



PASCOAL JOSÉ GASPAR JÚNIOR

**“Caracterização de holocelulases fúngicas na otimização da
biomassa lignocelulósica”**

**Campinas
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



PASCOAL JOSÉ GASPAR JÚNIOR

**“Caracterização de holocelulases fúngicas na otimização da
biomassa lignocelulósica”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área
de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni
Coorientador: Prof. Dr. Saulo Luís da Silva

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO PASCOAL JOSÉ GASPAR JÚNIOR,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. SERGIO MARANGONI

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G213c Gaspar Júnior, Pascoal José, 1971-
Caracterização de holocelulases fúngicas na otimização da biomassa
lignocelulósica / Pascoal José Gaspar Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sérgio Marangoni.
Coorientador: Saulo Luis da Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biomassa vegetal. 2. Lignocelulose. 3. Enzimas de fungos. 4. *Penicillium simplicissimum*. 5. *Penicillium corylophilum*. I. Marangoni, Sérgio, 1951-. II. Silva, Saulo Luis. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of fungal holocelulases optimization of lignocellulosic biomass

Palavras-chave em inglês:

Plant biomass

Lignocellulose

Fungal enzymes

Penicillium simplicissimum

Penicillium corylophilum

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sérgio Marangoni [Orientador]

Ana Carolina Santos de Souza

Galvão Luciana Maria de Hollanda

Daniel Martins de Souza

Felix Gonçalves de Siqueira

Data de defesa: 31-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

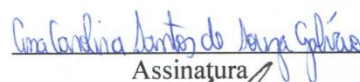
Campinas, 31 de julho de 2014

BANCA EXAMINADORA

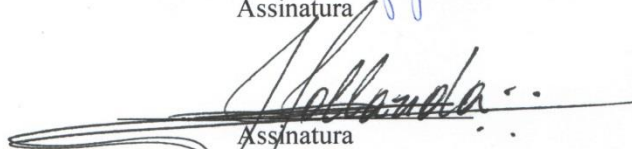
Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão


Assinatura

Dra. Luciana Maria de Hollanda


Assinatura

Prof. Dr. Daniel Martins de Souza


Assinatura

Dr. Felix Gonçalves de Siqueira


Assinatura

Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

Dr. Daniel Henrique do Amaral Corrêa

Assinatura

RESUMO

A triagem de fungos produtores de holocelulases é uma estratégia para a obtenção de enzimas capazes de hidrolisar o material lignocelulósico da biomassa vegetal, contribuindo para aumentar a viabilidade da produção de etanol celulósico. Este trabalho avaliou o potencial enzimático dos fungos *Penicillium corylophilum* e *Penicillium simplicissimum* com relação às enzimas (endoglicanase, exoglicanase, β -glicosidase, FPase, xilanase, pectinase e mananase) sobre substratos lignocelulósicos e comerciais como fonte de carbono. Além disso, avaliou-se também a influência da adição de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio sobre a atividade enzimática. Os fungos foram cultivados em triplicata em meio líquido suplementar com 1% de substrato lignocelulósico como fonte de carbono, em pH 7,0. A inoculação foi feita por suspensão de esporos (10^8 esporos/mL). O cultivo foi feito sob agitação a 120 rpm, a 28°C e os filtrados resultantes em 12, 24, 72 e 120 horas foram utilizados como fontes enzimáticas pelo método do DNS (ácido-3,5- dinitrosalicílico) em triplicata. De todas as atividades enzimáticas analisadas nas fontes lignocelulósicas, a atividade de xilanase do *P. simplicissimum* sobre a linhaça foi a mais expressiva (3,87 e 3,97 UI/ml), cultivados em 72 e 120 horas, respectivamente, e selecionada para os testes de purificação proteica. A atividade xilanásica específica aumentou consideravelmente após os passos cromatográficos de gel filtração e troca iônica (CTI), sendo inicialmente 3×10^{-3} atv/ μ g de proteína no liofilizado e 19,2 atv/ μ g de proteína na fração proveniente da CTI. Nos testes de pH, observou-se que a atividade de xilanase foi maior em pH=4,0 e temperatura de 50°C. Com relação à adição de substratos comerciais, a celulose microcristalina e a xilana apresentaram os resultados mais expressivos da indução da produção de xilanase, sendo que a concentração de 0,5% de xilana mostrou a melhor atividade enzimática em ambos os fungos estudados. A xilose apresentou uma concentração indutora mínima de 0,04% que foi suficiente para aumentar a atividade de xilanase do *P. simplicissimum*. Com relação à suplementação de fontes de nitrogênio no meio de cultivo para a produção de holocelulases, a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e caseína é uma alternativa importante para a potencialização das atividades de pectinase e de endoglicanase respectivamente pois foram fontes de nitrogênio que proporcionaram um aumento da atividade enzimática em ambos os fungos estudados como

também nas duas fontes de carbono testadas. As frações contendo xilanases após cromatografia de gel filtração seguida de fase reversa, após análises por espectrometria de massas apresentam relação massa/carga de 18831,26 Da. A utilização do resíduo lignocelulósico da linhaça, como fonte de carbono para o cultivo submerso do *Penicillium simplicissimum* é uma opção ecologicamente correta, exequível e de baixo custo para a produção de xilanases. Diversas aplicações biotecnológicas como a utilização na ração animal, na indústria do papel e no etanol de segunda geração, dentre outros, possibilitam um acréscimo substancial do valor agregado desse substrato, permitindo uma ampliação da utilização da linhaça, além do aproveitamento do óleo, sem aumentar a área plantada.

ABSTRACT

Screening for producing fungi holocelulases is a strategy for obtaining enzymes that hydrolyze the lignocellulosic material from plant biomass, helping to increase the viability of cellulosic ethanol production. This study evaluated the enzymatic potential of *Penicillium simplicissimum* and *Penicillium corylophilum* regarding enzymes (endoglycanase, exoglycanase, β -glucosidase, FPase, xylanase, pectinase and mannanase) for commercial and lignocellulosic substrates as a carbon source. Furthermore, it was also evaluated the influence of the addition of different organic and inorganic nitrogen sources on enzyme activity. The fungus was grown in triplicate in a liquid medium supplement with 1% lignocellulosic substrate as carbon source, pH 7.0. The inoculation was done by the spore suspension (10^8 spores/ml). The cultivation was done with stirring at 120 rpm at 28 °C and the resulting filtered in 12, 24, 72 and 120 hours were used as enzyme sources for DNS (acid-3,5- dinitrosalicilic) method in triplicates. All enzymatic activities analyzed in lignocellulosic sources, the xylanase activity of *P. simplicissimum* about flaxseed was greater (3.87 and 3.97 IU/ml), grown at 72 and 120 h of cultivation, respectively, and selected for testing for protein purification. The specific xylanase activity increased considerably after the chromatographic steps of gel filtration and ion exchange (CTI), initially 3×10^{-3} atv/ mg of protein in lyophilized and 19.2 atv/ mg of protein in the fraction from the CTI. In pH testing, it was noted that the xylanase activity was higher at pH 4.0 and 50 °C. With respect to the addition of commercial substrates, microcrystalline cellulose and xylan showed the most significant results of induction of xylanase production, and the concentration of 0.5% xylan showed the best enzyme activity in both fungi studied. The xylose showed a minimal inducing concentration of 0.04% which was sufficient to increase the activity of xylanase from *P. simplicissimum*. With respect to supplemental nitrogen sources in the culture medium for the production of holocelulases, the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and casein can be an important tool for the enhancement of pectinase and endoglycanase activities respectively as alternative nitrogen sources that were provided an increase in enzyme activity in both fungi studied as well as the two carbon sources tested. The use of lignocellulosic residue of flaxseed as a source of carbon for submerged cultivation of *Penicillium simplicissimum* is an environmentally friendly, feasible and cost

effective for the production of xylanases option. The fractions containing xylanases after gel filtration chromatography followed by reverse phase after analysis by mass spectrometry are related mass/charge of 18831 26 Da. The use of lignocellulosic waste of flaxseed as a source of carbon for submerged cultivation of *Penicillium simplicissimum* is an environmentally friendly, feasible and cost effective for the production of xylanases option. Various biotechnological applications such as use in animal feed, in the paper industry and in second generation ethanol, among others, allow a substantial increase in the value of this substrate, allowing an expansion of the use of flaxseed, plus the use of oil, without increasing acreage.

ÍNDICE

Índice de Figuras	xix
Índice de Tabelas	xxv
Índice de Quadros	xxvii
Lista de Abreviações	xxix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Resíduos Agroindustriais.....	2
1.2 Biomassa lignocelulósica	3
1.3 Fungos decompositores	9
1.3.1 <i>Penicillium</i> spp	10
1.3.1.1. <i>Penicillium simplicissimum</i>	10
1.3.1.2. <i>Penicillium corylophilum</i>	11
1.4. Organização estrutural dos matérias lignocelulósicos	12
1.4.1. Celulose	13
1.4.2. Hemicelulose	14
1.4.2.1 Xilana	16
1.4.2.2 Manana	18
1.4.3. Lignina	18
1.4.4. Pectina	19
1.5. Enzimas	20
1.5.1. Celulases	24
1.5.1.1. Endoglicanase (1,4-β-D-glucano 4 – glucanohidrolase, EC 3.2.1.4)	25
1.5.1.2. Exoglicanase (1,4-β-D-glucano celobiohidrolase, EC 3.2.1.91)	25
1.5.1.3. β-Glicosidase (β-D-glicosideo glicohidrolase, EC 3.2.1.21)	26
1.5.1.4. FPase (Filter Paper Activity)	27
1.5.2. Pectinase	27

1.5.3. Hemicelulases	28
1.5.3.1 Xilanase	29
1.5.3.2. Mananase	30
1.6. Substratos Lignocelulósicos	31
1.6.1 Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	32
1.6.2 Cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i>)	33
1.6.3 Crambe (<i>Crambe abyssinica</i>)	33
1.6.4 Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	34
1.6.5 Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>)	35
1.6.6 Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	36
1.6.7 Nabo Forrageiro (<i>Raphanus sativus</i>)	36
1.6.8 Níger (<i>Guizotia abyssinica</i>)	37
1.6.9 Pinhão Manso (<i>Jatropha curcas</i>)	38
1.6.10 Soja (<i>Glycine max</i>)	39
1.6.11 Tremoço (<i>Lupinus albuns</i>)	39
1.7 Pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos	40
1.8. Fontes de Nitrogênio	41
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Condições de cultivo dos fungos filamentosos <i>Penicillium corylophilum</i> e <i>P. simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	47
4.2 Determinação da atividade enzimática	48
4.3 Efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase	50
4.4 Avaliação da suplementação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de holocelulases	51

4.5 Purificação e caracterização parcial das xilanases presentes no extrato bruto de <i>Penicillium simplicissimum</i>	53
4.5.1 Cromatografia de gel filtração	53
4.5.2 Cromatografia de troca aniônica	53
4.5.3 Cromatografia de fase reversa	54
4.5.4 Quantificação de proteínas	54
4.5.5 Espectrometria de massas – MALDI-TOF-TOF	54
4.5.6 Análises estatísticas	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Análises físico-químicas dos substratos lignocelulósicos	56
5.2 Avaliação da produção de enzimas pelos fungos filamentosos <i>Penicillium corylophilum</i> e <i>P. simplicissimum</i> após a adição de substrato lignocelulósicos em meios de cultivo	57
5.2.1 Atividades de endoglicanases	57
5.2.2 Atividades de exoglicanases	58
5.2.3 Atividades de FPase	59
5.2.4 Atividades de β glicosidases	61
5.2.5 Atividades de xilanases	62
5.2.6 Atividades de pectinases	63
5.2.7 Atividades de mananases	64
5.8 Avaliação da produção da xilanase pelos fungos filamentosos <i>Penicillium corylophilum</i> e <i>P. simplicissimum</i> após a adição de substratos comerciais como fonte de carbono	65
5.9 Avaliação da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio na produção de holocelulases	67
5.9.1 Linhaça como fonte de carbono	67
5.9.1.1 Fungo <i>P. corylophilum</i>	67
5.9.1.2 Fungo <i>P. simplicissimum</i>	74

5.9.2 Pinhão manso como fonte de carbono	81
5.9.2.1 Fungo <i>P. corylophilum</i>	81
5.9.2.2 Fungo <i>P. simplicissimum</i>	89
5.10 Caracterização bioquímica parcial das xilanases provenientes do cultivo com <i>Penicillium simplicissimum</i> no substrato da linhaça	95
5.10.1 Cromatografia de gel filtração do extrato fúngico <i>P. simplicissimum</i> , cultivado no resíduo lignocelulósico da linhaça	95
5.10.2 Cromatografia de troca aniônica das frações com atividades de xilanase	96
5.10.3 Curva da calibração de soroalbumina bovina para dosagem de proteínas pelo método Bradford	97
5.10.4 Atividade específica do extrato bruto e das frações após os dois primeiros passos cromatográficos	98
5.10.5 Efeito de pH e a temperatura na atividade enzimática	99
5.10.6 Caracterização estrutural das xilanases do extrato do fungo <i>P. simplicissimum</i>	101
6 DISCUSSÃO	105
7 CONCLUSÕES	124
8 REFERÊNCIAS	126

Dedico esse trabalho:

** Aos meus filhos Pascoal Neto e Pedro Otávio, que me ensinaram o que é o Amor incondicional... prometo compensar os momentos de ausência com muito videogame, basquete, passeio de bicicleta e muito mais...*

** A minha esposa Micheline, por todo amor dispensado, agradeço todo apoio, as palavras de incentivo, por ser a minha fortaleza!!!*

** Aos meus pais, que mesmo não entendendo muito bem o que estava acontecendo, sempre torceram e me colocaram nas suas intermináveis orações...*

** Às minhas irmãs, Regina e Fatinha, que sempre me acolheram de forma maternal, agradeço os conselhos e a torcida. À Zezé, por todo carinho e orações dispensadas!*

** À tia Zinha por ter sido presença constante durante a minha caminhada...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me mostrado um caminho diferente, por ter me mostrado que o mérito não se encontra no fim mas durante a caminhada, por ter me apresentado tantas pessoas especiais que se tornaram parte da minha história...

