

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CATARINA BERNARDES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
HEMICELULOLÍTICAS POR FUNGOS ISOLADOS DO CERRADO, COSTA
MARINHA BRASILEIRA E DA ANTÁRTICA, UTILIZANDO CASCA DE
SOJA COMO SUBSTRATO**

BRASÍLIA-DF

2016

CATARINA BERNARDES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
HEMICELULOLÍTICAS POR FUNGOS ISOLADOS DO CERRADO, COSTA
MARINHA BRASILEIRA E DA ANTÁRTICA, UTILIZANDO CASCA DE
SOJA COMO SUBSTRATO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA-DF

2016

CATARINA BERNARDES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E
HEMICELULOLÍTICAS POR FUNGOS ISOLADOS DO CERRADO, COSTA
MARINHA BRASILEIRA E DA ANTÁRTICA, UTILIZANDO CASCA DE
SOJA COMO SUBSTRATO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB)

Presidente

Prof^a. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha

Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Borin

Universidade de Brasília (UnB)

*Aos meus pais, irmãos, família e amigos o agradecimento por saber que tenho
as melhores pessoas do mundo ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pela incansável educação e amor que me foram passados ao longo de toda a minha vida. Aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho e apoio sempre. Ao meu pai, ainda que distante, sempre presente e responsável por essa realização. Agradeço à minha família onde cada um me auxiliou com afeto e dedicação. Aos miguxos que são meu melhor lado e sempre colaboraram com minha felicidade e realização de vida.

Um profundo agradecimento à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Pérola Magalhães, pelos ensinamentos, paciência e incentivo ao meu trabalho ao longo desses dois anos. Por ter me acolhido e cobrado o devido esforço por acreditar na minha capacidade, obrigada pelo crescimento.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho (IB/UnB) pelo fornecimento de substratos necessários ao trabalho. À Prof^a. Dr^a. Lara Durães Sette (CRM-UNESP), pela colaboração na pesquisa, cedendo gentilmente as cepas isoladas da Costa Marinha e da Antartida.

Aos meus colegas, estagiários e técnicas do Laboratório de Produtos Naturais pela paciência, ensinamentos, suporte e risadas que tornaram esse tempo muito mais prazeroso. Agradeço pela amizade, carinho e troca que vivenciamos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e toda sua equipe pela competência no suporte de nossas necessidades acadêmicas. À CAPES pelo apoio financeiro por meio de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite.

“Aprende depressa a chamar-te de realidade porque és o avesso do avesso do avesso do avesso.”

Caetano Veloso

RESUMO

Em razão do Brasil exercer grande atividade agrícola, são gerados enormes volumes de resíduos que são rotineiramente acumulados no meio ambiente, com destaque para a soja. O reaproveitamento desses recursos naturais disponíveis abundantemente, possibilita a produção de diversos metabólitos de interesse industrial obtendo produtos de maior valor agregado, através de tecnologias de baixo impacto ambiental, baixo custo, consumindo menos recursos e simplificando o processo. Relatam-se diversas produções enzimáticas através de processos biotecnológicos de fungos filamentosos em meios contendo resíduos da agroindústria. Dentro dessa visão, o trabalho objetivou avaliar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas de fungos isolados do cerrado, costa marinha brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato. Em sua primeira etapa, foi realizado o isolamento de 58 fungos endofíticos de 13 espécies de plantas nativas do Cerrado. Posteriormente foi realizado o processo de fermentação submersa (SF) de 104 fungos avaliando-se suas capacidades de produção enzimática. Uma triagem foi feita e 3 produtores de cada bioma (9 fungos) passaram também por fermentação em estado sólido (SSF). Os 18 extratos enzimáticos tiveram suas características físico-químicas analisadas quanto ao melhor pH e temperatura. Os resultados obtidos indicam que a casca de soja é um ótimo substrato na produção de xilanase, mananase, carboximetilcelulase (CMCase) e β -glicosidase. Os cultivos apresentaram enzimas com melhor atividade em pH 5,4 para xilabase, mananase e CMCase, e pH 4,8 para β -glicosidase. A faixa de temperatura ótima se manteve entre 40 °C e 60 °C para todos as enzimas em ambos os tipos de fermentações. As atividades mensuradas mostraram-se mais expressivas para xilanase atingindo cerca de 14 UI/mL. Foi possível observar um aumento de atividade enzimática nos cultivos de fungos do cerrado quando cultivados em SSF. Dessa forma, os resultados permitem concluir que os fungos estudados apresentam potencial para a produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas através de SF e SSF em um meio de baixo valor agregado apresentando assim interesse biotecnológico.

Palavras-chave: fungos filamentosos, fungos endofíticos, fermentação em estado sólido, casca de soja, enzimas hemicelulolíticas.

ABSTRACT

Due to the fact Brazil practices a great agricultural activity, huge volumes of waste are generated and are commonly accumulated in the environment, specially soybeans. The reuse of these highly available natural resources, allows for the production of several metabolites of industrial interest, obtaining products with higher added value, through technologies with low environmental impact and low cost, consuming less resources and simplifying the process. There are reports of several enzymatic productions through biotechnological processes of filamentous fungi in means containing agriculture industry residues. Within this view, the aim of the present work was to evaluate the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from isolated fungi in the Brazilian *Cerrado* and marine coast and in Antarctica, using soy husk as substrate. In its first stage, it performed the isolation of 58 endophytic fungi of 13 species of native plants of the *Cerrado*. Later it was realized the process of submerged fermentation (SF) of 104 fungi, evaluating their capability of enzymatic production. A selection was made and 3 producers of each biome (9 fungi) additionally went through solid state fermentation (SSF). The 18 enzymatic extracts had its physical-chemical characteristics analyzed as to find the optimum pH and temperature. The results obtained indicate that the soy husk is an great substrate in the production of xylanase, mananase, carboximetilcelulase (CMCase) and β -glucosidase. The enzymes had presented their best activity in pH 5.4 for xylanase, mannanase and CMCase and pH 4.8 for β -glucosidase. The optimum temperature range was kept between 40°C and 60°C for all enzymes in both fermentations. The activities measured have been revealed as expressive for xylanase reaching around 14 UI/mL. It was possible to observe an increase of enzymatic activity for the *Cerrado* fungi when cultivated in SSF. Therefore, the results allow to conclude that the fungi used present potential for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes through SF and SSF in a low added value mean, thus presenting biotechnological interest.

Keywords: filamentous fungi, endophytic fungi, solid state fermentation, soy husk, hemicellulolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização estrutural da parede celular vegetal.....	20
Figura 2 - Parede celular e as enzimas envolvidas na sua degradação.....	21
Figura 3 - Estrutura de um fragmento da cadeia de celulose.....	22
Figura 4 - Estrutura da celulose destacando-se as regiões cristalina e amorfa.....	23
Figura 5 - Degradação enzimática de lignocelulose.....	25
Figura 6 - Representação das unidades básicas que constituem a lignina e seus principais tipos de ligações (Lignina de madeira de coníferas).....	26
Figura 7 - Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da estrutura da celulose.....	29
Figura 8 - Estrutura hipotética da xilana e as enzimas envolvidas em sua degradação.....	31
Figura 9 - Fluxograma do <i>screening</i> feito dos 104 fungos.....	56
Figura 10 - Diagrama das espécies vegetais com destaque para as 3 espécies que geraram as cepas que obtiveram melhores resultados no trabalho.....	57
Figura 11 a) Placas de petri com fragmentos de folhas e controles negativos; b)-g) Fungos endofíticos crescidos em placa de Petri.....	58
Figura 12 - Atividades enzimáticas dos fungos do Cerrado cultivados em SF, 7 dias, 28 °C e 120 rpm.....	68
Figura 13 - Atividades enzimáticas dos fungos da Costa Marinha cultivados em SF, 7 dias, 28 °C e 120 rpm.....	68
Figura 14 - Atividades enzimáticas dos fungos da Antártica cultivados em SF, 7 dias, 15 °C e 120 rpm.....	68
Figura 15 a) Erlenmeyer com casca de soja como substrato para crescimento microbiano; b) Crescimento do fungo Ipê 01 em SSF; c) Crescimento do fungo 558 em SSF; d) Crescimento do fungo OH02 em SSF.....	71
Figura 16 - a) Casca de soja; b) Triturada em moinho de facas; c) Triturada em liquidificador.....	71
Figura 17 - Variação do volume de inóculo adicionado e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SSF, 7 dias e 28 °C.....	73
Figura 18 - Variação do volume de inóculo adicionado e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SSF, 28 dias e 28 °C.....	73

Figura 19 - Variação da temperatura de cultivo e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SF e SSF, 7 dias e 15 °C.....	77
Figura 20 - Variação da temperatura de cultivo e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SSF, 28 dias e 15 °C.....	77
Figura 21 - Melhores condições observadas para maiores produções enzimáticas dos fungos do Cerrado cultivados em SSF, por 7 dias a 28 °C.....	78
Figura 22 - Melhores condições observadas para maiores produções enzimáticas dos fungos da Costa Marinha cultivados em SSF, por 7 dias a 28 °C.....	79
Figura 23 - Melhores condições observadas para maiores produções enzimáticas dos fungos da Antártica cultivados em SSF, por 7 dias a 15 °C.....	79
Figura 24 - Gráfico comparativo das atividades enzimáticas dos fungos do Cerrado cultivados em SF e SSF nas melhores condições avaliadas.....	81
Figura 25 - Gráfico comparativo das atividades enzimáticas dos fungos da Costa Marinha cultivados em SF e SSF nas melhores condições avaliadas.....	81
Figura 26 - Gráfico comparativo das atividades enzimáticas dos fungos da Antártica cultivados em SF e SSF nas melhores condições avaliadas.....	81
Figura 27 - Comparação dos valores de atividade total e de atividade específica.....	85
Figura 28 - Gráficos da influência da temperatura para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SF.....	89
Figura 29 - Gráficos da influência da temperatura para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SSF.....	90
Figura 30 - Gráficos da influência do pH para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SF.....	94
Figura 31 - Gráficos da influência do pH para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SSF.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nome científico e popular das plantas, e código dos fungos isolados.....	50
Tabela 2 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de xilanase medidos em UI/mL.....	59
Tabela 3 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de xilanase medidos em UI/mL.....	59
Tabela 4 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de xilanase medidos em UI/mL.....	59
Tabela 5 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de mananase medidos em UI/mL.....	61
Tabela 6 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de mananase medidos em UI/mL.....	62
Tabela 7 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de mananase medidos em UI/mL.....	62
Tabela 8 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de CMCase medidos em UI/mL.....	63
Tabela 9 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de CMCase medidos em UI/mL.....	63
Tabela 10 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de CMCase medidos em UI/mL.....	64
Tabela 11 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de β -glicosidase medidos em UI/mL.....	65
Tabela 12 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de β -glicosidase medidos em UI/mL.....	65
Tabela 13 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de β -glicosidase medidos em UI/mL.....	66
Tabela 14 - Vantagens e desvantagens da SSF em relação à SF.....	83
Tabela 15 - Quantificação de proteína total.....	84
Tabela 16 - Tabela comparativa de atividade específica e atividade total em SF e SSF	84
Tabela 17 - Valores das temperaturas ótimas dos fungos cultivados em SF.....	88
Tabela 18 - Valores das temperaturas ótimas dos fungos cultivados em SSF.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC: Carboxi-Metil-Celulose

CMCase: Carboximetilcelulase

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EC: *Enzyme Commission*

pH: Potencial Hidrogeniônico

pNPG: Para-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo

RPM: Rotação por minuto

SF: Fermentação Submersa

SSF: Fermentação em Estado Sólido

UI: Unidade Internacional

$U\ mL^{-1}$: μ mol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto por mL (atividade enzimática)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1 Estrutura e composição da parede celular vegetal.....	20
1.1 Celulose.....	22
1.2 Hemicelulose.....	23
1.3 Lignina.....	25
2 Enzimas.....	27
2.1 Enzimas celulolíticas.....	28
2.2 Enzimas hemicelulolíticas.....	30
2.3 Aplicações biotecnológicas.....	33
3 Biomassas.....	36
3.1 Cerrado.....	36
3.2 Costa Marinha.....	38
3.3 Antártica.....	40
4 Fungos filamentosos.....	42
4.1 Fungos endofíticos.....	44
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
Lista de Reagentes.....	47
Lista de Preparo de Soluções.....	48
4.1 Isolamento.....	50
4.1.1 Origem dos fungos da Costa Marinha e Antártica.....	51

4.1.2 Manutenção das cepas.....	51
4.2 Resíduo lignocelulolítico.....	51
4.2.1 Origem do resíduo.....	51
4.2.2 Pré-tratamento da casca de soja.....	51
4.3 Cultivo dos fungos.....	52
4.3.1 Cultivo em fermentação submersa.....	52
4.3.2 Cultivo em fermentação em estado sólido.....	52
4.3.2.1. Pré-inóculo.....	52
4.3.2.2 Inóculo.....	53
4.3.3 Extração enzimática - Fermentação em estado sólido.....	53
4.4 Quantificação de proteínas.....	53
4.5 Determinação das atividades enzimáticas.....	54
4.5.1 Xilanase, mananase, carboximetilcelulase.....	54
4.5.2 β -glicosidase.....	55
4.6 <i>Screening</i> funcional.....	55
4.7 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.....	56
4.8 Efeito do pH sobre a atividade enzimática.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Isolamento dos fungos endofíticos.....	57
5.2 Atividades enzimáticas.....	58
5.2.1 Xilanase.....	58
5.2.2 Mananase.....	61
5.2.3 Carboximetilcelulase.....	63
5.2.4 β -glicosidase.....	65
5.3 Avaliação da produção enzimática em fermentação submersa.....	67

5.4 Avaliação da produção enzimática em fermentação em estado sólido.....	70
5.4.1 Variação do volume de inóculo.....	72
5.4.2 Variação do tempo de cultivo.....	72
5.5 Avaliação da produção enzimática em fermentação submersa e fermentação em estado sólido após variação de temperatura de cultivo.....	76
5.5.1 Melhores resultados SSF.....	78
5.5.2 Comparação atividades SF x SSF.....	81
5.6 Caracterização das enzimas no extrato bruto.....	86
5.6.1 Influência da temperatura na atividade enzimática.....	87
5.6.1.1 Fermentação submersa (SF).....	89
5.6.1.2 Fermentação em estado sólido (SSF).....	90
5.6.2 Influência do pH na atividade enzimática.....	93
5.6.2.1 Fermentação submersa (SF).....	94
5.6.2.2 Fermentação em estado sólido (SSF).....	95
6 CONCLUSÃO.....	97
7 PERSPECTIVAS.....	98
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

Em razão do Brasil exercer grande atividade agrícola, em todo o país são gerados enormes volumes de resíduos que são rotineiramente acumulados no meio ambiente. O reaproveitamento destes resíduos ou subprodutos agroindustriais e dos recursos naturais, disponíveis abundantemente, possibilita a produção de diversos metabólitos de interesse industrial obtendo produtos de maior valor agregado tais como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, alcoóis, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos aromáticos (Jegannathan e Nielsen, 2013; Dantas e Aquino, 2010; Heck *et al.*, 2002; Soccol e Vandenberghe, 2003; Siqueira *et al.*, 2010). Além disso, processos que envolvem tecnologias de baixo impacto ambiental, consumindo menos recursos, simplificando o processo e diminuindo custos, utilizando matérias-primas renováveis, contribuem para a diminuição de resíduos no Brasil e no mundo (Schmidell *et al.*, 2001; Dantas e Aquino, 2010).

Relatam-se diversas produções enzimáticas através de processos biotecnológicos de fungos filamentosos em meios contendo resíduos da agroindústria, como proteases em farelo de trigo, amilases em casca de mandioca (Cruz *et al.*, 2011), xilanases em bagaço de cana e casca de soja (Moreira, 2013; Cunha, 2016), β -galactosidase em casca de soja (Martarello, 2016) e pectinases extraídas de cultivo em casca de maracujá (Jaramillo, 2014). Desta forma, a busca recorrente por enzimas de origem fúngicas produzidas através de cultivo a partir de resíduos de soja, por exemplo, se torna interessante do ponto de vista de aplicabilidade industrial, econômica e ambiental.

A estrutura da biomassa lignocelulósica, presente nas plantas, é composta por celulose, hemicelulose e lignina, uma mistura de polímeros de carboidratos com uma proporção aproximada de 2:1:1. A lignocelulose é o principal material da parede celular de plantas, é a fração mais comumente encontrada na natureza e a degradação deste material em açúcares monoméricos envolve sinergismo de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (Juhász *et al.*, 2005). A celulose é uma cadeia de polissacarídeos parcialmente insolúveis que fornecem força e rigidez às paredes celulares. A lignina por sua vez atua como uma barreira amorfa evitando a degradação microbiana. A hemicelulose é intercalada com celulose e lignina completando o complexo lignocelulolítico fornecendo às paredes celulares flexibilidade suficiente para que ocorra movimentação e crescimento (Van Zyl *et al.*, 2010). A hemicelulose pode ser

classificada em xilanas, mananas, arabinanas e galactanas, de acordo com o principal açúcar encontrado em suas estruturas. As mais comuns entre elas, as xilanas, possuem ligações β -D-1,4-xilopiranosídicas, enquanto que as mananas consistem de ligações β -1,4 de glicose e manose, as quais encontram-se distribuídas randomicamente (Juhász *et al.*, 2005).

Os materiais lignocelulósicos como cascas, farelos, polpas, sementes e bagaços, têm como seus principais componentes não só celulose, hemicelulose e lignina, mas também amido, pectina e proteínas, o que os tornam materiais heterogêneos servindo como fonte de carbono e energia, além de suporte físico para o crescimento de microrganismos (Pandey, 2003). Um grande número de bactérias e fungos produzem hemicelulases, sendo os fungos filamentosos interessantes produtores destas enzimas do ponto de vista industrial, principalmente de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (Michelin *et al.*, 2010).

Pode-se citar como vantagens do uso de enzimas o alto grau de especificidade das reações, elas serem produtos naturais biológicos que aumentam a eficiência do processo, podendo ter sua atividade regulada, além de atuarem em baixas concentrações sob condições amenas (Rodrigues e Soccol, 2009). Devem, porém, ser tolerantes a fatores físico-químicos como pH, temperatura, íons metálicos, e apresentarem alta eficiência catalítica, e baixo custo de produção (Bokhari *et al.*, 2009).

A caracterização da enzima é fundamental para a sua aplicação biotecnológica. No entanto o custo elevado do processo é um dos principais fatores que influencia na economia de produção, separação, recuperação e purificação de uma enzima. Essa redução no custo, pode ser alcançada pela otimização dos processos de produção (Shah e Madamwar, 2005; Santos *et al.*, 2013). Para isso avaliam-se os estudos das variáveis inerentes não somente à enzima (caracterização, estabilidade e purificação), mas também ao processo fermentativo (o microrganismo, pH, umidade, temperatura, tempo de cultivo, composição do substrato e da solução nutritiva, além de taxa de aeração do meio fermentativo e tipo de biorreator).

Sabe-se que leveduras e fungos filamentosos são muito promissores para a produção de enzimas de interesse biotecnológico e industrial devido à grande variedade de atividades catalíticas, fácil adaptação, à possibilidade da produção enzimática através de processos fermentativos em grande escala, a expressão de enzimas extracelulares, a

produção de enzimas auxiliares, e à simplicidade dos requerimentos nutricionais, como por exemplo, na habilidade em degradar materiais lignocelulósicos, o que permite o cultivo com resíduos agroindustriais como fonte de carbono para seu crescimento (Bon *et al.*, 2008; Lopes, 2011). A utilização de enzimas em diversas áreas da indústria faz com que microrganismos sejam cada vez mais estudados e suas enzimas caracterizadas, disponibilizando uma gama de conhecimento que vai de encontro às necessidades da indústria.

Dentro desse cenário apresentado, o trabalho visou selecionar fungos endofíticos do Cerrado, fungos da Costa Marinha brasileira e fungos da Antártica produtores de xilanase, mananase, carboximetilcelulase e β -glicosidase em fermentação submersa e fermentação em estado sólido utilizando casca de soja como fonte de carbono.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

Os compostos orgânicos mais abundantes da natureza são os polissacarídeos da parede celular das plantas, abrangendo predominantemente, os materiais agroindustriais, os resíduos urbanos e as madeiras de angiospermas e gimnospermas. Estes são formados principalmente de celulose, hemicelulose, pectina e complexos fenólicos como a lignina, fornecendo alta complexidade e rigidez à parede celular das plantas (Chandel e Silva, 2013). De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina, porém, o tamanho e a forma da parede celular, assim como sua composição química varia de espécie para espécie (Castro e Pereira Jr., 2010).

A parede celular é constituída de várias camadas como ilustrado pela Figura 1. Sendo subdivididas em parede primária e secundária. São formadas por diversos polissacarídeos e unidos através de ligações covalentes e não covalentes (Taiz e Zieger, 2004). A parede celular primária é formada por microfibrilas de celulose e é continuamente depositada durante o crescimento da mesma. Mais internamente existe a parede celular secundária composta principalmente de celulose e lignina. Esta, por sua vez, pode ser dividida em três camadas, que são classificadas de acordo com as orientações das microfibrilas de celulose. A partir do crescimento da parede, ou seja, da divisão celular, as células recém formadas permanecem unidas pela lamela média, que por sua vez, é constituída principalmente por lignina (Fengel e Wegener, 1989).

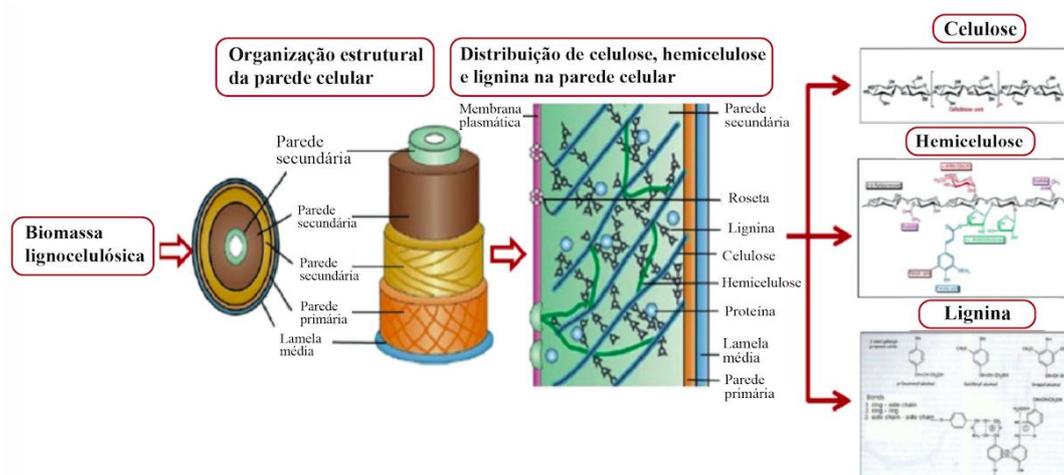


Figura 1 - Organização estrutural da parede celular vegetal (Adaptado de Menon e Rao, 2012)

Durante o crescimento celular a parede primária é construída, e deve ter equilíbrio entre estabilidade para conseguir crescer e flexibilidade para permitir a expansão das células e não ocorrer ruptura. Consiste principalmente de celulose, hemiceluloses e pectina. Logo após cessar o crescimento celular, inicia-se o processo de diferenciação celular: início da formação da parede secundária. Esta confere principalmente estabilidade mecânica à planta. É caracterizada pela diminuição da síntese de pectina e um grande aumento na síntese de lignina (Taiz e Zeiger, 2004).

A complexidade de seus componentes dificulta o ataque químico e bioquímico à parede celular vegetal, dificultando o acesso das várias enzimas envolvidas em sua degradação, que depende de sinergismo. Inicia-se com a remoção de pequenas quantidades de lignina e celulose que gera alterações substanciais na estrutura dos componentes da parede celular abrindo espaço para que mais enzimas possam penetrar. A Figura 2 exemplifica os diferentes tipos de substratos lignocelulolíticos, os componentes estruturais de suas paredes celulares e as enzimas específicas no processo de degradação; além das aplicações industriais de seus produtos.

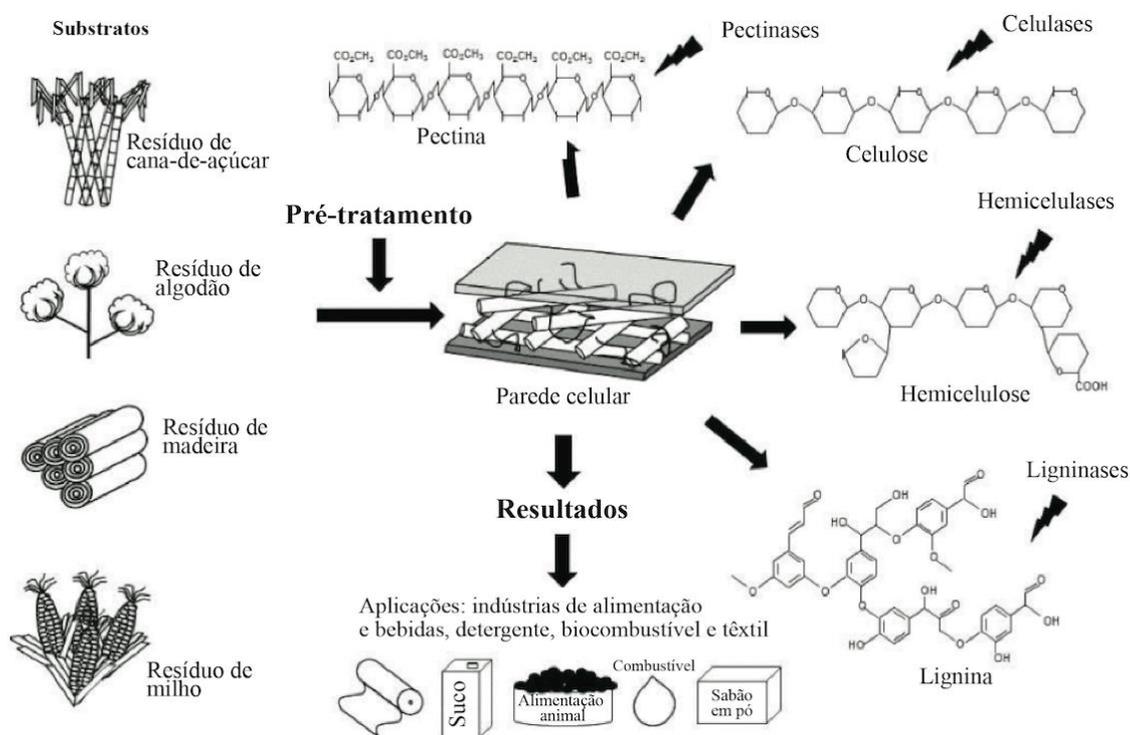


Figura 2 - Parede celular e as enzimas envolvidas em sua degradação. (Adaptado de Jaramillo, 2014)

1.1 CELULOSE

Dentre os componentes da parede celular, a celulose é o mais abundante, correspondendo de 40 a 45% do peso seco das plantas. Encontra-se envolvida em uma matriz de hemicelulose (30-35%) e lignina (20-23%). A estrutura desse polímero é linear e não-ramificado, formado por monômeros de anidro-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) que resultam da perda de uma molécula de água. Estritamente a celulose é composta por unidades de celobiose que se repetem sempre apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (Figura 3). (Esposito e Azevedo, 2010).

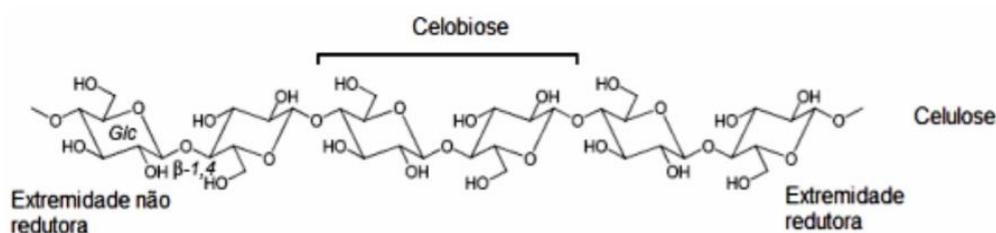


Figura 3 - Estrutura de um fragmento da cadeia de celulose (Santos, 2014)

Na parede celular de plantas, a celulose é organizada em microfibrilas (junção de várias fibrilas), que contém aproximadamente de 30 a 36 cadeias de celulose. O tamanho das fibrilas é desconhecido, mas relata-se constituição de 14000 unidades de glicose, correspondendo a uma fibrila de 7 μ m. São formadas através de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals formadas durante o acoplamento lateral de suas cadeias resultando em uma estrutura cristalina contínua, estável e insolúvel (Horn *et al.*, 2012). O comprimento da molécula de celulose é determinado pelo número de unidades de glicana no polímero, chamado de grau de polimerização, e que varia de 2.000 a 27.000 unidades. Tais características fazem da celulose um polímero de caráter estrutural (Khandeparker e Numan, 2008).

