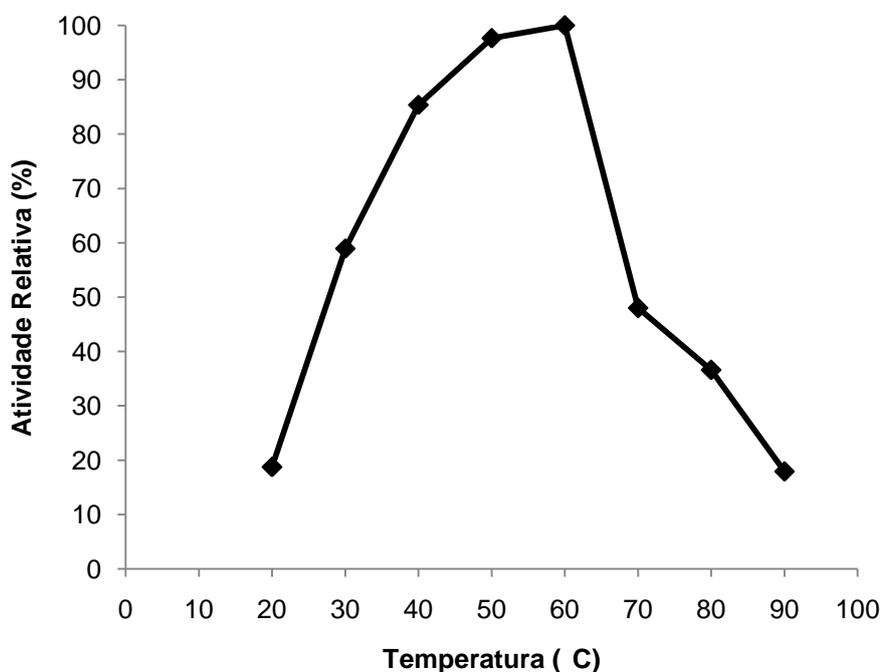


Figura 18. Efeito da temperatura na atividade CMCase produzida por *Trichoderma reesei* RUT-C30. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

Na figura 19 observa-se, esquematicamente, o perfil ótimo de temperatura para a atividade FPase. Nota-se que, entre 40 e 60° C a atividade se mantém acima de 75%, atingindo o valor máximo á 60° C (244,2 U.L⁻¹), em todas as temperaturas estudadas, a atividade manteve-se acima de 20%.

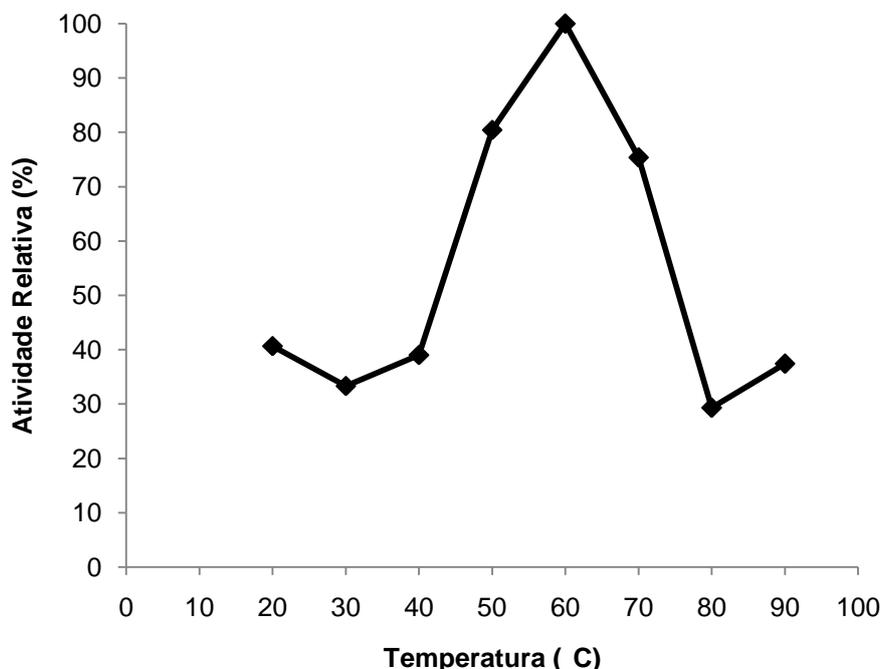


Figura 19. Efeito da temperatura na atividade FPase produzida por *Trichoderma reesei* RUT-C30. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

Determinação do perfil ótimo de pH

Em relação ao perfil ótimo de pH, para a atividade CMCase, foi possível observar, que a atividade manteve-se acima de 70% em tampões que apresentaram pH 4,0, 6,0 e 7,0, sendo a maior atividade apresentada com o tampão fosfato pH 7,0 (1083,90 U.L⁻¹) (Figura 20). Atividades inferiores a 20% em relação a máxima foram detectadas em pH 2,0 e 3,0.

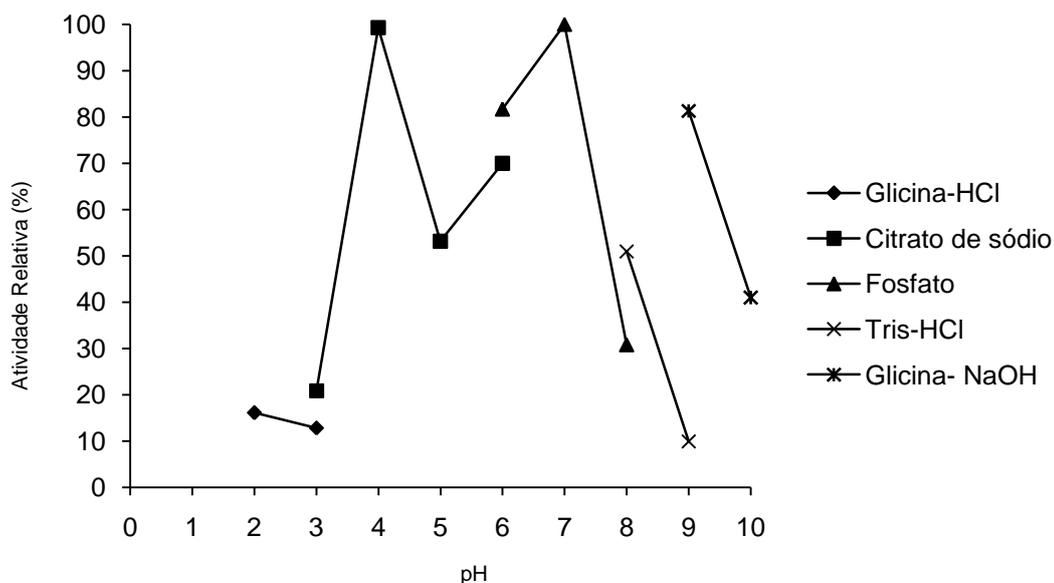


Figura 20. Efeito do pH na atividade CMCase produzida por *Trichoderma reesei* RUT-C30. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

O perfil ótimo da atividade FPase foi alcançado em pH 6,0 (tampão Fosfato). Valores acima de 80% em relação à atividade máxima foi observado em pH 5,0 (tampão citrato de sódio). Nota-se que em pH 3,0 (tampão Glicina) a atividade apresenta-se inferior a 3% (Figura 21).

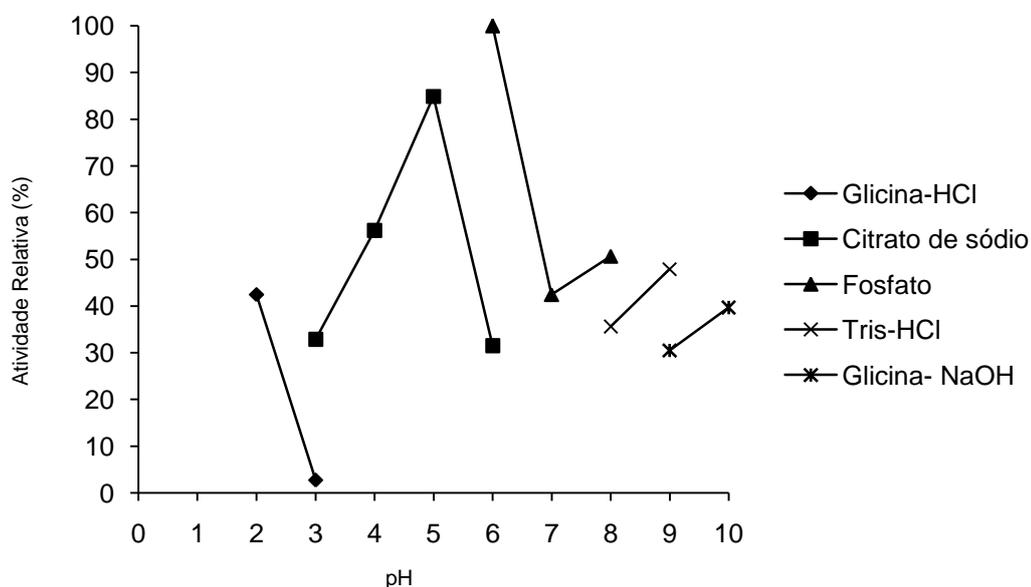


Figura 21. Efeito do pH na atividade FPase produzida por *Trichoderma reesei* RUT-C30. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

O gráfico comparativo entre os valores máximos de atividades das enzimas CMCase e FPase produzidas por *Penicillium* sp. IS-7 e *T. reesei* RUT-C30 em meio de saís acrescidos de palha de cana-de açúcar e milhocina, aos quatro dias de fermentação pode ser observado na Figura 22. Os resultados demonstraram a potencialidade dos resíduos agro-industriais, nas condições referidas neste estudo, como substratos de baixo custo para a produção de celulases pela estirpe *Penicillium* sp. IS-07, pois produziu tanto CMC quanto FPase em maiores quantidades do que *T. reesei* RUT-C30.