Agradeço ao professor Sérgio Marangoni pela oportunidade de desenvolver um trabalho diferente, por todo apoio, paciência e amizade durante a execução deste trabalho.

Agradeço a Doutora Fernanda Torres (UFMG) pela ajuda fundamental...através do seu exemplo, compreendi que novos desafios são feitos para serem conquistados com alegria, dedicação, entusiasmo e sabedoria!!! Ela foi orientadora, psicóloga, amiga, inquisidora,... enfim, ela foi TUDO!!! Muito obrigado por TUDO!!! Este trabalho também é seu!!!

Agradeço a doutora Maria Helena pela atenção e por ter aberto as portas do seu laboratório (Laboratório de Venenos e Toxinas Animais – UFMG) para a execução da purificação proteica.

Agradeço ao doutor Daniel Santos (UFMG) pela amizade, pela paciência, pela sabedoria e pelo grande apoio dispensado.

Agradeço ao professor Félix Siqueira, que mesmo se me conhecer direito, sempre me amparou com sugestões e críticas que me proporcionaram um caminho a ser trilhado. Ele foi a nossa “bússola” e a sua tese a nossa “Bíblia” durante toda a caminhada. Este trabalho também é seu!!!

Agradeço ao professor Edivaldo Ximenes Filho por me acolher no seu laboratório de Enzimologia da UnB. Seu grande exemplo de serenidade me ensinou que sempre há espaço para uma reflexão sobre todos os acontecimentos, inclusive os inesperados.

Agradeço a doutora Paula Jaramillo por ter me recebido na UnB e por ter perdido muito tempo comigo. Agradeço todos os seus ensinamentos, inclusive os de Excel...só lamento ter faltado um sorriso...

Agradeço ao professor Saulo por ter me convencido a tentar o doutorado na UNICAMP...foi por causa da sua ausência (sem explicação) que pude conhecer muitas pessoas que me ajudaram a construir a minha história.

Ao meu irmão Marquinho, agradeço a torcida.

Agradeço a bibliotecária Virgínia pela grande disponibilidade, carinho e amizade disponibilizados na execução deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, professores e irmãos Juraci e Stênio, agradeço o companheirismo, preocupação, carinho e amizade.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica: Géssyca, Lucas, Nilo e Ana Paula pela ajuda imprescindível na realização deste estudo! Este trabalho também é de vocês!!!

Agradeço a professora Camila de Melo Silva, ex-companheira de pesquisa, que nos incentivou na pesquisa dos resíduos pirotécnicos.

Ao Centro Universitário de Formiga-MG (UNIFOR-MG), agradeço todo o incentivo dispensado durante a execução desse estudo.

Aos meus coordenadores do UNIFOR-MG: Lília, Leo, Leyser, agradeço o incentivo e a torcida e também a D. Rachel Matias, ex-supervisora dos tempos de Rodolfo Almeida e UNIFOR-MG, pelas orações e pelos conselhos.

Ao querido professor Eustáquio da Universidade Federal de Lavras (UFLA), orientador do meu mestrado, toda a gratidão pela paciência e dedicação dispensados durante esse tempo.

Agradeço a querida secretária da pós-graduação, Andréia Vigilato, pelo carinho e presteza com que sempre me atendeu.

Agradeço ao professor Pedro Castro Neto da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo fornecimento dos substratos lignocelulósicos e também pela atenção e cordialidade.

Ao meu amigo Paulinho Baldasso, do laboratório de Química de Proteínas da UNICAMP, agradeço a torcida e a amizade.

Ao meu amigo, professor Carlos Bernardes (Digui), agradeço imensamente pela amizade e pela luz que colocou no meio caminho, ou seja, por ter me apresentado a doutora Fernanda Torres.

À minha sobrinha/afilhada Luísa, agradeço a forma acolhedora, carinhosa e natural como aceitou revisar nosso trabalho.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parede celular vegetal	13
Figura 2. Estrutura da celulose	14
Figura 3. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses.....	15
Figura 4. Xilana de gramínea	17
Figura 5. Ataque enzimático na estrutura holocelulósica	23
Figura 6. Fluxograma do ensaio do efeito da adição de substratos lignocelulósicos como fonte de carbono sobre a atividade enzimática	48
Figura 7. Fluxograma do ensaio do efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase	52
Figura 8. Fluxograma da avaliação da suplementação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de holocelulases	51
Figura 9. Atividade de endoglicanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	57
Figura 10. Atividade de endoglicanase do fungo <i>P. simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	58
Figura 11. Atividade de exoglicanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	59
Figura 12. Atividade do exoglicanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	59
Figura 13. Atividade de FPase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	60
Figura 14. Atividade de FPase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	60
Figura 15. Atividade de β glicosidase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	61

Figura 16. Atividade de β glicosidade do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	62
Figura 17. Atividade de xilanase do <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	63
Figura 18. Atividade de xilanase do <i>Penicillium simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	63
Figura 19. Atividade de pectinase do <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	64
Figura 20. Atividade de pectinase do <i>Penicillium simplicissimum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	64
Figura 21. Atividade de mananase do <i>Penicillium corylophilum</i> em diferentes substratos lignocelulósicos	65
Figura 22. Efeito de adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase do fungo <i>P. simplicissimum</i>	66
Figura 23. Efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase do fungo <i>P. corylophilum</i>	67
Figura 24. Atividade de endoglicanases do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	69
Figura 25. Atividade de exoglicanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	69
Figura 26. Atividade de FPase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	70

Figura 27. Atividade de β glicosidase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	70
Figura 28. Atividade de xilanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	73
Figura 29. Atividade de pectinase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	73
Figura 30. Atividade de mananase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	74
Figura 31. Atividade de endoglicanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	76
Figura 32. Atividade de exoglicanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	76
Figura 33. Atividade de FPase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	77
Figura 34. Atividade de β glicosidase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	77
Figura 35. Atividade de xilanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	80

Figura 36. Atividade de pectinase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	80
Figura 37. Atividade de mananase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	81
Figura 38. Atividade de endoglicanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	84
Figura 39. Atividade de exoglicanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	84
Figura 40. Atividade de FPase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	85
Figura 41. Atividade de β glicosidase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	85
Figura 42. Atividade de xilanase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	88
Figura 43. Atividade de pectinase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	88
Figura 44. Atividade de mananase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	89

Figura 45. Atividade de endoglicanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono	91
Figura 46. Atividade de exoglicanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	91
Figura 47. Atividade de FPase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	92
Figura 48. Atividade de β glicosidase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	92
Figura 49. Atividade de xilanase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	94
Figura 50. Atividade de pectinase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	94
Figura 51. Atividade de mananase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono.....	95
Figura 52. Cromatografia de gel filtração do extrato bruto de <i>P. simplicissimum</i>	96
Figura 53. Cromatografia de troca aniônica das frações com atividades xilanásica provenientes da cromatografia de filtração em gel	97
Figura 54. Curva padrão de BSA para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford R ² :0,99	97
Figura 55. Experimento representativo da atividade xilanásica específica	98

Figura 56. Experimento representativo da atividade de xilanase em diferentes pH	99
Figura 57. Experimento representativo da atividade xilanásica em diferentes temperaturas em pH=4,0	100
Figura 58. Experimento representativo da atividade de xilanase em diferentes temperaturas em pH=4,0 do complexo enzima-substrato	101
Figura 59. Cromatografia de fase reversa das frações em atividade xilanásica provenientes da cromatografia de troca aniônica após tripsinólise	102
Figura 60. Cromatografia de fase reversa das frações com atividade xilanásica provenientes da cromatografia de gel filtração	103
Figura 61. Espectrometria de massas	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Atividade enzimática de celulases do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	68
Tabela 2. Atividade enzimática de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	72
Tabela 3. Atividade enzimática de celulases do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	75
Tabela 4. Atividade enzimática de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono	79
Tabela 5. Atividade enzimática de celulases do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono	83
Tabela 6. Atividade enzimática de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono	87
Tabela 7. Atividade enzimática de celulases do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono	90
Tabela 8. Atividade enzimática de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase do fungo <i>Penicillium simplicissimum</i> , cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão manso como fonte de carbono	93

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Análises físico-químicas dos substratos lignocelulósicos utilizados como fontes de carbono nos cultivos submersos	56
Quadro 2. Rendimentos e atividades específicas após as etapas de purificação proteica.....	99

LISTA DE ABREVIACOES

DNS	cido 3,5-dinitrosalicílico
CMC	carboximetilcelulose
CMCase	carboximetilcelulase
FPase	Filter Paper Activity
CIM	concentrao indutora mínima
CFG	cromatografia de gel filtrao
CTI	troca iônica
pNPG	ρ -nitro-fenil-glicosídico
DEAE	Dietilaminoetil
TFA	cido trifluoracético

1. INTRODUÇÃO

A agricultura industrializada produz uma quantidade enorme de resíduos lignocelulósicos, extrapolando a capacidade de reciclagem do ambiente. Uma das formas de se obter fontes renováveis de energia é a implantação da “agricultura de energia”, ou seja, cultivo de plantas destinadas à produção de energia que resultam, por exemplo, na produção de biodiesel, do etanol, dos óleos vegetais, dos lubrificantes automotivos, dentre outras utilidades (Primieri *et al.*, 2010). As exigências mundiais aumentaram bruscamente, não só pela produção de alimentos e de produtos de origem animal e vegetal para consumo da humanidade. Mas cresceram também, nas mesmas proporções, as necessidades por fontes alternativas de energia das mais variadas formas, dentre as quais se inserem os biocombustíveis que têm, como suprimento alternativo de matéria-prima, a agricultura (Santos *et al.*, 2013).

A hidrólise enzimática de carboidratos vegetais surgiu como a tecnologia mais importante para a conversão da biomassa em açúcares monoméricos para posterior fermentação em bioetanol. A degradação biológica dos hidratos de carbono no interior da biomassa é alcançada utilizando várias enzimas que atuam sinergicamente nas proporções definidas para converter carboidratos em seus monômeros. Posteriormente, ocorre a fermentação destes açúcares em etanol (Van Dyk & Pletschke, 2012). O bioetanol, produzido através da biomassa celulósica, é denominado a segunda geração de biocombustíveis, proporcionando uma opção viável para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol (Sukumaran *et al.*, 2009).

Os materiais lignocelulósicos, constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, são alvos de diversos estudos e apontados como grande aposta para a solução do problema energético mundial (Monte *et al.*, 2010). Uma triagem para a aquisição de novas celulasas fúngicas é uma estratégia para a obtenção de enzimas com capacidade de hidrolisar os resíduos lignocelulósicos, viabilizando ainda mais a produção do etanol celulósico (Delabona *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006). A hidrólise dessa biomassa em açúcares simples é catalisada por celulasas e hemicelulasas (Lee *et al.*, 2009). Durante a hidrólise enzimática, uma série de enzimas diferentes (exoglicanases, endoglicanases, β -glicosidases, xilanases e outras enzimas acessórias) com variadas funções degradam a celulose e hemicelulose, gradualmente, para os açúcares fermentáveis (glicose e xilose) para serem utilizados para a produção de bioetanol (Zhang *et al.*, 2010). Xilanases são utilizadas nas indústrias de papel e celulose, farmacêutica, têxtil, de bebidas e de alimentos, onde se destacam na produção de xilooligossacarídeos para

enriquecimento de alimentos funcionais. Celulases são aplicadas em resíduos celulósicos, visando à obtenção de glicose para produção do etanol (Monte *et al.*, 2010).

A hidrólise enzimática é o passo mais complexo no processo da produção do etanol de segunda geração. Por isso, o entendimento e o consequente melhoramento da atividade de enzimas capazes de degradar a celulose e a hemicelulose a moléculas de açúcares fermentáveis a etanol assumiram papel essencial nas pesquisas relacionadas aos biocombustíveis (Colussi *et al.*, 2011).

A ampla disponibilidade de recursos vegetais também pode ser utilizada de outras maneiras como o tratamento e a utilização de enzimas exógenas (β -glicanases e xilanases) para diminuir os efeitos negativos dos polissacarídeos não amiláceos na alimentação de peixes e melhorar o valor nutritivo desses alimentos (Sinha *et al.*, 2011). β -glicanases e xilanases têm sido utilizados com sucesso em dietas monogástricas para hidrolisar os polissacarídeos não amiláceos da cevada (Cowan, 1996). Além disso, Yin *et al.*, 2001, relataram que a inclusão de β -glicanases e xilanases aumentou a digestibilidade em rações contendo cevada para porcos. Em uma dieta à base de milho e soja, xilanase e glicanase foram mais eficazes para quebrar a fração fibra insolúvel na nutrição de frangos de corte (Leslie *et al.*, 2007).