As microfibrilas constituem-se de região cristalina - onde as fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade - e região amorfa, onde existem porções mais fracamente associadas, apresentando fibras mais distantes entre si e menos compactas, culminando em uma maior reatividade quando comparada com a estrutura cristalina (Figura 4) (Lynd *et al.*, 2002; Arantes e Saddler, 2010).

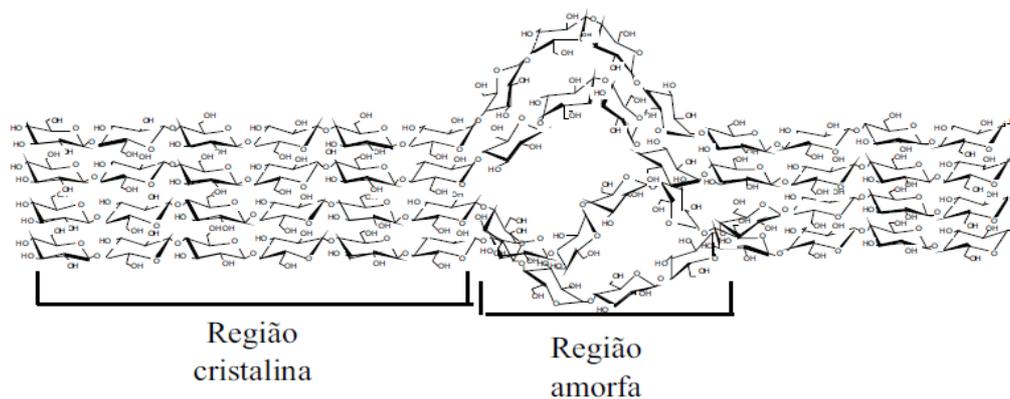


Figura 4 - Estrutura da celulose destacando-se as regiões cristalina e amorfa (Farinas, 2011)

Nas regiões amorfas a água e enzimas têm maior acesso, sendo mais facilmente hidrolisada e primeiramente atacada e degradada. Já na região cristalina, os átomos são altamente ordenados e o empacotamento das cadeias dificulta a penetração de moléculas no interior da microfibrila, dificultando sua degradação por microrganismos. A base para muitas das propriedades físico-químicas da celulose nas plantas, incluindo a rigidez e a sua natureza insolúvel, justifica-se pela estrutura altamente ordenada da celulose e as pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Vale ressaltar que o processo de degradação da celulose pode ser facilitado porque além de regiões amorfas, estas fibras apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas (Lynd *et al.*, 2002; Arantes e Saddler, 2010).

1.2 HEMICELULOSE

A hemicelulose (ou polioses), segundo constituinte mais abundante em plantas disponível na natureza, é um polímero que também assume função estrutural na parede celular (Heck *et al.*, 2002). Na parede celular a hemicelulose está intimamente relacionada com a celulose, revestindo as microfibrilas e dificultando a ação das celulases, além de ser covalentemente ligada à lignina, sendo importante na conexão entre celulose e lignina (Collins *et al.*, 2005). No geral, as hemiceluloses apresentam um baixo grau de polimerização (média de 100 - 200) e a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses depende do tipo de parede celular e da espécie analisada (Rowel *et al.*, 2005).

A classificação das hemiceluloses é dada pelo principal resíduo de açúcar presente na sua estrutura polimérica, e variam em: D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses) e D-xilose e L-arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses, onde são unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e ocasionalmente ligações glicosídicas β -1,3. Esses açúcares apresentam menor massa molecular que a celulose e são polímeros ramificados. De acordo com o tipo de monossacarídeo predominante na sua principal cadeia as hemiceluloses são denominadas de xilana, manana, galactana e arabinanas. Podem ser homopolímeros quando formam-se somente por um único tipo de açúcar (ex: xilana formada por xilose) ou heteropolímeros quando formam-se por mais de um tipo de açúcar (ex: glicomanana, formada por glicose e manose) (Esposito e Azevedo, 2010; Fengel e Wegener, 1989; Bento *et al.*, 2012). As xilanas compreendem o principal componente hemicelulósico em folhosas e gramíneas, enquanto as mananas são o principal polissacarídeo hemicelulósico em coníferas, bem como em estruturas especializadas (sementes e frutos de plantas) (Van Zyl *et al.*, 2010).

As hemiceluloses também contêm como substituintes grupos acetil, ácido ferúlico e metil (Collins *et al.*, 2005; Rowel *et al.*, 2005). As cadeias laterais determinam a solubilidade, a conformação física e a reatividade da molécula com outros componentes hemicelulósicos. Além disso, também apresentam grande influência no modo e na extensão da clivagem enzimática (Kulkarni *et al.*, 1999).

A característica estrutural comum entre os diferentes tipos de hemiceluloses está na configuração de sua estrutura, com a presença de hexoses ou pentoses com ligações do tipo β -1,4 na hidroxila do C-4 em orientação equatorial. Por essa razão, sua estrutura é linear, similar à da celulose. No entanto, diferem-se por apresentarem grande variedade de açúcares nas ramificações, o que impede a formação de grandes regiões cristalinas como acontece com a celulose (Jovanovic *et al.*, 2009).

No geral, a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses dependem do tipo de parede celular, tipo de célula e varia de espécie para espécie (Collins *et al.*, 2005; Polizeli, *et al.*, 2005). Enquanto o farelo de arroz é rico em arabinose, a xilana de bétula possui um conteúdo significativo de glicurانات e baixo de arabinose (Chávez *et al.*, 2006). De acordo com Kanderparker e Numan (2008), a xilana possui significativa representação de biomassa renovável: aproximadamente 20 – 30%

do peso seco de resíduos agroindustriais, tais como as cascas de soja utilizadas na forma de suporte e substrato.

Apesar de serem mais acessíveis ao ataque químico ou enzimático, as ramificações do esqueleto do polissacarídeo bloqueiam a clivagem em determinados locais, tornando a hemicelulose muito mais complexa de ser degradada enzimaticamente. As enzimas que serão necessárias para esta degradação, dependerão da composição da biomassa a ser degradada. A hidrólise enzimática da hemicelulose ocorre pela ação cooperativa de diversas endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares; podendo até ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal e enzimas que degradam as cadeias laterais. Na Figura 5 constam os componentes da parede celular vegetal e os locais de ação das enzimas que auxiliam no processo de degradação do material.

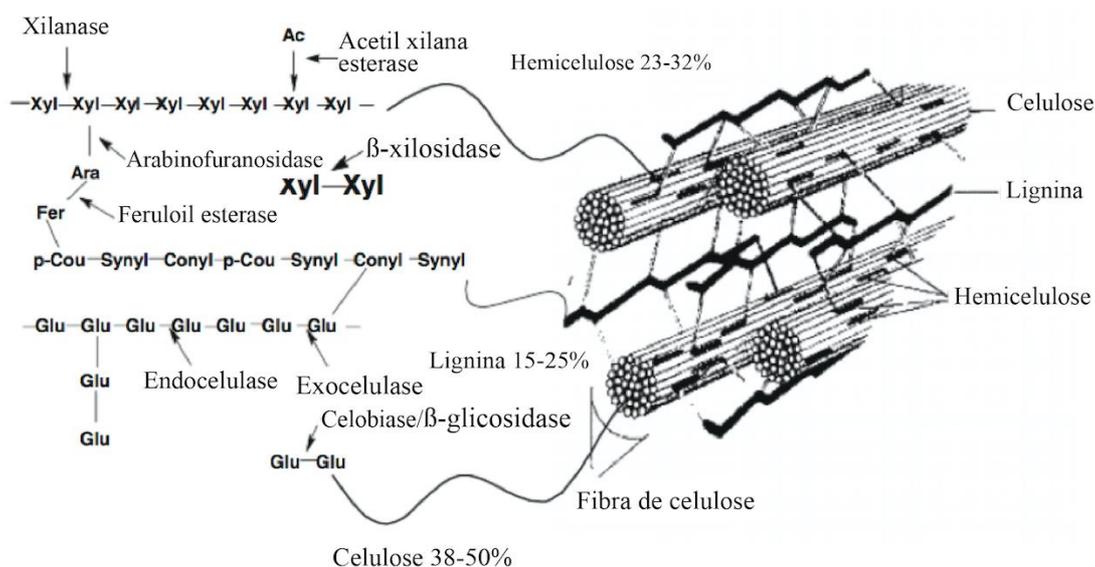


Figura 5 - Degradação enzimática de lignocelulose (Adaptado de Khandeparker e Numan, 2008)

1.3 LIGNINA

Lignina é um composto que está covalentemente ligado à celulose e outros polissacarídeos da parede celular, empacotando suas microfibrilas e protegendo-os contra a atividade hidrolítica de enzimas e outros fatores externos; além de estabilizar o complexo lignocelulose (Taiz e Zeiger, 2004). A quantidade de lignina tende a ser maior à medida que ocorre o envelhecimento da planta, e apesar de estar presente em

menores quantidades em relação aos outros componentes, a lignina atribui limitação suficiente dificultando a hidrólise do material lignocelulósico retardando-a ou até mesmo evitando completamente a ação enzimática (Castro e Pereira Jr., 2010).

É composta basicamente de unidades de fenilpropano e o acoplamento dessas unidades não ocorre de forma regular e repetitiva, formando assim uma macromolécula que resulta em uma rede tridimensional (Figura 6). Gerando vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano, sendo que as mais abundantes são: β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (Carvalho *et al.*, 2009).

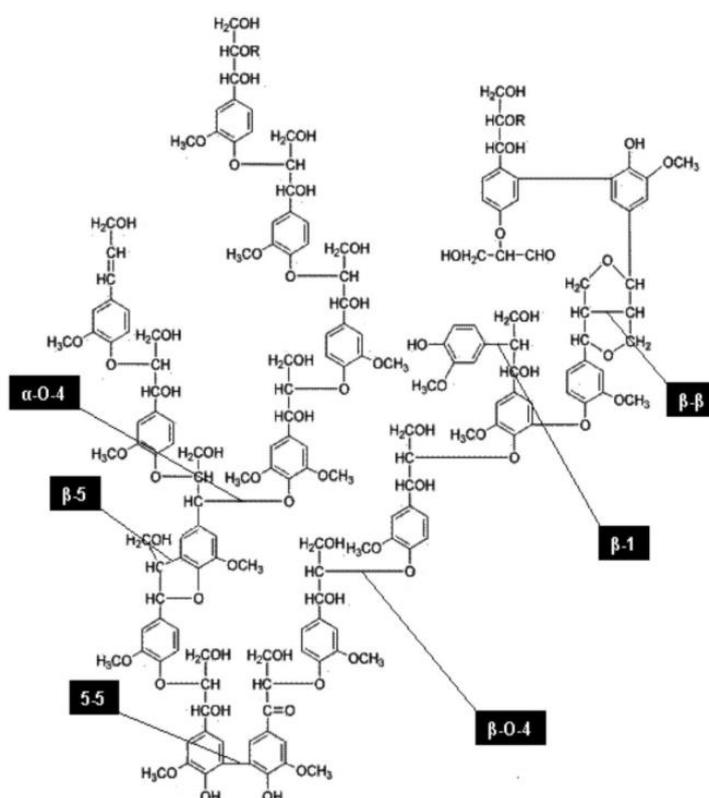


Figura 6 - Representação das unidades básicas que constituem a lignina e seus principais tipos de ligações (Lignina de madeira de coníferas) (Carvalho *et al.* 2009)

É considerado o terceiro maior constituinte da parede celular, e diferentemente da celulose e da hemicelulose, a lignina não forma cadeia. Esse polímero confere rigidez e impermeabilidade à membrana, apresenta funções mecânicas de sustentação e reduz a digestibilidade de material vegetal por animais. O polímero de lignina é altamente resistente à degradação química e biológica devido a sua estrutura molecular complexa e essas características aumentam ainda a limitação no processo de conversão da biomassa (Tuomela *et al.*, 2000; Basso *et al.*, 2010). *Basidiomicetos* e alguns

Ascomycetos são os fungos que, em sua maioria, são capazes de degradar a lignina. Na natureza essa degradação ocorre através da produção e do sinergismo das enzimas lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase que são as três principais enzimas estudadas (Tuomela *et al.*, 2000).

2 ENZIMAS

O homem utiliza-se de enzimas para catalisar inúmeras reações há muito tempo (ex: produção de vinho, pão e queijo a.C.) apesar de não se conhecer o mecanismo pelo qual as reações aconteciam nesses processos de produção naquela época. Com o desenvolvimento sob o conhecimento da natureza das enzimas, extratos obtidos a partir de tecidos animais ou vegetais, bactérias, fungos e leveduras culminaram em aprimoramento para as aplicações técnicas enzimáticas. Sendo desenvolvidos processos técnicos para a produção de enzimas microbianas em escala comercial, por reconhecer-se que as enzimas têm composição protéica e são biocatalisadores responsáveis por uma gama de reações ocorrentes nas células vivas (Spier, 2005).

As vantagens do uso de enzimas ao invés de produtos químicos são a alta eficiência de conversão, a ausência de perda de substrato devido às modificações químicas, são de baixo consumo energético, possuem baixa toxicidade e são altamente específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de variados tipos de resíduos sem o uso de altas temperaturas, solventes orgânicos e extremos de pH, oferecendo, ao mesmo tempo, maior especificidade na reação, pureza no produto e redução no impacto ambiental (Mussatto *et al.*, 2007).

Acredita-se que um dos principais fatores que controlam a biodegradação é a disponibilidade da celulose e da hemicelulose para ser degradada por estas enzimas. Os fungos empregam diferentes mecanismos para romper essa barreira de parede celular, e mesmo assim muitos não são capazes de degradá-la. Esta ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes dos materiais lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos envolvidos (Aguiar e Ferraz, 2011).

2.1 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

As celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de promover a hidrólise de materiais celulósicos, sendo biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de glicose, que por sua vez, apresenta enorme interesse industrial (Castro e Pereira Jr., 2010).

Pertencentes à família das glicohidrolases (EC 3.2), as celulasas são classificadas por suas diferentes formas de ação:

1. As endoglucanases (endo- β -1,4-glucanases, carboximetilcelulasas, EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar o processo de hidrólise da molécula de celulose. Hidrolisam as regiões internas da parte amorfa, clivando ligações β -1,4-D-glicosídicas liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novas extremidades redutoras e não-redutoras resultando na redução no tamanho da cadeia e grau de polimerização. Sua atividade diminui com o encurtamento da cadeia de celulose (Bhat e Bhat, 1997; Lynd *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006).
2. As exoglucanases (exo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.91) atuam de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias da celulose, podendo liberar tanto glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolases) como produtos principais. Atuam nas extremidades da molécula de celulose em sua região cristalina, liberando unidades de celobiose, aumentando a taxa de hidrólise por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (Zhang e Lynd, 2004; Cao e Tan, 2002). As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Elas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outra enzima do complexo celulolítico, a β -glicosidade (Bon *et al.*, 2008).
3. As β -1,4-glicosidases (celobiasas, EC 3.2.1.21) finalizam a despolimerização da celulose por hidrolizarem celobiose e oligossacarídeos solúveis liberando glicose. Dessa forma, além de aumentarem o rendimento total da formação de glicose, também contribuem para a taxa global do processo consumindo a celobiose, que é um inibidor de endoglucanase e exoglucanase (Castro e Pereira Jr., 2010).

As enzimas celulolíticas, quando atuam em conjunto apresentam um rendimento melhor e o sinergismo dessas três enzimas pode ser observado na Figura 7.

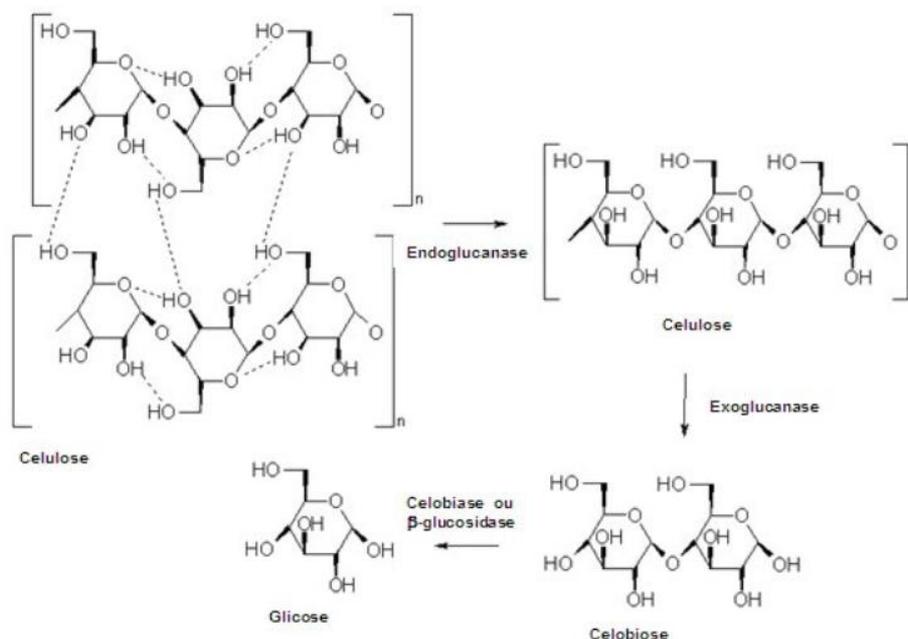


Figura 7 - Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases na degradação da estrutura da celulose (Farinas, 2011)

Apesar de existirem várias espécies no reino Fungi capazes de crescer e degradar celulose, poucos são os fungos capazes de sintetizar um sistema enzimático completo que efetivamente hidrolise materiais e que produzem enzimas em quantidade e características desejáveis, o que inclui a estabilidade e atividade em alta temperatura com atuação em ampla faixa de pH e que não sejam susceptíveis à inibição pelo produto (Qin *et al.*, 2010). De acordo com Linardi (1998), os melhores produtores encontram-se em espécies pertencentes aos gêneros: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Curvallaria*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phoma*, *Saprolegnia*, *Sporotrichium* e *Stachybotris*.

Estudos demonstram que celulasas fúngicas apresentam temperatura ótima entre 37 e 80 °C e uma massa molar entre 35 e 250 kDa. Mostraram pH ótimo entre 3,5 e 7,0 e ponto isoelétrico médio (pI) ácido próximo a 5 (Castro e Pereira Jr., 2010). As celulasas podem atingir um intervalo de 34 kDa a 250 kDa, pois podem ser sintetizadas como monômeros ou na forma de estrutura quaternárias constituídas por várias unidades peptídicas (Van Tilbeurgh e Claeysens, 1985). Ncube *et al.* (2012) analisaram a produção de CMCase e xilanase pelo fungo *Aspergillus niger* utilizando a torta de semente de pinhão manso e verificaram, através de zimograma, seis tipos de celulasas com as massas moleculares variando entre 20 a 43 kDa e apenas uma xilanase com

massa molecular de 31 kDa. Rodrigues (2014) purificou um complexo celulásico de 3 endocelulases com massas moleculares de 35,9 kDa, 42 kDa e 52,7 kDa. Sendo este termoestável (50-75 °C) e apresentando atividades em pH ácido (3,5 - 5,5).

2.2 ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS

As hemicelulases são frequentemente classificadas de acordo com o seu modo de ação em diferentes substratos:

1. As endoxilanases (endo-1,4- β -D-xilanases, EC 3.2.1.8) são as principais enzimas envolvidas na degradação de hemicelulases. Clivam aleatoriamente ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando diminuição do grau de polimerização do substrato, produzindo xilooligômeros e xilobiose; que por sua vez são hidrolisados por β -xilosidases (EC 3.2.1.37) que liberam xilose a partir de suas extremidades não redutoras. As xilanases são inibidas por altas concentrações de seus produtos, uma das funções das β -xilosidases é diminuir a inibição causada pela concentração de xilooligossacarídeos, aumentando a eficiência da degradação (Subramaniyan e Prema, 2002; Polizeli *et al.*, 2005).
2. Podem ser necessárias enzimas auxiliares para a remoção das cadeias laterais deste polímero que requerem a enzima específica para o grupo a ser hidrolisado. α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que removem ramificações de L-arabinose presentes em arabinoxilanas e glicuronoarabinoxilanas; α -glicuronidase (EC 3.2.1.131) que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano; α -galactosidases (EC 3.2.1.22) que atuam juntamente com manosidases, mananases e outras enzimas para degradação dos demais polímeros; acetilxilana esterase (EC 3.1.1.6) que removem grupos acetil presentes; feruloil esterase (EC 3.1.1.73) e coumaroil esterase (EC 3.1.1.-) que clivam na xilana as ligações ester entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido p-coumárico, respectivamente (Jovanovic *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2005; Polizeli *et al.*, 2005).

O sinergismo entre as enzimas xilanolíticas aumentam a susceptibilidade do polímero de xilana ao ataque enzimático como ilustrado na Figura 8.

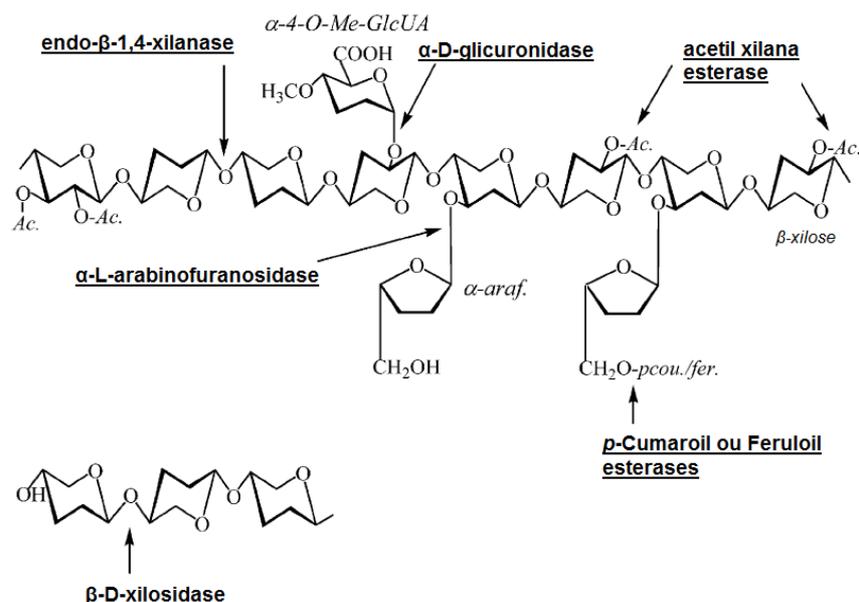


Figura 8 - Estrutura hipotética da xilana e as enzimas envolvidas em sua degradação (Collins *et al.*, 2005)

Pertencentes à família das glicosil hidrolases (GHs), as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) são glicosidases que hidrolisam as ligações β -1,4-D-xilosídicas na xilana. Também conhecidas como xilanase, endo-xilanase, 1,4- β -D-xilana-xilanohidrolase, endo-1,4- β -D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilanaase elas são um largo grupo de enzimas envolvidas na produção de xilose; e produzidas por vários organismos incluindo bactéria, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes (Collins *et al.*, 2005).

A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de degradar as cadeias laterais. A hidrólise de diferentes xilanases por xilanases rende variados produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xiloses, xilobioses, xilotrioses e xilooligossacarídeos liberados. Dessa forma, a produção de múltiplas xilanases de origem microbiana já foi documentada, variando as suas especificidades e tendo sinergismo no processo de degradação da hemicelulose (Moreira *et al.*, 2008).

Classificam-se majoritariamente em duas famílias de GHs: Família 10 (F) e família 11(G), apesar de enzimas com atividade xilanólítica também serem relatadas em outras famílias, como 5, 7, 8, 9, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62. Esse fato pode explicar a existência de enzimas bifuncionais (apresentem dois domínios catalíticos) ou enzimas que apresentam atividade xilanólítica residual (Collins *et al.*, 2005; Uday *et al.*, 2016).

As xilanases da Família 10 consistem em sua maioria de endo-1,4- β -xilanases, contendo também endo-1,3- β -xilanases e celobiohidrolases. Podem apresentar especificidade para outros substratos além da xilana, no entanto, ocorre uma redução da eficiência catalítica. Têm, em geral, alto peso molecular, baixo ponto isoelétrico e tendem a formar baixo grau de polimerização de oligossacarídeos (Collins *et al.*, 2005). Além disso, apresentam 4 ou 5 sítios de ligação aparentemente menos profundos que os da família 11. Este fato, junto com uma possível maior flexibilidade conformacional devido ao alto peso molecular, quando comparadas às enzimas menores, pode contribuir para a menor especificidade ao substrato das xilanases da família 10 (Biely *et al.*, 1997).

Já as xilanases da Família 11, são denominadas “verdadeiras”, devido à sua exclusividade por serem ativas em substratos que contêm o resíduo D-xilose. Seus domínios catalíticos são formados principalmente de folhas β torcidas que protegem o sítio catalítico. É uma família de enzimas monoespecíficas, consistindo somente de xilanases. Gerando assim produtos que podem ser hidrolisados, posteriormente, por enzimas da família 10. As enzimas da família 11 são geralmente caracterizadas por baixo peso molecular, alto valor de ponto isoelétrico e uma estrutura de folhas β (Collins *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que mananases fúngicas apresentam temperatura ótima entre 50 e 92 °C e uma massa molar entre 20 e 65 kDa. Mostraram pH ótimo entre 3,0 e 6,0 e ponto isoelétrico (pI) ácido entre 3,5 e 5,5, sendo poucas com atividade em pH acima de 9,0 (Xu *et al.*, 2002). Já as xilanases microbianas são proteínas com massa molecular na faixa de 8 a 145 kDa. Usualmente estáveis numa faixa de pH entre 3 a 10 e o pH ótimo de 4 a 7 (Kulkarni *et al.*, 1999). No trabalho de He *et al.* (2015), foi purificada uma xilanase obtida de *Aspergillus oryzae* com peso molecular de 33,67 kDa com pH ótimo 6,0 e temperatura ótima de 65 °C. Moreira *et al.* (2013), também purificou xilanases (24,3 e 23,6 kDa) de *Aspergillus terreus* com pH ótimo 6 e 5 e temperatura ótima 50 e 45 °C, respectivamente. No trabalho de Sandrim *et al.* (2005), uma xilanase foi purificada de *Aspergillus caespitosus* com massa molecular estimada de 17,7 kDa com pH e temperatura ótima de 5,5 - 6,5 e 50 - 55°C, respectivamente.

2.3 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Desde muito tempo produtos biotecnológicos eram produzidos por meio da utilização de enzimas em técnicas artesanais, desconhecendo-se, porém, os mecanismos envolvidos nos processos de fabricação, seja ela para produção de alimentos (queijo, cerveja, vinho e vinagre) ou mercadorias como couro, índigo e linho. Somente a partir do século XVII, iniciaram-se os estudos da biotecnologia esclarecendo os fenômenos que ocorriam nas produções e possibilitando o avanço da ciência e aplicabilidade das enzimas em processos industriais (Kirk *et al.*, 2002; Vitolo e Pessoa, 2015).

O mercado da utilização de enzimas como catalisadores nos mais diversos ramos industriais encontra-se basicamente dividido em três segmentos: enzimas técnicas (detergente, amido, têxtil, bioetanol, polpa de papel e celulose e couro), alimentação e bebidas e alimentação animal (Kirk *et al.*, 2002; Mussatto *et al.*, 2007), sendo esta utilização uma tendência cada vez maior em todo o mundo.

O mercado mundial de enzimas na indústria de alimentos foi estimado em US\$ 4 bilhões em 2015. Onde o Brasil encontra-se com uma estimativa de US\$ 240 milhões, o que corresponde a aproximadamente 6% do mercado global. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), a indústria de produtos alimentícios e bebidas teve um faturamento de R\$ 562 bilhões em 2015, o que corresponde ao 9,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil (ABIA, 2016). As hemicelulases são enzimas que contribuem para as vendas globais de enzimas alimentares.

No mercado mundial, representando 5% das enzimas industriais encontram-se as enzimas com ação hidrolítica, que atuam na degradação de várias substâncias naturais. Sendo as proteases, representante do maior grupo de enzimas usadas industrialmente devido seu extensivo uso em indústrias de detergentes e em laticínios. Em segundo lugar, vêm as glicosidases que são utilizadas nas indústrias têxteis, alimentícias, de detergentes. E representando 20% desse mercado encontram-se as celulases juntamente com xilanases e pectinases (Kirk *et al.*, 2002; Polizeli *et al.*, 2005).