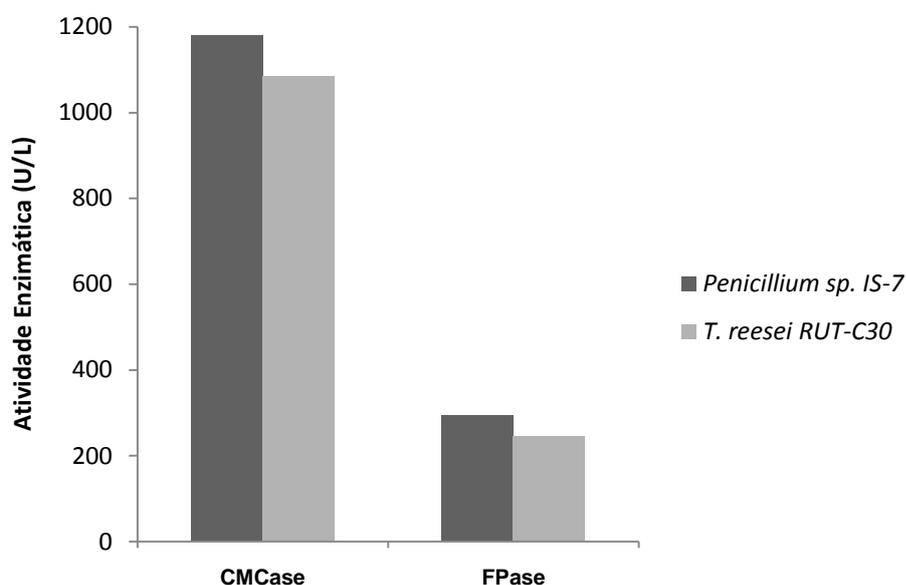


Figura 22. Valores máximos de atividade CMCase e FPase obtido aos quatro dias de fermentação submersa para a estirpe fúngica *Penicillium* sp. IS-7 em comparação ao *Trichoderma reesei* RUT-C30.

DISCUSSÃO

A estirpe *Penicillium* sp. IS-07 testado no presente trabalho foi previamente selecionado de sedimentos de restinga na APA (Área de Proteção Ambiental) de Guaibim, Bahia. Com uma área estimada de 2.000 ha, tornou-se APA, por apresentar remanescentes de Mata Atlântica em contato direto com praias ainda não exploradas por ação antropogênica. A grande diversidade vegetal, o solo e o clima da região sugerem a existência de microorganismos promissores para aplicações biotecnológicas (ANDRADE, 2010).

O fungo *Trichoderma reesei*, por apresentar dados comprobatórios de sua produção enzimática foi testado nas mesmas condições experimentais do *Penicillium* sp. IS-07, para efeito de comparação. As pesquisas apontam esta espécie como produtora de celulases largamente utilizadas para a produção de etanol. Isso porque o mutante RUT C30 não tem a produção de celulases reprimida na presença de glicose, ao contrario do que acontece normalmente com outros microorganismos (Grigorevski de Lima *et al.*, 2009).

As fermentações submersas (FS) incluem uma grande variedade de processos microbianos na qual a biomassa é completamente rodeada pelo meio líquido. Murthy e colaboradores (1993) descreveram que a diferença entre os dois processos refere-se à utilização, na FS, de substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Gervais e Molin (2003) relataram que a principal diferença entre FES e FS está na capacidade de mistura dos sistemas. As FS são reações de mistura perfeita nas quais, em teoria, cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de microorganismos, nutrientes e metabólitos. Em FS, a aeração pode ser facilmente contornada com uso da agitação (HOLKER e LENZ, 2005).

Atualmente os esforços concentram-se no emprego de subprodutos agro-industriais, por serem baratos e abundantes, buscando obter produtos de alto valor comercial. Além disso, têm estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Entre os resíduos mais utilizados encontram-se bagaços de laranja, de cana ou de abacaxi; farelos de soja, de café, de arroz ou de trigo; palhas de cana ou de milho etc. Cada grupo de pesquisa busca o substrato mais abundante em sua região (ROCHA, 2010).

Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúvel em água, são fontes de carbono e nitrogênio que atuam como suporte para o crescimento de microorganismos. Normalmente são materiais em partículas, e a água presente no meio encontra-se complexada na matriz sólida, a qual pode ser aproveitada pela cultura microbiana. Bactérias e leveduras crescem na superfície, enquanto que a estrutura micelar dos fungos filamentosos penetra nas partículas do substrato (CORREIA, 2004).

Em muitos estudos, substratos modelo são utilizados para facilitar a diferenciação entre atividades enzimáticas, como endo- ou exoglucanásicas e celobiásicas ou β -glucosidásica. Ao substituir a celulose com suficiente quantidade de grupos carboximetílicos ou hidroxietílicos é possível torná-la solúvel em água. Esses substratos são produzidos comercialmente com diferentes GP e GS (grau de substituição), e são amplamente usados como substratos-modelo para ensaios de atividade endoglucanásica. Tal atividade pode ser medida tanto pelo aumento da concentração de açúcares redutores no meio quanto através da redução da viscosidade da solução. Esses tipos de celulose modificada são bons substratos para endoglucanases porque apresentam grande solubilidade em água e não podem ser hidrolisados extensivamente por celobiohidrolases, devido a sua baixa organização estrutural e/ou caráter amorfo pronunciado, além do impedimento estérico causado pelos grupos substituintes (carboximetil ou hidroximetil), que impedem que a cadeia da celulose penetre no sítio ativo das celobiohidrolases. A carboximetilcelulose de viscosidade média (CMC) foi escolhida pela Comissão de Biotecnologia da IUPAC (GHOSE, 1987) como substrato recomendado para medir a atividade endoglucanásica e a hidroxietilcelulose é utilizada como substrato alternativo para este mesmo fim (MEDVE, 1997).

Também recomendado pela IUPAC para se avaliar a atividade celulásica total de um sistema celulásico, o papel de filtro é um substrato tradicionalmente utilizado em pesquisas de celulasas. As fibras de celulose que constituem o papel têm uma estrutura complexa e, para a sua hidrólise substancial, é necessário um sistema celulásico completo, composto por celobiohidrolases e endoglucanases (GHOSE, 1987; MEDVE, 1997).

Um desenho experimental inclui três etapas fundamentais: fazer experimentos estatisticamente desenhados, estimar os coeficientes em modelos matemáticos predizendo resposta e checar a aplicabilidade do modelo (TECHAPUN et al., 2002). A análise de variância (ANOVA) mostra importantes dados do experimento como os valores de Probabilidade de *Fisher*, cujo valor indica a significância dos fatores avaliados, suas interações, erros e a falta de ajuste do experimento. A soma dos quadrados dos fatores, interações e resíduos (*lack of fit* somado ao erro puro) são outros importantes indicadores na avaliação do experimento e escolha do modelo. Quanto maior o valor da soma dos quadrados maior é o efeito dos fatores avaliados. (MAEDA, 2010)

Os resultados dos experimentos mostraram-se satisfatórios para a atividade celulásica. A estirpe testada *Penicillium* sp. IS-7 com um aumento de 340% em relação à atividade CMC_{case} obtida no planejamento fatorial, produziu 1.179,19 U.L⁻¹ no quarto dia de fermentação, valor superior ao do fungo *Trichoderma reesei* RUT-C30 (1.083,90 U.L⁻¹). A realização dos experimentos com os dois sistemas celulásicos permitiu assegurar bons critérios de validação para os procedimentos utilizados neste trabalho, além disso os resultados foram comparados com dados já reportados em literatura.

Sukumaram et al. (2009) avaliaram a produção de celulase com *Aspergillus niger* utilizando farelo de trigo em 72 horas de processo e com adição de nutrientes (peptona, extrato de levedura, uréia, sais de fósforo e de magnésio e oligoelementos) obtiveram atividade de 4,55 U/g. Rocha (2010), utilizando casca de maracujá, encontrou atividade 5,98 U/g para produção de celulase por *Aspergillus niger*.

Martins (2005), avaliando a produção de celulase com *Penicillium echinulatum*, utilizando carboximetilcelulose como substrato demonstrou resultados cinco vezes menor que o encontrado, no mesmo experimento com o *T. reesei* RUT C30, como controle. Estes resultados demonstram que a estirpe *Penicillium* IS-7 constitui-se como bom produtor de celulase, uma vez que sua atividade foi superior à do micro-organismo controle.

Ao trabalhar com *Trichoderma* sp., Khan et al. (2007) obtiveram atividade de endoglucanase de 0,7 UI.mL⁻¹ de extrato enzimático, com o uso

de palha de arroz como substrato com 8 dias de cultivo. Singhanian et al. (2007) ao utilizar *T. reesei* RUT-C30 em farelo de trigo, obtiveram atividade de celulase total de 0,17 U.I g⁻¹ de substrato com 5 dias de cultivo. Basso, 2010, observou-se atividade de 2,3 UI g⁻¹ no 15º dia, para o *T. reesei* QM9414 com bagaço de cana-de-açúcar como substrato. É interessante para os processos biotecnológicos a redução do tempo para produção de enzimas.

Maeda (2010), avaliando a produção de celulase por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa utilizando bagaço de cana pré-tratado, uréia e extrato de levedura como substrato, encontrou atividade enzimática CMC_{Case} de 7100 UI/L. Carvalho (2007), encontrou valores superiores aos relatados neste estudo para a atividade endoglucanase (3171,5 UI.L⁻¹) por *P. funiculosum*, utilizando uréia, extrato de levedura, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O e a celulose microcristalina como substrato. Contudo o uso de substratos de baixo custo é indispensável para a indústria obter máximo rendimento. Camassola e Dillon (2007) obtiveram atividade de endoglucanase de 20 UI. g⁻¹, em bagaço de cana-de-açúcar tratado com NaOH, com o uso de *Penicillium echinulatum* e cinco dias de cultivo. Os resultados demonstram a influência da utilização das diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como o comportamento dos micro-organismos frente às diferentes condições oferecidas.

Martins et al. (2008) avaliaram a produção de celulasas por *Penicillium echinulatum* em diversos substratos e obtiveram valores de atividade CMC_{Case} de 1.530 UI/L e FP_{Case} de 270 UI/L ao final de 192 h de fermentação.