As celulases possuem aplicações mais amplas como no processamento de alimentos em combinação com outras enzimas (xilanases e pectinases). Também têm sido utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais. Durante o processamento, reduzem a viscosidade, além de melhorar as propriedades aromáticas dos sucos de fruta e suas polpas (Juturu & Wu, 2014).

As xilanases de micro-organismos possuem um grande número de aplicações biotecnológicas, incluindo clareamento de sucos de frutas e vinhos, melhoria das propriedades nutricionais da silagem agrícola, grãos de ração para aves, degomagem de fibras vegetais e bio-polpação, além do processamento de alimentos, em combinação com celulases. A utilização de xilanases de baixo peso molecular no pré-branqueamento da pasta de celulose tornou-se uma abordagem alternativa para a eliminação do cloro em operações de branqueamento (Duarte *et al.*, 2012).

1.1. Resíduos Agroindustriais

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão mineral e do gás natural. Contudo, a limitação destas fontes não renováveis, e os problemas

ambientais gerados, despertam a preocupação pela procura de fontes de energia renováveis. Uma alternativa a isto é o surgimento de uma espécie de biomassa moderna, provinda de diversas fontes, com grande importância para o futuro, representando ao final do século 21, de 10 a 20% de toda a energia a ser usada pela humanidade (Goldemberg, 2009).

A biomassa é um recurso natural que armazena energia (através da fotossíntese) e que é processada para proporcionar formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. Como esse processo é cíclico, tem-se um recurso renovável. Esta é uma alternativa adequada para os combustíveis fósseis convencionais, sendo proveniente de diversas fontes, como óleos animais e vegetais, madeira, resíduos florestais e pecuários, carvão vegetal, resíduos de origem humana e animal, adubos, algas, plantas aquáticas entre outros (Moraes, 2012).

Além disso, todo resíduo agroindustrial necessita de um destino específico, necessitando de tratamentos de purificação antes de serem depositados no meio ambiente. Esses resíduos tornam-se um passivo para a empresa que o produz já que não podem ser acumulados indefinidamente (Aquarone *et al.*, 1990). Com isso, surgiu uma crescente busca pela utilização desses resíduos já que as atividades agrícolas aumentaram bastante nas últimas décadas (Menezes *et al.*, 2009).

1.2. Biomassa lignocelulósica

Biomassa é a denominação genérica para todas as matérias que são de origem vegetal ou animal e são aproveitadas como fonte inicial de calor ou eletricidade, como por exemplo, cana-de-açúcar, milho, beterraba, óleos vegetais, madeira. Em torno de 50% da biomassa dos compostos orgânicos dos ecossistemas terrestres é formado por materiais lignocelulósicos (Souza *et al.*, 2012), que são utilizados como substratos para processos fermentativos já que 70% da matéria seca é constituída de carboidratos (Saha, 2003).

Lignocelulose é um polímero complexo de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose, é um homopolímero de unidades de glicose reunidas por ligações glicosídicas β -1,4 e possui estrutura linear e cristalina. A hemicelulose é um heteropolímero curto e muito ramificado de D-xilose, D-arabinose, D-glicose, D-galactose e D-manose. Já a lignina é de natureza hidrofóbica e é firmemente presa aos outros dois polímeros, protegendo-os de ataques microbianos (Peiji *et al.*, 1997; Sarkar *et al.*, 2012). Tanto a celulose quanto a hemicelulose são convertidas em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol (Bastos, 2007; Franco *et al.*, 2009).

O termo estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma a parede celular, sendo constituída por uma matriz dura e fibrosa, na qual fibras flexíveis, celulose, hemicelulose estão embebidas em uma matriz de lignina, uma macromolécula tridimensional de natureza aromática. Assim, os principais componentes das fibras vegetais são celulose, hemicelulose e lignina (Silva *et al.*, 2009).

A complexidade dos substratos lignocelulósicos requer numerosas enzimas, funcionando em sinergia para sua hidrólise. A variação na estrutura entre substratos de diferentes fontes e os efeitos dos diferentes tipos de pré-tratamentos aumentam ainda mais esse enredamento. A complexidade na degradação da lignocelulose é resultante da estrutura tridimensional das paredes das células vegetais e das interações entre os diferentes componentes. O acesso à celulose é dificultado pela hemicelulose, bem como pela lignina. O desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para a degradação da lignocelulose está na produção de enzimas acessórias indicadas para melhorar a degradação da celulose, enquanto que também alcança altos rendimentos de açúcares da hemicelulose (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Há uma crescente tendência por processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica. Diversas matérias-primas são exemplos disso como o sabugo e palha de milho, o bagaço da cana-de-açúcar, caule e cascas, resíduos sólidos urbanos (papel e papelão, lixo de jardim) e da indústria de papel e celulose (Bastos, 2007).

Dentro deste contexto, os materiais lignocelulósicos chamaram a atenção por causa da sua abundância e do seu caráter renovável. Com a preocupação da preservação do meio ambiente, o aproveitamento dos resíduos agroindustriais tornou-se uma motivação a mais já que são constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, sendo a celulose o mais abundante, abrangendo cerca de dois terços de toda matéria orgânica existente no planeta (Zhao *et al.*, 2007).

A partir da biomassa gerada por esses resíduos agroindustriais, duas etapas são basicamente requeridas para a obtenção de etanol, além do pré-tratamento. A primeira etapa é a hidrólise dos polissacarídeos, originando mono e dissacarídeos. A segunda abrange a fermentação dos mono e dissacarídeos em etanol. A hidrólise de celulose, então, produz glicose e celobiose (um dímero de glicose). Por outro lado, a hidrólise de ligninas e hemicelulose gera açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e

ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana (Ogeda & Petri, 2010; Olsson *et al.*, 2004).

As matérias-primas para a produção de etanol são classificadas em função da sua estrutura e complexidade molecular em matérias-primas açucaradas (sacarose, glicose, frutose e lactose) que são solúveis e facilmente extraídas da cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino e as matérias-primas amiláceas (grãos de milho, mandioca, trigo, cevada, batata) que contêm polissacarídeos insolúveis, precisando de um pré-tratamento térmico para a solubilização e hidrólise. Entretanto, as matérias-primas lignocelulósicas diferem das demais por serem insolúveis e recalcitrantes, necessitando de pré-tratamento de natureza mecânica, física ou química, seguido de hidrólise, preferencialmente enzimática (Bon *et al.*, 2008). O principal objetivo na conversão dessa biomassa é a degradação dos hidratos de carbono no interior do substrato para os monômeros de açúcares, com particular referência à glicose (Van Dyk & Pletschke, 2012). As leveduras atuam como catalisadores biológicos, produzindo o bioetanol através da fermentação desses açúcares (Saha, 2003).

O etanol produzido convencionalmente a partir de matérias-primas sacaríneas ou amiláceas é denominado etanol de primeira geração. Neste caso, a produção ocorre a partir da fermentação, principalmente de sacarose de caldo de cana, ou glicose da hidrólise de amido, por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, quando este combustível é produzido a partir de biomassa lignocelulósica como resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais, além de matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais como bagaço e palha da cana de açúcar, o sabugo e a palha de milho, as palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada, e resíduos municipais baseados em papel (Bastos, 2007; Franco *et al.*, 2009), é denominado etanol de segunda geração. Neste caso, a degradação da mesma pode ocorrer por métodos físicos ou químicos, mas principalmente através da utilização de enzimas – as hidrolases (Bon *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2009).

A necessidade de um aumento de matérias-primas para a produção de etanol, sem a interferência nas áreas reservadas para plantação de alimentos, fez surgir no mundo o interesse por novas tecnologias, dando origem a esse etanol de segunda geração (Bastos, 2007; Franco *et al.*, 2009).

A utilização eficaz de todos os três componentes (celulose, hemicelulose e lignina), já citados, da parede celular vegetal desempenha um papel significativo na viabilidade econômica do etanol celulósico (Menon & Rao, 2012). A bioconversão desses resíduos lignocelulósicos

apresenta-se como uma rota alternativa, promissora e de grande interesse industrial para o aumento da produtividade do bioetanol (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

A maioria da energia oriunda da biomassa é produzida a partir de resíduos da madeira (64%), seguido de resíduos sólidos urbanos (24%), resíduos agrícolas (5%) e gases de aterro sanitário (5%). Diferentes tipos de biomassa podem ser cultivadas com o propósito expresso de produção de energia. As culturas que tem sido utilizadas para a energia incluem: cana-de-açúcar, milho, algas, beterraba, grãos, capim-elefante e outros (Balat *et al.*, 2009). Outros tipos de resíduos são os agroindustriais gerados durante o processamento de alimentos, fibras, couro, madeira entre outros. A população humana produz milhões de toneladas de resíduos agroindustriais. A América Latina, por exemplo, produz 500 milhões de toneladas por ano de subprodutos agroindustriais, sendo que o Brasil é responsável por quase a metade deste montante (Alves *et al.*, 2007). Normalmente, esses resíduos são vertidos no meio ambiente, provocando sérios problemas de poluição no solo, em águas superficiais e subterrâneas.

Os resíduos agroindustriais também podem ser aproveitados como substratos em processos biotecnológicos para a produção de bioetanol. Apresentam inúmeras vantagens como o baixo custo, além de serem abundantes e renováveis. Também não liberam gás carbônico e possuem pequeno conteúdo de enxofre. O bioetanol celulósico apresenta potencial para produzir pelo menos duas vezes mais combustível da mesma área de terra plantada e disponibilidade da biomassa. Devido ao aumento dos preços dos combustíveis fósseis isso demonstra grande potencial econômico (Shreeve, 2006; Demirbas & Demirbas, 2007).

De acordo com Teixeira (2005), outro biocombustível, o biodiesel, pode ser obtido a partir das oleaginosas. A agricultura brasileira possui uma propensão ao cultivo de oleaginosas devido a sua diversidade climática e de ecossistemas. As principais oleaginosas cultiváveis no Brasil que poderiam ser utilizadas para a fabricação de biodiesel são: Soja (*Glycine max*), Algodão (*Gossypium spp.*), Girassol (*Helianthus annuus*), Mamona (*Ricinus communis*), Dendê (*Elaeis guineensis*), Nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), Macaúba (*Acrocomia aculeata*) e Pinhão-manso (*Jatropha curcas*).

Atualmente no Brasil, a soja tem sido a principal oleaginosa utilizada para a produção de biodiesel. Entretanto, sendo essa uma cultura de verão, faz-se necessário a identificação de culturas de inverno também produtoras de óleo, o que permitiria o melhor uso do solo pelo agricultor e a manutenção do fluxo de matéria prima para a produção de biodiesel. Considerando-se os estados da região Sul do Brasil, são estudadas com maior ênfase as culturas

de Canola (*Brassica napus*), Crambe (*Crambe abyssinica*), Cártamo (*Carthamus tinctorius*) e Nabo-Forageiro (*Raphanus sativus*) (Moura, 2009).

Outro ponto a ser ressaltado é que as fontes de biocombustíveis, além de gerar menor quantidade de gases que causam o efeito estufa, são melhores distribuídos geograficamente que os combustíveis fósseis. Isso provoca a redução dos impactos ambientais, principalmente das mudanças climáticas, promovendo emprego nas áreas rurais. A utilização das matérias-primas lignocelulósicas provoca a diminuição do conflito potencial entre o uso da terra para a produção de alimentos ou para a produção de matérias-primas para a produção de combustíveis. Os resíduos da biomassa lignocelulósica são mais viáveis financeiramente do que os da matéria-prima agrícola (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Rodrigues, 2009)

Os estudos sobre o aproveitamento de co-produtos gerados na cadeia produtiva do biodiesel são bastante incipientes de acordo com Neiva Júnior *et al.* (2007) e merecem investigações de maior profundidade, já que muitas cadeias somente serão viáveis economicamente quando esses resíduos agregarem valor aos sistemas de produção. Por serem espécies ainda pouco conhecidas e sem uma cadeia produtiva estabelecida no Brasil, são escassas as informações sobre suas tortas e farelos. A caracterização desses co-produtos é de extrema importância na avaliação da viabilidade dessas novas oleaginosas, uma vez que a composição dessas tortas e farelos pode ser decisiva na definição de seus usos potenciais (Moura, 2009).

Uma visão da tendência internacional no desenvolvimento de biocombustíveis, compartilhada por muitos especialistas, é a de que os biocombustíveis de primeira geração (etanol de sacarose e amido; biodiesel produzido pela transesterificação de óleos e gorduras com etanol ou metanol) atualmente disponíveis serão seguidos pelos chamados “biocombustíveis de segunda geração”, que incluem o diesel produzido a partir de gás de síntese em processos termoquímicos e o etanol a partir de materiais lignocelulósicos por processos químicos e enzimáticos. O desenvolvimento industrial dessas tecnologias (hidrólise e de gaseificação) possibilitará a transformação de fibras em combustíveis, através da fermentação do açúcar gerado pela hidrólise ou da síntese de compostos a partir dos gases, processo chamado de Fischer-Tropsch. Em seguida, nesta linha do tempo, biorrefinarias integradas serão construídas para aproveitamento integral de energia, biocombustíveis e um grande número de produtos químicos e bioquímicos a partir da biomassa como pigmentos, pinturas, essências aromáticas, enzimas, hormônios entre outros (Cerqueira Leite *et al.*, 2009).