Aliando-se o fato de existir uma enorme variedade de enzimas e diversos ramos de aplicabilidade, juntamente à necessidade da utilização de processos industriais menos agressivos ao meio ambiente justifica-se sua pesquisa e produção demonstrando assim o potencial da aplicação enzimática microbiana (Mussatto *et al.*, 2007). Surge, portanto,

espaço para aplicação de celulases e hemicelulases. Produzidas por uma diversidade de microrganismos em condições de aero e anaerobiose e em diferentes temperaturas, as celulases são fundamentais para a obtenção de açúcares a partir da celulose como fonte de carbono.

A busca por novos produtores de enzimas e novas aplicações seguem o fluxo contínuo da demanda do mercado por novas tecnologias aliadas ao baixo custo e alta produtividade do processo. Levando dessa maneira ao desenvolvimento dos processos de fermentação e avanços da biotecnologia que permitiu a produção, purificação e caracterização de enzimas e sua aplicação, inclusive em larga escala. Foi possível uma expansão do seu uso industrial quando houve o desenvolvimento que viabilizou a introdução das enzimas em processos e produtos industriais, também sendo possível adaptar estas moléculas a novas condições do processo (Kirk *et al.*, 2002).

Para possuir uma ampla faixa de aplicações, a caracterização enzimática é importante para sua aplicação biotecnológica. A utilização das celulases e hemicelulases teve seu uso mais intenso primeiro na indústria de alimentação animal, seguido na aplicação na indústria de alimentos. Subsequentemente, estas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e lavanderia (Bhat, 2000). Podendo, ser aplicadas na produção de alimentos e bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos; na indústria têxtil, em processos de biopolimento e bioestonagem; indústria de polpa e papel; produção de bioetanol e aditivos para ração animal (Castro e Pereira Jr., 2010).

As enzimas xilanolíticas, por sua vez, apresentam aplicações na conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos e combustíveis, como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft; nas indústrias de alimentos e bebidas, indústria têxtil e elaboração de ração animal, além de deixar a fibra de celulose mais acessível ao ataque enzimático das celulases. Os monômeros de diferentes hemiceluloses são úteis para a produção de diferentes antibióticos, álcoois, reagentes químicos e combustíveis (Xin e He, 2013; Heck *et al.* 2002).

Celulases e hemicelulases, como as estudadas no presente trabalho, têm uma ampla aplicação nas indústrias alimentícias. Essas enzimas podem ser utilizadas na extração e clarificação de sucos, melhora na textura, viscosidade, e incremento da recuperação de aromas, óleos essenciais, sais minerais e vitaminas, qualidade e vida útil

do produto (Polizeli *et al.*, 2005). As xilanases também têm sido utilizadas para o aperfeiçoamento da qualidade de massas, pães, biscoitos, tortas e outros produtos de padaria facilitando a manipulação das massas, volume dos pães, textura e estabilidade e seu sabor final (Camacho e Aguilar, 2003). Já as β -glicosidases possuem capacidade de liberar compostos aromáticos durante a fabricação do vinho, como terpenos, compostos fenólicos de capacidade antioxidante, nutracêutica e flavorizante, melhorando assim as qualidades organolépticas (Daroit *et al.*, 2007).

Em ruminantes a utilização de celulasas em conjunto com pectinases e hemicelulasas, vêm da necessidade de aumentar a digestão das plantas, base da alimentação dos animais, e assim poder incrementar a qualidade e digestibilidade da ração, já que a hemicelulose é uma fibra insolúvel e a sua ingestão na forma integral, possui pouco valor nutricional para os animais ruminantes (Bhat, 2000).

Na indústria têxtil, as celulasas são utilizadas para a remoção do excesso de corantes em tecidos *jeans*. Atuam na remoção de microfibras desfiadas de algodão, formadas depois de repetidas lavagens do tecido, restauração da cor e brilho de roupas de algodão (Bhat, 2000; Kirk *et al.*, 2002).

Nas indústrias de papel e celulose, xilanase é a hemicelulase que tem maior importância. Esta enzima pode atuar no processo de branqueamento do papel auxiliando no desligamento da lignina da fibra. Isso faz com que o material fique mais suscetível ao tratamento químico, diminuindo assim, a utilização de cloro durante o tratamento. Mananases foram também avaliadas em combinação com xilanases em estudos de biobranqueamento da polpa celulósica, levando a uma redução significativa na quantidade de produtos químicos necessários para o branqueamento (Bhat, 2000).

Existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (Zhang *et al.*, 2006). As β -glicosidases têm função importante na atuação do complexo de celulasas na degradação de biomassa de resíduos agrícolas, pois a enzima hidrolisa a celobiose em glicose, a partir da qual pode ser produzido o combustível etanol. Para tal são especialmente importantes aquelas β -glicosidases que não são afetadas pela concentração do produto, ou seja, são ativas a altas concentrações de glicose, e aquelas ativas em valores de pH ácidos (Sonia *et al.*, 2008).

3 BIOMAS

3.1 CERRADO

O Brasil possui enorme diversidade biológica. Sua grande extensão territorial com diferenças ambientais promove diversas condições para adaptação de animais, plantas e microrganismos, estando em posição estratégica na exploração racional e sustentável de novos produtos com valor agregado provenientes de produtos naturais (Pinto *et al.*, 2002; Basso *et al.*, 2005). O uso da natureza como fonte para a descoberta de novos produtos tem grandes vantagens, e culmina na descoberta de fontes de grande número de produtos naturais que foram pouco estudadas, como organismos marinhos e microrganismos.

A pesquisa por substâncias presentes em fontes naturais se destaca como uma das mais importantes entre as estratégias utilizadas em todo mundo para o isolamento e identificação de substâncias com potencial de comercialização, sendo as plantas e os microrganismos cultiváveis as principais fontes de moléculas biologicamente ativas (Pupo *et al.*, 2007).

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade no mundo, pois se calcula que nada menos do que 10% de toda a biota terrestre encontram-se no país (Machado *et al.*, 2004). O Cerrado brasileiro, a maior e a mais rica savana tropical do mundo, com uma área de aproximadamente 2 milhões de Km², cobrindo 25% do seu território, faz parte desta vasta diversidade biológica (Silva e Bates, 2002; Bustamante *et al.*, 2004). Com isso, enzimas, extratos vegetais, suas frações e produtos isolados têm sido objeto de pesquisa, no entanto, apesar de ser o segundo maior bioma brasileiro com uma enorme variedade de espécies vegetais, apresenta até então poucos estudos quanto à sua exploração neste quesito.

O Brasil abriga cerca de 55 mil espécies de plantas superiores (aproximadamente 22% do total mundial), compondo um cenário de exuberante diversidade biológica. Entretanto, o potencial de produtos oriundos da microbiota deste bioma continua pouco explorado e o interesse por novos compostos tem crescido nos últimos anos (Ministério do MA SBF, 2002).

A nomenclatura Cerrado é utilizado para designar o conjunto de ecossistemas

(savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central. Seu clima é estacional, caracterizado por um período chuvoso que ocorre nos meses de outubro a março, seguido um período seco, que estende-se aos meses de abril a setembro, gerando precipitação média anual de 1.500 mm. As temperaturas médias anuais giram em torno de 18 °C a 28 °C. Os solos da maior parte da área do cerrado são distróficos, com baixo pH e disponibilidade de cálcio e magnésio, e alto teor de alumínio (Klink e Machado, 2005; Ratter *et al.*, 1997).

A riqueza florística do Cerrado brasileiro e o alto nível de endemismo culminam para a elevada biodiversidade de espécies de fungos encontradas nesse bioma. Por desempenhar funções essenciais (decomposição e ciclagem de nutrientes, além de diversas interações com outros organismos) os fungos do solo tornam-se cruciais para a manutenção desses ecossistemas (Siqueira, 2010).

Já os fungos endofíticos, são caracterizados por colonizar os tecidos das plantas de forma simbiótica, sendo assim responsáveis pela grande quantidade de metabólitos secundários produzidos, também já foram isolados de espécies vegetais características do Cerrado brasileiro (Souza *et al.*, 2004; Mesquita, 2011; Chapla *et al.*, 2013). Almeida (2015) avaliou a produção de L-Asparaginase por fungos isolados do cerrado. Cunha (2016) e Martarello (2016) produziram e purificaram uma xilanase e uma β -galactosidase, respectivamente, obtidas por *Aspergillus foetidus* isolados do cerrado. Souza (2015) também produziu protease através de *A. foetidus* isolado do cerrado do centro-oeste brasileiro.

Dessa forma, a identificação das espécies vegetais presentes no Cerrado brasileiro poderá contribuir para a promoção de uma exploração racional e auto-sustentável deste bioma, já que estas plantas são fontes de compostos com potencial farmacológico e biotecnológico (Albernaz *et al.*, 2010). A diversidade química presente e sua vegetação deve-se a diferentes maneiras de adaptação às condições climáticas, de solo e geográficas (Machado *et al.*, 2004). Por isso, sua exploração na procura de produtos naturais com atividade biotecnológica surge como uma boa perspectiva abrangendo às suas atividades e a seus microrganismos simbióticos.

3.2 COSTA MARINHA

Os microrganismos marinhos podem ser encontrados em colunas d'água, crescendo em superfícies ou ainda realizando simbiose de vida livre, elevando, dessa forma, a riqueza microbiana nestes ecossistemas. São os principais decompositores de materiais lignocelulósicos e diferentes espécies de animais nesse habitat (Hawksworth, 1991). Entretanto, estudos com este grupo microbiano são ainda escassos no que diz respeito às suas funções ecológicas, origem evolutiva e como fontes de metabólitos que podem ser úteis para bioprodução, agregando valor à cadeia produtiva (Osterhage *et al.*, 2002; Klemke *et al.*, 2004).

São separados em espécies obrigatórias (crescem e esporulam exclusivamente na água do mar, e seus esporos são capazes de germinar neste ambiente) ou facultativas (são terrestres mas possuem adaptações que permitem seu crescimento no ambiente marinho) (Kohlmeyer e Kohlmeyer, 1979). Em 1948 foi descrita a primeira espécie de fungo marinho facultativo: *Phaeosphaeria typharus*, e somente em 1969 foi descrita a espécie *Halothia posidoniae*, que ficou conhecida como o primeiro fungo marinho obrigatório (Loque, 2009).

Estes microrganismos podem estar associados a diferentes macrorganismos marinhos, sendo essa associação uma característica comum nesse habitat. Exemplos de cianobactérias, fungos e bactérias são conhecidos por manterem relações simbióticas ou de parasitismo com corais e esponjas, gerando um conglomerado em miniatura de vários organismos. Porém, para muitos dos organismos marinhos, falta estudo e elucidação sobre a natureza destas associações (Loque, 2009; Barato, 2014).

Estes fungos, podem, portanto, ser obtidos de esponjas, algas, madeiras, tunicados, sedimentos, moluscos, corais, plantas e peixes. Fungos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Cladosporium*, pertencentes a gêneros cosmopolitas, são rotineiramente isoladas da superfície, tecidos internos e cavidades de algas, esponjas, ascídias e outros invertebrados marinhos. Em alguns casos, como o da esponja *Aplysina aerophoba*, a biomassa do organismo é composta por até 40% de microrganismos (Barato, 2014).

Exemplos de gêneros facultativos (por ocorrerem também em ambientes terrestres) foram relatados por König *et al.* (2006) *Gymnascella*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Cochliobolus* e *Curvularia* associados a invertebrados marinhos como esponjas e cnidários. Sendo que muitos destes fungos parecem estar completamente adaptados ao ambiente marinho desenvolvendo-se até melhor em água do mar. Entretanto, os estudos sobre microrganismos marinhos ao longo da costa Brasileira são mínimos (Menezes *et al.*, 2010; Passarini *et al.*, 2013).

Mbata (2008) isolou e identificou fungos filamentosos de águas marinhas profundas e hiper salinas, entres eles, *Gymnascella*, *Eurotium* sp., *Chaetomium globosum*, *Aspergillus versicolor*, *Hortaea werneckii* e *Aureobasidium pullulans*. Fungos endofíticos marinhos também foram isolados, como *Penicillium critinum* e *Apiospora montagnei* associados a algas vermelhas e *Fusarium* sp., associado a algas verdes (Raghukumar, 2008). O fungo *Penicillium chrysogenum*, isolado de algas vermelhas tem se destacado pela produção de metabólicos ativos contra o fungo patogênico *Alternaria brassicae* (Gao *et al.*, 2011).

Ruegger e Tornisielo (2004) isolaram fungos de solo e da água, testou a atividade das celulasas e constatou que 45% dos isolados produziram estes compostos catalíticos. As espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* também são citadas como ótimas produtoras dessas enzimas e são amplamente utilizadas na indústria. Garcia (2011) obteve fungos marinhos que apresentaram atividade lipolítica expressiva em pH alcalino para cepas de *Fusarium* sp., *Aspergillus parasiticus* e *Trichoderma* sp. Chi *et al.* (2007) isolaram *Aureobasidium pullulas* das águas salinas do Mar Amarelo na China, sendo importante produtor de proteases alcalinas e amilases. *Aspergillus niger* isolados do ambiente marinho, mostraram alta atividade de xinalase alcalina, e espécies de *Penicillium*, isolados do mar amarelo da China, também apresentaram alta capacidade de secretar esta enzima (Zhang e Kim, 2010). *Mucor* sp. isolado por Mohapatra *et al.*, (1998) associado a esponjas do gênero *Spirastrella* sp. apresentou um novo tipo de amilase. Dessa forma, tendo em vista a crescente demanda por complexos enzimáticos com potencial biotecnológico estes estudos corroboram com a demonstração que o ambiente marinho pode ser importante fonte de novos compostos bioativos.

3.3 ANTÁRTICA

Situado na região polar austral, o continente Antártico é considerado o mais frio, elevado, seco e inóspito da Terra. Seu volume de gelo compreende 70% de água doce, sendo o seu território recoberto por uma camada de gelo e rodeado por uma camada de mar congelado e suas temperaturas podendo chegar a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante os meses de inverno. São consideradas extremófilas as formas de vida que habitam esses ambientes extremos de condições naturais terrestres (Tindall, 2004).

É um continente que possui características inóspitas como a temperatura média mensal inferior a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, frequentes ciclos de congelamento e degelo, elevada incidência de radiação e ventos fortes, limitando assim o desenvolvimento de qualquer forma de vida (Onofri *et al.*, 2007; D'elia, 2008). Por isso sua fauna e flora são escassos, sendo sua vegetação limitada a musgos, líquens e algas, e somente os animais mais adaptados como peixes, aves e mamíferos marinhos conseguem sobreviver na região. Quanto aos microrganismos, podem ser observados apenas aqueles adaptados às condições extremas do continente Antártico (Da Silva, 2007).

Devido ao fato de pouco se conhecer sobre a biodiversidade e biologia dos microrganismos devirados de ambientes como o Antártico é que se tem elevado o interesses a respeito dos mesmos. Em prol de sua sobrevivência às condições adversas e de estresse desses ecossistemas resultaram em adaptações fisiológicas dos microrganismos que habitam esses ambientes, incluindo produção de melanina, estabilidade e fluidez da membrana plasmática e aumento da flexibilidade das enzimas (contém menor quantidade de pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto). Além disso, microrganismos que se desenvolvem em ambientes extremos produzem enzimas que são adaptadas ao frio e que pode vir a ser importante para uma variedade de aplicações industriais (Georlette *et al.*, 2004; D'elia, 2008).

Os microrganismos têm papel fundamental no transporte de energia e matéria orgânica já que muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica, devido às condições extremas e restritivas existentes ali. A diversidade é tão limitada que em alguns sistemas, os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares chegam a ser formadas exclusivamente por microrganismos, como nos solos minerais dos desertos frios e em porções mais profundas de gelo glacial

(Vincent, 2000; Clarke, 2003). Dessa forma, a procura alternativa de fungos produtores de enzimas, entre os fungos que crescem em condições extremas de temperatura e umidade, é atraente, pois estes são estimulados a expressar vários metabólitos para promover a adaptação e sobrevivência nessas condições (Sun *et al.*, 2011).

Devido ao baixo conhecimento de endemicidade dos fungos da Antártica e suas adaptações, as comunidades microbianas antárticas são temas de grande interesse por estarem sujeitas a longos períodos de isolamento com baixos níveis de perturbação. Portanto, o conhecimento da diversidade fúngica e o potencial biotecnológico destes microrganismos é estratégico e de extrema relevância para o conhecimento da dinâmica dos ecossistemas extremos e para a obtenção de compostos naturais que gerem valor agregado à cadeia produtiva (Pikuta *et al.*, 2007; Ragueneis *et al.*, 1997).

De acordo com Maheshwari *et al.* (2000) os isolados *Chaetomiun termophile*, o gênero *Humicola*, *Thermoascus aurantiacus*, *Taloromuces emersonii*, *Sporotrichum termophile* estão sendo pesquisados, devido a sua capacidade de secretar enzimas que degradam a celulose em temperaturas extremas e possuem melhor estabilidade térmica. Além de conseguirem desenvolver-se em uma variedade de substratos com menos riscos de contaminação por outros microrganismos, eles são opções para a produção de celulases termotolerantes, além de sintetizarem celulases resistentes à pHs de alcalinidade e acidez elevados (Bhat e Bhat, 1997).

A nomenclatura psicrófilico e psicrotrófico é utilizada para microrganismos que se desenvolvem em temperaturas frias. Os fungos psicrófilicos são capazes de crescer a 0 °C e possuem crescimento ótimo em temperaturas inferiores a 15 °C e temperatura máxima de crescimento de até 20 °C. Já os fungos denominados psicrotróficos (ou psicrotolerantes) podem crescer a 0 °C mas sua temperatura máxima de crescimento pode estar acima de 20 °C. A maioria dos microrganismos recuperados de amostras das regiões Ártica e Antártica são psicrotolerantes (Ruisi, 2007).

O principal desafio enfrentado por microrganismos psicrófilos é manter uma taxa adequada para reações químicas catalisadas por enzimas que estão envolvidas em processos celulares essenciais, tendo em vista que as baixas temperaturas inibem fortemente essas taxas de reações. Porém, isto é conseguido através da sintetização de enzimas adaptadas ao frio e lábil ao calor, podendo ter atividade até 10 vezes maior em

baixas temperaturas do que por seus homólogos mesófilos (Feller e Gerday, 2003). Sendo assim, para uma posterior aplicação destas no setor biotecnológico, a compreensão das relações entre a estabilidade térmica, flexibilidade e eficiência catalítica das enzimas adaptadas ao frio é de fundamental importância (Georlette *et al.*, 2004; D'amico *et al.*, 2006).

4 FUNGOS FILAMENTOSOS

O reino Fungi consiste em um grupo de organismos eucarióticos que inclui microrganismos tais como leveduras e fungos filamentosos. Divide-se nos Filos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (Leite, 2010). Mais de 70.000 espécies de fungos já foram descritas, mas estima-se que existam pelo menos 1,5 milhões de espécies no mundo, ou seja apenas 5% são conhecidos (Galvagno e Forchiassin, 2010; Suryanarayanan *et al.*, 2009). São seres eucarióticos (possuem membrana nuclear) sendo unicelulares, como as leveduras, ou pluricelulares como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (Tortora *et al.*, 2005). São amplamente distribuídos na natureza, encontrados em vegetais, animais e no solo, podendo ter hábitos saprófitos, parasitas ou simbióticos e são fundamentais na ciclagem de nutrientes na biosfera (Grimm *et al.*, 2005).

Os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente pela fragmentação de suas hifas, e tanto as reproduções sexuada e assexuada ocorrem pela formação de esporos, sendo sua identificação normalmente feita através do tipo desses esporos. Estes são, completamente diferentes dos endosporos de bactérias, e logo após um fungo filamentoso formar um esporo, o mesmo se separa da célula parental e germina originando um novo fungo filamentoso (Tortora *et al.*, 2005).

De acordo com as condições físico-químicas do meio ambiente que os fungos estão inseridos, seu crescimento, variabilidade e flexibilidade metabólica podem variar. Eles são capazes de modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio, como fonte de energia e como elementos básicos para seu crescimento e reprodução, o que permite sua ubiquidade. Sua nutrição é do tipo absorptiva, e ocorre através da produção extracelular de sistemas enzimáticos por eles produzido que

degradam macromoléculas em moléculas menores, possibilitando a incorporação em seu organismo como fonte de energia para seu crescimento (Lopes, 2011; Jaramillo, 2014; Galvagno e Forchiassin, 2010).

Através da capacidade de secretarem enzimas extracelulares e pela sua particular forma de crescimento, os fungos filamentosos se adaptam ao aproveitamento de uma ampla gama de substratos. Existem polímeros em abundância que podem ser aproveitados como fontes nutricionais, principalmente resíduos de origem vegetal. Os componentes dos materiais lignocelulósicos durante a decomposição fúngica são progressivamente despolimerizados por complexos enzimáticos. As células alargadas de crescimento apical, permitem que os fungos filamentosos colonizem a superfície do substrato e penetrem dentro do mesmo, em busca de nutrientes, facilitando a utilização de resíduos para produção de substâncias de interesse como as enzimas. (Galvagno e Forchiassin, 2010; Arantes e Milagres, 2009).

Essa eficiência na degradação de substratos contribui para a grande capacidade adaptativa colonizando diferentes ambientes com variações de temperatura e pH, umidade e nutrientes. Além desses fatores seletivos, as variações filogenéticas (composição de aminoácidos, mecanismos de manutenção e estabilização da estrutura) também devem ser consideradas para explicar a produção de diferentes enzimas por fungos de uma mesma espécie (Moreira, 2013; Gomes *et al.*, 2007).

Em caso de fungos isolados do solo, sabe-se que o tipo de solo também influencia a estrutura das comunidades microbianas, em função de tamanho de partículas, pH, capacidade de troca de íons e o conteúdo de matéria orgânica, além dos compostos liberados pelas raízes das plantas (Garbeva *et al.*, 2004). O solo, em particular, é um nicho ecológico bastante explorado para microrganismos produzirem metabólitos biologicamente ativos, como antibióticos produzidos por bactérias (*Streptomice*) e fungos. Existe a necessidade de explorar diferentes tipos de solos, florestas tropicais, costas marinhas e mangues por serem interessantes na expectativa de encontrar microrganismos que sejam capazes de expressar enzimas com características industriais desejáveis. Sendo os microrganismos, dessa forma, cada vez mais explorados com uma boa perspectiva na busca inovadora de fontes enzimáticas.

Por serem organismos metabolicamente ativos, diversas espécies de fungos

filamentosos, que dão origem a compostos bioativos, são conhecidas e as pesquisas que visam o isolamento desses produtos são muito expressivas em todo o mundo, sendo explorados comercialmente como fontes produtoras de substâncias de interesse para as indústrias de medicamentos, alimentos e produtos agrícolas, como enzimas e fármacos (Sun, *et al.*, 2011). Uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, são capazes de produzir celulases e hemicelulases. Dentre eles, os fungos filamentosos são produtores particularmente interessantes de um ponto de vista industrial devido ao fato de secretarem as enzimas extracelularmente, eliminando a necessidade de lise celular (Hammel, 1997). Entre os melhores produtores dessas enzimas estão os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Lynd *et al.*, 2002).

4.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos são organismos importantes na procura de produtos com aplicação biotecnológica. Entre eles estão os fungos endofíticos, que, por sua vez, se caracterizam por colonizar os tecidos das plantas de forma simbiótica, gerando assim um grande quantidade de metabólitos secundários. Normalmente produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, em virtude da estreita interação metabólica com seus hospedeiros que resulta, em alguns casos, na capacidade de produção dos mesmos metabólitos. Essa capacidade pode ser explicada pela recombinação gênica sofrida pelos fungos durante o processo evolutivo ocorrido com a simbiose entre o fungo endofítico e a planta hospedeira (Gallo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006).

Os fungos endofíticos, pertencentes a várias ordens de fungos, colonizam de forma intracelular ou extracelular os tecidos vivos e internos das plantas, em uma relação de simbiose que varia ao limite da patogenicidade (Gallo *et al.*, 2007; Saikkonen *et al.*, 1998). Muitos desses microrganismos são capazes de produzir substâncias que impedem ataques de insetos, que deixam a planta com sabor desagradável ou ainda favorecendo o seu crescimento em ambientes hostis contribuindo, dessa forma, com a adaptação e seleção de várias espécies vegetais. As estratégias de invasão utilizadas pelos fungos endofíticos se assemelham às usadas por fungos fitopatogênicos através de feridas e do uso de enzimas hidrolíticas (lignocelulósicas) estes conseguem invadir o

tecido do hospedeiro colonizando-o (Alexopoulos *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006).

A possibilidade de manipulação genética e dos processos fermentativos de cepas dos fungos produtores, os tornam vantajosos para produção em maior quantidade do composto de interesse. Concomitantemente à vantagem de utilização de metabólitos e enzimas de origem microbiana quando comparada ao processo que utilizam subprodutos de origem vegetal por ser planejada de forma a evitar efeitos de sazonalidade de culturas, e ser mais versátil quanto à disponibilidade de matéria-prima (Takahashi e Lucas, 2008). Supõe-se que a relação evolutiva entre fungos endofíticos e seus hospedeiros provavelmente foi estabelecida desde o surgimento das plantas superiores, há milhares de anos atrás. Vale ressaltar que a compreensão de como ocorre a relação simbiótica é ainda limitada, apesar de que diversos estudos mostram a composição e diversidade desses fungos.

A busca pela produção dessas enzimas nos fungos endofíticos se justifica em sua semelhança com os fitopatogênicos e no mecanismo utilizado para inserção no tecido da planta. Para a busca por enzimas celulolíticas os fungos fitopatógenos são mais estudados e já apresentam muitos resultados descritos na literatura. Eles produzem maior quantidade de celulasas pois é esse seu mecanismo de fitopatogenicidade. Já os endofíticos apresentam essa produção de celulasas e principalmente de hemicelulasas também por esse mecanismo para se inserir no tecido vegetal. A vantagem, então, em sua utilização se dá pelo fato de eles serem menos estudados e abrir oportunidades de descoberta de novas espécies, ou enzimas diferentes com características bioquímicas diferentes. Já para a busca de produtores de celulasas dentre os fungos da Costa Marinha se justifica por eles as produzirem devido ao seu habitat para conseguirem invadir o interior de algas, esponjas, corais e plantas. E os fungos da Antártica são interessantes pela possibilidade de produção dessas enzimas em condições diferentes de temperaturas e encontrar características enzimáticas diversas das usuais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do Cerrado, Costa Marinha brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumprir o objetivo principal foram realizadas as seguintes etapas:

- Coleta de folhas de espécies vegetais presentes no bioma Cerrado do Distrito Federal e arredores;
- Isolamento de fungos endofíticos das folhas de plantas citadas;
- Avaliação da produção de celulasas e hemicelulasas após fermentação submersa;
- Avaliação da produção de celulasas e hemicelulasas após fermentação em estado sólido;
- Seleção de 9 cepas produtoras das enzimas hemicelulolíticas;
- Caracterização das hemicelulasas presentes nos meios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

LISTA DE REAGENTES

Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Xylan (birchwood), Xylan (beechwood), D(+)-Manose, p-Nitrofenol, Carboximetilcelulose, Manana, 4-nitrofenil- D- β -glicopiranosídeo (pNPG).

Vetec Quimica Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

Sulfato de magnésio, Hidróxido de sódio, Fosfato de sódio monobásico, Fosfato de sódio dibásico, Fosfato de potássio monobásico, Bissulfito de sódio, Ácido 3,5-dinitrosalicílico, Glicerol, Cloreto de Sódio.

HiMedia Laboratories Pvt. Lts. (Mumbai, India)

Extrato de levedura, Peptona.

Acumedia (Lansing, MI, USA)

Sabouraund dextrose agar.

Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (Diadema, SP, Brasil)

Glicose, Tartarato de sódio e potássio, Metanol, Ácido fosfórico.

Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Alemanha)

D(+)-Xilose, Tween 80.

LabSynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, Brasil)

Bicarbonato de sódio.

Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)

Coomassie Brilliant Blue G-250.

LISTA DE PREPARO DE SOLUÇÕES**Tampão Fosfato de Sódio 50mM pH 5,4 e 4,8**

Fosfato de sódio bibásico		4,108 g
Fosfato de sódio monobásico		2,036 g
Água destilada	q.s.p	1000 mL

Reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Ácido 3,5-dinitrosalicílico		10,6 g
Tartarato de sódio e potássio		306,0 g
Hidróxido de sódio		19,8 g
Bissulfito de sódio		8,3 g
Água destilada	q.s.p	1400 mL

Reagente de Bradford

Azul de Coomassie G-250		100 mg
Ácido fosfórico 85%		100 mL
Metanol 95%		50 mL
Água destilada	q.s.p	1000 mL

Solução de bicarbonato de sódio 10%

Bicarbonato de sódio		10 g
Água destilada	q.s.p.	100 mL

Solução Xilana 1,0%

Xilana birchwood/beechwood		1 g
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 5,4	q.s.p.	100 mL

Solução Manana 0,5%

Manana (<i>locust bean gum</i>)		0,5 g
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 5,4	q.s.p.	100 mL

Solução Carboximetilcelulose 0,44%

Carboximetilcelulose		0,44 g
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 5,4	q.s.p.	100 mL

Solução p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) 0,1%

p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo		0,1 g
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 4,8	q.s.p.	100 mL

4.1 ISOLAMENTO

As folhas foram coletadas no Campus Universitário Darcy Ribeiro/Universidade de Brasília - DF, Brasil, e arredores entre os meses de agosto a dezembro de 2014. A Tabela 1 apresenta as espécies vegetais usadas no isolamento dos fungos endofíticos.