Para a atividade FP_{Case} encontramos atividade máxima para *Penicillium* sp. IS-7 de 293,8 U.L⁻¹, superior a máxima produzida pelo *T. reesei* RUT-C30 (244,2 U.L⁻¹). Jorgensen e Olsson (2006), encontraram 360 UI.L⁻¹, após seis dias, quando avaliaram a produção FP_{Case} por *Penicillium brasilianum*. Latifian et al. (2007) obtiveram atividade FPase de 1 UI. g⁻¹ em farelo de arroz, ao utilizar *T. reesei* QM 9414, enquanto, Basso, 2010, utilizando bagaço de cana-de-açúcar, encontrou para a mesma espécie uma atividade quatro vezes superior. Kang et al. empregando palha de arroz e nutrientes (milhocina, extrato de levedura e sai de cobre, cobalto e fósforo) com

A. niger para a produção de FPase, após quatro dias de fermentação obtiveram 19 U/g. Maeda, 2010, relata atividade FPásica, de 250,0 U.L⁻¹, utilizando uréia e extrato de levedura por *Penicillium funiculosum*. Andrade, (2011), apresentou atividades FPase 447,0 e 465.1U.L⁻¹, utilizando farelo de trigo e peptona para o *Trichoderma* sp. IS-05. Valores superiores aos obtidos neste trabalho. Diferenças de substrato dificultam comparações entre os resultados encontrados.

Neste trabalho, a CMC do *Penicillium* IS-7, apresentou atividade máxima à 60° C, a mesma encontrada para o *T. reesei* RUT C30. Vários trabalhos relatam que a faixa ótima de atuação para produção de CMCCase é entre 50 e 70° C (GRIGOREVSKI-LIMA, 2009; NAIKA et al., 2007; KAUR et al., 2007).

A enzima FPase também apresentou perfil ótimo de temperatura à 60° C para o *T. reesei* RUT-C30, diferente do *Penicillium* sp. IS-7 (80° C). Não foram encontrados trabalhos que citam perfil de temperatura semelhante para FPase. Grigorevski-Lima (2009), relata uma faixa entre 30 e 60° C, sendo a mais comum 50° C.

Com relação ao ótimo de pH, neste trabalho a CMCCase avaliada apresentou atividade máxima em pH 5,0 para *Penicillium* sp. IS-7 e pH 7,0 para o *T. reesei* RUT-C30, ambos em pH ácido. Grigorevski-Lima (2009), apresentou faixa ótima de atividade entre pH 3,0 e 5,0, sendo a máxima atividade constatada em pH 4,0. Estes resultados são compatíveis com os encontrados na literatura para as CMCases (GASHE,1992).

O perfil ótimo de pH para a atividade FPase foi em pH 6,0 para *T. reesei* RUT-C30 e pH 9,0 para o *Penicillium* sp. IS-7. Gashe, 1992, encontrou atividade máxima em pH 5,5 para o *Trichoderma* sp.. Grigorevski-Lima (2009), apresenta faixa ótima de atividade para FPase entre pH 4,0 e 6,0, sendo o pH 5,0 o que apresentou a atividade máxima. Para a atividade FPase do *Penicillium* sp. IS-7, ocorreu atividade em torno de 90% em pH 3,0, o que sugere a atuação de mais de uma enzima, devendo ser realizado estudos mais aprofundados ea realização de um zimograma.

Capítulo 2

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE AMILASE POR
STREPTOMYCES SP. IGAR-01 UTILIZANDO ÁGUA DE
MANIPUEIRA.**

RESUMO

FERREIRA, M. A. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE AMILASE POR *STREPTOMYCES SP.* IGAR-01 UTILIZANDO ÁGUA DE MANIPUEIRA.

A utilização da água de manipueira como substrato indutor para a produção de amilase além de reduzir seu impacto ambiental, constitui-se como importante fonte de carbono na produção enzimática, por apresentar elevada taxa de amido. Várias espécies de actinobactérias têm sido descritas como produtoras de enzimas de interesse comercial. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de amilases pela estirpe *Streptomyces sp.* IGAR-01 em água de manipueira como substrato indutor em diferentes concentrações e caracterizar quanto ao perfil de temperatura e pH, através da fermentação submersa, seguindo um planejamento experimental com o auxílio do software STATSOFT 7.0[®]. Conforme os resultados observados a atividade máxima da amilase ocorreu no extrato enzimático formado por 3,0% de água de manipueira; 1,0% de extrato de levedura e 55 µL da concentração de inóculo em agitação de 150 rpm à 28° C, após a caracterização deste extrato obteve-se atividade máxima de 2.456,17 U.L⁻¹ em temperatura de 60° C e pH 6,0. A máxima atividade de amilase obtida utilizando 3,0% (p/v) de água de manipueira indica a potencialidade do uso deste resíduo como substrato indutor. Porém, novos estudos deverão ser conduzidos para analisar melhores respostas em outros sistemas de cultivo.

Palavras-chave: *Streptomyces sp.*, amido, fermentação submersa, mandioca

ABSTRACT

Ferreira, M. A. PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF AMYLASE BY *STREPTOMYCES* SP. IGAR-01 USING MANIPUEIRA WATER.

The use of manipueira water as inductor substrate for the production of amylase and reduce their environmental impact, constitutes an important source of carbon in enzyme production, due to its high rate of starch. Several species of actinobacteria have been described as producing enzymes of commercial interest. Therefore, this study aimed to evaluate the production of amylase by strain *Streptomyces* sp. IGAR-01 in manipueira water as inductor substrate in different concentrations and analyzed for pH and temperature profile through the submerged fermentation, following an experimental design with STATSOFT 7.0 ® software. As the results showed the maximal activity of amylase enzyme in the extract was composed of 3.0% water manipueira, 1.0% yeast extract and 55 µL of the inoculum concentration in agitation of 150 rpm at 28° C after the characterization of this extract was obtained maximum activity of 2456.17 UL⁻¹ at a temperature of 60° C and pH 6.0. The maximum amylase activity obtained using 3.0% (w / v) manipueira water indicates the potential of using this residue as inductor substrate. However, new studies should be conducted to analyze best responses in other cropping systems.

Keywords: *Streptomyces* sp., Starch, submerged fermentation, cassava

INTRODUÇÃO

Actinobactérias são bactérias Gram positivas que apresentam um DNA rico em guanina e citosina (G+C 72%, no gênero *Streptomyces*) possuindo a capacidade de formar filamentos em algum estágio de seu desenvolvimento (VOBIS, 1997). Eles têm sido descritos como principais produtores de antibióticos no solo, e também como um dos principais grupos microbianos produtores de enzimas de interesse comercial (GOODFELLOW e CROSS, 1984). A heterogeneidade bioquímica das actinobactérias, sua diversidade ecológica e sua capacidade para produção de metabolitos secundários os fazem um bom alvo para a produção de enzimas, desempenhando novas atividades e/ou especificidades. Estudos recentes vêm apontando as actinobactérias como fontes emergentes promissoras de uma ampla faixa de importantes enzimas de interesse industrial e ambiental, como aquelas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos (NASCIMENTO et al, 2009).

As amilases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula de amido. As amilases têm ganhado um papel importante na conversão do amido em álcool utilizando-se, simultaneamente, a sacarificação e a fermentação (GUPTA et al., 2003, KANDRA et al., 2003, PEIXOTO et al., 2003). A aplicação das amilases na produção de etanol tem solucionado, em parte, os problemas que alguns países apresentam em função da escassez de reservas de combustível. O amido presente no meio fermentativo é convertido, através da ação conjunta das amilases, em glicose que posteriormente é convertida por fermentação em etanol (GUPTA et al., 2003).

A mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) é considerada uma importante fonte alimentar calórica em países tropicais da Ásia, África e América Latina (PANDEY et al., 2000). Historicamente, o Brasil é um dos maiores produtores de mandioca do mundo (THEORODO e MARINGONI, 2002, MELO et al., 2006). O processamento da mandioca para produção de farinha ou fécula gera grande quantidade de casca, água residual ou manipueira e farelo ou massa (THEORODO e MARINGONI, 2002). A manipueira é um resíduo líquido resultante do processamento da mandioca para a fabricação de farinha e fécula, os quais podem atingir vazões da ordem de 500 litros de água residual

por tonelada de raiz processada, representando cerca de 60% do peso da matéria processada (FIORETTO, 2001). A composição química da manipueira depende das condições de clima e do solo, sendo que uma tonelada de raízes de mandioca pode conter em média 600 litros de água (60% de umidade) nas suas células. Durante os processos de fabricação de farinha, 20 a 30% dessa água é eliminada, tendo um aspecto leitoso e se não houver a decantação ou uso de tecidos na prensa, podem conter de 5% a 7% de fécula, proteínas, glicose, restos de células, ácido cianídrico, substâncias orgânicas e nutrientes minerais essenciais (FIORETTO, 2001).

Resíduos aquosos de mandioca apresentam quantidades elevadas de amido, podendo ser uma fonte potencial para o bioetanol produção (LACERDA et al., 2008). A manipueira apresenta atributos favoráveis, do ponto de vista do uso agrícola como fonte de nutrientes às plantas, bem como aplicação em processos tecnológicos, como produção de ácido cítrico (LEONEL e CEREDA, 1995, MELO et al., 2006). A preocupação com os impactos ambientais cresce à medida que os resíduos agroindustriais são utilizados em diferentes processos ambientais e tecnológicos. Uma crescente necessidade de preparações enzimáticas, a partir de substratos indutores alternativos, vem estimulando a busca no universo microbiano. Atualmente, as enzimas são comumente utilizadas em muitas aplicações industriais, e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas está crescendo rapidamente. Diante deste panorama, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de amilases pela estirpe *Streptomyces sp.* IGAR-01, previamente selecionada em estudos anteriores, utilizando água de manipueira e extrato de levedura, em diferentes concentrações. A utilização da água de manipueira como substrato se deve a possibilidade de sua utilização como substrato indutor para a produção de amilase, reduzindo seu impacto ambiental, agregando valor a este resíduo. Em um amplo contexto, as amilases têm sido aplicadas em diversas áreas, reforçando a importância dos estudos aplicados à tecnologia enzimática desta enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção da estirpe de actinobactéria.

A estirpe promissora de *Streptomyces* sp. IGAR-01 (previamente selecionadas), foi mantida na forma de suspensão de esporos em glicerol 30%, a temperatura de -18°C no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (HOPWOOD et al., 1995). A suspensão foi padronizada obtendo-se concentração de $6,83 \times 10^8$ UFC/mL.

Produção de amilases utilizando resíduo agro-industrial.