Apesar das reconhecidas vantagens do etanol celulósico sobre os biocombustíveis de 1ª geração, os custos de produção da hidrólise enzimática ainda são menos comparáveis com o etanol sacarídeo e com a gasolina, devido à complexidade da matéria-prima e do processo de produção (Seabra *et al.*, 2010).

A inserção da tecnologia enzimática no contexto do setor sucroalcooleiro consiste na integração de uma planta produtora padrão com uma unidade de hidrólise. O processo brasileiro possui uma viabilidade econômica elevada em relação aos outros biocombustíveis de 2ª geração. As vantagens econômicas como os baixos custos da matéria-prima (bagaço de cana) e a disponibilidade da infraestrutura industrial existente serão refletidos diretamente no custo de produção e no favorecimento de um crescimento gradativo na produção de biocombustíveis (Rodríguez-Zúñiga, 2010). Desta mesma maneira, os resíduos lignocelulósicos da indústria do biodiesel também podem ter o seu valor agregado, viabilizando e reforçando ainda mais toda a estrutura dos biocombustíveis de segunda geração.

A maior aplicação potencial das enzimas do complexo celulolítico é na hidrólise da biomassa lignocelulósica. As matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20 a 60% de celulose que pode ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado para a obtenção de uma imensa gama de produtos, desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse (Castro & Pereira Junior, 2010).

No contexto nacional, somente a indústria de açúcar e álcool gera 195 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar por ano, parte do qual é queimado de forma ineficiente em usinas para cogeração de energia. Apesar disso, existe um excedente de 12-50% disponível para conversão em etanol celulósico. Com este objetivo, a rota enzimática tem se apresentado como uma tecnologia vantajosa visando à adequada e eficiente bioconversão da lignocelulose em seus componentes (Rodríguez-Zúñiga, 2010).

Diante desta conjuntura, os fungos ganham destaque como decompositores universais capazes de reciclar eficazmente uma extensa gama de resíduos (Souza, 2012) através de suas enzimas extracelulares. A seleção de fungos produtores de celulasas é uma das possíveis estratégias para a obtenção das enzimas necessárias para hidrolisar o material lignocelulósico da biomassa vegetal e com isso contribuir para a viabilização da produção de etanol celulósico (Pirota *et al.*, 2013).

1.3. Fungos decompositores

Os fungos pertencem ao reino Fungi, maior reino eucariótico e dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. O tecido que forma o organismo dos fungos é composto por hifas, sendo filamentos celulares microscópicos, cujo conjunto constitui o micélio, responsável por todas as funções vegetativas desses organismos. A absorção de nutrientes pelos fungos é realizada através das paredes celulares, sendo que os elementos nutritivos devem estar na forma de solução. O micélio é encarregado de secretar enzimas especiais que atuam sobre as substâncias, ocorrendo liquefação, como é o caso, por exemplo, dos fungos ligninolíticos. Em outras situações, o micélio emite órgãos chamados haustórios, que penetram no tecido dos organismos hospedeiros, absorvendo o alimento (Esposito & Azevedo, 2004).

Na cadeia alimentar, os fungos são capazes de produzir enzimas extracelulares o que os torna aptos a utilizar uma ampla gama de substratos, tanto de altas quanto de baixas massas molares e diferentes graus de toxicidade. Dessa forma, ocupam a posição de decompositores, tendo um papel muito importante na manutenção do equilíbrio ambiental (Souza, 2012).

Por serem organismos heterotróficos, obtém o carbono para a síntese celular a partir da matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Como saprófitas, decompõem resíduos complexos de plantas e animais, transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao ambiente (Pelczar; Chan; Krieg, 1996). Os fungos são considerados como os agentes mais importantes de degradação da Terra, principalmente quando se estuda os ecossistemas florestais, onde estes micro-organismos são os principais decompositores de celulose e lignina. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é em grande parte controlado por fungos degradadores de madeira, que determinam as taxas dos nutrientes liberados e seu retorno ao ecossistema após a morte das árvores (Esposito & Azevedo, 2004).

Fungos lignocelulolíticos são capazes de superar as barreiras químicas e anatômicas de lignocelulose para degradar substratos lignocelulósicos. Eles usam métodos enzimáticos ou uma combinação de mecanismos não enzimáticos celulolíticos para conseguir a decomposição. Os dois principais grupos de fungos que degradam materiais lenhosos são basidiomicetos de podridão branca e de podridão-parda, e ambos são os melhores organismos de degradação da lignocelulose estudados devido à prevalência na floresta e madeira em serviço (Duncan & Schilling, 2010).

As diferenças na química do material lignocelulósico e na anatomia da célula vegetal levam à questão de como os fungos de podridão ajustam a hidrólise enzimática de carboidratos para degradar os distintos materiais vegetais. Pela cultura tanto de um fungo de podridão branca e parda em uma variedade de substratos como lignina, celulose e hemicelulose e teores de grupos diferentes de madeira, percebe-se que os fungos se adaptam a diferentes matérias-primas com diferentes proporções de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Há grandes tendências na utilização comercial dessas enzimas adaptadas (Duncan & Schilling, 2010).

Os fungos filamentosos mais frequentemente utilizados para a produção de enzimas que degradam os polissacarídeos são *Trichoderma reesei* e diversas estirpes de *Aspergillus* e *Penicillium* (Aro *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2007). Os fungos filamentosos são amplamente utilizados para a produção de enzimas para a indústria de biocombustíveis (Hinz *et al.*, 2009).

1.3.1. *Penicillium* spp

O gênero *Penicillium* pertence ao filo Ascomycota, ao subfilo Pezizomycotina, a classe Eurotiomycetes e a família Trichocomaceae. A presença de talos septados e a reprodução assexuada através de conídios são suas principais características (Silva, 2005). São fungos saprófitos, mesofílicos e reproduzem-se também sexuadamente pela formação de ascósporos (esporos sexuais internos). Crescem em diversos habitats através de micélios vegetativos septados que penetram no substrato, produzindo hifas aéreas, nas quais se desenvolvem conidióforos que são esporos assexuais (Pelczar; Chan; Krieg, 1996).

1.3.1.1. *Penicillium simplicissimum*

Estes micro-organismos demonstram a capacidade de sobreviver por adaptação ou por mutação em concentrações elevadas de metais pesados tóxicos. Alguns estudos como a obtenção de estirpes de fungos tolerantes a metais pesados incluem *Penicillium funiculosum*, *Penicillium simplicissimum* e *Aspergillus foetidus*. A adaptação de *Penicillium simplicissimum* para os íons metálicos (Ni, Mo, Fe e W) mostrou um aumento no índice de tolerância com o aumento das concentrações desses metais (Amiri *et al.*, 2011).

A excreção de citrato por *P. simplicissimum*, por exemplo, é utilizada para a lixiviação de metais a partir de resíduos industriais e minérios de baixo grau (Burgstaller & Schinner, 1993).

No estudo apresentado por Liu *et al.* (2011), a adição de saponinas aumentou a capacidade de adsorção de Cd (II) por *P. simplicissimum* e alterou o pH ótimo para essa adsorção.

O *Penicillium simplicissimum*, utilizado nesse trabalho, foi isolado de uma fazenda no município de Capitólio-MG no solo de uma plantação de eucaliptos. Esse dado é muito importante pois essa planta ao expoliar o potássio do solo (adubo), deixa o fósforo inorgânico em excesso. Com isso, o *Penicillium simplicissimum* encontra um ambiente ideal para se desenvolver pois ele requer esse íon para o seu crescimento (Klimek-Ochab *et al.*, 2006).

1.3.1.2. *Penicillium corylophilum*

O fungo *Penicillium corylophilum* é encontrado no solo, em ambientes com baixa umidade, em grãos de cereais e em material em decomposição. Estudos de biocatálise demonstram que suas cepas participam de reações orgânicas de síntese. Constatou-se também o potencial deste fungo em participar na bioconversão de materiais orgânicos insolúveis em lodos, favorecendo assim o tratamento de dejetos domésticos em estações de tratamento (Silva *et al.* 2006).

No trabalho realizado por Medeiros *et al.* (2003), dez espécies de fungos foram isolados a partir de decomposição de madeira na floresta amazônica e cultivados em meio líquido contendo xilana (*oat spelt xylan*). O fungo *P. corylophilum* mostrou a melhor atividade xilanolítica na faixa de pH entre 4,5 a 5,5 a 45° C.

Vinte e seis espécies, representando 13 gêneros, foram identificadas na palha de arroz, palha de trigo e bagaço de cana sobre o meio utilizado. *P. corylophilum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. funiculosum*, *P. oxalicum* e *Trichoderma harzianum* foram as espécies mais prevalentes nesses três substratos estudados (Abdel-Sater & El-Said, 2001).

A aplicação biotecnológica do *Penicillium corylophilum* não se restringe á produção convencional de metabólitos em processos fermentativos ou como parte de reações químicas. Este organismo também é utilizado no controle biológico de insetos, como agentes patogênicos de mosquitos vetores de doenças tropicais, tais como *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Além disso, houve uma ação bactericida e tripanocida (Silva, 2004).

O fungo *Penicillium corylophilum*, utilizado nesse trabalho de doutorado, foi isolado de amostras de solo, coletados na região de São Carlos no estado de São Paulo e identificado pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Toselo.

1.4. Organização estrutural dos materiais lignocelulósicos

As paredes celulares vegetais são formadas por camadas, denominadas de parede primária, lamela média e, em algumas células, parede secundária (Wulff *et al.*, 2003). A parede primária é organizada por celulose (glicana β -D-1,4), hemicelulose (xiloglicana), pectina (ácido α -1,4-D-poligalacturônico) e proteínas ricas em hidroxiprolina. Em relação à parede primária, a parede secundária (camada parietal) é formada por depósitos de células (Wulff *et al.*, 2003) e possui maior quantidade de celulose, hemicelulose, lignina e pectina (Raven *et al.*, 1999) e fornece um suporte estrutural à célula pela presença de lignina (Prade *et al.*, 1999). A lamela média está localizada entre as paredes primária e secundária, sendo constituída por galacturonanas, ramnogalacturonanas, arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (substâncias pécticas) e hemicelulose. Essa estrutura ainda preenche os espaços entre as paredes primárias e as células adjacentes

As estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina (Figura 1), cuja função estrutural é agir como barreira natural à degradação enzimática onde os componentes estão arranjados de forma que as cadeias de celulose e hemicelulose fiquem embebidas pela lignina (Pitarelo *et al.*, 2012).

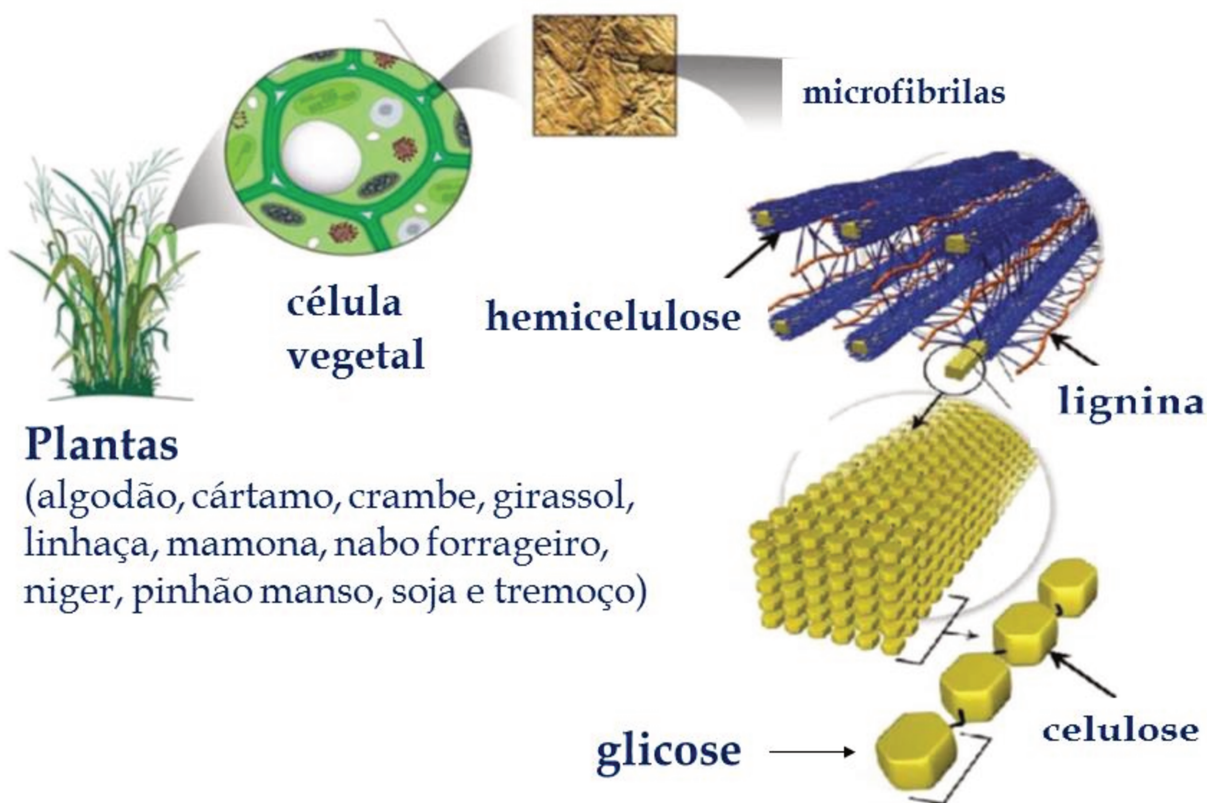


Figura 1. Parede celular vegetal (Canilha, 2010), modificado por Gaspar Júnior, 2014.