Tabela 1. Nome científico das plantas, nome popular e código atribuído aos fungos isolados.

Nome científico	Nome Popular	Fungos isolados
<i>Sapindus saponaria</i>	Fruta-de-sabão	Ssp Br; Ssp P; Ssp B
<i>Morus nigra</i>	Amoreira-preta	Morus
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Jacareúba/Guanandi	CB01; CB02
<i>Eriotheca pubescens</i>	Paineira-do-cerrado	EP01; EP02; EP03; EP04
<i>Ouratea hexasperma</i>	Vassoura-de-bruxa	OH01; OH02; OH03; OH04; OH05
<i>Dalbergia miscolobium</i>	Caviúna-do-cerrado	DM01; DM02
<i>Pouteria torta</i>	Abiurana	PT01; PT02; PT03
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão	SADS01; SADS02
<i>Kielmeyera coriacea</i>	Pau-santo	KC01; KC02; KCS
<i>Solanum lycocarpum</i>	Lobeira	SL01; SLS
<i>Caryocar brasiliense</i>	Pequizeiro	PEQ01; PEQ02; PEQ03; PEQ04; PEQ05; PEQ06; PEQ07; PEQ08; PEQ09; PEQ10; PEQ11; PEQ12
<i>Tabebuia ochracea</i>	Ipê Amarelo	IPE01; IPE02; IPE03; IPE04; IPE05; IPE06
<i>Psidium guajava L.</i>	Goiabeira	GOI01; GOI02; GOI03; GOI04; GOI05; GOI06; GOI07; GOI08; GOI09; GOI10; GOI11; GOI12; GOI13

O procedimento de esterilização de superfície da folha iniciou-se com a lavagem em água corrente e detergente líquido, com cuidado para que o tecido não fosse rompido e, em seguida, cada folha foi imersa em etanol 70 °GL por 60 segundos. A seguir, as folhas foram imersas, em sequência, por 60, 90 e 180 segundos em três recipientes distintos contendo hipoclorito de sódio (teor de cloro ativo a 2 %), foram novamente mergulhadas em etanol 70 °GL por 60 segundos e lavadas por imersão com agitação por 30 segundos em três recipientes distintos contendo água destilada previamente esterilizada. O excesso de água foi retirado das folhas com ajuda de papel de filtro esterilizado.



Uma amostra da última água de lavagem das folhas foi utilizada para o controle negativo de crescimento microbiano. A impressão da folha também foi feita na placa de Petri para controle negativo de contaminação de superfície.

Fragmentos das folhas foram cortados com auxílio de uma tesoura esterilizada, foram depositados em uma placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 a 5 dias. Repiques das colônias isoladas foram retirados a medida que cresciam e inoculados em novas placas de Petri, sendo incubados a 30 °C por 7 dias (Mesquita, 2011). Todo o processo de repicagem e inoculação dos 58 fungos isolados foi realizado em uma câmara de fluxo laminar.

4.1.1 ORIGEM DOS FUNGOS DA COSTA MARINHA E ANTÁRTICA

Um total de 30 fungos isolados da Costa Marinha brasileira e 16 fungos isolados da Antártica depositados na Central de Recursos Microbianos da UNESP, foram gentilmente cedidos pela Profa.Dra Lara Durães Sette do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial da Universidade Estadual Paulista - Julio de Mesquita Filho - UNESP.

4.1.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Os fungos foram mantidos através de repiques periódicos em placa de Petri contendo meio de ágar Sabouraud dextrose. Incubados a 30 °C por 7 dias para as cepas do Cerrado e Costa Marinha, e incubados a 15 °C por 7 dias para as cepas da Antártica. Logo após foram preservados a -80 °C em criotubos, contendo glicerol 50% (v/v).

4.2 RESÍDUO LIGNOCELULOLÍTICO

4.2.1 ORIGEM DO RESÍDUO

A casca da soja é proveniente da Fazenda Três Pinheiros, em Planaltina - DF, Brasil, gentilmente cedidos pelo Dr. Félix Gonçalves de Siqueira - Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Agroenergia.

4.2.2 PRÉ-TRATAMENTO DA CASCA DE SOJA

A casca de soja foi autoclavada a 121 °C por 2 horas, com posterior lavagem em água corrente para retirar o excesso de sujeira do resíduo. Após a lavagem, este material foi seco a 65 °C por 72 horas em estufa. Sendo então triturado em moinho de facas (30

mesh) para obtenção de pequenas partículas homogêneas (Siqueira *et al.*, 2010). E outra parte da amostra foi triturada em liquidificador de baixa rotação para que suas partículas ficassem maiores.

4.3 CULTIVO DOS FUNGOS

4.3.1 CULTIVO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os cultivos em meio líquido das cepas reativadas, foram realizados utilizando frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo em cada um 50 mL de meio líquido com a seguinte composição (m/v): peptona 0,4%, extrato de levedura 0,4%, KH_2PO_4 0,2%, NaH_2PO_4 0,8%, MgSO_4 0,25%; pH 7 e casca de soja triturada em moinho 2,0%, como fonte de carbono (Nagy *et al.*, 2001).

Todos os meios de cultura foram previamente esterelizados a 121 °C por 20 minutos e foram introduzidos 2 discos de 8 mm de diâmetro de fungo anteriormente crescido em meio sólido. Todo o processo de inoculação foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. O cultivo em meio líquido foi realizado a 28 °C e agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) por 7 dias. Para os fungos da Antártica, a temperatura de fermentação foi de 15 °C. Não houve contagem de micélio por motivos de segurança pelo não conhecimento do microrganismo trabalho e para fins do presente trabalho não foi necessário o ajuste dessa contagem minuciosa.

Após o cultivo, o meio foi filtrado em funil do tipo Büchner com papel de filtro (Whatman n°1) e armazenado a 4 °C. O filtrado, a partir de agora denominado extrato bruto (EB-SF), foi usado como fonte de xilanases, mananases, carboximetilcelulases, β -glicosidase e quantificação de proteína total.

4.3.2 CULTIVO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.3.2.1. PRÉ-INÓCULO

Os cultivos em meio líquido das cepas com melhores atividades foram realizados utilizando frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo em cada um 50 mL de meio líquido com a seguinte composição (m/v): peptona 0,4%, extrato de

levedura 0,4%, KH_2PO_4 0,2%, NaH_2PO_4 0,8%, MgSO_4 0,25%; pH 7 e glicose 2,0%, como fonte de carbono (Nagy *et al.*, 2001).

Todos os meios de cultura foram previamente esterelizados a 121 °C por 20 minutos e foram introduzidos 2 discos de 8 mm de diâmetro de fungo anteriormente crescido em meio sólido. Todo o processo de inoculação foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. O cultivo em meio líquido foi realizado a 28 °C e agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) por 5 dias para crescimento de massa micelial. Para os fungos da Antártica, a temperatura de fermentação foi de 15 °C.

4.3.2.2 INÓCULO

Os cultivos em meio sólido foram realizados utilizando frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL, previamente esterelizados a 121 °C por 20 minutos, contendo em cada um 5 g de casca de soja triturada em liquidificador de baixa rotação, ao qual foi adicionado 5 mL e 10 mL do caldo fúngico do pré-inóculo (Weingartner, 2010). Os frascos foram incubados a 28 °C durante 7 e 28 dias sem rotação. Para os fungos da Antártica, a temperatura de fermentação foi de 15 °C.

4.3.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Para extração enzimática adicionou-se 50 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, 4 °C, pH 5,4 ao frasco do fungo fermentado. Foi homogeneizado em agitador magnético por 20 minutos. A mistura foi filtrada em funil do tipo Büchner com papel de filtro Whatman n°1 e armazenado a 4°C para posterior determinação da atividade enzimática e quantificação de proteína total. O filtrado foi denominado extrato bruto (EB-SSF) (Weingartner, 2010).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteínas presentes nos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Bradford (1976). Uma alíquota de 100 µL de amostra foi adicionada a 1000 µL do reagente de Bradford. Após 5 minutos, ao abrigo da luz e em temperatura

ambiente a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu Spectrophotometer, UV-1800) a 595 nm.

Para os cálculos da concentração de proteína, foi preparada uma curva padrão utilizando a albumina bovina sérica como padrão (0-0,3 mg/mL). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados para as atividades específicas de foram expressos em UI mg⁻¹ (unidades de atividade enzimática por mg de proteína).

4.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.5.1 XILANASE, MANANASE E CARBOXIMETILCELULASE

Para determinação das atividades de xilanase, mananase e carboximetilcelulose foram incubados 100 µL de substrato (xilana 1%, manana 0,5% e carboximetilcelulose (CMC) 0,44%, respectivamente) e 50 µL do extrato bruto em banho termostaticado a 50°C durante 30 minutos (Ferreira *et al.*, 1993). Transcorrido o tempo de reação, 300 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados. O DNS detecta a quantidade de açúcar redutor liberado durante o ensaio. As soluções com o reagente foram incubadas a 100 °C durante 10 minutos (Miller, 1959). Ao final, 1,5 mL de água destilada foi adicionado e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm (Shimadzu Spectrophotometer, UV-1800). As atividades enzimáticas foram expressas como 1 µmol de açúcar redutor formado por minuto (Unidade Internacional – UI) por 1 mL de enzima (UI.mL⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para eliminar interferência da coloração do extrato enzimático e do substrato foram feitos controles onde se substituiu o volume do substrato e da amostra, respectivamente, pelo tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,4. Para calibração do aparelho foi feito outro controle onde se substituiu o volume total da reação (150 µL) pelo mesmo tampão já citado.

A curva padrão para a quantificação de xilanase foi construída com solução de xilose, a concentrações de 0; 0,075; 0,150; 0,300; 0,750; 1; 1,2; 1,5; 1,8 e 2 mg/mL. E as curvas padrões para a quantificação de mananase e CMCase foram construídas com solução de manose e glicose, respectivamente, em concentrações de 0; 0,050; 0,100;

0,200; 0,450; 0,875; 1,75 e 3,5 mg/mL. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol açúcar redutor por minuto.

4.5.2 β -GLICOSIDASE

Para determinação da atividade de β -glicosidase foram incubados 100 μL de substrato (pNPG 0,1%), 50 μL do extrato bruto e 850 μL de água destilada em banho termostático a 50 °C durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de Na_2CO_3 10%. O produto (pNP) liberado foi quantificado pela leitura da absorbância a 410 nm (Shimadizu Spectrophotometer, UV-1800) (Ximenes *et al.*, 1996). As atividades enzimáticas foram expressas como 1 μmol de açúcar redutor formado por minuto (Unidade Internacional – U) por 1 mL de enzima ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para eliminar interferência da coloração do extrato enzimático e do substrato foram feitos controles onde se substituiu o volume do substrato e da amostra, respectivamente, pelo tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 4,8. Para calibração do aparelho foi feito outro controle onde se substituiu o volume total da reação (150 μL) pelo mesmo tampão já citado.

A curva padrão foi construída com solução de p-nitrofenol a concentrações de 0; 0,003; 0,006; 0,013; 0,025; 0,050; 0,075; 0,150 mg/mL. Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto.

4.6 SCREENING FUNCIONAL

O total de 104 fungos fermentados em cultivo líquido foram submetidos ao teste de atividade enzimática para xilanase. Destes, 14 endofíticos, 21 da costa marinha e os 16 da Antártica apresentaram boas atividades xinalolíticas.

Todos os 51 fungos selecionados na primeira etapa foram submetidos posteriormente aos demais testes de atividades enzimáticas (mananase,

carboximetilcelulase e β -glicosidase). Sendo selecionados, por fim, 3 fungos de cada bioma para dar continuação aos estudos (Figura 9)

Somente para estes 9 fungos selecionados realizou-se a fermentação em estado sólido como descrito no item 4.3.3. A melhor condição analisada resultou no extrato bruto escolhido para continuação dos estudos.

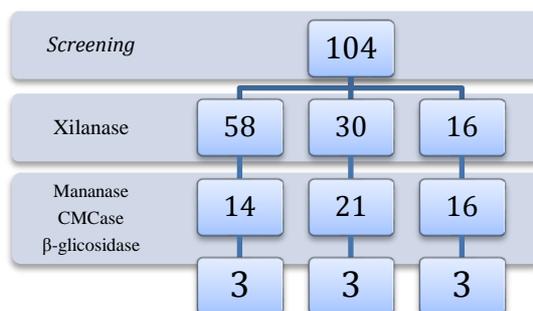


Figura 9 - Fluxograma do *screening* feito dos 104 fungos

4.7 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram realizados ensaios enzimáticos de temperatura ótima para todas as enzimas (xilanase, mananase, CMCCase e β -glicosidase) para os 9 fungos selecionados oriundos de ambos os tipos de fermentação a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C, nas condições previamente descritas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.8 EFEITO DO PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O pH ótimo foi realizado no valor de temperatura ótima individual de cada fungo perante cada enzima testada. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Para determinar o efeito do pH na atividade, as amostras do extrato bruto da fermentação líquida e fermentação sólida foram avaliadas na presença de cada substrato e soluções tampões em diferentes valores de pH no intervalo de 3,4 - 8,4 para xilanase, mananase e carboximetilcelulase, e nos diferentes valores de pH no intervalo de 3,8 - 8,8 para β -glicosidase.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A droga vegetal foi coletada em Brasília - DF, Brasil, e o isolamento dos fungos endofíticos de suas folhas mostrou a presença de diferentes microrganismos. A metodologia utilizada para o isolamento mostrou-se eficiente, pois foram isolados um total de 58 fungos endofíticos de 13 diferentes espécies de plantas nativas do Cerrado brasileiro presentes no Distrito Federal - DF, Brasil. Dentre as 13 espécies de plantas coletadas, foram isolados 44 fungos em 10 delas. Destacam-se *Ouratea hexasperma* com 5 fungos isolados, *Kielmeyera coriacea* com 3 e *Tabebuia ochracea* com 6 fungos isolados (Figura 10).

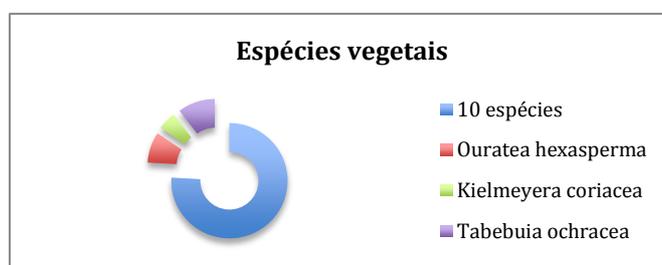
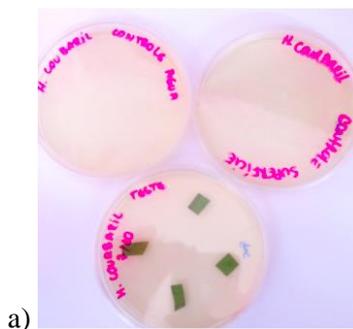


Figura 10 - Diagrama das espécies vegetais com destaque para 3 espécies que geraram as cepas que obtiveram melhores resultados no presente trabalho.

De acordo com Trabulsi e Alterthum, (2005), a identificação de fungos multicelulares ocorre através da consideração da sua aparência física, incluindo características das colônias e dos esporos reprodutivos. Portanto, após observação macroscópica para a separação das espécies de fungos endofíticos isolados das folhas, amostras das diferentes culturas foram inoculadas em outras placas de Petri. As fotos de alguns fungos isolados podem ser observadas nas Figuras 11 a)-g). Futura identificação molecular dos fungos isolados e produtores de celulasas e hemicelulasas será realizada.



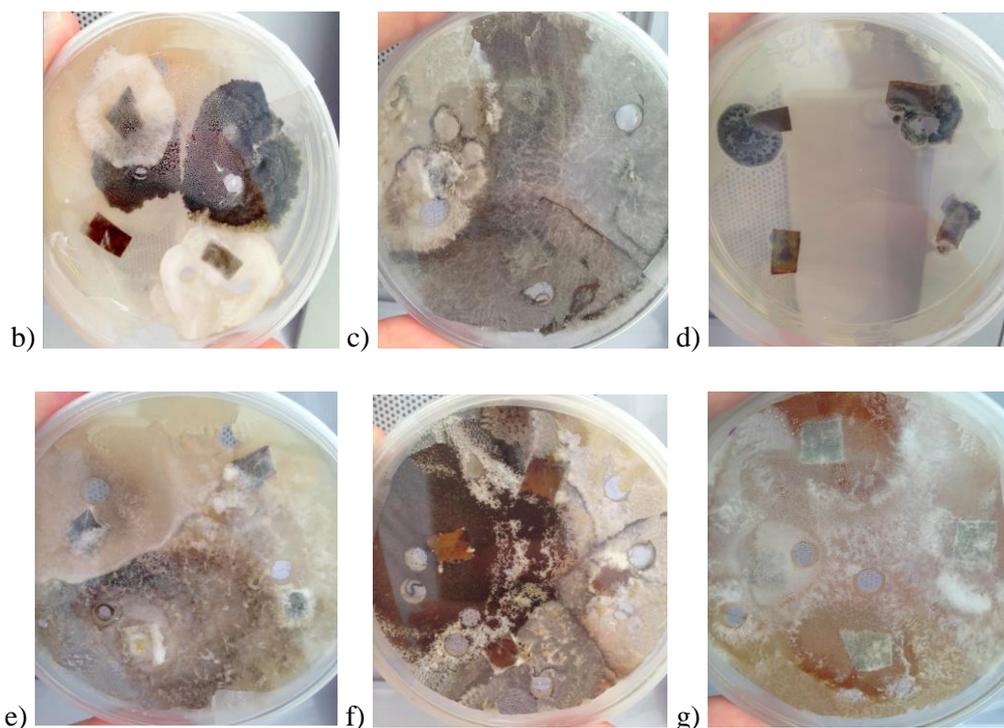


Figura 11 a) Placas de petri com fragmentos de folhas e controles negativos; b)-g) Fungos endofíticos crescidos em placa de Petri.

5.2 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

5.2.1 XILANASE

Inicialmente mediu-se a atividade da enzima xilanase para todos os 58 fungos do cerrado, 30 fungos da costa marinha, e 16 fungos da Antártica. Destes 14 fungos do cerrado e 21 da costa marinha, destacados em vermelho (Tabelas 2, 3 e 4), cuja atividade xilanolítica apresentaram-se em maiores níveis, além dos 16 melhores da Antártica, foram selecionados para dar continuidade à medição das demais atividades enzimáticas (mananase, carboximetilcelulase e β -glicosidase).

A atividade xilanolítica atingiu seu máximo (10,2 UI/mL, 12,4 UI/mL e 13,4 UI/mL para os fungos do cerrado, costa marinha e Antártica respectivamente) em 7 dias de cultivo em fermentação submersa a 28 °C e 120 rpm para os fungos do Cerrado e Costa Marinha e 15 °C e 120 rpm para os fungos da Antártica.

Tabela 2 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de xilanase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
Morus	0	OH 04	2,564	Peq 03	3,535	Goi 06	2,191
Sp. Preto	0	OH 05	8,012	Peq 04	1,451	Goi 07	0,611
Sp. Branco	0,402	CAM 01	5,633	Peq 05	1,064	Goi 08	1,793
Br Rosa	2,457	PT 01	1,797	Peq 06	2,246	Goi 09	0
Dm 01	9,376	PT 02	5,968	Peq 07	5,446	Goi 10	0,297
Dm 02	8,313	PT 03	2,616	Peq 08	0	Goi 11	0,359
EP 01	0,694	KC 01	9,248	Peq 09	5,737	Goi 12	0
EP 02	2,139	KC 02	0,345	Peq 10	0,404	Goi 13	0,736
EP 03	4,513	Sp. Kiel	0	Peq 11	4,783	Ipê 01	10,293
EP 04	1,202	SL 01	5,695	Peq 12	1,382	Ipê 02	7,727
CB 01	0	Sp. Soc	0	Goi 01	0,297	Ipê 03	4,416
CB 02	0	SADS 1	1,441	Goi 02	3,922	Ipê 04	1,133
OH 01	6,773	SADS 2	6,602	Goi 03	2,847	Ipê 05	4,524
OH 02	8,355	Peq 01	7,442	Goi 04	0	Ipê 06	2,654
OH 03	6,784	Peq 02	7,396	Goi 05	3,259		

Tabela 3 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de xilanase medidos em UI/mL

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
A01	10,304	A08	9,422	A15.2	8,821	A22	3,787
A02	9,697	A09	10,117	A16	0	A23	7,815
A03	8,821	A10	8,495	A17	11,558	A24	3,729
A04	9,853	A11	5,166	A18.1	7,250	A25	7,981
A05.1	7,261	A12	6,499	A18.2	1,859	A26	10,651
A05.2	10,407	A13	6,934	A19	0	A27	0
A06	8,152	A14	12,429	A20	10,630		
A07	0,454	A15.1	11,392	A21	1,512		

Tabela 4 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de xilanase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
497	1,050	513	1,316	558	13,409	600	5,913
499	0	528	0,995	565	1,047	606	4,487
505	7,069	550	3,587	571	10,024	610	11,626
506	0	556	2,118	587	7,567	613	7,250

Existem variedades das condições de estudo e de métodos de determinação para uma mesma enzima. Sendo assim, é necessário ter cuidado ao comparar resultados de atividade enzimática obtidos por diversos autores, devido às possíveis mudanças existentes e em função da falta de definição de padrões consensualmente aceitos.

Utilizados como substratos das fermentações, os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e produção de enzimas. O crescimento microbiano e a produção de diversas enzimas de interesse industrial são favorecidos pela complexidade nutricional deste tipo de resíduo, agregando valor à cadeia produtiva e contribuindo com a viabilidade econômica do processo. Vários autores têm testado diferentes resíduos agroindustriais como matérias-primas para produção de celulases e hemicelulases em fungos filamentosos e estes serão abordados e discutidos para comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

Dados da literatura trazem outros estudos sobre produção de xilanases que corroboram com os resultados obtidos nesse trabalho. Cunha (2016) utilizando *Aspergillus foetidus* apresentou atividade xilanolítica de 9,72 U/mL no sétimo dia de cultivo em meio líquido contendo casca de soja 2% o que se assemelha aos resultados obtidos. Porém estes resultados ficaram abaixo aos obtidos por Qinnghé *et al.* (2004), que obteve 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus* em fermentação submersa, sob condições otimizadas.

Ximenes *et al.* (1997) utilizando o microrganismo *Fumigatus fransenius* produziu 1,2 U/mL em farelo de trigo, um valor ainda inferior do que os encontrados no presente estudo. Assim como Milanezi (2010) obteve atividade xilanolítica muito inferior chegando a aproximadamente a 0,7 UI/mL de xilanase produzida por *A. niger* em meio líquido contendo bagaço de cana 1%. Almeida (2009) cultivou *Acremonium zeae* em bagaço de cana-de-açúcar e obteve em SSF 0,78 U/mL de xilanase em 15 dias e em SF obteve 2,14 U/mL de xilanase em 14 dias, ambos também inferiores aos valores encontrados.

Dos Santos *et al.* (2016) utilizando 31 cepas de fungos marinhos em SF a 28 °C e 140 rpm obteve atividade xilanolítica superior a 10 UI/mL, sendo o fungo *Aspergillus tubingensis* produtor de 49,41 UI/mL de xilanase, um valor muito superior aos relatados

no presente trabalho. Por outro lado, Raghukumar *et al.* (2004) produziu xilanase de 3 isolados marinhos (*A. niger*, *A. ustus* e *Flavodon flavus*) e obteve aproximadamente 1,3 UI/L de atividade quando cultivado em bagaço de cana.

Os resultados da produção enzimática realizado por Barato (2014) em fermentação semi-sólida revelaram que os fungos *Cadophora luteo-olivaceae* e *Cadophora malorum* isolados da Antártica foram capazes de produzir xilanases em substratos de bagaço de cana, sabugo de milho e palha de arroz. No entanto, o fungo *C. malorum* foi o melhor produtor quando cultivado em bagaço de cana (3,48 U/mL) e sabugo de milho (2,41 U/mL). A maior produção desta enzima (1,9 U/mL) pelo fungo de origem marinha *C. luteo-olivaceae* também se deu no substrato bagaço de cana, todos a 15 °C. Comparando aos resultados obtidos, pode-se observar uma superioridade de produção nas cepas escolhidas no presente trabalho.

5.2.2 MANANASE

Sethuraman *et al.* (1998), já haviam relatado que a produção enzimática é extremamente dependente da fonte de carbono presente no meio, e que em diferentes meios líquidos certas cepas apresentam maior atividade hemicelulolítica quando comparada às atividades celulolíticas, justificando, assim, a maior produção de xilanase quando comparada às demais enzimas avaliadas.

A atividade de mananase (Tabelas 5, 6 e 7) atingiu seu máximo (4,3 UI/mL, 5,1 UI/mL e 4,4 UI/mL para os fungos do cerrado, costa marinha e Antártica respectivamente) em 7 dias de cultivo em fermentação submersa a 28 °C e 120 rpm para os fungos do Cerrado e Costa Marinha e 15 °C e 120 rpm para os fungos da Antártica.

Tabela 5 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de mananase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
Dm 01	3,202	OH 03	0	KC 01	3,498	Ipê 01	2,785
Dm 02	3,382	OH 05	1,858	SADS 2	3,779	Ipê 02	3,434
OH 01	1,426	CAM 01	2,507	Peq 01	4,364		
OH 02	2,631	PT 02	3,130	Peq 02	3,590		

Tabela 6 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de mananase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
A01	2,840	A06	1,452	A14	2,927	A23	2,295
A02	3,402	A08	4,141	A15.1	3,272	A25	4,335
A03	1,774	A09	1,583	A15.2	1,820	A26	3,837
A04	5,187	A10	3,544	A17	3,361		
A05.1	2,892	A12	1,594	A18.1	2,652		
A05.2	3,046	A13	0,792	A20	3,051		

Tabela 7 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de mananase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
497	0	513	0,980	558	4,483	600	3,385
499	0	528	2,020	565	0	606	3,373
505	3,642	550	1,003	571	3,805	610	3,660
506	0	556	0,951	587	2,582	613	2,402

As Tabelas 2 e 5 apresentam os dados das atividades de hemicelulases detectadas no extrato bruto proveniente do cultivo dos fungos do cerrado em casca de soja. Estes dados são semelhantes aos encontrados na literatura. Ferreira e Filho (2004) observaram a produção de mananase por *Trichoderma harzianum* a partir do 6º dia de cultivo em farelo de trigo com atividade máxima de 9 U/mL entre o 8º e 9º dia.

A atividade enzimática aqui obtida pode ser baixa quando comparada com o estudo de Lin e Chen (2004) que utilizando linhagens de *A. niger* obtiveram 24 U/mL de mananase. E também quando comparados a Santos (2014) que cultivou *Penicillium sp.* isolado do cerrado e atingiu em SSF 39,9 UI/g de atividade de mananase em farelo de trigo, 14,7 UI/g em farelo de soja e 4,88 UI/g em casca de arroz; valores estes superiores aos apresentados no presente trabalho. Porém, são novamente semelhantes aos resultados apresentados por Weingartner (2010) que obteve 3,3 U/mL de atividade mananolítica.

Ademark *et al.* (1998) avaliaram a produção de mananase em meio sintético, suplementado e atingiu 3,35 U/mL de atividades de mananase produzida por *A. niger*, valores estes semelhantes aos encontrados no presente trabalho cujo substrato é

orgânico e não suplementado. Da mesma forma, Marco (2014) cultivou *Aspergillus foetidus* isolado do cerrado em SF na presença de casca de soja 1% e as melhores atividades detectadas foram de mananase (1,98 UI/mL) no 15º dia de cultivo e xilanase (0,85 UI/mL) no 17º dia de cultivo, ambas inferiores ao achados.

Devido aos estudos escassos a respeito de microrganismos advindos da Antártica e isolados da Costa Marinha brasileira produtores de celulasas e hemicelulasas como mananases, CMCases e β -glicosidasas a comparação desses resultados obtidos no presente trabalho com a literatura foi prejudicada.