A estirpe foi cultivada em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio de sais minerais (pH 6,9), descrito por GRIGOREVSKI-LIMA et al. (2009) modificado, suplementado com água de manipueira como fonte de carbono indutora e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, em diferentes concentrações, de acordo com a matriz do planejamento fatorial fracionado com 5 variáveis (Tabelas 31 e 32). Os frascos foram incubados durante seis dias. Os sobrenadantes brutos, obtidos através da centrifugação a 3000 rpm/15 min, foram filtrados e congelados (-20° C) para análises posteriores

Tabela 31 - Valores utilizados para composição da matriz do delineamento fatorial fracionado

Nível	-1	0	+1
Agitação (rpm)	100	150	200
Temperatura (° C)	25	28	31
% Água de Manipueira	1,0	2,0	3,0
% Ext. de Levedura	0,2	0,6	1,0
Inóculo (µL)	25	50	75

Tabela 32 – Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} para produção de lignocelulases (RODRIGUES e IEMMA, 2009)

Ensaio	Agitação	Temperatura	Água de Maipueira	Extrato de Levedura	Inoculo
1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0

Ensaio Analítico

Medida dos Açúcares Redutores

A Atividade de amilase foi determinada através da medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação do extrato enzimático com solução de amido (1% p/v) em pH 6,9, a 55° C / 10 minutos (NOVOZYME, 2005).

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 micromol de substrato por minuto ou como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 micromol de açúcar redutor por minuto, sob as condições descritas acima.

A medida dos açúcares redutores foi feita através dos métodos de DNS (MILLER, 1959) e para a confecção das curvas padrões, foi utilizada soluções

de glicose 0,01M. Os resultados foram apresentados em U.L⁻¹ onde cada unidade (U) corresponde a quantidade de micromoles de açúcares redutores liberados por minuto.

Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A otimização das condições de produção de amilase foi realizada por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), ou seja, um planejamento 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, como mostra a tabela 33 (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Como fontes de carbono, foi utilizada água de manipueira suplementada com extrato de levedura. O sistema foi conduzido em frascos de Erlenmeyers (250 mL), por fermentação submersa, e a melhor combinação entre as fontes de cada experimento, bem como, o dia em que apresentou maior atividade enzimática, foram analisados, afim de definir faixas mais adequadas para cada resposta. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software STATSOFT 7.0[®].

Tabela 33 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (valores codificados) para determinação da atividade enzimática (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

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

Determinação do perfil ótimo de temperatura

O estudo foi realizado sob as mesmas condições descritas no item anterior. As temperaturas de incubação variaram de 10 em 10 graus num intervalo de 20 a 90 °C. A mistura reacional foi incubada em banho-maria a pH 4,8, nas respectivas temperaturas (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005), após o tempo de reação, a atividade foi interrompida em banho de gelo. A dosagem dos açúcares redutores produzidos após a atividade enzimática foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959).

Determinação do perfil ótimo de pH

Para o estudo do efeito do pH, a atividade 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 50 mM (pH 2,0 e 3,0), Citrato de sódio 50 mM (pH 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0), Fosfato 50 mM (pH 6,0; 7,0 e 8,0), Tris-HCl 50 mM (pH 8,0 e 9,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0).

Os tampões foram preparados de acordo com os procedimentos descritos por COLOWICK e KAPLAN (1995). A mistura reacional foi incubada em banho-maria, nos respectivos pH e após o tempo de reação 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

Neste capítulo foi avaliada a produção de amilase pela estirpe *Streptomyces* sp. IGAR-01, em fermentação submersa, utilizando diferentes concentrações de água de manipueira, extrato de levedura e inóculo, bem como, diferentes variações para agitação e temperatura, de acordo com um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Com base na tabela 34, podem-se analisar os valores obtidos para a atividade enzimática de acordo com o delineamento 2^{5-1} . Esta tabela mostra que a maior atividade da amilase (845,08 U.L⁻¹) foi obtida quando foi utilizada uma agitação de 200 rpm à 25°C em 3,0 % água de manipueira, 1,0 % de extrato de levedura inoculando-se 25 µL da suspensão de esporos. Pode-se visualizar também os valores preditos pelo programa durante a análise estatística.

Tabela 34. Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} (valores reais), com resultados obtidos e preditos para a estirpe *Streptomyces* sp. IGAR-01

Ensaio	Valores Reais					Atividade Amilase	
	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Água de Manipueira (%)	Extrato de Levedura (%)	Inóculo (µL)	Observado (U.L ⁻¹)	Predito
1	100	25	1,0	0,2	75	150,82	115,58
2	200	25	1,0	0,2	25	299,25	264,01
3	100	31	1,0	0,2	25	213,07	177,83
4	200	31	1,0	0,2	75	177,16	141,92
5	100	25	3,0	0,2	25	275,31	240,07
6	200	25	3,0	0,2	75	296,86	261,62
7	100	31	3,0	0,2	75	191,52	156,28
8	200	31	3,0	0,2	25	739,75	704,51
9	100	25	1,0	1,0	25	215,46	180,22
10	200	25	1,0	1,0	75	464,44	429,20
11	100	31	1,0	1,0	75	136,46	101,22
12	200	31	1,0	1,0	25	380,65	345,41
13	100	25	3,0	1,0	75	150,82	115,58
14	200	25	3,0	1,0	25	845,08	809,84
15	100	31	3,0	1,0	25	229,82	194,58
16	200	31	3,0	1,0	75	119,70	84,46
17 (C)	150	28	2,0	0,6	50	86,18	270,14
18 (C)	150	28	2,0	0,6	50	76,61	270,14
19 (C)	150	28	2,0	0,6	50	83,79	270,14

De acordo com os resultados obtidos na estimativa dos efeitos selecionou-se, com níveis de significância (p - valor) inferiores a 5%, as variáveis agitação e concentração de inóculo para realização do estudo DCCR para a atividade (Tabela 35). Estes resultados podem ser comprovados com melhor exatidão na figura 22, diagrama de Pareto, gerado com base nos resultados anteriores.

Tabela 35 - Estimativa dos efeitos para a Atividade Amilase para a estirpe *Streptomyces sp.* IGAR-01.

Fatores	Efeito (U/L)	Erro Padrão	t(12)	p - valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	305,385	38,084	8,019	0,0000	222,407	388,362
Curvatura	-446,381	191,685	-2,329	0,0382	-864,027	-28,736
Agitação (rpm)	219,949	76,168	2,888	0,0136	53,993	385,904
Temperatura (°C)	-63,740	76,168	-0,837	0,4190	-229,696	102,215
Palha de cana (g/L)	101,446	76,168	1,332	0,2076	-64,510	267,401
Milhocina (g/L)	24,838	76,168	0,326	0,7500	-141,118	190,793
Inóculo (µL)	-188,827	76,168	-2,479	0,0290	-354,782	-22,871

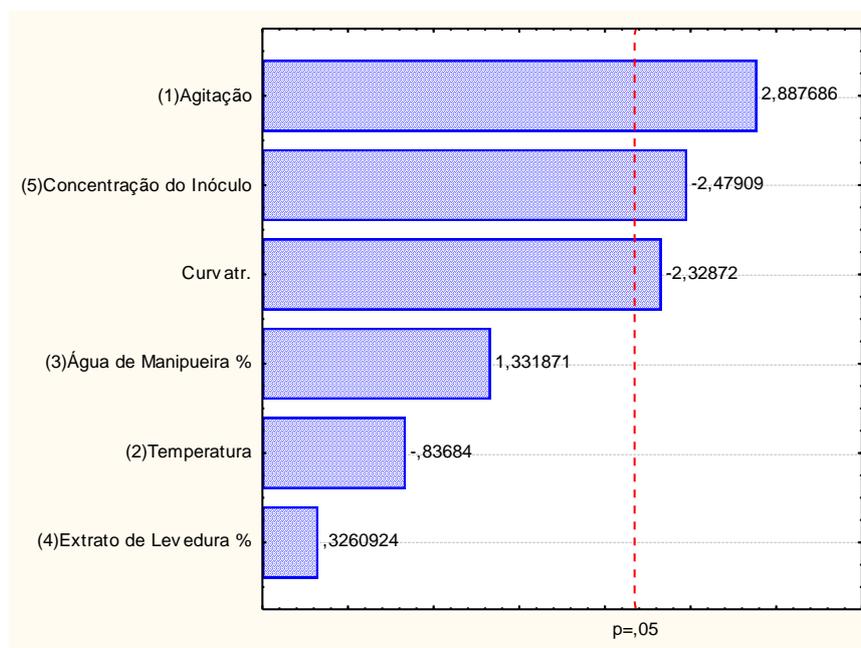


Figura 22. Diagrama de Pareto para atividade da amilase para a estirpe *Streptomyces sp.* IGAR-01. Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Otimização da produção de amilase por *Streptomyces sp.* IGAR-01

Para o estudo de otimização da amilase realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para cada resposta obtida, a fim de analisar os principais efeitos das variáveis.

A tabela 36 apresenta a matriz do DCCR com os valores reais e as respostas para a atividade observada e predita pelo modelo estatístico para a atividade da amilase. A água de manipueira (3,0%) e a concentração do extrato de levedura (1,0 %), foram fixadas no ponto máximo e a temperatura de 28° C . Nota-se que os resultados para atividade da amilase variaram entre 69,38 e 1475,63 U.L⁻¹, sendo que o maior valor obtido ocorreu com a agitação de 200 rpm e acréscimo de 55 µL de inoculo . Analisando os resultados pode-se perceber que em diferentes agitações nos ensaios 4, 5 e 6 obteve-se bons valores para a atividade de amilase à concentrações próximas de inoculo (40 e 55 µL), mostrando que a agitação exerceu maior influência nos resultados obtidos.

Tabela 36. Matriz do DCCR (valores reais), com resultados obtidos e preditos na atividade CMCase para o fungo *Streptomyces sp.* IGAR-01.

Ensaio	Valores Reais		Atividade Amilase (U.L ⁻¹)	
	Agitação (rpm)	Inoculo (µL)	Observado	Predito
1	100	25	69,38	371,08
2	200	25	1344,38	1000,34
3	100	55	140,63	423,18
4	200	55	1475,63	1052,44
5	79,05	40	1179,38	746,14
6	220,50	40	1108,13	1633,39
7	150	18,85	180,00	191,16
8	150	61,15	183,75	264,62
9 (C)	150	40	195,00	218,38
10 (C)	150	40	193,13	218,38
11 (C)	150	40	268,13	218,38

Para os resultados experimentais da atividade enzimática em função da relação entre agitação e inoculo analisou-se através do coeficiente de regressão os valores de p . Estão representados na tabela 37 os parâmetros lineares (L), a interação e o termo quadrático (Q) das duas variáveis estudadas com um coeficiente de correlação de (R^2) de 0,70 e nível de significância (p)

inferiores a 5% para a atividade da amilase. Com um *p*-valor de 0,0446, a agitação em termo quadrático forneceu subsidio para proceder com a validação deste resultado.