1.4.1. Celulose

A celulose é um polímero de cadeia longa e classificado como um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-glicose que interagem entre si por ligações β -1,4 (Figura 2), mantendo uma estrutura linear e plana, sendo a celobiose, o dissacarídeo 4-O- β -D glicopiranosil-D-glicopiranosil, a unidade repetitiva do polímero (Nascimento *et al.*, 2009). A celulose compreende 30-60% de lignocelulose, tornando-o o biopolímero orgânico mais abundante na natureza, sendo um homopolímero não ramificado (Peters, 2007).

Essas cadeias de celulose estão unidas por ligações de hidrogênio fortes que transformam as cadeias de celulose em microfibrilas, tornando-se de natureza cristalina e muito recalcitrantes à degradação. Algumas partes da estrutura da celulose podem ser de natureza amorfa, que é mais fácil de ser degradada. A celulose é adicionalmente incorporada em uma matriz de hemicelulose, pectina e lignina (Van Dyk & Pletschke, 2012). As cadeias de celulose

formam fibrilas, apresentando pontes de hidrogênio entre as hidroxilas intra e intercadeias. O resultado disso é o arranjo cristalino das moléculas de celulose. Essas regiões cristalinas seguem uma ordenação paralela. Regiões menos organizadas ou ordenadas são conhecidas como amorfas (Basso *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 1987). A lignina e hemicelulose são encontradas nos espaços entre as microfibrilas de celulose na parede celular primária e secundária, assim como a lamela média (Eriksson & Bermek, 2009). As fortes ligações de hidrogênio intra e intermolecular, fazem a celulose cristalina resistente à hidrólise enzimática, enquanto que a hemicelulose e a celulose amorfa são mais facilmente digeríveis (Viikari *et al.*, 2012).

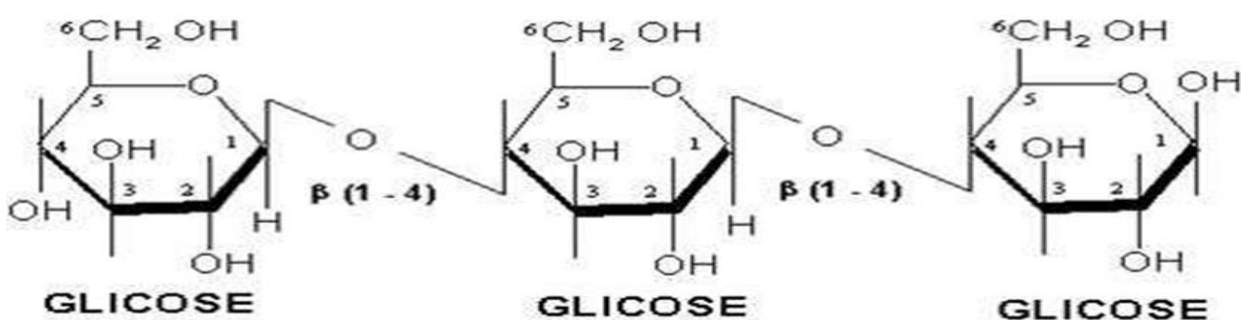


Figura 2. Estrutura da celulose (Franco *et al.*, 2009).

O elevado peso molecular e a estrutura ordenada conferem à celulose ser insolúvel na água. As regiões cristalinas de celulose são mais resistentes à degradação do que as partes amorfas (Menon & Rao, 2012).

1.4.2. Hemicelulose

A hemicelulose é composta principalmente por xilose, arabinose, glicose, manose e galactose, sendo que as xiloglicanas e as xilanas são os constituintes predominantes nas paredes primárias e secundárias, respectivamente. As xiloglicanas são formadas por moléculas de glicose com ligações glicosídicas β -1,4 e ramificações de xilose em ligações α -1,6, enquanto as xilanas são cadeias de xilose em ligações β -1,4. A hemicelulose mais abundante na natureza é a molécula de xilana (Koukiekolo *et al.*, 2005). A degradação das hemiceluloses requer a atuação de várias enzimas comumente denominadas de hemicelulases (Landecker, 1996).

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos (Figura 3) de pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -L-galactose) e ácidos urônicos (α -D-

glicurônico, α -D-O-4-metil galacturônico, α -D-galacturônico). Ao contrário da celulose, hemiceluloses não são quimicamente homogêneas. Hemiceluloses de madeira (*hardwoods*) contêm principalmente xilanas, enquanto hemiceluloses resinosa (*softwoods*) contêm principalmente glucomananas. Xilanas de diversas plantas são heteropolissacarídeos com cadeias principais homopoliméricas de unidades de β -D-(1,4)-xilopiranosose (Saha, 2003). Glicuronoxilana, mais simplesmente referida como xilana, é a hemicelulose predominante encontrada em madeiras (Liu *et al.*, 2012).

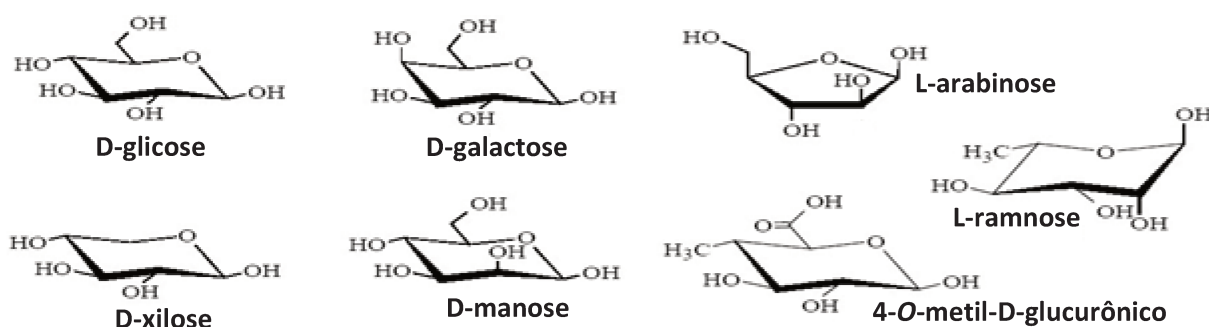


Figura 3. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses (Martins, 2005).

A estrutura molecular da hemicelulose se assemelha mais com a celulose do que com a lignina, apresentando ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, fornecendo flexibilidade e estabilidade ao agregado (Ramos, 2003). A hemicelulose está intimamente associada à celulose na estrutura da parede celular e estabelece ligação entre a celulose e a lignina (Bon *et al.*, 2008).

Hemicelulose representa o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É composto por 20-40% de biomassa lignocelulósica (Peters, 2007). O principal componente da hemicelulose é a xilana. Ele é um polissacarídeo que consiste de uma cadeia principal de unidades de xilopiranosil unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (Klippel & Antranikian, 2011).

A função das hemiceluloses é manter a flexibilidade da parede da célula, evitando a aderência das fibrilas de celulose umas às outras e manter os componentes da parede celular em conjunto (Carpita, 1996).

As moléculas de xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas formam hemiceluloses de baixa massa molecular (entre 100 e 200 unidades glicosídicas). A diversidade de ligações, de unidades monoméricas e de ramificações, favorece a complexidade da molécula.

Ao contrário da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, sendo mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas (Bon *et al.*, 2008). Impedimentos estéricos, devido à presença de cadeias laterais e de grupos hidroxila axiais de açúcares diferentes da hemicelulose, impedem a formação de uma estrutura cristalina, promovendo reações com componentes diferentes da biomassa, incluindo celulose (YU *et al.*, 2011).

Os heteropolímeros de xilana e manana também exigem um grupo de enzimas de clivagem secundários, incluindo a α -galactosidase, α -glucuronidase e um α -arabinosidase. Além disso, as esterases são necessárias para a remoção de grupos acetil a partir de xilanas em madeira e plantas anuais, assim como a partir de galactoglucomanana acetilada de madeiras macias. Finalmente, β -glicosidase, β -xilosidase e β -manosidase são necessárias para hidrolisar oligômeros pequenos em monômeros. A hidrólise completa de polímeros nativos requer a ação coordenada de todas essas enzimas (Maijala *et al.*, 2012). A hemicelulose funciona como uma ligação entre as fibras de celulose e a lignina, sendo facilmente hidrolisada por ácido diluído ou uma base, assim como pelas enzimas hemicelulases (Talebnia *et al.*, 2010).

As hemiceluloses têm massa molecular mais baixa do que a celulose e ramificações com cadeias laterais curtas o que consiste em heteropolímeros mais fáceis de serem hidrolisados. São intimamente associadas com a lignina e celulose, além de interagir covalentemente com a pectina. O componente dominante da madeira dura e plantas agrícolas, como o capim e a palha, é a xilana, enquanto que a de madeira mole é a glicomanana (Hendriks & Zeeman, 2009).

1.4.2.1 Xilana

De acordo com Groot *et al.* (1998), a xilana, o mais abundante componente hemicelulósico em compostos de palha para o cultivo de cogumelo, é um polímero consistindo de resíduos de xilosil, unidos por ligações β -1,4. A ação de algumas enzimas, incluindo endo-1,4- β -xilanaase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -D-glicoronidase e algumas esterases asseguram a conversão enzimática completa de xilana em açúcares monoméricos. A xilana está presente em todas as camadas da parede celular vegetal, inclusive na interface entre a celulose e a lignina (Collins *et al.*, 2005; Polizeli *et al.*, 2005). A forma mais abundante de xilana é heteroxilana (Figura 4), que é constituída por resíduos de xilose na cadeia principal com o acetato, arabinose e resíduos de glicose como substituintes comuns (Li *et al.*, 2009).

Nas plantas, a xilana forma uma camada que se sobrepõe por meio de ligações de

hidrogênio com a celulose, enquanto a ligação covalente com a lignina forma uma bainha exterior para proteger a planta (Van Dyk & Pletschke, 2012). Xilana constitui uma parte importante da parede celular das plantas, formando 30-35% do peso seco total, embora a abundância exata da xilana possa diferir entre as plantas (Beg *et al.*, 2001).

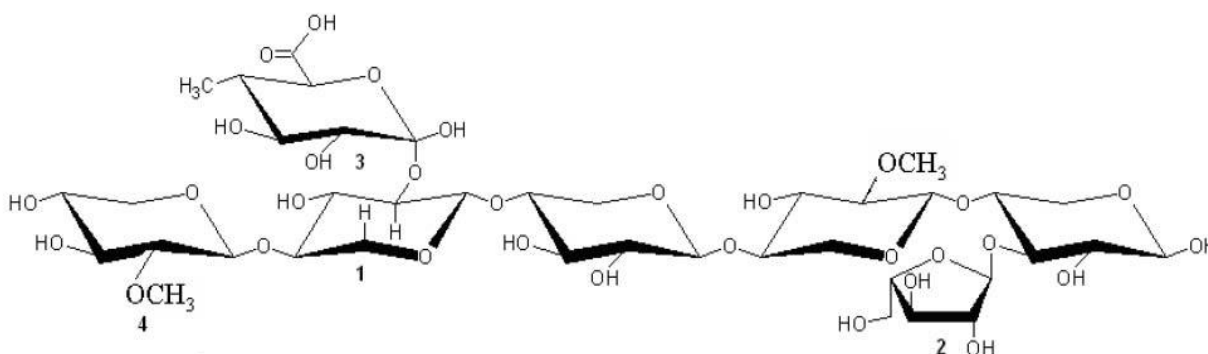


Figura 4. Xilana de gramínea. (1) 1,4-D-xilopiranoose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glicurônico; (4) grupo acetil (Pitarelo, 2007).

Em plantas de madeira *hardwoods* tais como *beechwood* (madeira de faia), *willow* (salgueiro) e *poplar* (álamo), a composição de xilana difere daquela em plantas herbáceas (tais como *spruce* e *pine*). Nas primeiras, essa composição ocorre por O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana com elevados níveis de acetilação. Os grupos acetil são responsáveis pela solubilidade da xilana em água, mas são removidos durante pré-tratamentos alcalinos. Xilanas (*softwoods*) não são acetiladas e contêm α -L-arabinofuranose unidas por ligações α -1,3-glicosídicas na posição C-3, mas há um alto conteúdo de manana e lignina (Eriksson & Bermek, 2009; Saha, 2003). A xilana não ocorre apenas em plantas lenhosas, mas também em plantas anuais, tais como milho e cana de açúcar, onde o mesmo pode constituir até 30% da sua composição. Xiloglucanos são predominantes no polissacarídeo hemicelulósico quantitativamente nas paredes celulares primárias de madeiras (principalmente em dicotiledôneas e menos em monocotiledôneas) (de Vries e Visser, 2001) e também pode aparecer em pequenas quantidades em gramas. Esses consistem da cadeia principal de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4 com 75% desses resíduos substituídos em O-6 com D-xilose. Resíduos de L-arabinose e de D-galactose podem ser anexados aos resíduos de xilose na formação de cadeias laterais di ou triglicosiladas. Xiloglucanos interagem com as microfibrilas de celulose por meio

da formação de ligações de hidrogênio, contribuindo assim para a integridade estrutural da rede de celulose (Girio *et al.*, 2010).