5.2.3 CARBOXIMETILCELULASE

A produção mais elevada de CMCCase (1,3 UI/mL, 1,3 UI/mL e 0,9 UI/mL para os fungos do cerrado, costa marinha e Antártica respectivamente) ocorreu em 7 dias de cultivo em fermentação submersa a 28 °C e 120 rpm para os fungos do Cerrado e Costa Marinha e 15 °C e 120 rpm para os fungos da Antártica (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 8 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de CMCCase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
Dm 01	0,880	OH 03	0,315	KC 01	1,032	Ipê 01	1,185
Dm 02	0,742	OH 05	0,617	SADS 2	0,834	Ipê 02	0,990
OH 01	0,642	CAM 01	0,571	Peq 01	0,962		
OH 02	1,338	PT 02	0,303	Peq 02	1,017		

Tabela 9 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de CMCCase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
A01	0,724	A06	0,388	A14	0,999	A23	0,477
A02	0,489	A08	0,663	A15.1	1,319	A25	0,950
A03	0	A09	0,648	A15.2	0,709	A26	0,611
A04	1,222	A10	1,011	A17	1,368		
A05.1	0,321	A12	0,266	A18.1	0,770		
A05.2	1,316	A13	0	A20	0,968		

Tabela 10 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de CMCCase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
497	0	513	0	558	0,910	600	0,480
499	0	528	0,336	565	0	606	0,281
505	0,452	550	0	571	0,581	610	0,468
506	0	556	0	587	0,275	613	0,477

De acordo com os resultados apresentados por Menezes *et al.* (2009) para a atividade de carboximetilcelulase, todas as amostras apresentaram baixas atividades desta enzima, sendo que a maior foi produzida pela linhagem *Pleurotus tailandia* com 0,06 U/mL no 10º dia de incubação em fermentação submersa contendo bagaço de cana. Marco (2012) obteve também em meio sólido a atividade de 2,4 U/mL de CMCCase através do isolado de *Bacillus sp.* Já em fermentação submersa obteve com a mesma linhagem 0,08 U/mL de atividade de CMCCase. Almeida (2009) cultivou *Acremonium zeae* em bagaço de cana-de-açúcar e obteve em SSF o máximo de 0,08 U/mL de endoglucanase em 33 dias enquanto que em SF obteve um ápice de 0,09 U/mL de endoglucanase em apenas 3 dias, valores bastante inferiores aos encontrados no presente trabalho, justificando mais uma vez a importância dos valores observados.

Nair *et al.* (2008) utilizaram várias cepas *Aspergillus niger* para a produção de xilanase e CMCCase, e produziram valores superiores de xilanase e semelhantes de CMCCase: 32,4 U/mL de xilanase e 1,81 U/mL de CMCCase utilizando o farelo de trigo como substrato. Assim como Cunha *et al.* (2012) com a mesma linhagem de fungo, utilizando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram uma produção de 1,36 U/mL de CMCCase e 16,8 U/mL de xilanase após 30 horas de cultivo. Da mesma forma Gomathi *et al.* (2012) produziu valores semelhantes de CMCCase que foi de 1,4 U/mL, utilizando *A. flavus* como produtor em farelo de trigo como substrato, pelo tempo de 3 dias de cultivo.

Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes ao estudo feito por Sciuto (2015) que apresentou atividade de CMCCase de 0,65 UI/mL no sétimo dia de cultivo em SF contendo casca de soja como substrato, através do microrganismo *Clonostachys byssicola* isolado do cerrado. Em trabalho realizado por Lima *et al.* (2009), a maior atividade de CMCCase (0,36 UI/mL) foi obtida no sexto dia de cultivo de

Aspergillus fumigatus, em bagaço de cana de açúcar 1% como fonte de carbono, assim como os resultados aqui descritos.

5.2.4 β -GLICOSIDASE

As β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose liberando monômeros de glicose, gerando produtos com valor agregado, podendo ser empregadas em diversos processos industriais. Dessa forma, as β -glicosidases têm um papel fundamental para a degradação de materiais lignocelulósicos, sendo a celobiose (principal substrato para a enzima) um potente inibidor de exocelulases, portanto a presença dessa enzima de interesse potencializa a degradação de biomassas.

Dessa forma, a produção mais elevada de β -glicosidase (4,0 UI/mL, 4,4 UI/mL e 5,2 UI/mL para os fungos do cerrado, costa marinha e Antártica respectivamente) ocorreu em 7 dias de cultivo em fermentação submersa a 28 °C e 120 rpm para os fungos do Cerrado e Costa Marinha e 15 °C e 120 rpm para os fungos da Antártica. Os valores das atividades podem ser analisados nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11 - Fungos do Cerrado cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de β -glicosidase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
Dm 01	4,092	OH 03	0	KC 01	0,785	Ipê 01	1,200
Dm 02	3,736	OH 05	2,828	SADS 2	3,673	Ipê 02	1,398
OH 01	3,653	CAM 01	0,433	Peq 01	1,437		
OH 02	2,576	PT 02	2,762	Peq 02	1,202		

Tabela 12 - Fungos da Costa Marinha cultivados em SF por 7 dias, 28 °C e 120 rpm e valores da atividade de β -glicosidase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
A01	4,062	A06	0,663	A14	4,338	A23	2,278
A02	1,993	A08	2,323	A15.1	3,050	A25	4,442
A03	1,404	A09	2,832	A15.2	0,275	A26	3,590
A04	3,204	A10	3,887	A17	4,321		
A05.1	2,033	A12	0,158	A18.1	1,891		
A05.2	4,061	A13	0,935	A20	3,671		

Tabela 13 - Fungos da Antártica cultivados em SF por 7 dias, 15 °C e 120 rpm e valores da atividade de β -glicosidase medidos em UI/mL.

Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL	Fungo	UI/mL
497	0,316	513	0,592	558	3,149	600	1,334
499	2,456	528	0,314	565	0,543	606	2,080
505	1,791	550	0,866	571	3,263	610	5,260
506	0	556	0,627	587	2,951	613	1,495

Almeida (2009) cultivou *Acremonium zeae* em bagaço de cana-de-açúcar e obteve em SSF um máximo de 0,08 U/mL de β -glicosidase em 36 dias e em SF obteve 0,03 U/mL de β -glicosidase em 7 dias. Silva *et al.* (2013) utilizando o microrganismo *Lichtheimia ramosa* relatam produção de 0,061 U/mL de β -glicosidase utilizando pequi como substrato após 48 horas a 30 °C, demonstrando que ambos os resultados são inferiores aos achados no presente trabalho.

Gonçalves *et al.* (2013) obtiveram valores superiores de β -glicosidase com o microrganismo *Lichtheimia ramosa* produzindo 17,26 U/mL em farelo de trigo na temperatura de 35 °C após 120 horas de cultivo. Assim como Matkar *et al.* (2013) avaliaram a produção de celulase pelo fungo *Aspergillus sydowii* utilizando celulose como fonte de carbono em pH de 5,5 a 120 rpm na temperatura de 40 °C por 6 dias, obtendo a produção de 1,32 U/mL de endoglicanase, 3,99 U/mL de exoglicanase e 9,24 U/mL de β -glicosidase.

Fang *et al.* (2010) analisaram a produção de β -glicosidase por fermentação submersa em palha de milho e obteve no 7º dia de cultivo o pico de produção da β -glicosidase pelo fungo *A. niger* (1,4 U/mL) e após 6 dias de cultivo pelo fungo *T. reesei* (0,3 U/mL), corroborando, dessa forma, com os valores superiores encontrados no presente trabalho. Por outro lado, Singhanian *et al.* (2011) analisaram a produção de β -glicosidase pelo fungo *A. niger* cultivado em fermentação submersa por 4 dias em farelo de trigo como substrato e produziu impressionantes 1400 U/mL de β -glicosidase e não se observou a produção da enzima em meio com glicose como substrato.

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A atividade de xilanase expressa pelos fungos foi mais representativa quando comparada às demais enzimas, portanto, levou-se em consideração a medida da atividade de xilanase para selecionar os fungos que dariam continuidade ao trabalho. Valores de atividade xilanolítica maiores que 8 UI/mL foi o critério adotado. Dessa forma, foram selecionados 3 fungos de cada bioma.

Inicialmente 104 cepas de fungos filamentosos foram selecionadas para avaliação da produção de xilanase, mananase, CMC_{Case} e β -glicosidase. As atividades enzimáticas de todos os fungos estão representada nas Tabelas 2 - 13. Nove das 104 cepas apresentaram melhores atividades para as enzimas relatadas. Estas atividades variaram de 0,46 UI/mL a 13,4 UI/mL, quando cultivadas em fermentação submersa adicionada de casca de soja como fonte de carbono.

As Figuras 12, 13 e 14 mostram os fungos selecionados para os ensaios seguintes, separados por sua origem de bioma, e suas respectivas atividades enzimáticas (UI/mL). Uma correlação pode ser observada no perfil das produções de celulases e hemicelulases, onde a expressão das hemicelulases (xilanase e mananase) se manteve constante para todos os fungos nos diferentes biomas, sendo a xilanase a mais expressiva. Essa constância foi o principal parâmetro analisado para a escolha das 3 cepas dos microrganismos escolhidas para os demais experimentos. Quanto à expressão da endocelulase CMC_{Case}, observa-se uma baixa produção em todas as cepas, sendo a menor delas nos fungos da Antártica. Por fim, a expressão de β -glicosidase, responsável pelos últimos passos da hidrólise celulolítica gerando resíduos de glicose, foi maior nos fungos da Antártica e Costa Marinha, culminando, nestes casos, em uma possível melhor hidrólise final da celulose apesar da baixa produção de CMC_{Case}.

Dessa forma, os fungos selecionados foram:

Cerrado: cepas OH02, KC01, Ipê01

Costa Marinha: cepas A05.2, A15.1, A17

Antártica: cepas 558, 571, 610

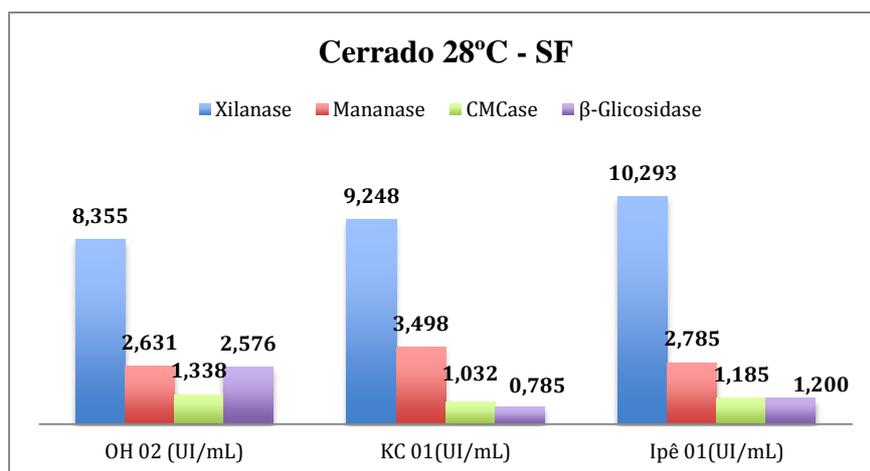


Figura 12 - Atividades enzimáticas dos fungos do Cerrado cultivados em SF, por 7 dias, 28 °C e 120 rpm

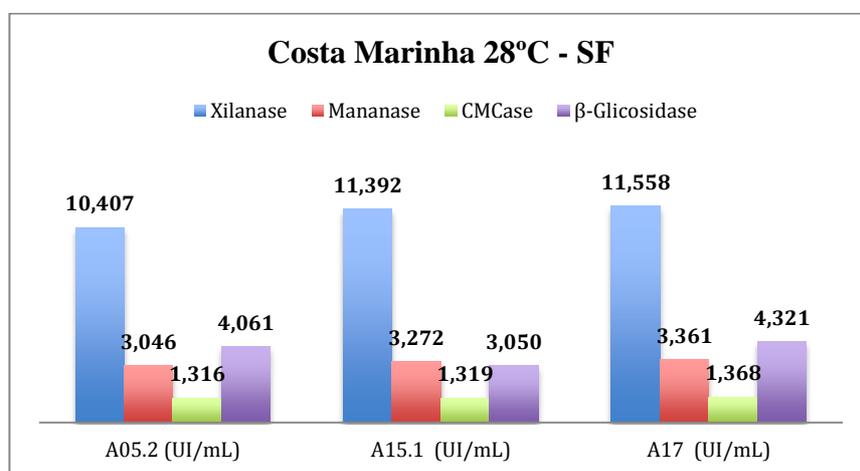


Figura 13 - Atividades enzimáticas dos fungos da Costa Marinha cultivados em SF, por 7 dias, 28 °C e 120 rpm

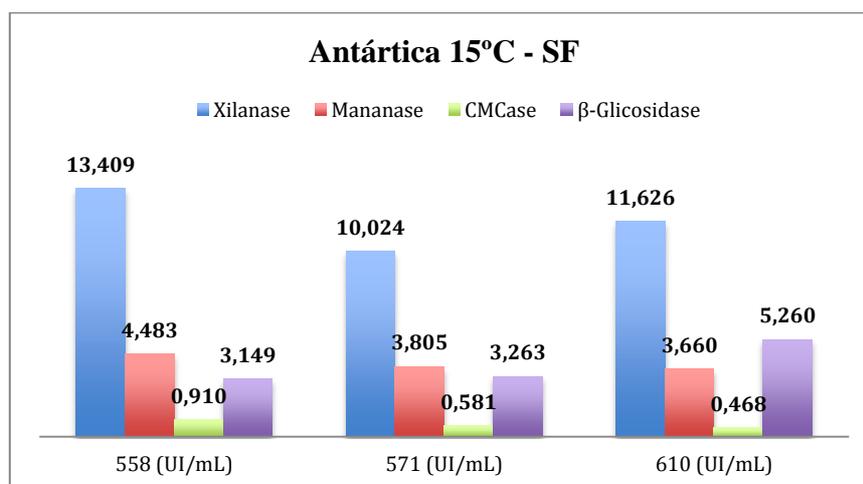


Figura 14 - Atividades enzimáticas dos fungos da Antártica cultivados em SF, por 7 dias, 15 °C e 120 rpm

Analisando as atividades enzimáticas determinadas neste trabalho, em fermentação submersa, verificou-se que a atividade de xilanase foi cerca de 3 vezes maior que mananase e β -glicosidase, que por sua vez foram 3 vezes maior que CMCase.

Utilizada como substrato no presente trabalho por poder ser usada em meios fermentativos, a casca do grão da soja é um subproduto obtido do beneficiamento do grão da soja, composto principalmente de celulose (51,9%), hemicelulose (10,4%) e lignina (9,4%) (Siqueira *et al.*, 2010). Sabe-se, ainda, que os principais açúcares presentes na xilana (hemicelulase) são D-xilose e L-arabinose (pentoses) e em menor quantidade, D-galactose, D-glicose e D-manose (hexoses). O fato dos processos fermentativos terem revelado melhores rendimentos de xilanase, informam que possivelmente a fração hemicelulósica encontrada no substrato seja composta majoritariamente por xilana, ou que os microrganismos selecionados têm mais facilidade de produzir essa enzima. E os valores medianos de mananase apresentados indicam presença de hemicelulose composta por açúcares D-manose, porém em menor quantidade. Primeiramente por hidrolisar a xilana, as xilanases tornam a fibra mais acessível ao ataque das outras enzimas que participam na conversão da biomassa lignocelulósica (Öhgren *et al.*, 2007). Essa é a vantagem de se ter alta produção dessa enzima de interesse como representada neste estudo.

Já a β -glicosidase desempenha o papel "chave" para o fim da hidrólise e reduz o efeito inibidor da celobiose sobre as outras enzimas celulolíticas, assim aumenta o rendimento total da produção dos monômeros de glicose (Parry *et al.*, 2001). Outro fator relevante dos resultados encontrados foi que em alguns casos a segunda maior expressão enzimática foi da β -glicosidase.

Xilanases e celulasas em sinergia podem ser utilizadas em processos de extração de óleos vegetais e como aditivos em rações animais para aumentar a digestibilidade e absorção dos nutrientes (Polizeli *et al.*, 2005). Além disso, Han e Chen (2008) mostraram que a adição de β -glicosidase de sabugo de milho durante a sacarificação e fermentação diminuiu a concentração de celulose em 28 % e a produção de etanol aumentou cerca de 22 %. Dessa forma, os maiores valores observados de xilanase seguidos da presença de β -glicosidase culminam em uma melhor sinergia no processo de biodegradação do material lignocelulósico.

Fungos filamentosos, na sua grande maioria, fazem parte do grupo de

microrganismo que contemplam as características desejadas para um processo fermentativo. São dotados de uma variedade morfológica e bioquímica que lhes conferem uma flexibilidade metabólica com potencial para a síntese de substâncias de interesse industrial em larga escala e possuem capacidade de secretá-las no meio extracelular (Esposito e Azevedo, 2010; Posch *et al.*, 2013). A produção enzimática para degradação desse tipo de substrato fornece carbono e energia para o crescimento fúngico, porém diferenças nas propriedades bioquímicas (especificidade ao substrato, pH e temperatura ótimos) são necessárias para uma completa degradação do substrato, devido à complexidade dos mesmos, sendo a produção de múltiplas enzimas uma estratégia do microrganismo que lhe conferem vantagens adaptativas.

A produção e liberação das enzimas no meio esta sujeita a mecanismos de regulação e síntese, ou seja, em alguns casos não são produzidas de modo constante, dependendo do substrato adequado para induzir sua síntese, além de ser reprimida por açúcares como a glicose. Por isso, é fundamental que o substrato favoreça a produtividade, provoque pouca repressão catabólica e que não interfira na estabilidade da enzima secretada (Galvagno e Forchiassin, 2010; Schimidell *et al.*, 2001). A habilidade dos fungos filamentosos de crescerem em uma grande variedade de substrato tem despertado interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais de baixo custo como componente alternativo do meio fermentativo desses microrganismos (Lopes, 2011). Dessa forma, é importante lembrar que os resultados aqui apresentados são provenientes de um processo de fermentação cujo substrato é um resíduo da agroindústria, cujas condições físico-químicas ainda não foram otimizadas e que podem interferir na produção enzimática.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação no estado sólido (SSF) é capaz de proporcionar uma reprodutibilidade muito próxima do habitat natural dos microrganismos, por isso vem ganhando renovado interesse empregando, principalmente espécies fúngicas (Singh *et al.*, 2008). A seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de fermentação em estado sólido, pois estes precisam ser capazes de

tolerar uma baixa atividade de água.

A seleção do substrato ou suporte adequado para a SSF, depende também de fatores que incluem além do custo, a viabilidade de uso, dessa forma, procura-se utilizar resíduos agroindustriais em bioprocessos (Pandey *et al.*, 2000). Para o caso da SSF em especial, os substratos sólidos devem ser constituídos basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água, e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares (Spier, 2005). As Figuras 15 (a - d) apresentam o crescimento em SSF observado no presente trabalho, utilizando casca de soja como única fonte de carbono.

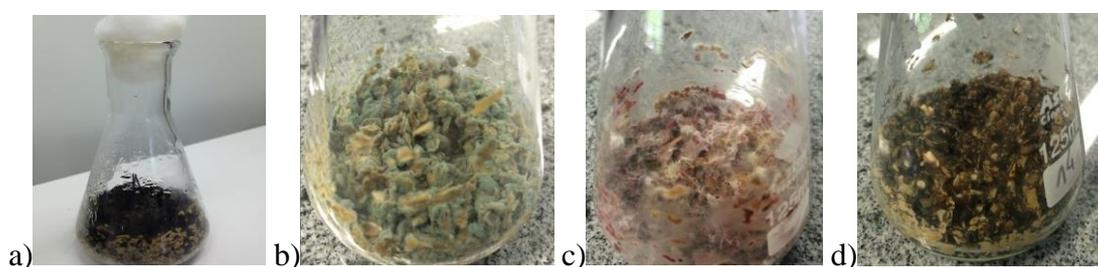


Figura 15 a) Erlenmeyer com casca de soja como substrato para crescimento microbiano; b) Crescimento do fungo Ipê 01 em SSF; c) Crescimento do fungo 558 em SSF; d) Crescimento do fungo OH02 em SSF

Quanto à interferência do tamanho das partículas do substrato no processo de fermentação, sabe-se que partículas pequenas promovem grande área de superfície para os microrganismos degradarem, porém se forem muito pequenas, podem gerar aglomeração do substrato e pouco crescimento microbiano. Em contraste, partículas grandes promovem melhor aeração, mas limitada superfície de ataque microbiano (Pandey *et al.*, 1999). Deve-se, avaliar o melhor tamanho do substrato para a finalidade da fermentação, portanto, as partículas foram moídas em liquidificador industrial para a SSF gerando um tamanho das partículas maior do que as utilizadas para a fermentação submersa, que por sua vez foram moídas em moinho de facas (Figura 16 a - c).



Figura 16 - a) Casca de soja; b) Triturada em moinho de facas; c) Triturada em liquidificador

A importância da escolha do meio nutricional se dá pelo fato que as celulases e hemicelulases são enzimas extracelulares e induzidas por seu substrato. Quando a fermentação de resíduos lignocelulolíticos ocorre em substratos complexos e heterogêneos, fatores exercem um efeito conjunto no nível de expressão dessas enzimas, como a acessibilidade ao substrato, a natureza química, a taxa e a quantidade de metabólitos liberados que, em alguns casos, atuam como inibidores da síntese das enzimas através de feedback negativo. De forma geral essa produção enzimática é um processo complexo e varia de acordo com o cada organismo em cada processo de fermentação submetido (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan e Prema, 2002).

5.4.1 VARIAÇÃO DO VOLUME DE INÓCULO

Inoculou-se 5 e 10 mL de pré-inóculo à casca de soja para iniciar o processo de fermentação em estado sólido. Os resultados mostraram que a influencia do volume de inóculo na produção enzimática variou de acordo com o bioma do fungo analisado. Os fungos da Antártica apresentaram maior produção enzimática quando foram inoculados 10 mL de pré-inóculo. Para os fungos do Cerrado 5 mL de pré-inóculo, foi mais efetivo para a produção das enzimas de interesse. Já para os fungos da Costa Marinha, houve variação da melhor quantidade de volume de inóculo adicionado. De acordo com Singhania *et al.* (2009) os fungos geralmente precisam de 40 a 60% de umidade, simulando assim as condições encontradas na natureza. As Figuras 17 e 18 apresentam a produção de xilanase, mananase, carboximetilcelulase e β -glicosidase dos fungos do Cerrado, Costa Marinha e Antártica variando as concentrações volume de inóculo adicionado na SSF.

5.4.2 VARIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO

Na avaliação do tempo de cultivo, a atividade enzimática se mostrou mais expressiva após 7 dias de cultivo em SSF, atingindo cerca de (14 UI/mL), tendo suas atividade decaídas no 28º dia de cultivo, como visto nas Figuras 17 e 18. A tendência de utilizar enzimas de origem microbiana está relacionada com menor tempo necessário para sua obtenção (Oliveira *et al.*, 2006).

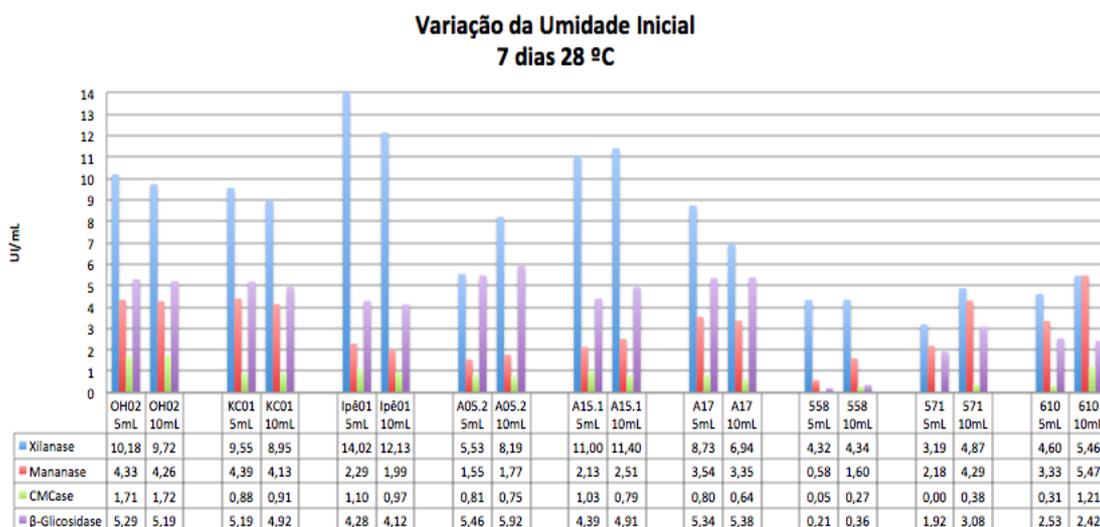


Figura 17 - Variação do volume de inóculo adicionado e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SSF, 7 dias e 28 °C.

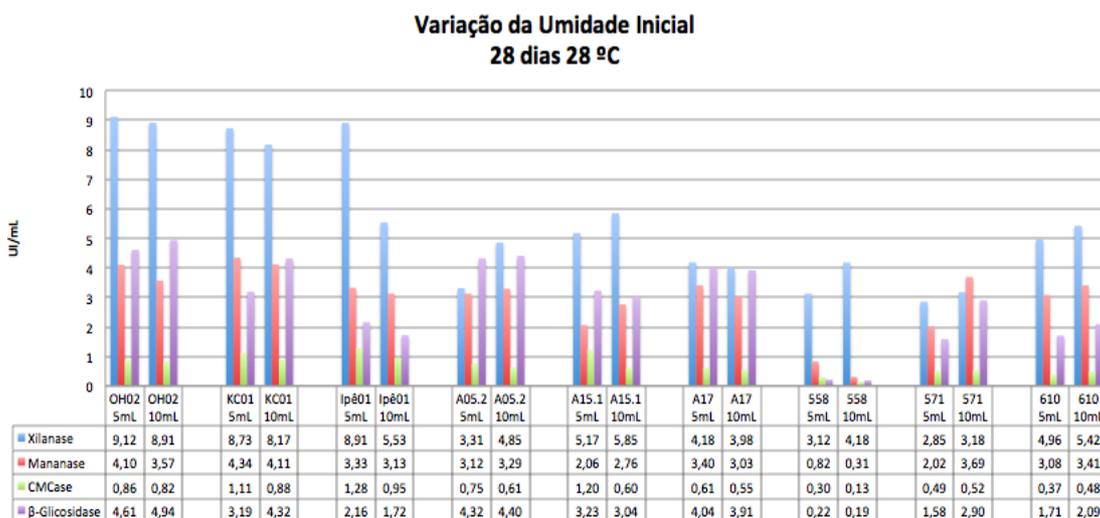


Figura 18 - Variação do volume de inóculo adicionado e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SSF, 28 dias e 28 °C.

A quantidade de água presente no meio de cultivo é um dos parâmetros que mais influenciam no sucesso do SSF. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar (Paris *et al.*, 2010). De modo geral, baixa concentração de água é uma boa vantagem para aplicação industrial, pois diminui os problemas com contaminação e geração de pequenas quantidades de água residual (Bon *et al.*, 2008).

Dentre as diversas funções da água em um bioprocesso está a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio, e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará em menor porosidade do meio, e menores trocas gasosas aumentando a temperatura interna do meio fermentado, isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Por outro lado, baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, à ineficiente utilização do substrato, ocasionando desequilíbrio nas vias, afetando os processos de germinação, esporulação, formação de metabólitos além de causar uma menor produção do produto desejado. Deve-se, portanto, balancear esses fatores em prol de uma melhor produção (Castro e Pereira Jr, 2010; Rodriguez-Zúñiga *et al.*, 2011).

Dessa forma, com a variação do volume de inóculo adicionado obteve-se como melhores resultados para os fungos do Cerrado cultivados em SSF a 28 °C com 5 mL de meio pré-fermentativo inoculados ao substrato durante 7 dias. As melhores condições encontradas foram com a cepa Ipê01 produtora de 14 UI/mL de xilanase, a cepa KC01 melhor produtora de mananase (4,3 UI/mL), e a cepa OH02 melhor produtora de CMCase e β -glicosidase (1,7 UI/mL e 5,2 UI/mL, respectivamente). Os resultados das fermentações no 28º dia foram ligeiramente menores, porém apresentam ainda valores relevantes quando comparados à literatura (9,1 UI/mL de xilanase para a cepa OH02; 4,3 de mananase para a cepa KC01; 1,2 UI/mL de CMCase para a cepa Ipê01 e 4,6 UI/mL de β -glicosidase para a cepa OH02).