A equação 5 apresenta os parâmetros significativos e não significativos para as respostas da atividade enzimática. O valor de R² indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 70% da variabilidade dos dados.

Tabela 37. Coeficiente de regressão para a resposta atividade Amilase.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor	Limite de Coeficiente	
					- 95%	+ 95%
Média	218,385	250,508	0,872	0,4232	-425,565	862,335
(1) Agitação (L)	314,628	153,634	2,048	0,0959	-80,302	709,558
Agitação (Q)	488,596	183,326	2,665	0,0446	17,342	959,850
(2) Inoculo (L)	26,051	153,634	0,170	0,8720	-368,879	420,981
Inoculo (Q)	4,780	183,326	0,026	0,9802	-466,474	476,034
1 (L) X 2 (L)	15,000	216,949	0,069	0,9476	-542,684	572,684

Equação 5: $Y = 218,4 + 314,6x_1 + 488,6x_1^2 + 26,05x_2^2 + 4,8x_2^2 + 15,0x_1x_2$

De acordo com o Diagrama de Pareto apresentado na figura 23, para a atividade da amilase, somente a agitação (Q) apresentou efeito significativo (*p* = 0,0446) para o nível de confiança de 95%.

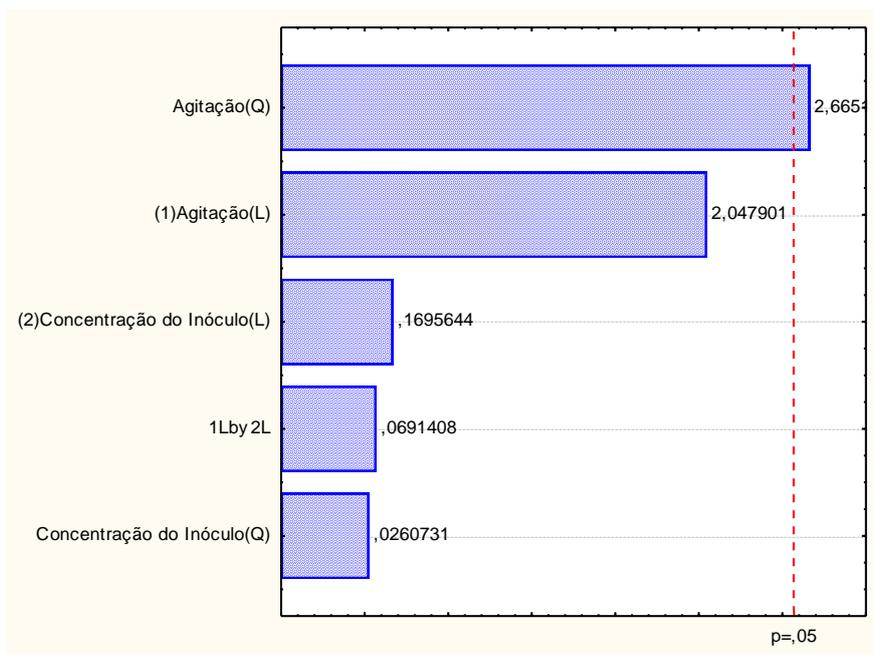
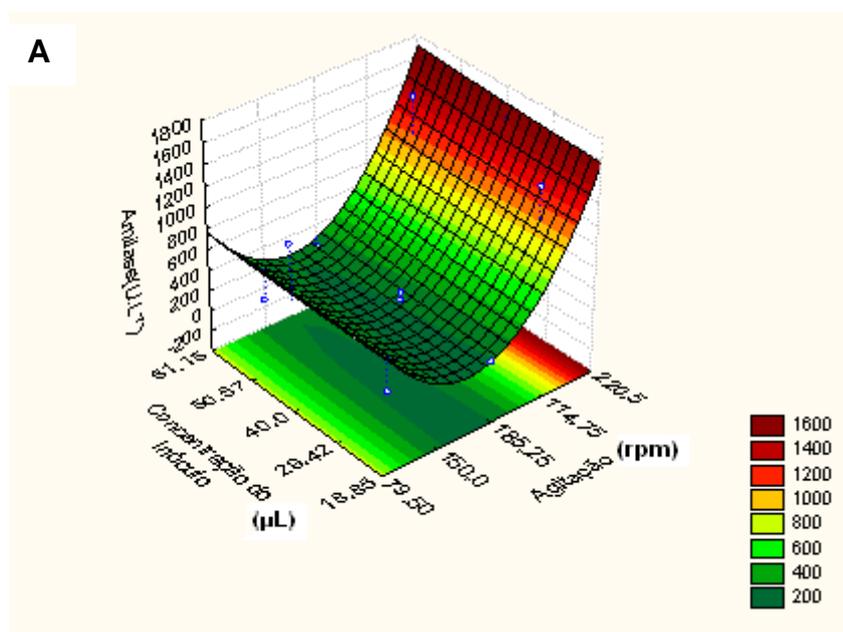


Figura 23. Diagrama de Pareto para atividade Amilásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade da amilase, são apresentadas as superfícies de resposta e curvas de contorno na Figura 24 (A e B), mostrando a região de otimização das variáveis em relação a resposta da atividade amilásica. Estes dados sugeriram, portanto, fixar a concentração do inóculo e testar diferentes agitações para proceder com a validação dos resultados.



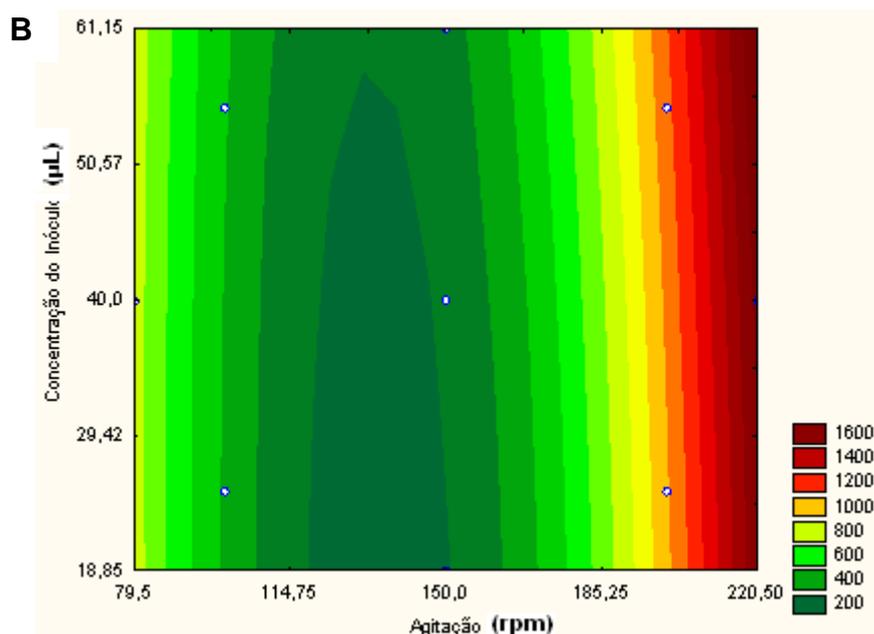


Figura 24. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade de amilase em função da agitação e temperatura por *Streptomyces* sp. IGAR-01.

De acordo com ANOVA (tabela 19) verifica-se que o $F_{\text{calculado}}$ (1,26), foi inferior ao F_{tabelado} (5,05), com um coeficiente de determinação de 70 %. O teste F não foi significativo para descrever os resultados através da superfície de resposta (Tabela 38).

Tabela 38. ANOVA para atividade de amilase no quarto dia de fermentação com água de manipueira e extrato de levedura por *Streptomyces* sp. IGAR-01.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_c	F_{tab}
Regressão	1191968	5	238393,6	1,26	5,05
Resíduos	941334	5	188266,8		
Total	2133302	10	426660,4		

% variação explicada (R^2) = 70% $F_{5;5;0,05} = 5,05$

Confirmação experimental das condições otimizadas

Com o objetivo de validar a atividade da amilase foram mantidas as condições da otimização, fixando-se a temperatura em 28° C, a 3,0% de água de manipueira, 1,0% de extrato de levedura e 55 µL da concentração de inóculo, variando, somente, a agitação em intervalos de 50 rpm, numa escala de 100 à 200 rpm, conforme a tabela 39, obtendo-se máxima atividade (2450,77 U.L⁻¹) utilizando-se agitação de 150 rpm. Com base neste resultado, o

extrato enzimático do ensaio 2 foi selecionado para fazer a determinação do perfil ótimo de temperatura e pH.

Tabela 39. Validação dos resultados obtidos com a atividade Amilásica por *Streptomyces* sp. IGAR-01.

Ensaio	Agitação (rpm)	Atividade Amilase (U.L ⁻¹)
1	100	1085,51
2	150	2450,77
3	200	1358,08

Determinação do perfil ótimo de Temperatura

A figura 25, representa graficamente o efeito da temperatura na atividade da amilase do *Streptomyces* sp. IGAR-01. O ótimo de temperatura ocorreu à 60° C, atingindo atividade máxima de 2456,17 U.L⁻¹, Observa-se que entre 30 e 50° C a atividade é superior a 50% em relação à máxima obtida.

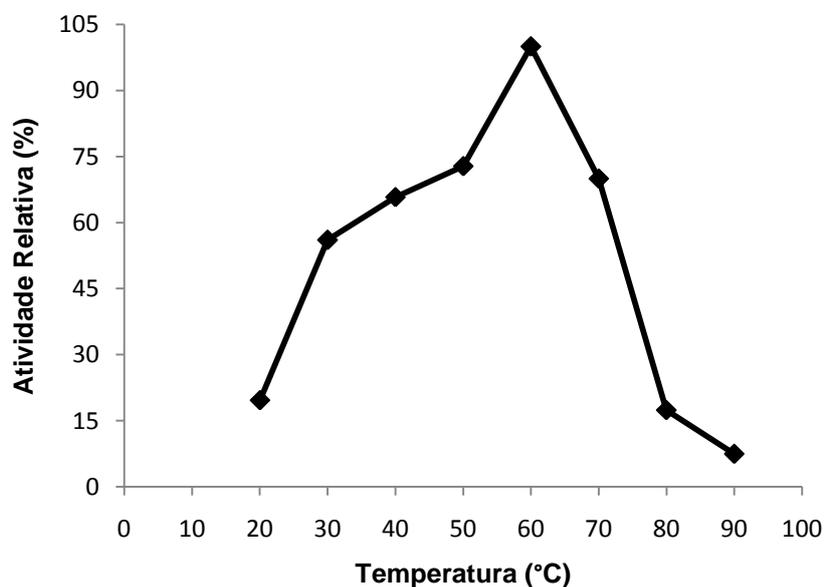


Figura 25. Efeito da temperatura na atividade Amilásica produzida por *Streptomyces* sp. IGAR-01. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

Determinação do perfil ótimo de pH

Em relação ao perfil ótimo de pH, para a atividade Amilásica, foi possível observar (Figura 26), que a atividade alcançou máxima de 2467,51 U.L⁻¹ em tampão fosfato pH 6,0. Atividades inferiores a 50% em relação a máxima obtida foram observadas em pH acima de 7,0.