1.4.2.2 Manana

A manana é uma hemicelulose presente principalmente em madeiras leves, apresentando estrutura linear de unidades de manose com ligações β -1,4 ou estrutura heteropolimérica, com a manose ligada a unidades de glicose por ligações β -1,4 (glicomanana) (Wulff *et al.*, 2003). A manana é um importante componente da hemicelulose e contém açúcares, tais como manose, galactose e glicose. As composições são variáveis e incluem glicomananas (hardwood), galactomananas e galactoglicomananas (softwood) (Van Zyl *et al.*, 2010). Algumas destas heteromananas também contém grupos acetil nas posições C-2 e C-3 e resíduos de α -1,6 galactopiranoses unidos (Gubitz *et al.*, 1996).

Hemiceluloses como glicomananas e galactoglicomananas são os principais componentes hemicelulósicos da parede secundária de resinosas (*softwood*) enquanto em madeiras (*hardwood*) ocorrem em pequenas montagens (Girio *et al.*, 2010).

As mananas possuem funções de armazenamento, sendo componentes estruturais nas paredes celulares de coníferas. Os grupos laterais de ligações α -1,6-D-galactose em galactomananas possibilitam uma estrutura mais amorfa que retém água, aumentando a solubilidade em água (Van Zyl *et al.*, 2010).

1.4.3. Lignina

A lignina possui uma estrutura tridimensional com características hidrofóbicas e com muitas ramificações, sendo referida como um polifenol. Esse arranjo irregular possui várias unidades de fenilpropano como álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que podem conter grupos metoxila e hidroxila como substituintes no grupo fenil (Silva *et al.*, 2009). Esta macromolécula é ramificada e amorfa, preenchendo os espaços entre as fibras de celulose (Ferraz, 2001; Fengel & Wegener, 1989). Possui ainda uma estrutura heterogênea, formada por anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aril-éter (Fengel & Wegener, 1989).

Uma das principais funções da lignina é o suporte estrutural da parede celular de plantas vasculares. A parede celular lignificada proporciona rigidez ao material lignocelulósico juntamente com as microfibrilas de celulose e hemicelulose. Com isso, a hidrofobicidade da parede celular vegetal permite o transporte eficiente de água nas plantas vasculares. Outra importante função é a resistência a ataques microbianos. A lignina consegue impedir ou até

retardar a atuação microbiana na parede celular vegetal (Fan *et al.*, 1987). A lignina aumenta a resistência mecânica das plantas e as protege contra o ataque de micro-organismos (Fengel & Wegener, 1989). A decomposição da lignina é mais lenta quando comparada com a celulose e hemiceluloses (Wagner & Wolf, 1999).

As enzimas ligninolíticas fúngicas são produzidas durante o metabolismo secundário já que a oxidação da lignina não proporciona energia para o fungo. As enzimas hidrolíticas de outros polímeros naturais como celulose e amido não possuem nenhum tipo de ação na lignina por causa da sua estrutura heterogênea e das suas ligações (Hofrichter, 2002).

A remoção da lignina tem sido estabelecida como essencial para a bioconversão eficiente da lignocelulose em açúcares. A remoção de lignina é conseguida de várias maneiras, por meio físico (mecânico, térmico), meios químicos ou enzimáticos. O processo mecânico de redução do tamanho do substrato através de trituração ou moagem é muitas vezes o primeiro passo para um pré-tratamento mais eficaz. A remoção de lignina por processos químicos é feita através de pré-tratamento da biomassa por métodos como a hidrólise ácida, tratamento com vapor ou tratamento alcalino que torna a biomassa mais susceptível à degradação enzimática (Fitzpatrick *et al.*, 2010; Hendriks & Zeeman, 2009; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Varnai *et al.* (2010) estabeleceram que a lignina constitui o maior obstáculo para a degradação da celulose, com a hemicelulose tendo um impacto menor. A remoção da lignina (por meio de pré-tratamento) tem o maior efeito sobre a capacidade de hidrólise, enquanto o obstáculo da hemicelulose pode ser superado com a utilização de enzimas acessórias.

1.4.4. Pectina

A pectina é o principal constituinte das substâncias pécnicas, e tem como característica dominante ser composta por uma cadeia linear de unidades de ácido D-galacturônico no qual proporções variáveis dos grupos ácidos (40 a 60 %) estão presentes como ésteres metílicos (Prade *et al.*, 1999). De acordo com o grau de metilação dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido galacturônico, as substâncias pécnicas são conhecidas como ácido pectínico ou pectina (Wulff *et al.*, 2003). Esse termo abrange o éster metílico, a pectina; o ácido pectico desesterificado e seus sais, os pectatos; além de certos polissacarídeos neutros sem a estrutura principal galacturonana, que são frequentemente encontrados em associação com a pectina (Prade *et al.*, 1999).

Genericamente denominada pectina, trata-se de um polissacarídeo ramificado, sendo

constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose, galactose, fucose e apiose (Raven, 2001; Willats *et al.*, 2006; Van Dyk & Pletschke, 2012). Esta composição lhe dá características como alto peso molecular, carga negativa e acidez. É um dos principais componentes da parede celular das plantas, encontrando-se na lamela média (Jayani *et al.*, 2005). Devido ao caráter hidrofílico da pectina, o que confere a parede celular propriedades plásticas e flexíveis, a água é capaz de penetrar através da parede celular, favorecendo a formação de géis, além de conferir flexibilidade (Raven, 2001).

A pectina atua para manter a unidade das células vegetais (Vatanparast *et al.*, 2012) e é o polissacarídeo mais complexo presente na parede celular primária e espaços intracelulares de plantas superiores (Mohamed *et al.*, 2006). Substâncias pécticas são abundantes na biomassa vegetal, e estas constituem 4-30% das cascas de frutas cítricas. Frutas e vegetais são particularmente ricos em pectina, que representa uma grande parte da sua biomassa (>30%), enquanto que a quantidade deste polímero é baixa em plantas superiores (1%) e em tecidos lignificados (Hoondal *et al.*, 2002).

As enzimas que degradam as substâncias pécticas são conhecidas como pectinases ou enzimas pectinolíticas como as metilpoligalacturonases, poligalacturonases, pectina liases, trans-eliminases do ácido poligalacturônico e metilesterases da pectina (Wulff *et al.*, 2003).

1.5. Enzimas

Enzimas são, em sua maioria, proteínas que aumentam a velocidade das reações orgânicas, atuando como catalisadores nos sistemas biológicos sem serem consumidas ou alteradas durante o processo. Demonstram uma formidável eficiência catalítica muito maior que a dos catalisadores químicos graças à redução da energia de ativação das reações químicas (Stryer, 2008). São biomoléculas com propriedades catalíticas proeminentes, apresentando alta conversão pela especificidade na transformação do substrato em produto, além de elevada atividade em condições de temperatura e pressão medianas. Vários fatores podem alterar a atividade enzimática como a concentração da enzima e do seu substrato específico. Além disso, o tempo de reação, a presença de co-fatores, de efetores alostéricos e de inibidores, a temperatura, o pH e o potencial iônico também podem influenciar a ação enzimática (Lehninger, 2006). A catálise enzimática ocorre quando os substratos se ligam à enzima em uma região específica de sua superfície, chamada de sítio ativo (Stryer, 2008).

As enzimas são constituídas de uma ou mais cadeias de L-aminoácidos, ligadas covalentemente através de ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sua sequência na cadeia são específicas para cada enzima. A atividade catalítica de diversas enzimas depende da conjugação com componentes não protéicos, denominados de co-fatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas complexas denominadas grupos prostéticos (Nielsen & Oxenboll, 1998).

Os íons metálicos podem estar envolvidos na catálise enzimática em várias formas: podem aceitar ou doar elétrons, pois eles próprios podem atuar como eletrófilos; eles podem mascarar nucleófilos para evitar reações secundárias indesejadas e podem reunir enzima e substrato por ligações coordenadas. Podem ainda conter grupos que reagem na orientação necessária 3-D e podem também simplesmente estabilizar uma conformação cataliticamente ativa da enzima (Palmer, 2001; Shah & Madamwar, 2005).

As hidrolases correspondem às enzimas do complexo celulolítico que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a enzima celulásica avaliada (Lynd et al., 2002). As glicosil hidrolases (GH) são enzimas-chave na hidrólise de carboidratos, sendo parte do grupo de enzimas que clivam ligações glicosídicas (Castro, 2010). A hidrólise enzimática pode ocorrer através de duas maneiras. As exoenzimas removem unidades dos terminais dos polímeros, enquanto que as endoenzimas hidrolisam as ligações internas em qualquer ponto ao longo da molécula (Mathewson, 1998).

As enzimas oxidativas e hidrolíticas são as responsáveis pela degradação dos resíduos lignocelulósicos. As enzimas lignocelulolíticas oxidativas (lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase) atuam na degradação da lignina. As enzimas oxidativas retiram os grupos metoxila da lignina, rompendo as ligações éter. Ocorre, então, a liberação de substâncias mais solúveis que expõem as cadeias restantes à ação das demais enzimas (Buswell *et al.* 1996). A biotransformação dos resíduos lignocelulósicos faz com que as enzimas hidrolíticas (celulases e xilanases) utilizem os polissacarídeos como fontes de carbono, possibilitando a absorção pelo micélio (Durrant *et al.* 1991).

A produção de enzimas lignocelulolíticas como lacase, celulase, manganês-peroxidase, carboximetilcelulase, lignina-peroxidase e xilanase torna-se importante do ponto de vista econômico por causa das inúmeras aplicações nas indústrias de celulose, de alimentos, de ração animal, sucroalcooleiras, têxtil, dentre outras (Souza, 2012).

Em comparação com os processos industriais geralmente aplicados, a utilização de enzimas apresenta características atraentes tais como aumento da estabilidade e elevada atividade, especificidade biocatalítica e a redução de subprodutos indesejáveis. Da mesma forma, a temperatura desejada, pH, pressão e as condições são moderadas, em comparação com os utilizados em processos químicos. Além disso, as enzimas são biodegradáveis, uma propriedade que reduz os problemas da toxicidade química, sendo, portanto, ambientalmente correto e também uma alternativa viável em termos econômicos (Hoondal *et al.*, 2002; MacCabe *et al.*, 2002; Lara-Marquez *et al.*, 2011).

O método mais promissor para a hidrólise de polissacarídeos em monômeros de açúcares é através do uso de enzimas, isto é, celulasas e hemicelulasas. Além disso, as hemicelulasas facilitam a hidrólise da celulose, expondo as fibras de celulose, tornando-as mais acessíveis (Shallom & Shoham, 2003). A hidrólise utilizando enzimas apropriadas representa o método mais eficaz para libertar os açúcares simples a partir de materiais celulósicos (Talebnia *et al.*, 2010).

A estratégia de sucesso para a produção de celulasas pode ser alcançada por meio da seleção de micro-organismos e melhores condições de processo de fermentação. Estes incluem triagem para novas atividades enzimáticas e desenvolvimento de pré-tratamentos que alteram a estrutura cristalina da celulose, aumentando a acessibilidade da enzima (Delabona *et al.*, 2012).

A hidrólise enzimática é vantajosa, devido à sua baixa toxicidade, baixo custo e baixa corrosão em comparação com a hidrólise ácida ou alcalina (Taherzadeh & Karimi, 2007). A hidrólise enzimática pode ser efetuada por celulasas que são altamente específicas de acordo com o seu substrato (Banerjee *et al.*, 2010). Em comparação com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática requer menos energia e as condições ambientais amenas (Ferreira *et al.*, 2009).

Os hidratos de carbono ou carboidratos consistem na cadeia principal de unidades piranosil dos açúcares monoméricos unidos por ligações β -1,4: glicose em celulose, xilose em xilana e manose em mananas ou manose e glicose em glicomananas. A hidrólise desses carboidratos (Figura 5) prossegue através da quebra das ligações glicosídicas β -1,4 nos polissacarídeos por celulasas, xilanases, mananases e glucanases (Maijala *et al.*, 2012). As holocelulasas são as enzimas que degradam a holocelulose (celulose com hemicelulose) da estrutura lignocelulósica da parede celular das plantas.