Para os fungos da Costa Marinha houve variação na escolha do volume de inóculo adicionado, de tal forma que duas cepas apresentaram melhores resultados com 10 mL e outra com 5 mL de volume de inóculo, porém todas as enzimas foram mais expressas em 7 dias de cultivo e 28 °C. As melhores condições geraram a cepa A15.1 produtora de 11,4 UI/mL de xilanase com 10 mL de inóculo adicionado, a cepa A17 melhor produtora de mananase e CMCase com 3,5 UI/mL e 0,8 UI/mL, respectivamente em 5 mL de inóculo adicionado, e a cepa A05.2 melhor produtora de β -glicosidase com a produção de 5,9 UI/mL em 10 mL. Os resultados das fermentações no 28º dia foram ligeiramente menores, porém apresentam ainda valores relevantes quando comparados à literatura (5,8 UI/mL de xilanase para a cepa A15.1; 3,4 de mananase para a cepa A17; 0,6 UI/mL de CMCase para todas as três cepas nas condições descritas e 4,4 UI/mL de β -glicosidase para a cepa A05.2).

Por fim, para os fungos da Antártica, todas as cepas mantiveram melhores resultados quando inoculadas com 10 mL de pré-inóculo. Mantiveram, porém, a 28 °C sua expressão em quantidades inferiores quando comparadas às expressões das cepas inoculadas a 15 °C. Dessa maneira, os melhores resultados da fermentação a 28 °C como apresentados acima são de 7 dias de cultivo com a cepa 610 produzindo atividade xilanolítica e mananolítica de 5,4 UI/mL e 1,2 UI/mL de produção de CMCCase, e a cepa 571 como a melhor produtora de β -glicosidase com atividade de 3 UI/mL. Da mesma forma que os biomas anteriores, os resultados das fermentações com tempo de duração de 28 dias foram ligeiramente menores, porém apresentam ainda valores relevantes quando comparados à literatura (5,4 UI/mL de xilanase e 0,4 UI/mL de CMCCase para a cepa 610; 3,6 UI/mL de mananase e 2,8 UI/mL de β -glicosidase para a cepa 571).

As enzimas de interesse neste trabalho também foram estudadas por vários autores e produzidas por diversos microrganismos. Munir *et al.* (2007) obtiveram com microrganismo *Trichoderma harzianum* em farelo de arroz, com atividade máxima de CMCCase em 4 dias de incubação, cerca de 1,9 U/mL, com *Trichoderma sp.* 1,5 U/mL e com *Phanerochaete* 2,4 U/mL. Leite *et al.* (2008) relatam a produção de 13 U/g de β -glicosidase após 120 horas em SSF pelo microrganismo *Aureobasidium pullulans* utilizando farelo de trigo como substrato. Silva *et al.* (2013) utilizando *Lichtheimia ramosa* relatam produção de β -glicosidase (0,061 U/mL) utilizando pequi como substrato após 48 horas a 30 °C; CMCCase (0,787 U/mL) em guavira após 96 horas a 35 °C e xilanase (1,802 U/mL) em substrato à base de bocaiúva após 144 horas a 35 °C. Gonçalves *et al.* (2013) obtiveram com o microrganismo *Lichtheimia ramosa* produção de 2,41 U/mL de xilanase e 2,13U/mL de CMCCase quando cultivados em farelo de trigo e produção de β -glicosidase de 17,26U/mL em farelo de trigo a 35 °C após 120 horas.

Quedas nas produções enzimáticas podem ser atribuídas ao esgotamento de nutrientes, ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática ou do crescimento celular, que podem resultar em morte celular e posteriormente a desnaturação das enzimas. Os produtos finais de uma dada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via (Bon *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011). Motivos esses possíveis justificadores da produção enzimática ter sido ligeiramente maior no 7º dia de cultivo quando comparados ao 28º.

5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE CULTIVO

O calor produzido durante o processo de cultivo (devido à atividade metabólica do fungo) é acumulado no meio, reduzindo a viabilidade do crescimento microbiano, o que pode interferir no rendimento do produto de interesse, podendo degradá-lo. Sabe-se que cultivos efetuados em temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento microbiano por ocorrer redução na produção enzimática (Pandey, 2003). Portanto, a variação de temperatura durante a fermentação foi mais um parâmetro avaliado na produção enzimática de xilanase, mananase, CMCase e β -glicosidase. Foi realizada variando-se em 15 °C e 28 °C para SF em 7 dias e SSF em 7 e 28 dias.

Avaliou-se esse perfil de produção durante a fermentação devido à presença dos fungos da Antártica, pois estes, por serem microrganismos psicofílicos e psicotróficos, necessitam de uma temperatura de crescimento e fermentação inferior à temperatura dos fungos do Cerrado e Costa Marinha. Dessa forma, foi possível concluir que apesar dos fungos da Antártica apresentarem expressão enzimática a 28 °C, essa expressão se eleva quando estes são fermentados a 15 °C. Na seção 5.4 foram apresentados os gráficos referentes à variação do volume de inóculo adicionado e do tempo de cultivo, todos em 28 °C. Já as dessa seção (Figuras 19 e 20) apresentam os gráficos e valores da produção enzimática em 15 °C, porém com a mesma variação do volume de inóculo adicionado e do tempo de cultivo.

No 7º dia de cultivo em SSF e 15 °C, observou-se que, para os fungos da Antártica, as atividades enzimáticas do complexo xilanolítico (xilanase e mananase) foram mais expressivas que as do complexo celulolítico (carboximetilcelulose e β -glicosidase). Sendo a mananase mais expressa que a xilanase para o fungo 610 inoculado com 10 mL de volume de inóculo adicionado (Figura 19).

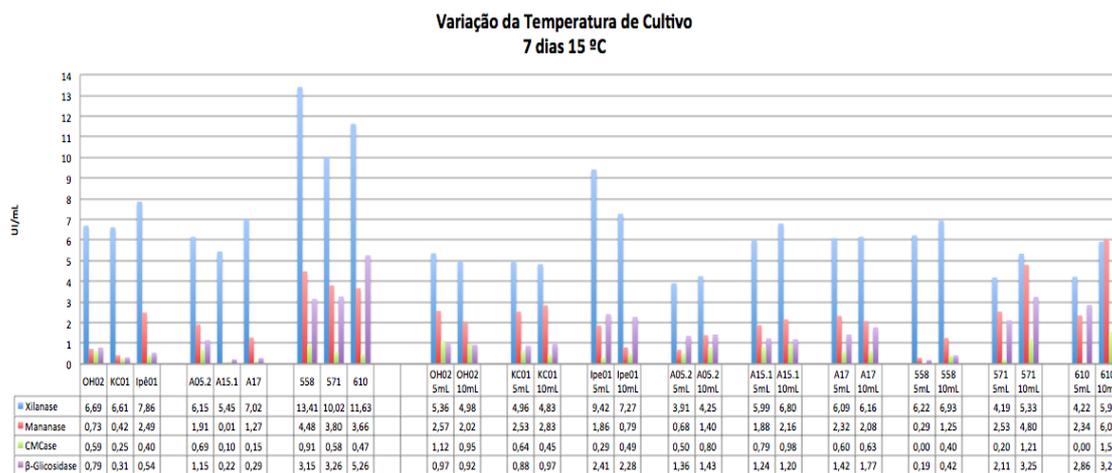


Figura 19 - Variação da temperatura de cultivo e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SF (3 da esquerda) e SSF (9 da direita), 7 dias e 15 °C

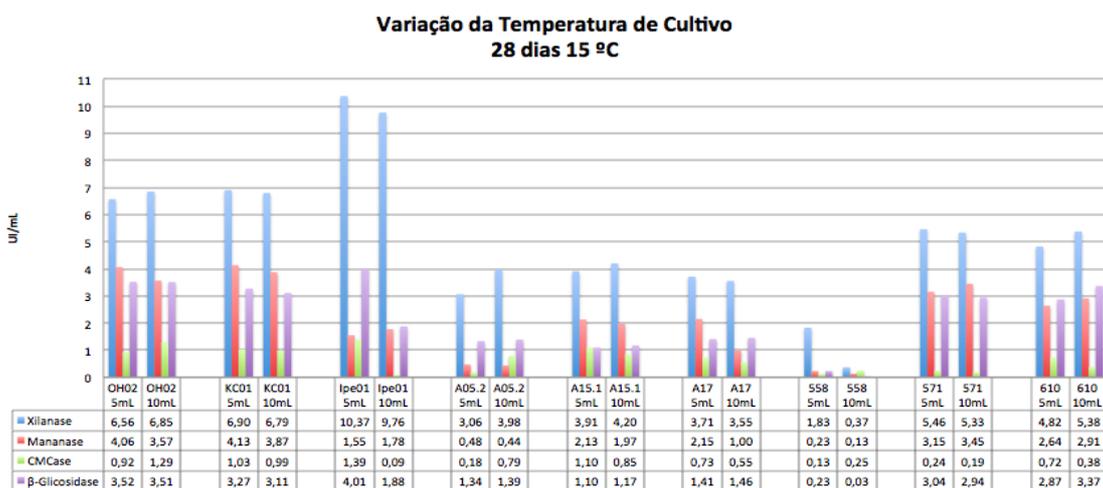


Figura 20 - Variação da temperatura de cultivo e atividades enzimáticas dos fungos cultivados em SSF, 28 dias e 15 °C

Na SSF podemos observar que a atividade de β -glicosidase foi maior do que a atividade de endocelulase para todos os fungos estudados. E que a β -glicosidase aqui produzida apresentou valores de atividade maiores do que os relatados para SF, com exceção dos fungos da Antártica. Entretanto, é sabido que a β -glicosidase é uma enzima “chave” para a completa degradação da celulose, fornecendo assim carbono e energia para o fungo. Dessa forma, sua maior expressão influencia diretamente na melhor degradação do material lignocelulolítico.

A atividade xilanolítica atingiu seu máximo (14 UI/mL, 11,4 UI/mL e 6,9 UI/mL) em 7 dias de cultivo com volume de inóculo de 5 mL, 10 mL e 10 mL para os

fungos do Cerrado, Costa Marinha e Antártica respectivamente). Já as atividades de mananase e CMCase tiveram sua maior expressão (4,3 UI/mL, 3,5 UI/mL e 6 UI/mL) e (1,7 UI/mL, 0,8 UI/mL e 1,5 UI/mL) em 7 dias de cultivo com volume de inóculo de 5mL, 5mL e 10mL para os fungos do Cerrado, Costa Marinha e Antártica respectivamente). Por fim, a produção mais elevada de β -glicosidase (5,2 UI/mL, 5,9 UI/mL e 3,2 UI/mL) em 7 dias de cultivo com volume de inóculo de 5 mL, 10 mL e 10 mL para os fungos do Cerrado, Costa Marinha e Antártica respectivamente). Todos os valores de atividades medidos foram gerados através da fermentação em estado sólido a 28 °C para Cerrado e Costa Marinha e 15 °C para os fungos da Antártica.

Dessa forma, com a variação da temperatura as enzimas para os fungos do Cerrado e Costa Marinha foram melhores expressas no cultivo a 28 °C e 7 dias, como descritos na seção 5.4. Já para os fungos da Antártica, todas as cepas mantiveram melhores resultados quando inoculadas também por 7 dias mas cultivados a 15 °C. Os melhores resultados dessa fermentação apresentam-se com a cepa 558 produzindo atividade xilanólítica de 6,9 UI/mL, com a cepa 610 produzindo 6 UI/mL e 1,5 UI/mL de atividade mananolítica e de CMCase, respectivamente, e com a produção de β -glicosidase com atividade de 3,2 UI/mL para as cepas 571 e 610.

5.5.1 MELHORES RESULTADOS SSF

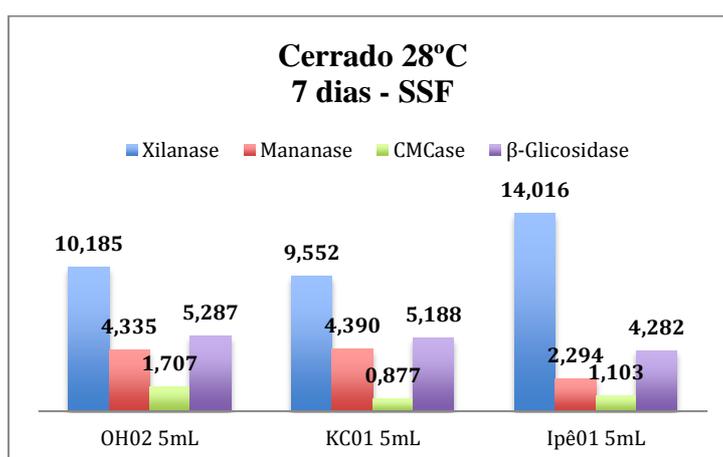


Figura 21 - Melhores condições observadas para maiores produções enzimáticas dos fungos do Cerrado cultivados em SSF, por 7 dias a 28 °C

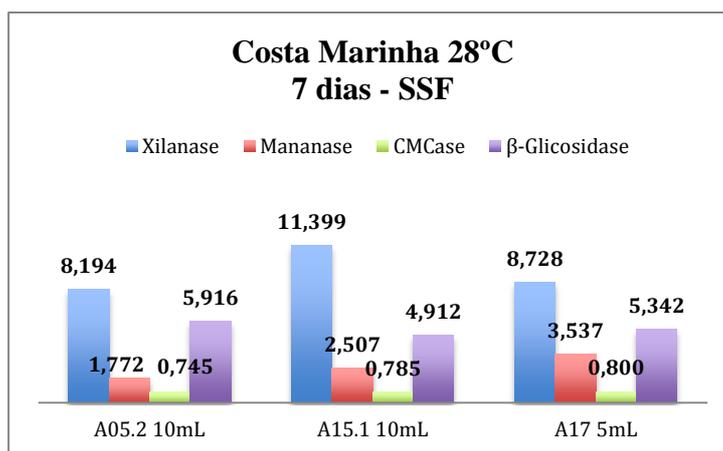


Figura 22 - Melhores condições observadas para maiores produções enzimáticas dos fungos da Costa Marinha cultivados em SSF, por 7 dias a 28 °C

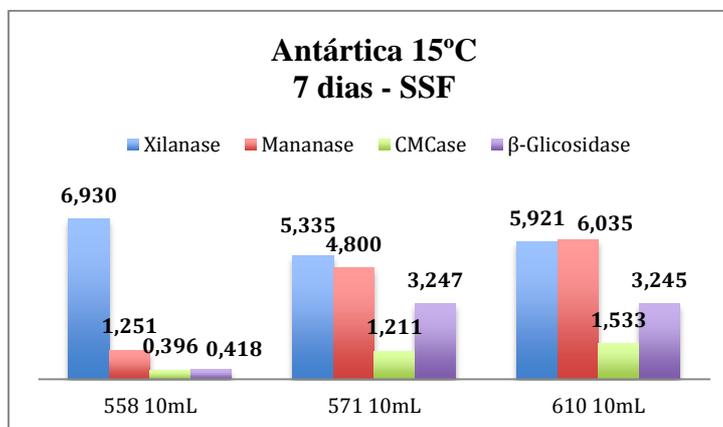


Figura 23 - Melhores condições observadas para maiores produções enzimáticas dos fungos da Antártica cultivados em SSF, por 7 dias a 15 °C

Conforme apresentado nas Figuras 21, 22 e 23, uma correlação pode ser observada no perfil das produções de celulases e hemicelulases, onde a expressão da xilanase foi maior quando comparada às demais enzimas analisadas. Quanto à expressão da endocelulase CMCase, observa-se na SSF também uma baixa produção em todas as cepas, sendo praticamente inexistente nos fungos da Costa Marinha.

Chang *et al.* (2009) mostraram atividade de duas linhagens de *Bacillus* sp. cultivados em meio sólido, com atividades de 1,9 U/mL e 2,33 U/mL de CMCase mostrando semelhança com os resultados obtidos no presente trabalho. Tavares (2012) obteve condições consideradas mais eficientes que os resultados obtidos no trabalho para CMCase. Através de cultivo em SSF, em 48 horas para o microrganismo *Aspergillus niger* em resíduos de caju e acerola, contendo 50% de umidade, atingiram

valores de atividades enzimáticas de CMCase (6,8 e 11,7 U/mL). Porém obteve valores xilanolíticos inferiores (2,6 e 4,1 U/mL).

Brito (2015) obteve resultados semelhantes aos encontrados no trabalho, utilizando *Aspergillus oryzae* em SSF usando a casca de arroz como substrato por 141,5 horas de fermentação, a 33 °C e com 58,5% de umidade produziu 1,72 U/mL de atividade de CMCase e atividade enzimática da xilanase de 9,03 U/mL em 137 horas de fermentação, 30 °C com 60% de umidade. Já utilizando casca de amendoim como substrato foram encontrados 4,29 U/mL de CMCase em 192 horas de cultivo e 9,54 U/mL em 151 horas, ambas sob as condições de 36 °C e 50 % de umidade.

Gottschalk *et al.* (2013) obtiveram a produção de xilanase pela cepa mutante *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, cultivado a 30 °C e 200 rpm. Os resultados obtidos mostraram níveis máximos de xilanase de 36.900 UI/L em 48h em farelo de trigo como substrato e 11.200 UI/L em 72h em okara como substrato. O resultado quanto à fermentação em farelo de trigo se mostrou superior aos evidenciados no presente trabalho, porém quando o substrato foi okara (derivado da soja) os valores se assemelharam melhor aos encontrados.

Nishida *et al.* (2013) encontraram a maior atividade de β -glicosidase através do microrganismo *Aspergillus awamori* 3,6 U/mL em farelo de trigo e 3,34 U/mL em misturas de farelo de soja e coroa de abacaxi com 5 e 7 dias de fermentação em estado sólido. Já I-Son *et al.* (2011) analisaram a atividade de β -glicosidase de 42 fungos regionais, e os seis melhores produtores dessa enzima apresentaram atividade no intervalo de 2,0 U/mL – 2,5 U/mL, enquanto Leite *et al.* (2008) registraram, em resíduos industriais, a atividade máxima dessa enzima de 1,3 U/mL por *Aureobasidium pullulans* e 7,0 U/mL por *Thermoascus aurantiacus*, mostrando que as atividades encontradas no presente trabalho são relevantes, tornando os microrganismos viáveis para estudos posteriores.

5.5.2 COMPARAÇÃO ATIVIDADES SF X SSF

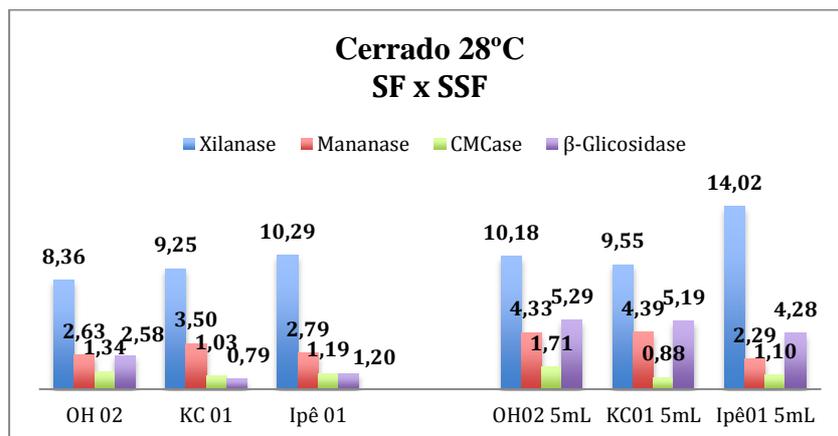


Figura 24 - Gráfico comparativo das atividades enzimáticas dos fungos do Cerrado cultivados em SF (esquerda) e SSF (direita) nas melhores condições avaliadas

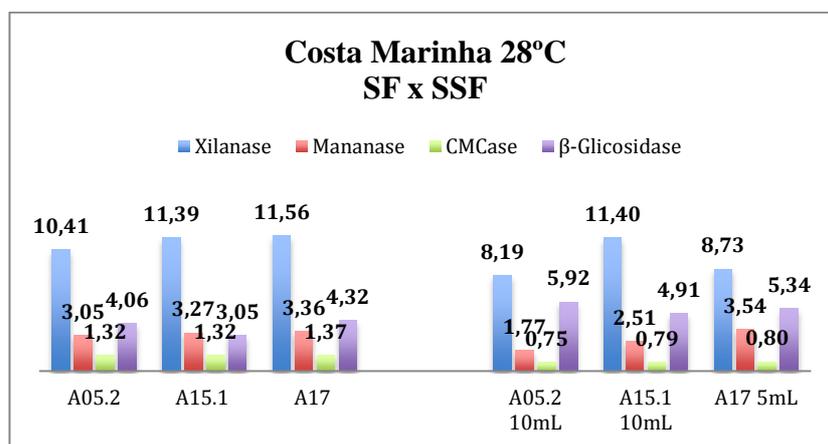


Figura 25 - Gráfico comparativo das atividades enzimáticas dos fungos da Costa Marinha cultivados em SF (esquerda) e SSF (direita) nas melhores condições avaliadas

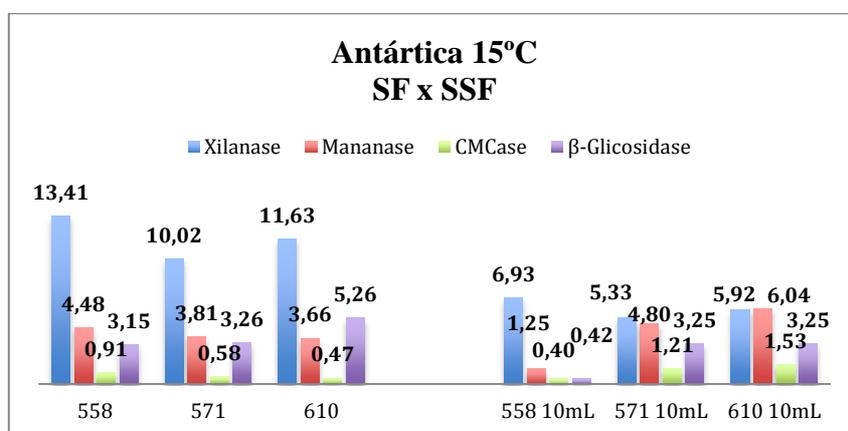


Figura 26 - Gráfico comparativo das atividades enzimáticas dos fungos da Antártica cultivados em SF (esquerda) e SSF (direita) nas melhores condições avaliadas

Partindo do princípio de que para obtenção de enzimas, o processo fermentativo é o ponto de referência, visto que ele contribui para a produção do produto alvo, suas condições, como pH do meio de cultura, temperatura de incubação, aeração, fonte de nitrogênio e carbono e concentração do inócuo do fungo são determinantes nesse processo, pois as pressões seletivas sofridas por eles é que ditarão a produção dos seus metabólitos (Hölker *et al.*, 2004; Graminha *et al.*, 2008). Quando comparados os dois tipos de fermentações para os fungos do Cerrado, cujo ambiente natural é mais seco, a fermentação sólida gerou maior valor de expressão enzimática. Já para os fungos da Costa Marinha e da Antártica, cujos ambientes naturais são mais úmidos, a fermentação submersa culminou em maiores produções enzimáticas, com maior destaque para os fungos da Antártica. Conforme observado nas Figuras 24, 25 e 26 o perfil de expressão se mantém constante quando comparadas as fermentações líquidas e sólidas, onde a xilanase sempre se mantém sendo expressa mais significativamente, seguida pela β -glicosidase, mananase e por fim a expressão menos expressiva da CMCase.

As cepas dos fungos da Antártica quando cultivada em SF praticamente não apresentam CMCase e possuem elevadas quantidades de xilanase, sugerindo aplicabilidade na indústria de papel e celulose quando cultivada nessas condições (Figura 26). A produção de β -glicosidase dos fungos do Cerrado e Costa Marinha foi maior quando cultivados em SSF para todas as cepas, sendo essa uma via alternativa para maior produção dessa enzima de interesse; visando, por exemplo, aplicabilidade na indústria de biocombustíveis (Figuras 24 e 25).

Transformar um problema ambiental em alternativa para subsidiar processos que gerem produtos de interesse industrial e que façam a economia girar, é mais um dos vários pontos positivos que a fermentação sólida tem a oferecer. A SSF é geralmente definida como o crescimento de microrganismos em material sólido (úmido) na ausência ou quase ausência de água livre, empregando um substrato natural ou inerte que é utilizado como suporte sólido (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2011).

O baixo teor de umidade significa que a fermentação pode ocorrer apenas por um número limitado de microrganismos. Embora algumas bactérias estejam sendo utilizadas, a SSF ocorre preferencialmente com leveduras e fungos filamentosos (Pandey *et al.*, 2000). Porém, em níveis industriais, o processo submerso continua sendo o principal sistema de geração de produtos obtidos via fermentação. O apelo ambiental

dos processos que empregam a SSF, aliado ao desenvolvimento de novos modelos de biorreatores, à modelagem e simulação poderá servir de poderosas ferramentas no aumento de sua aplicação industrial (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Segundo Pandey *et al.* (2005) apesar das enzimas industriais de origem microbiana serem produzidas, principalmente por fermentação submersa, a fermentação no estado sólido (SSF) representa um método favorável sendo cada vez mais considerada como uma alternativa para a produção de enzimas com aplicações industriais, possibilitando utilizar resíduos ou sub-produtos da agro-indústria como suporte/substrato (Tabela 14).

Tabela 14 - Vantagens e desvantagens da SSF em relação à SF.

Vantagens	Desvantagens
Elevada produtividade	Dificuldade de escalonamento
Melhor circulação de oxigênio	Homogeneização de baixa eficiência
Menos agressivo ao ambiente	Quantificação do crescimento microbiano
Reprodução do habitat natural	Dificuldade de automatizar o sistema
Menor possibilidade de contaminação bacteriana	Dificuldade de controle dos parâmetros do processo (pH, aquecimento, umidade, aeração, condições nutritivas)
Energia, água e custos reduzidos	Problemas com acúmulo de calor
Tecnologia simples	Produtos com elevada impureza, elevando os custos de recuperação do produto
Gera valor agregado dos produtos	
Problemas operacionais escassos	
Meio de cultivo de baixo custo	

Fonte: Couto; Sanromán, 2005; Paris *et al.*, 2010.

Outro aspecto importante de se abordar nessa discussão é a atividade enzimática específica. A partir da razão entre a atividade total e a quantificação de proteína total, calcula-se a atividade específica que é um parâmetro importante pois dessa forma avalia-se a atividade enzimática em relação à quantidade total de proteínas presentes na amostra. Em geral, enzimas com alta atividade específica apresentam seu processo de purificação mais facilitado (Gomes, 2014).

Os valores da quantificação de proteína total e atividade específica podem ser observados na Tabela 15 e 16 respectivamente. Onde o maior valor de atividade específica foi gerado pelo fungo denominado KC01 quando submetido à SF 28 °C, 120 rpm (283, 107, 31 e 24 UI/mg para xilanase, mananase, CMCase e β -glicosidase, respectivamente). A Figura 27 constam os valores da atividade enzimática e atividade específica do fungo KC01 para comparação. Devido a não padronização na contagem de micélio inoculado, os valores das atividades enzimáticas podem apresentar

divergências, dessa forma a análise através da atividade específica se faz mais fidedigna, sendo importante observar que além do valor da atividade enzimática, se a cepa produz muita proteína, sua purificação será dificultada. Portanto, deve-se haver um equilíbrio entre os valores da enzima de interesse e da quantidade de proteína produzida. Pode-se observar a diminuição da quantidade de proteína da cepa A17 quando cultivada em SSF e seus valores relevantes de atividade específica e atividades enzimáticas para xilanase e β -glicosidase. Assim como para a cepa 571 quando cultivada em SF.