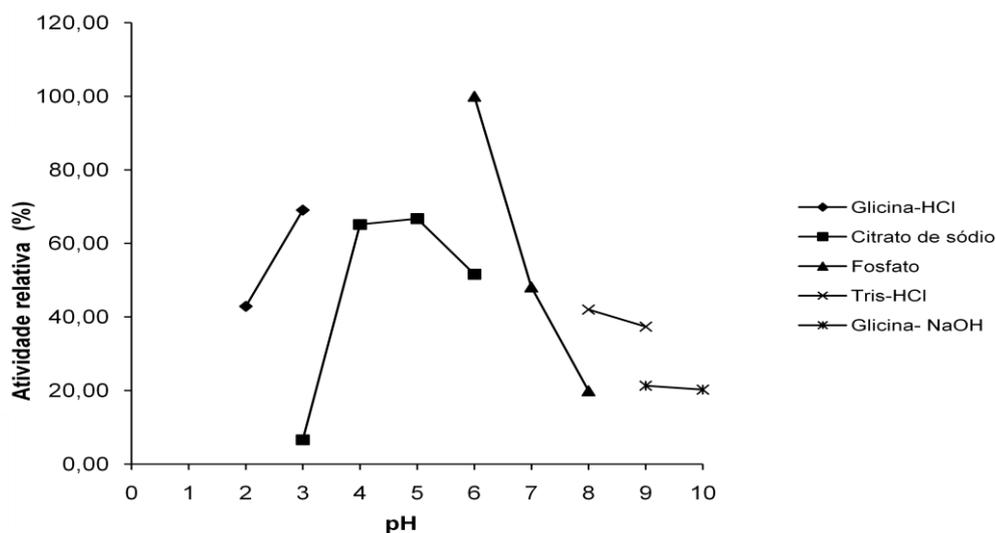


Figura 26. Efeito do pH na atividade Amilásica produzida por *Streptomyces sp.* IGAR-01. A atividade relativa está expressa em relação ao valor máximo obtido.

DISCUSSÃO

Na produção de amilases por fungos e bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão da enzima é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como substratos mais adequados para a alta produtividade da amilases, conforme mencionado por Cherry e colaboradores (2004) e Sexena et al. (2007), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento do amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para este fim (HAQ et al., 2003; KUNAMNENI et al., 2005; KONSOUOLA, 2007).

GUPTA et al. (2003) e PANDEY et al. (2005) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com

aplicações desde alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel. Apesar das amilases poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (NASCIMENTO, 2006).

A produção de amilase geralmente é induzida pela presença de amido ou de seu produto hidrolítico, a maltose. Existem vários estudos mostrando que a atividade enzimática aumentou quando foram utilizados amido e maltose como indutores de α -amilase. Já a glucose e outros açúcares como xilose e frutose podem reprimir a sua produção (GUPTA et al., 2003). Ao estudar a produção de amilases extracelulares através da fermentação no estado sólido de farelo de trigo por *Aspergillus oryzae*, Tunga e Tunga (2003) verificaram que a suplementação do meio com diferentes fontes de carbono (glucose, sacarose, maltose e lactose) não contribuíram para o aumento da produção da enzima. Segundo Gupta, (2003), fontes de nitrogênio orgânico têm sido preferidas para a produção de amilase por bactérias, como por exemplo o extrato de levedura a partir de *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. e *Halomonas meridiana*.

Dados na literatura comprovam que a *Streptomyces* sp. é uma excelente produtora de celulasas (NASCIMENTO et al., 2009; ALANI, 2008; GRIGOREVSKI-LIMA et al. 2005). Silva et al., (2004) ao utilizarem o resíduo fibroso de mandioca como substrato para a produção da amilase por *Penicillium notatum*, obteve atividade de 27,77 U/g com 5 dias de fermentação utilizando meio mineral Klausen. Tunga e Tunga (2003) obtiveram atividade amilásica de 255 U/g utilizando bagaço de cana em 72 horas de fermentação com o *Aspergillus oryzae*. Rahardjo e colaboradores (2005) empregando farinha de trigo e *A. oryzae* na produção de amilase obtiveram a atividade de 25 U.g⁻¹ para 4 dias de fermentação com adição de 1% de O₂ e 10 U.g⁻¹ para 13,3 dias de processo fermentativo a 0,25% de O₂.

Tanyildizi et al. (2005) observaram a produção máxima de amilase (16.602 U/L) por uma estirpe de *Bacillus* sp., quando se utilizou amido (1.0%

p/v), glicerol (1.0% p/v) e peptona (0.5% p/v), ao fim de 30 horas. Stamford et al (2001) detectaram uma elevada produção de amilase (39.200 U/L) pela estirpe *Nocardiosis* sp., uma actinobactéria isolado de vagem de feijão, quando amido e uréia foram utilizados como substratos, após 3 dias de fermentação. Santos e Martins (2003) observaram altos valores de atividade de amilase (350.000 U/L) produzidas por *Bacillus* sp. quando se utilizou 1,0% (p/v) amido, 0,5% (w/v) extrato de levedura e 1,0% (w/v) de peptona. As diferenças entre substrato e micro-organismo estudados dificultam comparações com os resultados obtidos pela estirpe *Streptomyces* sp. IGAR-01, vale ressaltar que a utilização de substrato disponível e de baixo custo como a água de manipueira é importante para os processos de produção em escala industrial.

Os resultados obtidos neste estudo comprovam que além das celulasas referidas na literatura, esta espécie, também, produz amilase de maneira eficiente, com uma produção máxima de 2467,51 U.L⁻¹. Tanto a temperatura (60° C) quanto o pH 6,0, encontram-se de acordo com as faixas explicadas na literatura para produção de enzimas, como constatamos no capítulo anterior em diversos estudos (GRIGOREVSKI-LIMA, 2009; GEORGE et al., 2001; NAIKA et al., 2007; KAUR et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados expostos anteriormente, pode-se afirmar que a estirpe *Penicillium* sp. IS-7, apresenta um bom potencial para aplicação na produção de enzimas por fermentação submersa utilizando palha de cana-de-açúcar e milhocina, que são resíduos agr-industriais abundantes e de baixo custo comercialmente, apresentando uma atividade enzimática superior ao da estirpe mutante *Trichoderma reesei* RUT-C30. Sendo que a fonte de nitrogênio (milhocina) influenciou na atividade CMC_{Case E} FPase do *Penicillium* sp. IS-7 e a fonte de carbono (palha de cana) e a temperatura foram significativas para a produção de FPase por *Trichoderma reesei* RUT-C30. As variáveis agitação e concentração de inóculo foram pouco relevantes para as atividades obtidas.

A máxima atividade de amilase obtida utilizando 3% (p/v) de água de manipueira indica a potencialidade do uso deste resíduo como substrato indutor pela estirpe *Streptomyces* sp. IGAR-01.

A fermentação submersa durante quatro dias revelou-se ideal para todos os micro-organismos estudados (*Penicillium* sp. IS-7, *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Streptomyces* sp. IGAR-01).

A caracterização quanto ao perfil de temperatura e pH mostrou 60° C como ideal para a maximização da atividade de celulasas e amilase e uma faixa ótima de pH entre 5,0 e 7,0, sendo que o *Penicillium* sp. IS-7 na atividade FPásica demonstrou grande potencial termotolerante, obtendo atividade máxima à 80° C, em pH 9,0.

A otimização dos processos, através do uso da metodologia de planejamento experimental foi bem sucedida, visto que se obtiveram as concentrações ótimas para as atividades enzimáticas (celulasas e amilase). Pode-se afirmar que o uso desta metodologia aliada ao bom senso é uma ferramenta necessária para a redução dos custos através do uso de resíduos lignocelulósicos e otimização dos processos na produção enzimática por micro-organismos com potencial biotecnológico.

Porém, novos estudos deverão ser conduzidos para analisar melhores respostas em outros sistemas de cultivo, através de análises fatoriais. Faz-se necessário, também, a realização de uma caracterização enzimática completa,

determinando os efeitos da termoestabilidade e influência dos íons metálicos nos extratos selecionados.

A realização de um estudo utilizando o pré-tratamento seria de grande importância para comparar com a produção obtida com o resíduo in natura.

Finalmente, é interessante a elaboração de um extrato enzimático misto para hidrólise da biomassa lignocelulósica para produção de etanol segunda geração.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça de bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestre em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2008.

ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. **Biotechnology Letters.** v, 30, p. 123-126, 2008.

ANDRADE, J.P. **Comunidade de fungos filamentosos Celulolíticos da restinga de guaibim – Bahia e seu potencial biotecnológico.** Monografia (Bacharelado em Biologia). 95 f. – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

ANDRADE, J. P. et al. Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 isolated from sandy coastal plains of northeast brazil. **Enzyme Research.** v. 2011, Article ID 167248, doi:10.4061/2011/167248. 2011.

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

BAFFI, M.A. et al. **Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use.** Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei*.** 90 f. Dissertação - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, SP, 2010.

BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation.** v. 3, p. 171-188, 1992.

BAYER, E. A. et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology** , v. 8, p. 548-557. 1998.

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

BELFAQUIH, N.; PENNINGKX, M. J. A bifunctional β -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 114-121, 2000.

BERGAMIN FILHO, A., KIMATI H.; AMORIM L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, 3 ed., São Paulo-SP, 1995.