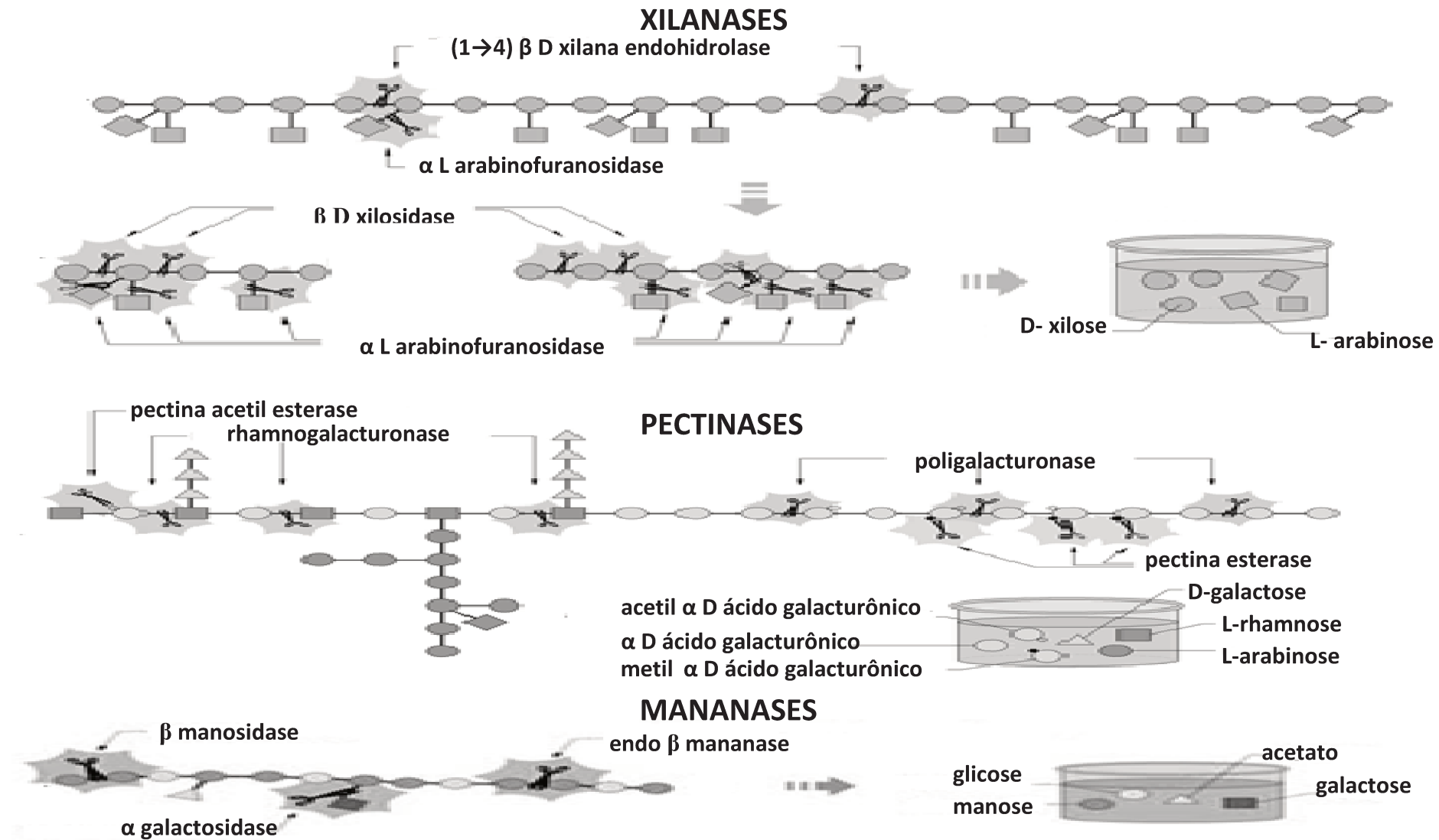


Figura 5. Ataque de pectinases, mananases e xilanases na estrutura holocelulósica (Siqueira *et al.*, 2010b), modificado por Gaspar Júnior, 2014.

1.5.1. Celulases

A maioria das celulases exibe uma estrutura semelhante de organização. Possuem uma estrutura molecular com dois ou mais domínios funcionais separados e independentes (Yague *et al.*, 1997; Linder *et al.*, 1996), sendo um domínio de ligação de celulose (CBD) e um domínio catalítico (CCD). Os domínios são unidos por uma sequência longa e altamente O-glicosilada (Liu *et al.*, 2012). O domínio catalítico, sítio das celulases onde ocorre a hidrólise da cadeia de celulose, representa a maior parte da enzima e o tamanho é variável entre as diferentes celulases (Kleywegt *et al.*, 1997).

O CBM (Módulo de Ligação à Celulose) é o menor domínio das celulases, consistindo de aproximadamente 35 aminoácidos. Ele pode ser ligado através do *linker* flexível ao módulo catalítico. A função do CBM é se ligar na fibra, e servir como uma "âncora" para a enzima, mantendo-a fortemente adsorvido à superfície da celulose. Isto reduz a necessidade de forte ligação do domínio catalítico com a celulose, e, assim, permite que a enzima tenha maior taxa de hidrólise (Harrison *et al.*, 1998; Srisodsuk *et al.*, 1993; Reinikainen *et al.*, 1992).

Essas enzimas hidrolisam as ligações β -1,4 em celulose e seus derivados. A hidrólise da celulose até moléculas de glicose ocorre pelo sinergismo de três diferentes enzimas: endoglicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam a celulose a glico-oligossacarídeos, celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), as quais liberam celobiose a partir de celulose e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que convertem a celobiose a monômeros de glicose (Castro, 2010; Castro & Pereira Jr, 2010; Juhász *et al.*, 2005). Do ponto de vista industrial, esse processo é muito importante devido à possibilidade de conversão da glicose em etanol (Verniz, 2012). Em geral, as celulases secretadas por fungos filamentosos, são glicoproteínas que contém sítios O- ou N-glicosilados (Linder & Teeri, 1996).

Em condições moderadas de operação (50-60°C), as celulases apresentam elevada especificidade de ação sobre a celulose, fornecendo uma utilização mais eficiente dos carboidratos e evitando, assim, a formação de produtos inibidores. Essa rota enzimática apresenta limitações tecnológicas como o alto custo das enzimas e a baixa produtividade (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

As celulases são utilizadas comumente em conjunto com hemicelulases e pectinases em processos de maceração, como na extração, na filtração e na clarificação de sucos de frutas e óleo de sementes (Bhat, 2000). As celulases agem juntamente com as xilanases, proporcionando a hidrólise de polissacarídeos não amiláveis em animais monogástricos. Em ruminantes, as

celulases são utilizadas em conjunto com pectinases e hemicelulases, aumentando a digestão das plantas forrageiras, base da alimentação dos animais. Desta forma, melhoram a qualidade e a digestibilidade da ração (Bhat, 2000). A primeira etapa da hidrólise das celulases em resíduos agrícolas é a adsorção das enzimas na superfície da celulose. Com isso, ocorre a biodegradação da celulose em açúcares fermentáveis e, logo após, a desadsorção das celulases dos resíduos (Wu & Ju, 1998). Uma dificuldade é o aumento dos produtos da hidrólise, como de celobiose e glicose que podem inibir a atividade celulásica (Sun & Cheng, 2002).

A taxa de hidrólise também pode ser alterada por fatores estruturais como a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, área de superfície e a concentração de lignina (McMillan, 1994). Outro fator que pode modificar a hidrólise enzimática é a concentração da enzima. Um aumento de celulases pode aumentar o rendimento e a taxa de hidrólise, mas aumentaria os custos do processo também (Sun & Cheng, 2002).

Segundo Gray *et al.* (2006), existem três principais grupos de atividades celulolíticas produzidas por fungos.

1.5.1.1. Endoglicanase (1,4- β -D-glucano 4 – glucanohidrolase, EC 3.2.1.4)

As endoglicanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose (Franco *et al.*, 2009). As ligações glicosídicas são quebradas nas regiões amorfas da celulose, abrindo espaço para as celobiohidrolases (Zhang & Lynd, 2006). Essas enzimas hidrolisam ao acaso ligações glicosídicas β -1,4. Ela não age em celobiose, mas hidrolisa celodextrinas, celulose ácida e celuloses substituídas como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxiethylcelulose (HEC). O polímero CMC é substrato solúvel utilizado para a quantificação da atividade da endoglicanase. Este polímero é alterado pela enzima resultando em uma alteração no grau de polimerização (Miller, 1959; Ghose, 1987; Bon *et al.*, 2008).

As endoglicanases são responsáveis primeiramente pela diminuição do grau de polimerização, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e consequentemente novos fins de cadeias susceptíveis à ação das exoglicanases (Lynd *et al.*, 2002) e utilizam como principais substratos a celulose amorfa, celotetraose e CMC (Goyal, Ghosh & Eveleigh, 1991).

1.5.1.2. Exoglicanase (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase, EC 3.2.1.91)

As exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH) são responsáveis por participar da hidrólise primária da fibra, em que promove aumento na taxa de hidrólise da celulose, por

tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto a ação das celulasas (Cao & Tan, 2002). A CBH pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, e a do tipo II (CBH II) que hidrolisa terminais não redutores (Castro, 2010). Estas enzimas são altamente específicas, hidrolisando somente a celulose (Zhang & Lynd, 2006). A CBHI é a principal enzima celulolítica produzida por *Trichoderma* sp. e atualmente é uma das celulasas mais investigadas para aplicações de biocombustíveis. Essa enzima hidrolisa as moléculas de celulose microcristalina em unidades solúveis de celobiose, favorecendo a produção de açúcares fermentáveis a partir da biomassa (Colussi *et al.*, 2011).

Essa enzima não age em celulosas substituídas, o que reflete um maior grau de especificidade em relação ao substrato comparado com as endoglicanases (Stubbs *et al.*, 1999). A celobiohidrolase hidrolisa celodextrinas, mas não a celobiose, utilizando como principais substratos a celulose cristalina, a celulose amorfa e a celotetraose (Meinke *et al.*, 1995). A necessidade de duas exoglicanases tem sido atribuída pelas suas preferências em reduzir (CBHI) ou não (CBHII) as extremidades de cadeias de celulose quando em celulose microcristalina. As exoglicanases são muito lentas ao diminuir o grau de polimerização da celulose (Lynd *et al.*, 2002).

As celobiohidrolases, que pertencem às famílias de glicosil hidrolases 5, 6, 9 e 48, sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose. As β -glicosidases assumem um papel importante nesse processo pois catalisam esse dissacarídeo (Bon *et al.*, 2008).

1.5.1.3. β -Glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21)

São responsáveis pela clivagem de pequenas cadeias de celo-oligossacarídeos e celobiose a glicose, a qual é utilizada nas vias metabólicas do micro-organismo (Nascimento, 2009). Esta enzima não age em celulose ou celodextrinas de maior grau. Utiliza como substratos a celotetraose e a celobiose (Goyal; Ghosh & Eveleigh, 1991; Meinke *et al.*, 1995). Apesar da β -glicosidase não atuar diretamente na celulose, considera-se como componente do sistema celulase por causa do estímulo à hidrólise de celulose (Maheshwari; Bharadwaj; Bhat, 2000). Essas enzimas pertencem às famílias glicosil hidrolases 1, 3, 9, 30 e 116 (Jabbour *et al.*, 2012).

A utilização de infusões de β -glicosidases em conjunto com pectinases faz com que aromas e características voláteis de frutas e vegetais aumentem, o que é de grande importância para a indústria de alimentos (Bhat, 2000).

Um dos principais desafios na bioconversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis líquidos inclui a busca por uma beta-glicosidase tolerante à glicose. Beta-glicosidase é a enzima chave presente na celulase e participa do passo final durante a hidrólise de celulose através da conversão da celobiose em glicose. Essa reação é realizada sempre sob controle, pois o seu próprio produto, a glicose, causa a inibição da enzima (Singhania *et al.*, 2013).

1.5.1.4. FPase (Filter Paper Activity)

As análises efetuadas pela FPase representam a atividade celulolítica total, refletindo a atividade enzimática do complexo das celulases através da reação das enzimas fúngicas com o substrato específico (papel de Whatman nº1).

A atividade de FPase é uma análise importante na avaliação de uma estirpe para atividade de celulase de um modo geral. Neste caso, a celulase vai apresentar uma atividade de endo e outra de exocelulase, e portanto, é capaz de atuar tanto nas regiões cristalinas como nas regiões amorfas da celulose (Franco *et al.*, 2009). A maioria dos micro-organismos celulolíticos apresentam atividade de endoglicanase, mas nem sempre apresentam de exoglicanase, e portanto, a atividade de FPase é um diferencial (Bhat, 2000).

1.5.2. Pectinase

Enzimas pectinolíticas ou pectinases são enzimas heterogêneas que degradam as pectinas presentes na maioria das paredes celulares vegetais, sendo utilizadas principalmente em indústrias de alimentos de clarificação e extração do suco de frutas (Belén *et al.*, 2012). Pectinases são classificadas em três grupos principais. As protopectinases solubilizam a protopectina, formando uma pectina solúvel. As esterases catalisam a desesterificação de pectinas pela remoção de ésteres, formando ácido péctico. As depolimerases catalisam a hidrólise da ligação glicosídica 1→4 de ácido galacturônico das substâncias pécticas (Jayani *et al.*, 2005).