Tabela 15 - Quantificação de proteína total

Quantificação de Proteína Total ($\mu\text{g/mL}$)			
Fermentação Submersa		Fermentação em Estado Sólido	
OH02	206,94	OH02	400,94
KC01	32,61	KC01	555,28
Ipê01	666,61	Ipê01	1555,89
A05.2	823,61	A05.2	957,28
A15.1	997,28	A15.1	1915,89
A17	1006,28	A17	391,94
558	830,28	558	496,94
571	415,61	571	1001,61
610	399,94	610	863,22

Tabela 16 - Tabela comparativa de atividade específica e atividade total em SF e SSF

Atividade Específica (UI/mg) e Atividade Total (UI/mL)								
Fermentação Submersa								
	Atividade Específica				Atividade Total			
	Xilanase	Mananase	CMCase	β -glicosidase	Xilanase	Mananase	CMCase	β -glicosidase
OH02	40,37	12,71	6,46	12,44	8,355	2,631	1,338	2,576
KC01	283,60	107,27	31,64	24,07	9,248	3,498	1,032	0,785
Ipê01	15,44	4,17	1,77	1,80	10,293	2,785	1,185	1,200
A05.2	12,63	3,69	1,59	4,93	10,407	3,046	1,316	4,061
A15.1	11,42	3,28	1,32	3,05	11,392	3,272	1,319	3,050
A17	11,48	3,34	1,35	4,29	11,558	3,361	1,368	4,321
558	16,15	5,39	1,09	3,79	13,409	4,483	0,910	3,149
571	24,11	9,15	1,39	7,85	10,024	3,805	0,581	3,263
610	29,06	9,15	1,17	13,15	11,626	3,660	0,468	5,260
Fermentação em Estado Sólido								
	Atividade Específica				Atividade Total			
	Xilanase	Mananase	CMCase	β -glicosidase	Xilanase	Mananase	CMCase	β -glicosidase
OH02 5mL	25,40	10,81	4,25	13,18	10,185	4,335	1,707	5,287
KC01 5mL	17,20	7,90	1,57	9,34	9,552	4,390	0,877	5,188
Ipê01 5mL	9,00	1,47	0,70	2,75	14,016	2,294	1,103	4,282
A05.2 10mL	8,56	1,85	0,77	6,18	8,194	1,772	0,745	5,916
A15.1 10mL	5,95	1,30	0,41	2,56	11,399	2,507	0,785	4,912
A17 5mL	22,26	9,02	2,04	13,62	8,728	3,537	0,800	5,342
558 10mL	13,94	2,51	0,79	0,84	6,930	1,251	0,396	0,418
571 10mL	5,32	4,79	1,20	3,24	5,335	4,800	1,211	3,247
610 10mL	6,85	6,99	1,77	3,76	5,921	6,035	1,533	3,245

CMCase = Carboximetilcelulase

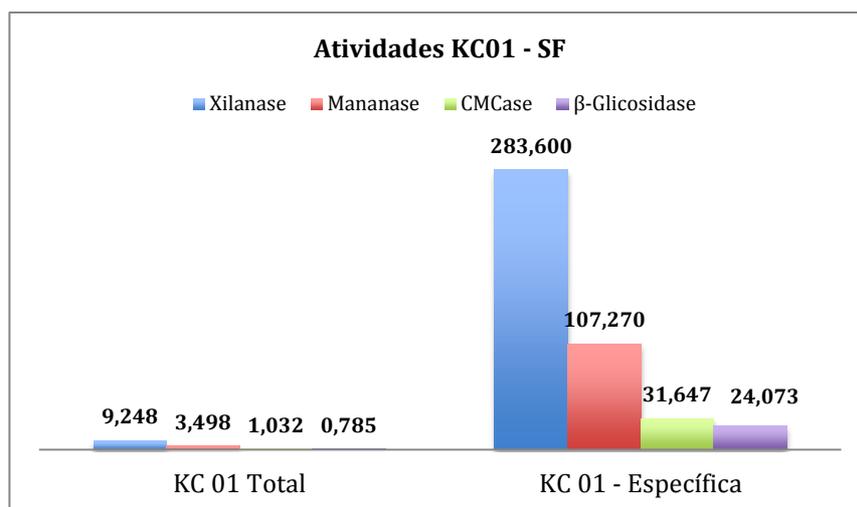


Figura 27 - Comparação dos valores de atividade total e atividade específica para a cepa KC01. As barras representadas no lado esquerdo do gráfico apresentam as atividades enzimáticas em UI/mL. As barras representadas no lado direito do gráfico apresentam as atividades específicas em UI/mg.

Os valores foram aqui apresentados visando como perspectiva do presente trabalho de bioprospecção a possível futura purificação das enzimas com altos valores de atividades específicas.

Dada à diversidade dos meios de cultivo e as variadas características das biomoléculas de interesse, a purificação de produtos biotecnológicos produzidos por microrganismos constitui uma etapa complexa do processo. Segundo Neto (2001) o nível de purificação desejada é dependente primeiramente do uso a qual se refere o produto final, determinando, dessa forma, o número de etapas empregadas no processo. Perde-se atividade em cada etapa de purificação, por isso, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado. Considerações como custos de material, tempo de trabalho e execução do processo são importantes em termos de economia. A criteriosa escolha dos processos aplicados em cada etapa possibilitará o melhor rendimento com um mínimo de perdas.

Um alto grau de pureza geralmente não é necessário em alimentos processados, detergentes e na indústria de papel e celulose, portanto, uma simples secagem de microrganismos cultivados para produção de proteína celular pode ser suficiente para sua comercialização, assim como caldos enzimáticos impuros, ou parcialmente purificados, podem ser utilizados como catalisadores em conversões químicas industriais. No entanto, uma elevada purificação final é necessária para grande parte dos produtos biotecnológicos, cuja alta pureza é fundamental, obtendo-se quantidades

relativamente pequenas (Chidi *et al.*, 2008). A escolha das técnicas de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima. Há um grande número de processos de separação que podem ser utilizados para o fracionamento. O processo deve ser cuidadosamente planejado, preocupando-se com a manutenção da estabilidade da proteína em diferentes temperaturas e diferentes valores de pH, de forma a obter adequada eficiência, velocidade, rendimento e pureza (Sanada, 2009).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS NO EXTRATO BRUTO

A caracterização enzimática é a etapa posterior à padronização do cultivo, extração das enzimas e medição das atividades. Diversos ensaios e técnicas podem ser utilizados na caracterização que revela, dentre as características das enzimas, aquelas que são promissoras do ponto de vista de aplicação industrial. A determinação do efeito da temperatura e do pH sobre a amostra enzimática estabelece o tipo de processo industrial em que ela pode ser aplicada.

O crescimento de fungos e sua produção enzimática são determinados por uma grande variedade de parâmetros, como a composição do meio, a temperatura e o pH. Para a otimização da utilização dessas enzimas na indústria, faz-se necessária uma prévia caracterização enzimática, que seja capaz de determinar os principais parâmetros influenciadores da atividade e estabilidade. A estrutura molecular de uma enzima é bastante frágil e, sabe-se que a preparação industrial enzimática tem se defrontado com os reconhecidos problemas de estabilidade frente ao calor, diferentes valores de pHs, presença de íons metálicos, agentes oxidantes e inibidores, sendo difícil estabelecer de modo específico e sistemático, todos os fatores que causam redução da atividade de uma enzima ou de uma classe de enzimas, no decorrer do tempo (Dias *et al.*, 2002).

Segundo Colombatto *et al.* (2003), a completa caracterização dos produtos enzimáticos antes de sua aplicação final é extremamente importante, uma vez que visa um correto e eficaz destino para aplicação do bioproduto. Os testes para a caracterização físico-química das enzimas obtidas foram realizados utilizando o extrato bruto obtido pelo cultivo dos fungos selecionados por fermentação submersa e em estado sólido em casca de soja, nos parâmetros ótimos de cada enzima.

5.6.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A eficiência das reações catalíticas são dependentes de uma temperatura ótima, influenciando diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade de reação e, por consequência, a conversão do substrato em produtos. Em temperaturas muito elevadas, ocorre a inativação enzimática, devido a desnaturação da mesma. Como consequência, o conhecimento da faixa de atividade ótima para cada enzima é fundamental para a otimização dos processos envolvendo-as (Carminatti, 2001).

No presente estudo, foram avaliadas enzimas de 9 amostras de SF e 9 de SSF, que apresentaram maior atividade entre 40 e 60 °C, e a temperatura ótima de cada enzima foi utilizada em ensaio posterior de pH. Apesar das maiores atividades estarem dentro de uma faixa fixa, a atividade enzimática foi expressa em uma faixa ampla de temperatura. Quando as enzimas presentes no meio foram submetidas a 70 °C e 80 °C, a atividade enzimática diminuiu para a maioria das enzimas, provavelmente devido à desnaturação das mesmas, com perda de sua configuração espacial, nessa elevada temperatura. Para algumas cepas nota-se que a mananase, não sofre alteração brusca de produção, mantendo-se constante até uma determinada temperatura. Desta forma, é possível que, para diversos processos industriais, a utilização de uma combinação de enzimas seja mais eficaz do que apenas uma determinada enzima, contanto que ambas suportem as condições industriais necessárias e não interfira na atividade uma da outra.

A influência da temperatura na atividade está representada nas Figuras 28 e 29, onde é possível perceber que as amostras seguem a mesma curva de resposta à temperatura, havendo apenas uma redução na escala de atividade de mananase, CMC_{ase} e β -glicosidase.

A temperatura ótima das enzimas para os fungos do cerrado em SF foi 50 °C e 60 °C, com destaque para o fungo KC01 que manteve 50 °C de temperatura ótima para todas as enzimas, e a CMC_{ase} que também manteve-se em 50 °C para todos os 3 fungos. Já a temperatura ótima das enzimas para os fungos da Costa Marinha brasileira em SF foi 40 °C a 60 °C, com destaque para o fungo A15.1 que manteve 60 °C de temperatura ótima para todas as enzimas. Por fim, a temperatura ótima de todas as enzimas para os fungos da Antártica em SF foi 50 °C para as 3 cepas de microrganismos estudados (Tabela 17).

A temperatura ótima das enzimas para os fungos do cerrado em SSF foi 50 °C e 60 °C, com destaque para o fungo OH02 que manteve 50 °C de temperatura ótima para todas as enzimas, e a CMCase e β -glicosidase que também mantiveram-se em 50 °C para todos os 3 fungos. A temperatura ótima das enzimas para os fungos da costa marinha brasileira em SSF foi 50 °C e 60 °C, com destaque para o mesmo padrão observado onde a xilanase, a CMCase e β -glicosidase tiveram temperaturas ótimas de 50 °C, e a mananase de 60 °C para todos os 3 fungos. Já a temperatura ótima de todas as enzimas para os fungos da Antártica em SSF foi 50 °C para as 3 cepas de microrganismos estudados (Tabela 18).

Tabela 17 - Valores das temperaturas ótimas dos fungos cultivados em SF

Temperatura Ótima - SF								
Fungo	Enzima	TO	Fungo	Enzima	TO	Fungo	Enzima	TO
OH 02	Xilanase	60	KC 01	Xilanase	50	Ipê 01	Xilanase	50
	Mananase	60		Mananase	50		Mananase	60
	CMCase	50		CMCase	50		CMCase	50
	β -glicosidase	60		β -glicosidase	50		β -glicosidase	60
A05.2	Xilanase	50	A15.1	Xilanase	60	A17	Xilanase	50
	Mananase	60		Mananase	60		Mananase	50
	CMCase	50		CMCase	60		CMCase	50
	β -glicosidase	50		β -glicosidase	60		β -glicosidase	40
558	Xilanase	50	571	Xilanase	50	610	Xilanase	50
	Mananase	50		Mananase	50		Mananase	50
	CMCase	50		CMCase	50		CMCase	50
	β -glicosidase	50		β -glicosidase	50		β -glicosidase	50

*CMCase = carboximetilcelulase

Tabela 18 - Valores das temperaturas ótimas dos fungos cultivados em SSF

Temperatura Ótima - SSF								
Fungo	Enzima	TO	Fungo	Enzima	TO	Fungo	Enzima	TO
OH 02	Xilanase	50	KC 01	Xilanase	60	Ipê 01	Xilanase	50
	Mananase	50		Mananase	60		Mananase	60
	CMCase	50		CMCase	50		CMCase	50
	β -glicosidase	50		β -glicosidase	50		β -glicosidase	50
A05.2	Xilanase	50	A15.1	Xilanase	50	A17	Xilanase	50
	Mananase	60		Mananase	60		Mananase	60
	CMCase	50		CMCase	50		CMCase	50
	β -glicosidase	50		β -glicosidase	50		β -glicosidase	50
558	Xilanase	50	571	Xilanase	50	610	Xilanase	
	Mananase	50		Mananase	50		Mananase	50
	CMCase	50		CMCase	50		CMCase	50
	β -glicosidase	50		β -glicosidase	50		β -glicosidase	50

*CMCase = carboximetilcelulase

5.6.1.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA (SF)



Figura 28 - Gráficos da influência da temperatura para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SF.

5.6.1.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (SSF)

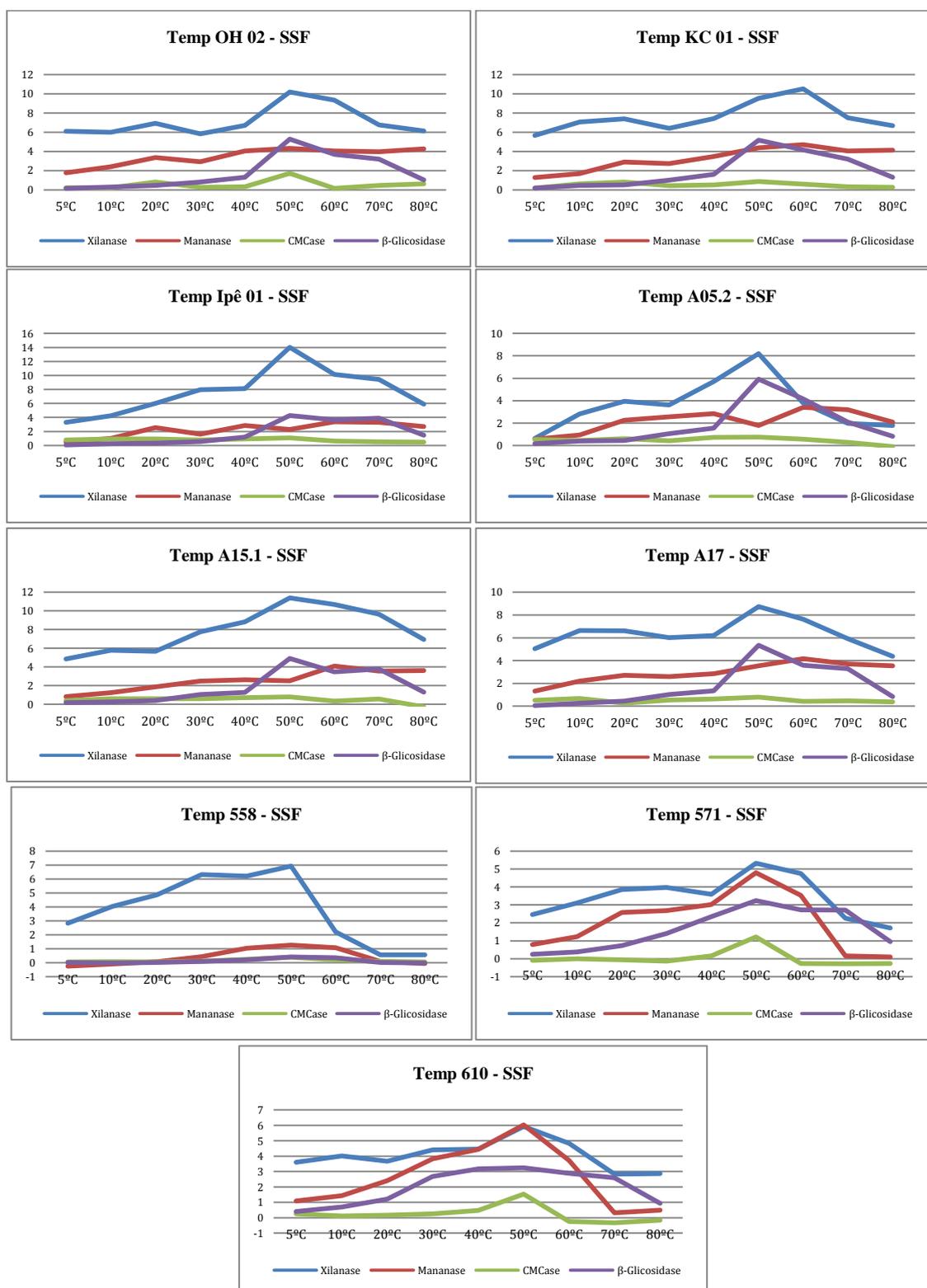


Figura 29 - Gráficos da influência da temperatura para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SSF.

A determinação do efeito da temperatura sobre uma amostra enzimática estabelece o tipo de processo industrial em que ela pode ser aplicada. Na maioria das vezes, a temperatura ótima para produção enzimática é a que corresponde à temperatura do habitat natural de onde o microrganismo foi isolado, não sendo regra, pois nem sempre a melhor temperatura de crescimento de um fungo é a melhor para expressão da atividade enzimática (Kheng e Ibrahim, 2005).

A temperatura propícia para a ação de endo-xilanases de bactérias e fungos varia entre 40 e 60 °C (Kulkarni *et al.*, 1999). Estudos do efeito da temperatura em xilanases de *Aspergillus* spp. selecionados por Subramaniyan e Prema (2002) revelam uma maior atividade na faixa entre 45 a 60 °C. Outros estudos mostram que pode haver variação nesta faixa de temperatura de acordo com o tipo de substrato. Medeiros *et al.* (2003) relataram como sendo de 40 °C a temperatura em que xilanases do extrato bruto de *A. niger* cultivado em meio líquido contendo xilana apresentam maior atividade. O extrato bruto do mesmo fungo, mas crescido em farelo de trigo, apresentou maior atividade a 48 °C, apesar de ser estável entre 45 e 55 °C (Zhao *et al.*, 2002). Em meio sólido, a maior atividade xilanólítica de *A. niger* crescido em bagaço de cana se deu a 35 °C (Gawande e Kamat, 1999).

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os resultados apresentados por Milanezi *et al.* (2012) que apresentaram 50 °C como a temperatura ótima para maior expressão de uma xilanase purificada de *Aspergillus niger*. Segundo Kulkarni *et al.* (1999) a temperatura ótima de xilanase de fungos varia entre 40 a 60 °C. Shah e Madamwar (2005) obtiveram temperatura ótima de 30 °C para expressão de xilanase utilizando extrato enzimático do fungo *Aspergillus foetidus*. Cysneiros *et al.* (2013) obtiveram 50 °C como temperatura ótima para expressão de xilanase e obtiveram boa atividade na faixa de 50 a 60 °C com a enzima β -glicosidase com o fungo *Humicola grisea* var. *Thermoidea*.

Por outro lado, a CMCase tem sido amplamente detectada em bactérias e fungos filamentosos. A maioria delas apresenta atividade ótima em temperaturas inferiores a 50 °C (Lee *et al.*, 2010). Ali *et al.* (2008) estudaram os efeitos da temperatura para produção de endoglucanase em *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*, obtendo temperatura ótima de 35 e 30 °C, respectivamente.

Alguns microrganismos mesófilos podem produzir enzimas que atuam a 60 °C ou maiores temperaturas (Gomes *et al.*, 2007). Decker *et al.* (2000) avaliaram a produção de β -glicosidase de cinco espécies de *Aspergillus* (*A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. japonicus* e *A. tubingens*). Somente a β -glicosidase produzida por *A. foetidus* obteve temperatura ótima de 60 °C, os outros tiveram sua temperatura entre 35 a 50 °C. Outras enzimas hemicelulolíticas como mananases de basidiomicetos também mostram-se especialmente estáveis com uma atividade máxima próximo a 50 °C. Para β -glicosidasas fúngicas entretanto, valores entre 50 e 70 °C têm sido relatados como temperatura ótima destas enzimas (Yazdi *et al.*, 2003).

Os fungos da Antártica, apesar de terem a melhor temperatura de fermentação a 15 °C, não deixam de produzir as enzimas a 28 °C, mostrando-se assim microrganismos termófilos moderados. Produzem, porém, melhores valores de atividade das enzimas analisadas quando submetidos a ensaios enzimáticos a 50 °C. A explicação concisa deste fenômeno é crítica devido a escassez de estudos envolvendo estes microrganismos. Neste sentido, trabalhos desenvolvidos nos ecossistemas antárticos objetivando a bioprospecção de metabólitos de possível aplicação industrial, farmacêutica e biotecnológica devem ser estimulados. As numerosas variáveis que influenciam a produção enzimática, segundo Schmidell *et al.* (2001), ocorrem devido à estrutura e a forma do sítio ativo da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. No caso da produção enzimática ocorrer em 50 °C para os fungos da Antártica infere-se que a produção enzimática ocorre em temperaturas maiores até mesmo para microrganismos psicrófilos.

As enzimas estudadas são sempre expressas no intervalo de temperatura encontrado no presente trabalho. Mais exemplos de atividades de CMC_{case} são encontrados nos trabalhos de Jang e Chen (2003) e Jung *et al.* (2015) que através do microrganismo *Streptomyces sp.* e *Penicillium sp.* respectivamente obtiveram temperatura ótima a 50 °C, e Ma *et al.* (2014) apresentaram temperatura ótima de 55 °C com o organismo *Mucor sp.*

Na natureza, em ambiente mesofílico, os organismos desenvolvem-se em duas etapas: na primeira, a microbiota cresce aceleradamente, utilizando, preferencialmente as fontes de carbono prontamente acessíveis e solúveis gerando calor por reações

metabólicas exotérmicas, elevando a temperatura para aproximadamente 40 °C. Somente após as fontes de carbono mais acessíveis estarem exauridas inicia-se a degradação dos polissacarídeos constituintes da biomassa, como celulose e hemicelulose, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares. O resultado desse processo é a degradação do material vegetal em temperaturas próximas a 60 °C (Gomes *et al.*, 2007). Dessa forma, no presente trabalho, a temperatura dos fungos quando expostos a substrato lignocelulósico ocorre nessas condições, justificando assim, os fungos da Antártica produzirem enzimas a 50 °C, porque somente nessas condições de temperatura é que há a produção das enzimas avaliadas.

5.6.2 INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Outro fator que afeta significativamente a atuação das enzimas é o pH do meio. Os testes de influencia de pH foram realizados utilizando o extrato bruto obtido pelo cultivo dos fungos selecionados para SF e SSF na temperatura ótima de cada enzima.

A influência do pH na atividade está representada nas Figuras 30 e 31, onde é possível perceber que as amostras seguem a mesma curva de resposta ao pH, havendo apenas uma redução na escala de atividade de mananase, CMCase e β -glicosidase. Nos gráficos fica evidente que altas atividades enzimáticas ocorrem preferencialmente em condições ácidas (pHs 4 e 5), mostrando a possibilidade do emprego desta enzima em processos cujas condições são ácidas. Para xilanase, mananase e CMCase o pH ótimo de todos os 9 fungos selecionados foi 5,4. Com relação à β -glicosidase o pH ótimo manteve-se em 4,8 para os mesmo avaliados. A mananase foi a enzima que mais se manteve estável ao longo da variação do pH. Nas condições alcalinas (pHs 7 e 8) a atividade residual da maioria das enzimas decaí. Portanto, as enzimas apresentaram um perfil típico de enzimas acidofílicas.

5.6.2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA (SF)

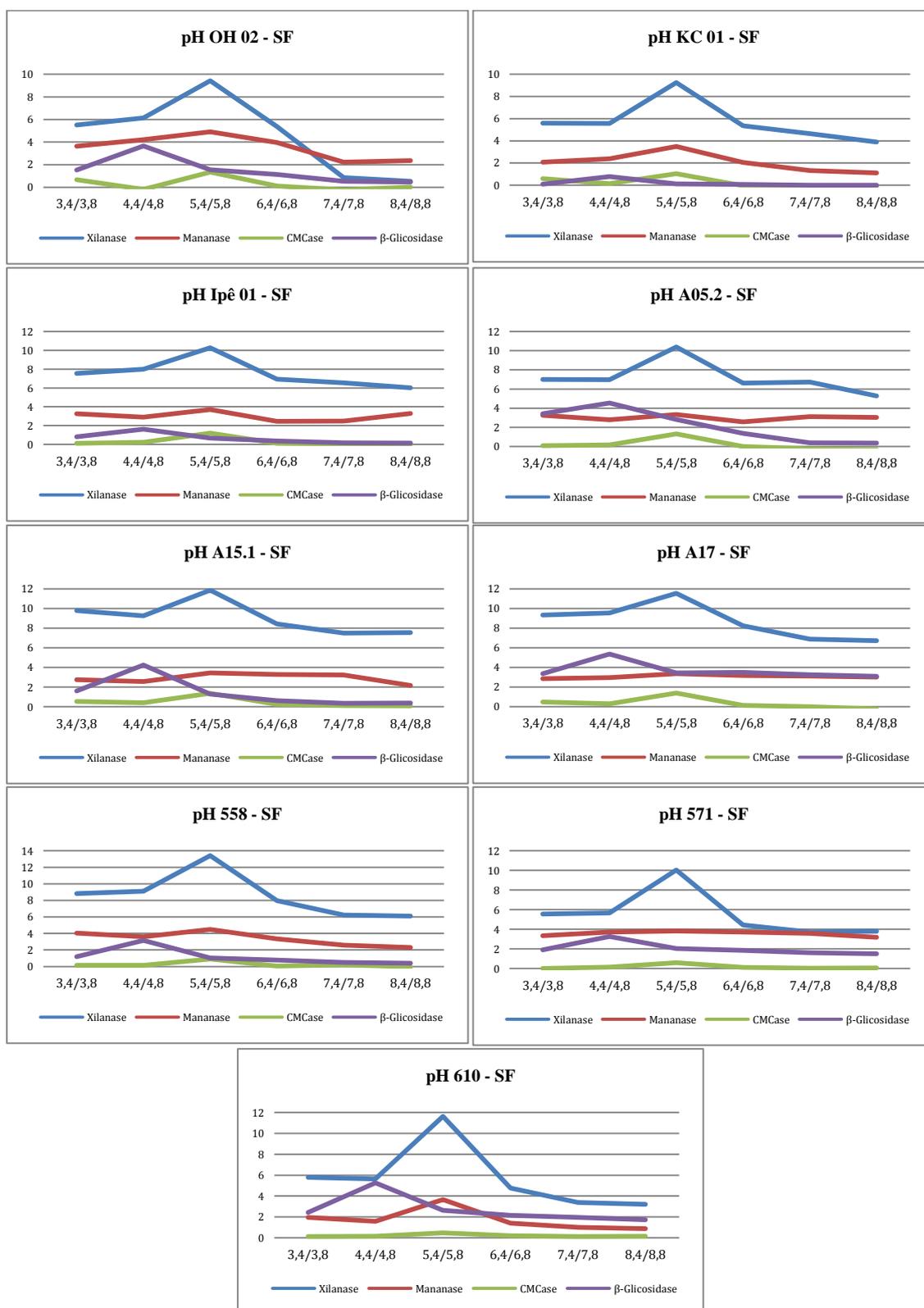


Figura 30 - Gráficos da influência do pH para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SF

5.6.2.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (SSF)

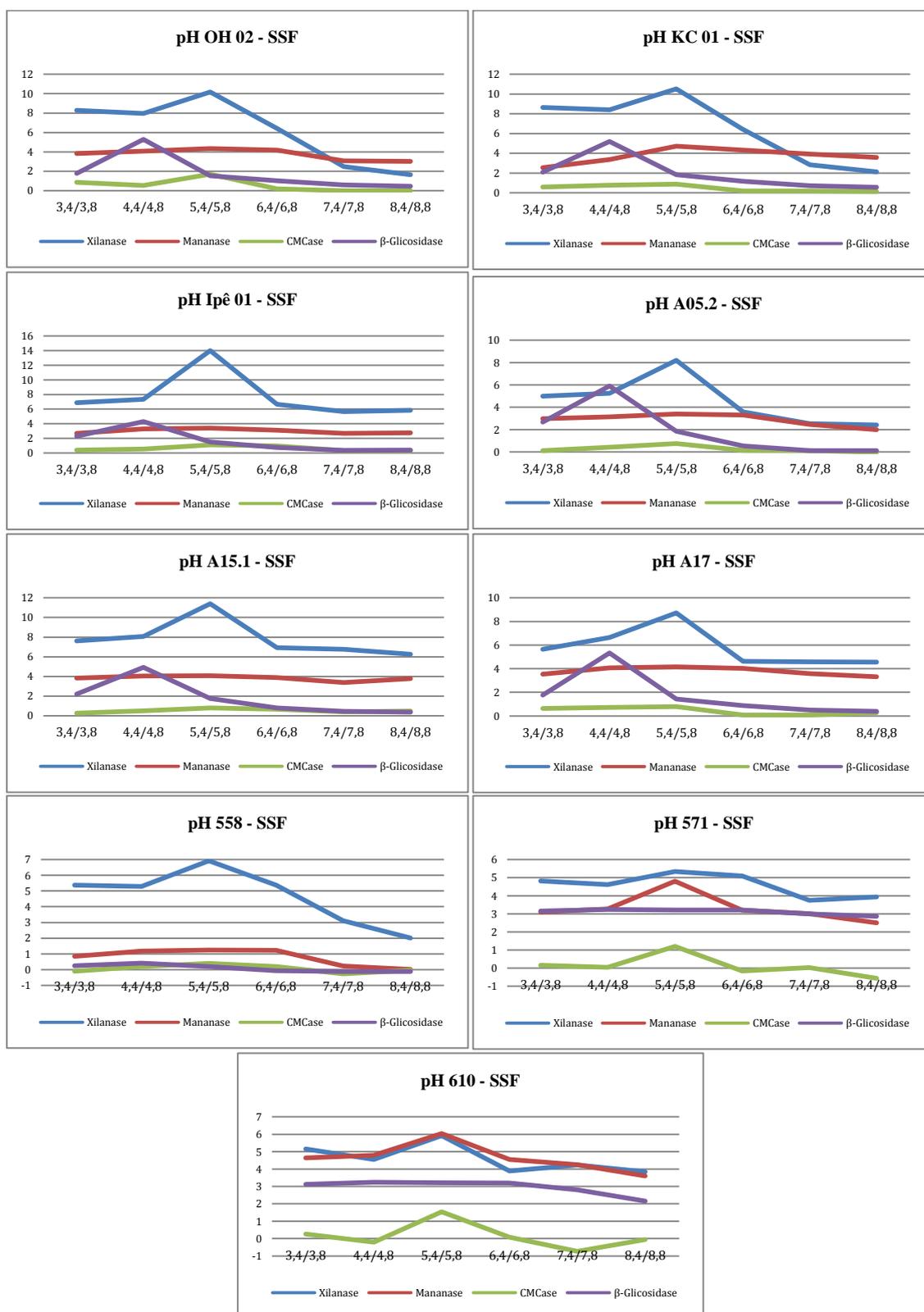


Figura 31 - Gráficos da influência do pH para a expressão enzimática dos fungos cultivados em SSF

Estes resultados são semelhantes aos da literatura, que mostra que geralmente as enzimas hidrolíticas produzidas por fungos apresentam valores de pH entre 3,0 e 7,0 (Sethuraman *et al.*, 1998), e corroboram a importância do pH do meio e do estabelecimento dos parâmetros enzimáticos ótimos para um melhor aproveitamento do processo. O pH ótimo manteve o mesmo padrão de produção das enzimas avaliadas para todos os diferentes fungos. Conforme discutido na seção anterior, a produção destas enzimas ocorre se o processo for submetido às condições necessárias como a exposição de material lignocelulósico em condições de cultivo que induzam a formação desse complexo enzimático. Dessa forma, a temperatura e pH ótimos, mantiveram-se semelhantes aos valores encontrados na literatura.