BIANCHI, M. L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolvente**. 1995. 87 f. Dissertação – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

BISSOON, S.; CHRISTOV, L.; SINGH, S. Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp. **Process Biochemistry**. v. 37, p. 567-572, 2002.

BON, E. P. S.; GIRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S. et al. (Eds.). Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. **Interciência Brasil**, p. 241-271, 2008.

BORGHETTI, I.A. **Avaliação do crescimento da Microalga Chlorella minutissima em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, 2009.

BRECCIA, J. D. et al. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 78, p. 469-472, 1995.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p 2196–2204, 2007.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1291-1296, 2002.

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

CARVALHO, W. R. **Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), 143 f. - Universidade Federal de Goiás, 2008.

CHAABOUNI, S.E. et al. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, 267-269, 1995.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration e Biodegradation**. v. 59, p. 85–89, 2007.

CHERRY, H. M.; HUSSAIN, T.; ANWAR, M. N. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigates*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 11, p. 1988-1992, 2004.

COLOWICK, S. P. ; KAPLAN, N. O. (eds.) Section I. General Preparative. Procedures. **Methods in Enzymology**. v. 1, p. 138-146, 1995.

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

CONESSA, A. et al. The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. **Fungal Genetics and Biology**. v. 33, p. 155-171, 2001.

COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. 2 ed. New York: Wiley-VCH, p. 397, 2000.

CORREIA, R. T. P. **Estudo de cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). 163 f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.

DA COSTA SOUSA, L. et al. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion on Biotechnology**, v. 20, p. 339 – 347, 2009.

DAMASO, M.C.T. et al. Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* LOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113-116, p. 1003-1012, 2004.

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

DASHTBAN M.; SCHRAFT H.; Bioconversão fúngicas em resíduos lignocelulósicos; oportunidades e perspectivas. **International Journal of Biological Sciences**. v. 5, p. 578-595, 2009.

DE AZEREDO, L.A.I., et al. A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. **Current Microbiology**. v. 53, p. 335–339, 2006.

DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of atarch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137-155, 2002.

DILLON, A.J. et al. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxygluco. **Journal of Applied Microbiology**. v.1, p. 48-53, 2011.

DING, S.Y.; HIMMEL M.E..The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **J. Agric. Food Chem.** 54:597-606. 2006.

ECKHOFF, S. R.; TSO, C. C. Wet milling of corn using gaseous SO₂ addition before steeping and the effect of lactic acid on steeping. **Cereal Chemistry**. v. 68 n.3, p. 248-251, 1991.

EMBRAPA s.d., Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aqwweb/nichtml/fgbd01.asp#P>. Acesso: maio de 2011.

FALZETTA, D. Álcool, energia do futuro. **Bayer report**, ed. 2005/2006, p. 15-19, 2006.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FENNINGTON, G., LUPO, D.; STUTZENBERGER, F. Enhanced cellulase production in mutants of *Thermonospora curvata*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 24, 2487-2497, 1982.

FERRAZ, A. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ª edição. EDUCS. p. 215-236, 2010.

FIORETTO, R.A. **Uso direto da manipueira em fertirrigação**: série culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, Fundação Cargill., v. 4, 2001.

FLORES, M. E. ; PEREZ, R.; HUITRON, C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, p. 410-416, 1997.

FOREMAN, P.K. et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, 2003.

FOWLER, T. et al. Cellulase enzymes and systems for their expressions. **U.S. Patent 5861271** (to Genencor International, Inc. USA). 1999.

FREEDONIA - The Freedonia Group Incorporated, 2005. **Word Enzymes to 2009**. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf>
Acesso em: julho de 2011.

GALANTE, Y.M., DE CONTI, A ; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In.: HARMAN G.F.; KUBICEK C.P. (Eds.), *Trichoderma e Gliocladium - Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. v. 2, p. 327-342, 1998.

GARG, A. P., MCCARTHY, A. J.; ROBERTS, J. C. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 18, p. 261-267, 1996.

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.

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

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

GOLDESTINE, I.S. **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 320, 1981.

GOMES, D.P.; et al. Efeito de diferentes tratamentos químicos na qualidade sanitária de sementes de amendoim. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, série 275, 2008.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). 94 f. Universidade de Pernambuco. 2007.

GONG, C. S.; TSAO, G. T.: Cellulase and biosynthesis regulation. **Annu. Rep. Ferment. Processes**. v. 3, p. 111-140, 1979.

GOODFELLOW, M.; CROSS, T. **Classification**. In: M. GOODFELLOW, M. MORDARSKI; S.T. WILLIAMS. The Biology of the Actinomycetes, p. 74-91. Academic Press, London. 1984.

GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. Actinomycetes in Biotechnology. **Academic Press**, London, 1988.

GOSH, B. K.; GHOSH, A. **Degradation of Cellulose by fungal Cellulase**. In: Microbial Degradation of Natural Products Ed. G. Winkelmann. New York. 1992.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. et al. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial byproducts and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 272–277, 2005.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. **Avaliação da produção de celulases e xilanases por fungos isolados de ambientes brasileiros**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) 94 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1599-1616, 2003

HAALAND, P. D.; **Experimental design in biotechnology**. Marcel Dekker INC., New York, 1989.

HAQ, I. et al.. Production of amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. **Bioresource Technology**. v. 87, p. 57-61, 2003.

HARGREAVES, P. L. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) 75 f. – Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, 2008.

HECK, J.K., 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 of Microbiology**. v. 33, 213-218, 2002.

HENDRIS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Review: pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v.100, p. 10–18, 2009.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and degradation. **Wood Science and Technology**. v. 24, p. 23-63, 1990.

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

HOPWOOD, D. W. et al. **Genetic Manipulation: a laboratory Manual**. The Jonh Innes Institute, Norwich, 1985.

HOWARD R. L. et al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Africano Journal of Biotechnology**. V. 2, p. 602-619, 2003.

HREGGVIDSSON, G.O. et al. An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 3047-3049, 1996.

ÍNDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/genusrecord.asp>. Acesso em junho de 2011.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E.; Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial e Engineering Chemistry Research**. v. 41, p.1454–146, 2002

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new Alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1263-1270, 2005.

JORGENSEN, H. et al. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 32, p. 851-861, 2003.

JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 – Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 381-390. 2006.

JOUHTEN, P. et al. ¹³C –Metabolic flux ratio and novel carbon path analyses confirmed that *Trichoderma reesei* uses primarily the respirative pathway also on the preferred carbon source glucose. **BioMed Central**. 2009.

JUHASZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JUNIOR, D. L. **Métodos alternativos para aproveitamento das hemiceluloses da Madeira de eucalipto na indústria de celulose Kraft.** 128 f. Dissertação- Universidade Federal de Viçosa, 2007.

KÄMPFER, P.. "O Streptomycetaceae Família, Parte I: Taxonomia". **Os procariontes: um manual sobre a biologia de bactérias,**. ISBN 0-387-25493-5, p. 538-604, 2006.

KANDRA, L. α -Amilases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 487, p. 666-667, 2003.

KANG, S.W. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. p. 153-156. 2004.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**. p. 74-81, 2007.

KHAN, M. D. M. H et al. Use off ungi for the bioconversion of Rice straw into cellulose enzymes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 42, p. 381-386, 2007.

KIESER, T. et al. **Prático Streptomyces Genetics** (2^a ed.). Norwich, Inglaterra, John Innes Foundation ISBN 0-7084-0623-8, 2000.

KIMATI, H. **Fungos**. In: GALLI, F., et al. Manual de Fitopatologia. Editora Agrônômica Ceres, 2 ed. São Paulo, SP, 1978.

KITAYAMA, O. **Bioeletricidade: co-geração através do bagaço da cana, ampliação dos empreendimentos.** In: Conbien – Congresso Brasileiro de Agrobioenergia e Simpósio Internacional de Biocombustíveis, Center Convention, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil,. CD-ROM. 2008

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of α -amylase and B- galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 150-157, 2007.

KOVACS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G.; Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1350-1357, 2009.

KROGH, K.B.R. et al. Screening genus *Penicillium* form producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113-116, p. 389-401, 2004.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

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.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, p. 168-171, 2005.

KWON-CHUNG, K. J. ; BENNETT, J. E. **Aspergillosis**. In Medical Mycology, p. 201-247. Philadelphia, 1992.

LACERDA, L. G. et al. Thermal characterization of partially hydrolyzed cassava (*Manihot esculenta*) starch granules. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, p. 1209-1216, 2008.

LATIFIAN, M.; ESFAHAANI, Z. H.; BARZEGAR, M. Evaluation os culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 3634-3637, 2007.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 52, p. 299-304, 1995.

LIGGETT, W.; KOFFLER, H. "Milhocina em Microbiologia", 1948. **Bacteriological Reviews** dezembro, v. 12, p. 300 Disponível em http://en.wikipedia.org/wiki/Corn_steep_liquor. Acesso: maio de 2011.

LIRA, G. G. S.; et al. Produção de amilase por *Streptomyces* sp. IGAR-01 utilizando água de manipueira por fermentação submersa. **Anais**. Sinaferm, Caxias do Sul, RS, 2011.

LIU YT, et al. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **N Biotechnol**, 2011.

LOPES FILHO, J.F. Avaliação da maceração dinâmica do milho após um curto período de hidratação e subsequente quebra do pericarpo do grão. **Ciências de Tecnologias de Alimentos**, Campinas, v. 9, n. 3, 1999.

LOPEZ-CONTRERAS et al. Substrate-induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 5238-5243, 2004.

LYND, R. L. et al. Microbial Cellulose Utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, p. 506–577, 2002.

MAEDA, R. N. **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**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 197 f., 2010.

MADDIPATI, P.; et al. Production of ethanol from synthesis gas by *Clostridium* strain P11, using corn steep liquor as a replacement of nutrients to theyeast extract. **Departamento de Engenharia Agrícola e Biosystems**, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, EUA, 2011.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**, Ed. Pearson, 10 ed, 624p, 2004.

MANDELS, M. Microbial sources of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 5, p. 81-105, 1975.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.426–432, 2007.

MARTINS, **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado em Química). 96 f. Universidade Federal do Paraná, 2005.

MARTINS, L.F. et al. Comparition of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity agaist various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1417-1424, 2008.

MATTHEWS, J.F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 138-152, 2006.

MAWADZA, C. et al. Purification and characterization of cellulases production by two *Bacillus strains*. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 177-187, 2000.

MEDVE, J. **Cellulose Hydrolysis *Trichoderma reesei* cellulases**: studies on adsorption, sugar production ond synergism of cellobiohydrolase I, II and

endoglucanase II. Lund, Sweden. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Department of Biochemistry, Lund University. 1997.

MELO, R.F. et al. Deslocamento miscível de cátions básicos provenientes da água residuária de mandioca em colunas de solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 10, p. 456–465, 2006.

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

MO, H., ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1293-1297, 2004.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Chapter 1, 6, 7. 4th edition. John Wiley e Sons, New York, 1997.

MOROZOVA V.V. et al. Influence of the cycle number in processing of cellulose from waste paper on its ability to hydrolysis by cellulases. **Prikl Biokhim Mikrobiol**. v. 46, p. 397-400, 2010.

MURTHY, R. M. V.; KARANTH, N. G.; RAO, R. K. S. Biochemical engineering of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99-149, 1993.

MUSSATTO, I.S. **Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação (Mestrado em Química) 114f. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2002.

NAIKA, G.S.; KAUL, P.; PRAKASH, V. Purification and haracterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v. 18, p. 7566-7572, 2007.

NAKAMURA, K.; KITAMURA, K. Purification and some properties of a cellulase active on crystalline cellulose from *Cellulomonas uda*. **Journal of Fermentation Technology**. v.61, p.379-382, 1983.

NASCIMENTO, R. P. et al. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 549-555, 2002.

NASCIMENTO, R. P. et al. A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-b-1,4-xylanase titres. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, 879–881, 2003.

NASCIMENTO, R. P. et al. Production and partial characterization of extracellular proteinases from *Streptomyces malaysiensis*, isolated from a Brazilian cerrado soil. **Arch. Microbiol.**, v. 184(3): 194-198, 2005.

NASCIMENTO, R.P. et al. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 48, p.529-535, 2009.

NC-IUBMB - **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. 2008. Disponível em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso: maio de 2011.

NOCHURE, S.V., ROBERTS, M.F. ; DEMAIN, A. True cellulase production by *Clostridium thermocellum* grown on different carbon sources. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 641-646, 1993.

NOVOZYMES, **NREL make further biomass-to-ethanol progress**. In: Ethanol producer magazine. USA: BBI International, 2005.

OINONEN, A.M., et al. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 332-341, 2004.

OKEKE, B.C.; PATERSON, A. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in the *Streptomyces sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.8, p.483-487, 1992.

OLISHEVSKA, S.V.; et al. Endoglucanase-producing micromycetes capable of plant wastes degrading. **Ukr Biokhim Zh.** v. 8, p.100-105, 2009.

OLIVEIRA, A. N.; et al. Production of amylase by rhizobia using peach palm flour as substrate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, F.M.V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana..** Dissertação 98 f. - Escola de Engenharia de Lorena Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

OLIVERIO, J.L. "O Processo Dhr - Dedini Hidrólise Rápida". Seminário: **Produção de álcool a partir do Bagaço**. São Paulo, SP, 2007.

ONG, L.G., et al. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation on using palm kernel cake as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 118, p. 73-79, 2004.

ORTEGA, J. Production of extracellular cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum lycopersici*. **Texas Journal of Science**. v. 42, p. 405-410, 1990.

PALACIOS-ORUETA A. et al. Emissões de queima de biomassa: uma revisão de modelos, usando sensoriamento remoto de dados. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 104, p. 189-209, 2005.

PANDEY, A., et al. Biotechnological potential of agro-Industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 81-87, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., p. 760, 2005.

PEIXOTO, S. C. et al. *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**. v. 6, p. 269-273, 2003.

PEREIRA Jr., N. **Investigation of D-xylose Fermenting Yeast**. Ph.D. Tese. Department of Chemistry. The University of Manchester, U.K. 1991.

PEREIRA Jr, N.; COUTO, M.A.P.G.; ANNA, L.M.M.S.B. Biomass of lignocellulosic compostion for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

PEREIRA, R.E. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos para a produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). 116 f. – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Properties of a novel glucose-enhanced β -glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1251, p. 145-153, 1995.

PETROVA, S.D.; BAKALOVA, N.G. ; KOLEV, D.N. Properties of two endoglucanases from a mutant of *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**. p. 2107-2111, 2002.

PIRET, J. M. ; DEMAIN, A. L. Actinomycetes in Biotechnology: An overview. actinomycetes in biotechnology. In: GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. E MORDARSKI, M. (eds). **Academic Press**, London, 1988.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues: a review. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 50, p. 1–39, 2007.

RAHARDJO, Y. S. P. et al. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. **Biomolecular Engineering**, v. 21, p. 163-172, 2005.

RAJOKA, M.I. ; MALIK K.A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**. v. 59, p. 21-27, 1997.

RAJOKA, M. I. ; ASHRAF, Y. ; KHALID, A. M. Kinetic of improved production and carboxymethyl cellulose hydrolysis by an endo-glucanase from a derepressed mutant of *Cellulomonas biazotea*. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 1329–1333, 2004.

RFA. Anual Mundial de Produção de Etanol por estimativas por país, 2008. **Renewable Fuels Association**, da FO Licht. Disponível em:<http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics/>. Acesso: maio de 2011.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) 98 f. Universidade Federal de Uberlândia, MG, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2a Ed., Campinas, SP: Editora Cárita, 2009.

ROUSHDI, M.; GHALI, Y. ; HASSANEAN, A. Factors improving the steeping process of corn grains. Part II. Effect of enzyme addition. **Journal Starch/Stärke**. v. 33, p. 7-9, 1981.

SAJEDI, R. H. et al. Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 666-671, 2005.

SAMIR, M.A.S.A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, E.O.; MARTINS, M.L.L. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, p. 129-134, 2003.

SANTOS, D. T. et al. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Janus**. v. 3, p. 164-183, 2006.

SAXENA, R. K. et al. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN 5. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 260-265, 2007.

SCHULEIN, M. Cellulases of *Trichoderma reesei*. In Wood W.A. & Abelson J.N. (Eds.), **Methods in Enzymology** . v. 160, p. 234-242. New York, Academic Press, 1988.

SCHULEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. **Journal of Biotechnology**. v. 57, p. 71-81, 1997.

SCHUSTER, A. e SCHMOLL, M. **Biology and biotechnology of *Trichoderma***. Research area gene technology and applied Biochemistry, Institute of Chemical Engineering. University of Technology, 9, 166. 2010.

SEBRAE, **O Aproveitamento Sustentável da Manipueira**: cartilha. Disponível em <http://www.rts.org.br/noticias/destaque-2/arquivos/cartilha.pdf>. Acesso: junho de 2011.

SEMEDO, L. T. A. S. et al. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** . v. 54, p. 1323–1328, 2004.

SHEN, H. et al. *Cellulomonas fimi* cellobiohydrolases. In.: SADDLER J.N. e PENNER M.H. (Eds.), **Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates** (p. 174-196), London, Oxford University Press, 1996.

SILVA, V.F.N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Dissertação, 116 f. – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SILVESTRIN, C.R. Bioeletricidade: reduzindo emissões e agregando valor ao sistema elétrico nacional. **Ethanol Summit**, São Paulo, 2009.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. **Advances Applied Microbiology**, v. 40, p. 1-44, 1995.

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

SOCCOL, C. P. et al. Potencial of solid state fermentation for production of L (+) – lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 41, p. 286-290, 1994.

STAMFORD, T.I.M. et al. Production and characterization of thermostable α -amilase from *Nocardia* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**. v.76, p. 137-141, 2001.

STUZENBERGER, F. J.; BODINE, A. B. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 72, p. 504-511, 1998.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 22, p. 33-64, 2002.

SUKUMARAN, R.K., SINGHANIA, R.R. ; PANDEY, A. Microbial cellulases: production, application and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 64, p. 832-844, 2005

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

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood**: cellulase enzyme production. Tese. Doutorado 61 f. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 449-484. 2004.

TAKASHIMA, S. et al. Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* celluloses by *Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties. **Journal of Biotechnology**. v. 65, p. 163-171, 1998.

TAKASHIMA, S. et al. Purification and characterization of cellulases from *Humicola grisea*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 60, p. 77-82. 1996.

TANYILDIZI, M.S.; ÖZER, D.; ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2291-2296, 2005.

TECHAPUN, C. et al. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochemistry**. v. 38, p.1327-1340, 2003.

THEBERGE, M. et al. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, p.815-820, 1992.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A.C. Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis em manipueira sob condições ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, p. 945-953, 2002.

TOMME, P.; et al. Characterization of CenC, an enzyme from *Cellulomonas fimi* with both endo-and exoglucanase activities. **Journal of Bacteriology**. v. 178, p. 4216–4223, 1996.

TUCKER, M.P. et al. Ultra-thermostable cellulases from *Acidothermus cellulolyticus*: comparison of temperature optima with previously reported cellulases. **Biology and Technology**. v.7, p. 817-820, 1989.

TUNCER, M. et al. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD 25. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 25, p. 38-47, 1999.

TUNGA, R.; TUNGA, B. S. Extra-cellular amylase production by *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. **International Center for Biotechnology**, Osaka University, p.12 , 2003.

UNICA – **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo**. 2006. Disponível em: <http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>. Acesso: abril de 2011.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137-155, 2002.

VOBIS, G. Morphology of actinomycetes. In: Atlas of Actinomycetes. HAMADA, M., et al. (eds.) p. 178–191. **Asakura Publishing Co. Ltda.** Tokyo. 1997.

WILSON, D.B. Cellulases of *Thermomonospora fusca*. In. : ABELSON J.A. et al. (Eds.), Methods in Enzymology: biomass, part A: cellulose and hemicelluloses. **Biomass**. v.160, p. 314-323, Academic Press San Diego, 1988.

WOOD, T.M. ; MCCRAE, S.I. Cellulase from *Fusarium solani*: purification and properties of C1 component. **Carbohydrate Research**. v. 57, p.117-133, 1977.

WOOD, T.M.; GARICA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**. v. 1, p. 147–161. 1990.

YAMANE, K., SUZUKI, H.; NISIZAWA, K. Purification and properties of extracellular and cellbound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. cellulasa. **Biochemical Journal**. v. 67, p. 19-35, 1970.

YU, H. et al. Microbial community succession and lignocelluloses degradation during agricultural waste composting. **Biodegradation**. v. 18, p. 793–802, 2007.

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