As xilanases da maioria dos organismos estudados são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, apresentando maior atividade no intervalo de pH de 4 a 7 (Kulkarni *et al.*, 1999). Por causa desta característica, enzimas como estas podem ser utilizadas em alimentação animal, sendo cruciais para a liberação de nutrientes no estômago ácido. Já as β -glicosidases são geralmente ativas em pH 5,0 e apresentam menor atividade em pH igual ou inferior 4,0 (Sonia *et al.*, 2008). Dependendo da fonte as β -glicosidases apresentam diferentes afinidades em relação aos substratos.

Kaur *et al.* (2007) estudou duas endoglucanases do fungo *Melanocarpus* sp., obtendo pH ótimo em 6,0 e 5,0. Zhang *et al.* (2006) obtiveram na avaliação enzimática do fungo *Aspergillus phoenicis* maiores produções em pH ácido (5,0) e em *Aspergillus niger* em pH entre 4,5 e 5,0 e com o fungo *Aspergillus oryzae* a maior atividade ocorreu quando o extrato foi incubado em pH 5,0.

Estes resultados indicam que as enzimas estudadas podem ter aplicação em processos cuja temperatura é moderada e o pH, ácido. Observa-se, nos últimos anos, o aumento do uso de xilanases que possuem pH ótimo abaixo de 5,5 (Subramaniyan e Prema, 2000), como é o caso de *A. fumigatus*, que requer pH abaixo de 3,0 na fase final do cultivo. Enzimas comerciais que apresentam atividade xilanolítica e que já são utilizadas na indústria têxtil no tratamento das fibras de algodão, exibem atividade ótima na faixa de pH de 4,5 - 5,0 a 50°C (Csiszár *et al.*, 2001). Devido à maior expressão enzimática da xilanase frente às demais enzimas analisadas, vale ressaltar a aplicabilidade nas biorefinarias, cujas enzimas mais utilizadas atualmente são de *T. reesei*, na temperatura de 50 °C e pH 5,0 (Merino e Cherry, 2007).

6 CONCLUSÃO

- Diversos fatores podem interferir sobre a obtenção de um bioproduto, portanto o estudo sobre produção, caracterização e otimização se fazem necessários com o intuito de melhorar a utilização do mesmo e rentabilidade do processo.
- Os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como fonte energética de baixo custo em processos de fermentação, obtendo assim, produtos com valor agregado e os resultados obtidos indicam que a casca de soja é um ótimo substrato na produção de xilanase, mananase, carboximetilcelulase (CMCase) e β -glicosidase.
- Três cepas de cada bioma foram selecionadas para os demais experimentos:
 - Cerrado: cepas OH02, KC01, Ipê01; Costa Marinha: cepas A05.2, A15.1, A17; Antártica: cepas 558, 571, 610.
- Recentemente a fermentação em estado sólido vem se tornando uma atrativa alternativa à fermentação submersa e foi possível observar um aumento de atividade enzimática para os fungos do cerrado quando cultivados em SSF por 7 dias a 28 °C.
- As atividades mensuradas mostraram-se mais expressivas para xilanase atingindo cerca de 13,4 UI/mL em SF e 14 UI/mL em SSF.
- Todas as enzimas mostraram-se mais expressivas quando cultivadas por 7 dias em 28 °C para fungos do Cerrado e Costa Marinha, e quando cultivadas por 7 dias em 15 °C para os fungos da Antártica.
- A produção enzimática foi maior nos fungos do cerrado cultivados com 5 mL de volume de inóculo adicionado, e para os fungos da Antártica com 10 mL.
- As enzimas apresentaram melhor atividade em pH 5,4 para xilanase, mananase e CMCase e pH 4,8 para β -glicosidase. A faixa de temperatura ótima se manteve entre 40 °C e 60 °C para todos as enzimas em ambos os tipos de fermentações.
- Dessa forma, os resultados permitem concluir que os fungos trabalhados apresentam potencial para a produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas através de SF e SSF em um meio de baixo valor agregado apresentando assim interesse biotecnológico.

7 PERSPECTIVAS

- Identificação molecular dos fungos isolados e produtores de celulases e hemicelulases;
- Purificação das celulases e hemicelulases produzidas pela cepa KC01 devido suas elevadas atividades específicas apresentadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA. www.abia.org.br. Disponível em: <www.abia.org.br>. Acesso em: 19/05/2016.

ADEMARK, P. et al. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 199–210, 1998.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**. v.34, n 10, p. 1729-38, 2011.

ALBERNAZ, L.C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 19, n.131, p. 116-21, 2010.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. **John Wiley and Sons**, 1996.

ALI, F.H.; SAAD EL-DEI, H.S. Production and Partial Purification of Complex by *Aspergillus Níger* and *Aspergillus nidulans* on Water Hyacinth Blend. **Journal of Applied Sciences Research**, p. 875-891, 2008.

ALMEIDA, M. **Celulases e hemicelulases de espécies de *Acremonium* endofíticos**. 2009 [Mestrado]. Departamento de Bioquímica agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ALMEIDA, R. **Avaliação da produção de L-Asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado**. 2015 [Mestrado]. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

ARANTES, V.; MILAGRES, A.M. Relevance of low molecular weight compounds produced by fungi and involved in wood biodegradation. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1586-95, 2009.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

BARATO, M. **Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas**. 2014 [Mestrado]. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

BASSO, L.A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 575-606, 2005.

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

BENTO, C.B.P.; CASARIL, K.B.P.B. Bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos. **Revista Faz Ciência, Unioeste**, v. 20, p. 151-180, 2012.

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

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

BIELY, P. et al. Endo- β -1, 4-xylanase families: differences in catalytic proprieties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 151-166, 1997.

BOKHARI, S.; LATIF, F.; RAJOKA, M. Purification and characterization of xylanases from *Thermomyces lanuginosus* and its mutant derivative possessing novel kinetic and thermodynamic properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 493-502, 2009.

BON, E.P.S. et al. Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado: Bioprocessos para produção de enzimas. **Cap. 5. Interciência, Rio de Janeiro - RJ**, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRITO, A. **Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre a casca de arroz e a casca de amendoim**. 2015 [Mestrado]. Departamento de Engenharia e Ciências dos alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2015.

BUSTAMANTE, M.M.C. et al. 15N Natural Abundance in woody plants and soils of central brazilian savannas (Cerrado). **Ecological Applications**, v.14, p. 200-13, 2004.

CAMACHO, N.A.; AGUILAR, O.G. Production, purification and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, p. 159-172, 2003.

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

CARMINATTI, C. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando Beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001 [Mestrado]. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

- CASTRO, A.M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CHANDEL, A.K.; DA SILVA, S.S. (Eds.). Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques. **Applications and Commercialization improve**, p. 207–233, 2013.
- CHANG, C. et al. Activity of cellulose from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from *Brassica* waste compost. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 304 – 308, 2009.
- CHAPLA, V.; BIASETTO, C.; ARAUJO, A. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium* **Journal of Biotechnology**, v. 123, p., 413– 433, 2006.
- CHI, Z.M. et al. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 534–538, 2007.
- CHIDI, S.B. et al. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspegillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008.
- CLARKE, A. Evolution, Adaptation And Diversity: Global Ecology In An Antarctic Context. In: HUISKES, A.H.L. et al. (Eds). *Antarctic Biology in a Global Context*, **Backhuys Publishers**, Leiden, pp. 3-17, 2003.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.1, p.3-23, 2005.
- COLOMBATTO, D. et al. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628–2638, 2003.
- COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production – review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- CRUZ, E.A. et al. Alpha-Amylase production by *Aspergillus niger* in cassava peels waste. **Journal Health Science**, v.13, n. 4, p. 245-9, 2011.
- CSISZÁR, E.; URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p.1065-1072. 2001

CUNHA, F.M. et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, 112, 270-274, 2012.

CUNHA, L. **Purificação e caracterização de uma xilanase obtida de *Aspergillus foetidus***. 2016 [Mestrado]. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CYSNEIROS, C.S.S. et al. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p. 426-435, 2013.

D'ELIA, T. **Isolation of bacteria and fungi from lake vostok accretion ice**. Tese [Doctor of Philosophy - Graduate College of Bowling Green State University], p.114, 2008.

D'AMICO, S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **European Molecular Biology Organization**, v.7, p.385-389, 2006.

DA SILVA, M.C.G. **Diversidade de Microrganismos depositados em neve/gelo recente na Ilha Rei George/Península Antártica**. 2007 [Mestrado]. Departamento de Ciências biológicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

DANTAS, E.M.; AQUINO, L.C.L. Fermentação em Estado Sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

DAROIT, D.J. et al. Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 904-908, 2007.

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

DIAS, J.C.C.A. et al. Avaliação da estabilidade *in vitro* de uma protease comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n.6, p. 618-622, 2002.

DOS SANTOS, J. et al. Marine-derived fungus *Aspergillus cf. tubingensis* LAMAI 31: a new genetic resource for xylanase production. **AMB Express**, v. 6, p. 25, 2016.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 Ed, Educs, Caxias do Sul - RS, 2010.

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X.Y., Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulose from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4111-4119, 2010.

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

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature.**, v.1, p.200-208, 2003.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. **Berlin: Walter de Gruyter**, p. 613, 1989.

FERREIRA, A.N. et al. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 207-213, 2011.

FERREIRA, E.; PULS, J.; COUGHLAN, M. Biochemical characteristics of two endo- β -1, 4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of industrial microbiology**, v. 11, n. 3, p. 171-180, 1993.

FERREIRA, H.M.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 23–29, 2004.

GALLO, M.B.C. et al. Atividade Citotóxica de Extratos de Fungos Endofíticos Isolados de *Smallanthus sonchifolius*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n. 2, p. 402-4, 2007.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: E. ESPOSITO; J.L. AZEVEDO (Eds.); *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2 Ed., p.125–173, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

GAO, S.S. et al. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, p 59-70, 2011.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS, J. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GARCIA, A. **Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira**. 2011 [Mestrado]. Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y. Production of *Aspergillus* xylanases by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.511-519,1999.

GEORLETTE, D. et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.25–42, 2004.

GOMATHI, D. et al. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 67-73, 2012.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GOMES, H. **Perfil e caracterização de holocelulases secretadas por *Penicillium fellutanum* com ênfase em mananase**. 2014 [Mestrado]. Departamento de Biologia microbiana, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

GONÇALVES, F.A. et al. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.

GOTTSCHALK, L.M.F. et al. Comparação da produção das enzimas xilanase e feruloil esterase em fermentação em estado sólido e submersa pela cepa mutante *Aspergillus niger* 3T5B8. XIX Símpósio Nacional de Bioprocessos, 2013.

GRAMINHA, E.B.N. et al. Review Enzyme production by solid -state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.

GRIMM, L.H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

HAMMEL, K.E. Fungal degradation of lignin. In: CADISCH, G.; GILLER, K.E. (eds) Plant litter quality and decomposition. **CAB-International**, p. 33- 46, 1997.

HAN, Y.; CHEN, H. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v.99 , p. 6081–6087, 2008.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimensiono f biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Reasearch**, v.95, p.641-655, 1991.

HE, H. et al. Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. **Applied biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3148-3161, 2015.

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

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, n.2, p. 175-86, 2004.

HORN, S.J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2012.

I-SON, N.G. et al. Dynamic synergistic effect on *Trichoderma reesei* cellulases by novel β -glucosidases from Taiwanese fungi. **Bioresource Technology**, v. 102, p.6073–6081, 2011.

JANG, H.; CHEN, K. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.263-268, 2003.

JARAMILLO, P. **Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo**. 2014 [Doutorado]. Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

JEGANNATHAN, K.R.; NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.

JOVANOVIC, I. et al. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, p. 687-697, 2009.

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

JUNG, Y. R. et al. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v.76, p.66-71, 2015.

KALOGERIS, E. et al. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207–213, 2003.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v.98, p. 74-81, 2007.

KHANDEPARKER, R.; NUMAN, M.T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 635-644, 2008.

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

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n.4, p. 345–351, 2002.

KLEMKE, C. et al. New secondary metabolites from the marine endophytic fungus *Apiospora montagnei*. **Jornal of Natural Products**, v.67, p. 1058-1063, 2004.

KLINK, C.; MACHADO, R. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. The Higher Fungi. Marine Mycology. **Academic Press**, New York, 1979.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, n. 4, p. 411-456, 1999.

LEE, K. et al. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 206–211, 2010.

LEITE, C.L. Taxonomia de fungos. In: E. ESPOSITO; J.L. AZEVEDO (Eds.); Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed., p.47–91, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

LEITE, R.S.R. et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391 – 395, 2008.

LIMA, A.L.G. et al. *Aspergillus fumigatus* Thermophilic and Acidophilic Endoglucanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.155, p.321-329, 2009.

LIN, T.; CHEN, C. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1103– 1109, 2004.

LINARDI, V.R. **Produção de Celulases pelo *Trichoderma viride* QM 9414 (*T. reesei*, Simmons, 1977) frente à variação de meios de cultura, substratos celulósicos e pH.** Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1998.

LOPES F. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos.** 2011 [Mestrado]. Departamento de Biologia celular e molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LOQUE, C.P. **Fungos associados à Macroalgas do litoral do Paraná e Península Antártica.** 2009 [Mestrado] Departamento de Ecologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

LYND, L.R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66 , p. 506-577, 2002.

MA, R. et al. Identification and characterization of a novel endoglucanase (CMCase) isolated from the larval gut of *Bombyx mori*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.17, p. 67-71, 2014.

MACHADO, R.B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Relatório Conservação Internacional**, p.1-23, 2004.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K.M. Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n.3 , p. 506 – 577, 2000.

MARCO, E. **Produção e caracterização de celulasas produzidas por um isolado de *Bacillus sp.***. 2012 [Mestrado]. Departamento de Microbiologia agrícola e do meio ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MARCO, J. **Produção e caracterização de mananase de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão da soja.** 2014 [Mestrado]. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MARTARELLO, R. **Purificação de uma beta-galactosidase produzida por *Aspergillus foetidus* através de técnicas cromatográficas.** 2016 [Mestrado] Departamento de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MATKAR, K. et al. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation.**, v.78, p. 24-33, 2013.

MBATA, T.I. Isolation of fungi in hyper saline Dead Sea water. **Sudanese Journal of Public Health.** v. 3, p. 170-172, 2008.

MEDEIROS, R.G.; HANADA, R.; FILHO, E.X.F. Production of xylan- degrading enzymes from Amazon Forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, n. 52, p. 97-100, 2003.

MENEZES, C.; SILVA, I.; DURRANT, L. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos.** v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MENEZES, C.B. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiology Research**, v. 165, p. 466-482, 2010.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

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

MESQUITA, P. **Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* - busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes.** 2011 [Mestrado]. Departamento de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MICHELIN, M. et al. Production and properties of xylanases from *Aspergillus terricola* Marchal and *Aspergillus ochraceus* and their use in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 7, p. 813-821, 2010.

MILANEZI, N. et al. Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 2, p. 363-371, 2012.

MILANEZI, N. **Purificação e caracterização de uma endo-1,4-B-xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial**. 2010 [Mestrado] Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

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

Ministério do Meio Ambiente SBF. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. **Biodiversidade Brasileira**. 2002.

MOHAPATRA, B.R.; BANERJEE, U.C.; BAPUJI, M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. **Journal Biotechnol**, v. 60, p.113–117, 1998.

MOREIRA, L. et al. Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013.

MOREIRA, L.R.D.S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. 2013 [Doutorado]. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MOREIRA, L.R.S.. et al. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, v. 10, p. 35-45, 2008.

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

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 242 , p. 28-33, 2007.

NAGY, Z. et al. Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein Expression Purification**, v.21, p. 24-9, 2001.

NAIR, S.G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal Microbiology**, v. 2, p.82–86, 2008.

NCUBE, T. et al. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118-123, 2012.

NETO, J.B. Purificação de enzimas. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biociologia Industrial**, v.3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 377-390, 2001.

NISHIDA, V. et al. Produção de B-glicosidases por *Aspergillus* spp. em cultivos em estado sólido. **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biociologia**, 2013.

ÖHGREN, K. et al. Effect of hemicelluloses and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503–2510, 2007.

OLIVEIRA, A.N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

ONOFRI, S. et al. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v.40, p. 1657–1664, 2007.

OSTERHAGE, C. et al. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. **Journal National Products**, v.65, p. 306-313, 2002.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. **Bioresources Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.

PANDEY, A. et al. Enzyme Technology. 1 ed. New Delhi: **Asiatech Publishers Inc.**, 2005.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149–162, 1999.

PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.

PARIS, L.D. et al. Estudo do crescimento de *Aspergillus casingii* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. **Estudos Tecnológicos**, v. 6, n. 1, p. 22-35, 2010.

PARRY, N.J. et al. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable β -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemistry Journal**, v. 353, p. 117-127, 2001.

PASSARINI, M.R.Z. et al. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drummacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 99-111, 2013.

PIKUTA, E.V. et al. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 33, p. 183 - 209, 2007.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p. 45-61, 2002.

POLIZELI, M.L. et al. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POSCH, A.E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends Biotechnol**, v.31, p. 37-44, 2013.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v.30, n.6, p. 1446-55, 2007.

QIN, Y. et al. Isolation and characterization of a thermostable cellulose-producing *Fusarium chlamyosporum*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 1991 – 1997, 2010.

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

RAGHUKUMAR, C. et al. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**; v.31, p. 433–41, 2004.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.

RAGUENES, G. et al. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 989-995, 1997.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. **Tecnologia Enzimática**. Curitiba: SENAI, 2009.

RODRIGUES, R. **Produção, purificação e caracterização de celulasas e hemicelulasas do fungo da podridão-branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2**. 2014 [Doutorado] Departamento de Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA, U.F. et al. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p. 912-919, 2011.

ROWEL, M.R. et al. Handbook of wood chemistry and wood composites. **Cap. 3: Cell wall chemistry**. CRC Press, p. 487, 2005.

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

RUISE, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v.6, p.127-141, 2007.

SAIKKONEN, K. et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.29, p. 319-43, 1998.

SANADA, C.T.N. **Produção de α -galactosidase a partir de vinhaça de soja**. 2009 [Mestrado]. Departamento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SANDRIM, V. et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1823-1828, 2005.

SANTOS, F. **Produção e caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense**. 2014 [Mestrado] Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourado, Dourado, 2014.

SANTOS, T.C. et al. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n.1, p. 65-71, 2013.

SCHMIDELL, W. et al. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, 2001.

SCIUTO, D. **Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma engoclicanase**. 2015 [Mestrado] Departamento de Biologia Celulase, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SETHURAMAN, A.; AKIN, D.E.; ERIKSSON, K.E. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 27, p. 37-47, 1998.

SHAH, A R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1763-1771, 2005.

SILVA, C.A.A. et al. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, 2013.

SILVA, J.M.C.; BATES, J.M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. **BioScience Journal**, v.52 , n.3 ,p.225-34, 2002.

SINGH, S.K. et al. Production of enzymes. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation. **1 ed. New Delhi: Springer**, p.181-204, 2008.

SINGHANIA, R.R. et al. Properties of a major B-glicosidase-BGL 1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1521-1524, 2011.

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

SIQUEIRA, F. **Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases**. 2010 [Doutorado] Departamento de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

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

SIQUEIRA, F.G. et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, n-1, p.20-26, 2010.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205–218, 2003.

SONIA, K.G. et al. Identification of glucose tolerant acid active b-glicosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 599–604, 2008.

SOUZA, A. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **ACTA Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, P.M.D. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolado do cerrado centro-oeste brasileiro**. 2015 [Doutorado]. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005 [Mestrado] Departamento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-46, 2002.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 1-7, 2000.

SUN, R. et al. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochem Lett**, v. 4 n. 2, p. 101-5, 2011.

SURYANARAYANAN, T.S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v.23, n.1, p 9-19, 2009.

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

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Occurrence and structural diversity of fungal metabolites with antibiotic activity. **Quimica Nova**, v.31, n.7, p. 1807-13, 2008.

TAVARES, I. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por *Aspergillus niger* a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de *Cróton grewioides***. 2012 [Mestrado]. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

TINDALL, B.J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 271-283, 2004.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia. 8. ed.** São Paulo: Artmed, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia. 5. Ed.** São Paulo: Elsevier, 2005.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169-183, 2000.

UDAY, U. et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041-1054, 2016.

VAN TILBEURGH, H.; CLAEYSSSENS, M. Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. *Febs Letters* v.187, n.2, p.283-288, 1985.

VAN ZYL, W.H. et al. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1203–1213, 2010.

VINCENT, W.F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v.12, p.374–385, 2000.

VITOLO, M.; PESSOA, A. Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial. **1ed. São Paulo-SP: Blucher**, 2015.

WEINGARTNER, V. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger***. 2010

[Mestrado]. Departamento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

XIMENES, F.; SILVEIRA, F.; FERREIRA, E. Production of β -Xylosidase Activity by *Trichoderma harzianum* Strains. **Current microbiology**, v. 33, n. 2, p. 71-77, 1996.

XIMENES, F.A. et al. Xylan-degrading enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi. **Review of Microbiology**, v. 5, p. 22-28, 1997.

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

XU, B. et al. Endo- β -1,4- Mannanase from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 267-277, 2002.

YAZDI, M.T. et al. Purification and characterization of two intracellular β -glucosidases from the *Neurospora crassa* mutant cell-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 79-84, 2003.

ZHANG, C.; KIM, S.K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**. v.8, p.1920-1934, 2010.

ZHANG, H.W. et al. Biology and chemistry of endophytes. **National Products Rap**, v.23, n.5, p. 753-71, 2006.

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

ZHAO, J. et al. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. **Enzyme and Microbial Tehnology**, v. 30, p.734-740, 2002.

ANEXOS

Tabela 1 - Resumo dos parâmetros analisados para fungos do cerrado em SF e SSF nas melhores condições encontradas.

Fermentação Submersa						Fermentação em Estado Sólido					
Fungo	Enzima	Atividade 28 °C	Atividade 15°C	Temperatura	pH	Fungo	Enzima	Atividade 28 °C	Atividade 15 °C	Temperatura	pH
OH 02	Xilanase	8,355	6,694	60	5,4	OH 02 5mL 7 dias	Xilanase	10,185	5,355	50	5,4
	Mananase	2,631	0,728	60	5,4		Mananase	4,335	2,566	50	5,4
	CMCase	1,338	0,590	50	5,4		CMCase	1,707	1,120	50	5,4
	β -glicosidase	2,576	0,793	60	4,8		β -glicosidase	5,287	0,974	50	4,8
KC 01	Xilanase	9,248	6,613	50	5,4	KC 01 5mL 7 dias	Xilanase	9,552	4,965	60	5,4
	Mananase	3,498	0,418	50	5,4		Mananase	4,390	2,533	60	5,4
	CMCase	1,032	0,255	50	5,4		CMCase	0,877	0,640	50	5,4
	β -glicosidase	0,785	0,314	50	4,8		β -glicosidase	5,188	0,879	50	4,8
Ipê 01	Xilanase	10,293	7,858	50	5,4	Ipê 01 5mL 7 dias	Xilanase	14,016	9,421	50	5,4
	Mananase	2,785	2,487	60	5,4		Mananase	2,294	1,855	60	5,4
	CMCase	1,185	0,399	50	5,4		CMCase	1,103	0,291	50	5,4
	β -glicosidase	1,200	0,538	60	4,8		β -glicosidase	4,282	2,410	50	4,8

*CMCase = carboximetilcelulase

Tabela 2 - Resumo dos parâmetros analisados para fungos da costa marinha brasileira em SF e SSF nas melhores condições encontradas.

Fermentação Submersa						Fermentação em Estado Sólido					
Fungo	Enzima	Atividade 28°C	Atividade 15°C	Temperatura	pH	Fungo	Enzima	Atividade 28°C	Atividade 15°C	Temperatura	pH
A05.2	Xilanase	10,407	6,153	50	5,4	A05.2 10mL 7 dias	Xilanase	8,194	4,248	50	5,4
	Mananase	3,046	1,911	60	5,4		Mananase	1,772	1,396	60	5,4
	CMCase	1,316	0,693	50	5,4		CMCase	0,745	0,796	50	5,4
	β -glicosidase	4,061	1,152	60	4,8		β -glicosidase	5,916	1,426	50	4,8
A15.1	Xilanase	11,392	5,449	60	5,4	A15.1 10mL 7 dias	Xilanase	11,399	6,796	50	5,4
	Mananase	3,272	0,013	60	5,4		Mananase	2,507	2,158	60	5,4
	CMCase	1,319	0,099	60	5,4		CMCase	0,785	0,979	50	5,4
	β -glicosidase	3,050	0,222	60	4,8		β -glicosidase	4,912	1,200	50	4,8
A17	Xilanase	11,558	7,016	50	5,4	A17 5mL 7 dias	Xilanase	8,728	6,092	50	5,4
	Mananase	3,361	1,270	50	5,4		Mananase	3,537	2,320	60	5,4
	CMCase	1,368	0,146	50	5,4		CMCase	0,800	0,605	50	5,4
	β -glicosidase	4,321	0,286	40	4,8		β -glicosidase	5,342	1,424	50	4,8

*CMCase = carboximetilcelulase

Tabela 3 - Resumo dos parâmetros analisados para fungos da Antártica em SF e SSF nas melhores condições encontradas.

Fermentação Submersa						Fermentação em Estado Sólido					
Fungo	Enzima	Atividade 28°C	Atividade 15°C	Temperatura	pH	Fungo	Enzima	Atividade 28°C	Atividade 15°C	Temperatura	pH
558	Xilanase	0,045	13,409	50	5,4	558 10mL 7 dias	Xilanase	4,338	6,930	50	5,4
	Mananase	-0,207	4,483	50	5,4		Mananase	1,602	1,251	50	5,4
	CMCase	-0,016	0,910	50	5,4		CMCase	0,272	0,396	50	5,4
	β -glicosidase	-0,021	3,149	50	4,8		β -glicosidase	0,361	0,418	50	4,8
571	Xilanase	3,782	10,024	50	5,4	571 10mL 7 dias	Xilanase	4,871	5,335	50	5,4
	Mananase	2,273	3,805	50	5,4		Mananase	4,287	4,800	50	5,4
	CMCase	-0,140	0,581	50	5,4		CMCase	0,378	1,211	50	5,4
	β -glicosidase	1,172	3,263	50	4,8		β -glicosidase	3,080	3,247	50	4,8
610	Xilanase	4,270	11,626	50	5,4	610 10mL 7 dias	Xilanase	5,457	5,921	50	5,4
	Mananase	0,884	3,660	50	5,4		Mananase	5,465	6,035	50	5,4
	CMCase	-0,213	0,468	50	5,4		CMCase	1,211	1,533	50	5,4
	β -glicosidase	1,498	5,260	50	4,8		β -glicosidase	2,420	3,245	50	4,8

*CMCase = carboximetilcelulase