As substâncias pécticas são despolimerizadas por três classes de enzimas, as quais podem atuar em conjunto. As liases ou eliminases (liase de pectina, liase de pectato) clivam ligações glicosídicas internas através de eliminação beta, produzindo oligômeros ou monômeros

com resíduos insaturados 4,5 na extremidade não redutora. As hidrolases (galacturonases) causam a hidrólise das ligações galacturonosídicas e provavelmente clivam as ligações oxigênio-glicosídeo. As poligalacturonases (PG) diferem em seu modo de ação, podendo ocasionar hidrólise ao acaso (endo) ou atuando somente nas extremidades das cadeias com liberação gradual de galacturonobiose (exo). As esterases (esterase e a acetil esterase da pectina) facilitam a degradação da pectina pela liase do pectato, pela geração de poligalacturonato através da desmetilação (hidrólise dos grupos ésteres) e desacetilação da pectina, respectivamente (Benen & Visser, 2003).

A degradação completa das substâncias pécticas pelas pectinases deriva inicialmente em ácido galacturônico e ramnose, com a produção de menores quantidades de galactose, arabinose, metanol, acetato e traços de diversos outros açúcares (xilose, fucose e apiose), os quais são assimilados e metabolizados pelos micro-organismos (Wulff, 2003).

Liases como pectato liases (PLY, EC 4.2.2.9 e 4.2.2.2) e pectina liases (PEL; EC 4.2.2.10) catalisam a degradação da pectina esterificada e poligalacturonato respectivamente, pela remoção de um próton e gerando uma ligação insaturada entre os carbonos C-4 e C-5 da extremidade não redutora de pectina. PLYs são específicos para a pectina não-esterificada e dependem de Ca^{2+} enquanto PEL degrada a pectina metil-esterificada e não depende deste cátion (Benen & Visser, 2003).

A endopoligalacturonase (PG, EC 3.2.1.15) é um exemplo de despolimerase. É uma enzima hidrolítica muito utilizada na indústria alimentícia nos processos de maceração, liquefação, extração, clarificação e filtração de sucos de frutas ou vegetais e vinhos. É muito usada industrialmente por possuir elevada atividade enzimática em pH baixo, satisfazendo as aplicações de frutas e verduras ao processo industrial (Zheng & Shetty, 2000).

As fontes comerciais de poligalacturonases da indústria alimentícia são usualmente derivadas de fungos principalmente *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus* (Zheng & Shetty, 2000).

1.5.3. Hemicelulases

A hemicelulose tem uma composição mais variada em relação à celulose e, portanto, requer um grande número de enzimas para hidrolisar eficazmente. Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes hemicelulases são necessárias para sua degradação. Essas enzimas podem ser divididas em enzimas despolimerizantes, que atacam a estrutura central e as enzimas

que removem os substituintes que podem representar impedimento estérico à despolimerização enzimática (Van Dyk & Pletschke, 2012). As hemicelulases possuem diferentes aplicações como na alimentação animal, na hidrólise de biomassas e na indústria de papel e da celulose (Heidorne *et al.*, 2006; Juhász *et al.*, 2005).

As conhecidas como β -xilanases (EC 3.2.1.8) quebram as ligações internas da cadeia de xilanos a xilo-oligossacarídeos. As β -xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam xilo-oligossacarídeos para produzir xilose. As β -mananases (EC 3.2.1.78) clivam as ligações internas de galacto (gluco) mananose a mano-oligossacarídeos. As β -manosidases (EC 3.2.1.25) hidrolisam mano-oligossacarídeos, liberando manose. Outras hemicelulases incluem α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), endo-arabinase (EC 3.2.1.99), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endogalactanase (EC 3.2.1.89), α -glicuronidase (EC 3.2.1.139), etc. (Heidorne *et al.*, 2006; Juhász *et al.*, 2005).

Os módulos catalíticos de hemicelulases são as glicosil hidrolases (GHS) que hidrolisam ligações glicosídicas, ou as esterases de carboidratos (CES), que hidrolisam ligações éster de grupos acetato ou grupos laterais de ácido ferúlico (Shallom & Shoham, 2003).

1.5.3.1. Xilanase

A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar as fortes ligações cruzadas entre a hemicelulose e as microfibrillas da celulose na parede vegetal através da hidrólise das ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose) (Lynd *et al.*, 2002; Santos, 2012). Uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido relatados para produzir enzimas xilanolíticas. Os fungos filamentosos têm demonstrado uma grande capacidade para secretar uma vasta gama de xilanases, com os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* sendo os mais extensivamente estudados e avaliados entre os fungos produtores de xilanase (Yang *et al.*, 2006; Pandya & Gupte, 2012).

As enzimas essenciais para a degradação da xilana em monômeros são as endoxilanases que clivam a cadeia principal de xilana em oligossacarídeos mais curtos, e β -xilosidase, que cliva xilo-oligossacarídeos curtos em xilose. Do mesmo modo, as enzimas essenciais para a degradação da manana são as endomananases e as β -manosidases. Então, xilanas e mananas geralmente possuem vários substituintes diferentes ligados à cadeia principal, tais como arabinose, galactose, glicose e grupos acetil. Desta forma, há uma exigência por um grande

número de enzimas auxiliares para removê-las a partir da cadeia principal, facilitando o acesso às moléculas principais (Meyer *et al.*, 2009).

Há um grande número de enzimas xilanolíticas procedentes da complexidade e da heterogeneidade estrutural das xilanas. As enzimas que mais se destacam nesses complexos enzimáticos são as β -1,4-endoxilanases (*β -1,4-D-xylan xylanohydrolase*; EC 3.2.1.8) que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β -xilosidases (*β -1,4-D-xyloside xylohydrolase*; EC 3.2.1.37). Os grupamentos laterais presentes na xilana são liberados pela ação das α -L-arabinofuranosidasas, α -glicuronidasas e acetilxilana esterases. Todas essas enzimas agem, cooperativamente, de modo a converter a xilana em seus açúcares constituintes (Nascimento, 2009; Pandya & Gupte, 2012).

De acordo com a sequência de aminoácidos homólogos, as endoxilanases microbianas são classificadas em dois grupos: família 10 e 11. As enzimas da família 10 demonstram maior versatilidade catalítica do que a família 11, pois as endoxilanases da família 10 apresentam melhor capacidade em clivar as ligações glicosídicas das cadeias de xilana, tais como ácido metil-glicurônico, ácido acético e α -L-arabinofuranose (Biely *et al.*, 1997). As xilanases da família 11 tem um grande sítio ativo e preferem a clivagem das principais cadeias em regiões não substituídas, enquanto a família 10 têm um sítio ativo menor e são capazes de clivar as cadeias principais mais próximas do substituinte. Assim, as xilanases da família 10 geralmente não requerem a remoção do substituinte para a sua atividade. Alguns endo- β -1,4-xilanases também se encontram na família 8, mas não foram caracterizadas (Van Dyk & Pletschke, 2012).

As acetil esterases de xilana são enzimas que são capazes de hidrolisar a ligação éster entre os grupos acetil e resíduos de xilose em (arabino) xilanas. A atividade específica destas enzimas para oligossacarídeos foi maior do que para polissacarídeos, mas 80% da quantidade total dos ésteres de grupos acetil é removido por clivagem em ambos os casos (Kabel *et al.*, 2003; Hinz *et al.*, 2009).

1.5.3.2. Mananase

As enzimas que hidrolisam as mananas, as mananases, têm sido largamente negligenciadas, embora seja uma hemicelulose abundante. A aplicação de mananases para catalisar a hidrólise de β -1,4 manana é tão importante como a aplicação de xilanases (Girio *et al.*, 2010).

As principais enzimas envolvidas na hidrólise de mananas e glucomananas lineares são

as 1,4- β -D-manana manohidrolases (conhecidas como β -mananases, EC 3.2.1.78), 1,4- β -D-manopiranosídeo hidrolases (denominadas β -manosidases, EC 3.2.1.25) e 1,4- β -D-glicosídeo glicohidrolases (β -glicosidases, EC 3.2.1.21) (Moreira & Filho, 2008). β -mananases (EC 3.2.1.78) hidrolisam hemiceluloses baseadas na manana e liberam β -1,4-mano-oligômeros, que podem ser ainda mais hidrolisados por manose β -manosidases (EC 3.2.1.25) (Shallom & Shoham, 2003). As β -mananases são endo-hidrolases, que agem nas ligações glicosídicas internas da cadeia estrutural de mananas, gerando β -1,4-manooligossacarídeos de cadeia curta. As β -manosidases são exo-hidrolases que geram manose a partir de oligossacarídeos agindo na ligação terminal no final não redutor, bem como, clivando manobiose em unidades de manose (Moreira & Filho, 2008; Van Zyl *et al.*, 2010).

A completa hidrólise da estrutura da manana requer ação sinérgica de endo e exo-hidrolases, juntamente com enzimas que clivam as cadeias laterais para alcançar a completa hidrólise. Ambas heterosinergias (a ação sinérgica das enzimas entre a cadeia principal e as cadeias laterais) e homosinergias (a ação sinérgica das enzimas entre as duas cadeias principais ou, entre as duas cadeias laterais) são relatadas na degradação de mananas (Moreira & Filho, 2008; Shallom & Shoham, 2003; Van Zyl *et al.*, 2010).

A principal molécula de açúcar de galactoglucomananas é a D-mannose, mas para a sua hidrólise total em açúcares simples, a ação sinérgica de endo β -1,4 mananases (EC 3.2.1.78) e exo β -manosidases (CE 3.2.1.25) é necessária para clivar a cadeia principal do polímero (Shallom & Shoham, 2003). Enzimas adicionais, tais como β -glicosidases, α -galactosidases e manana acetil esterases são necessárias para remover açúcares da cadeia lateral que estão ligados a vários pontos da mananas (Dhawan & Kaur, 2007).

A principal aplicação das mananases pode ser na indústria de papel e celulose. Além disso, as β -mananases podem ser utilizadas na liquefação e extração de frutas, nas preparações à base de café, apresentando melhor volatilidade do aroma, propriedades de sabor e aparência visual da bebida final. Podem ainda ser usados como aditivos alimentares sem valor nutricional para o crescimento seletivo da microflora intestinal benéfica (bifidobacteria e lactobacilos) em humanos (Puchart *et al.*, 2004).

1.6. Substratos lignocelulósicos

Resíduos agroindustriais, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, farelo e palha de trigo, sabugo de milho, sementes de frutas, efluentes da indústria de papel e de alimentos são

ricos em celulose, hemicelulose e lignina. Com a industrialização, a geração e o descarte desses resíduos têm aumentado, estimulando pesquisas e despertando o interesse de diversos setores em reaproveitá-los. Esses resíduos representam uma fonte barata para o crescimento de microrganismos capazes de produzir metabólitos com alto valor agregado, como enzimas, solventes orgânicos e açúcares (Monte *et al.*, 2010).

Devido aos resultados encontrados por diferentes pesquisadores sobre a influência do substrato lignocelulósico no meio de cultivo e a sua respectiva atividade enzimática, no presente estudo foram analisados onze substratos lignocelulósicos: algodão, cártamo, crambe, girassol, linhaça, mamona, nabo forrageiro, niger, pinhão-manso, soja e tremoço.

1.6.1. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.)

O algodão é derivado de diversos tipos de plantas da família *Gossypium* (*Gossypium hirsutum*, *G. barbadense*, *G. Arboreum* *G. herbaceum*). O algodão possui um sistema radicular mal adaptado a condições de alagamento e fica rapidamente danificado (Milroy, 2013). As fibras de algodão são os elementos estruturais usados para formar fios e tecidos. O algodão é uma fibra vegetal, obtendo destaque como a mais importante dentre as fibras naturais, sendo utilizada para diversos fins. Apresenta ênfase para a manufatura de uma grande proporção de roupas usadas pelo homem. Como fibra básica, oferece enormes possibilidades de usos especializados, pelas modificações físicas e químicas e em misturas. A fibra de algodão é prontamente diferenciada de todas as outras fibras têxteis pela alta qualidade de suas características, devido à estrutura interna única, pela forma e dimensões (Sanches, 2006).

Em relação ao conteúdo de óleo existente em seu caroço, esse varia entre 17 e 23%. A torta resultante da prensagem do algodão apresenta-se como uma fonte protéica importante (Bernardini, 1982). São produzidos do algodão: o óleo (16%), a torta (45%), o línter (9%) e caroço (26%), sendo os 4% restantes considerados como perdas do processo (Kohel, 1989). Com cerca de 20-25% de óleo, a semente de algodão é utilizada na fabricação de óleo para salada, gorduras e margarinas. Possui alto teor de ácidos graxos poli-insaturados mas a maior concentração é de ácidos graxos saturados quando comparado com outras sementes oleaginosas (Lukonge *et al.*, 2007).

1.6.2. Cártamo (*Carthamus tinctorius*)

O *Carthamus tinctorius* (cártamo) é uma asterácea de cultivo anual, medindo até 150 cm de altura, sendo uma oleaginosa propícia para cultivo no semi-árido brasileiro pois é uma espécie que apresenta elevada resistência à falta de água, às altas temperaturas e à baixa umidade relativa do ar, sendo ainda tolerante aos solos salinos (Lichston *et al.*, 2010).

O cártamo é cultivado extensivamente como cultura oleaginosa em muitos países, mas existe cultivares com características associadas à produção de flores de corte que são pouco conhecidas pelo Brasil (Streck *et al.*, 2005). O cultivo para a produção de óleo ocorre principalmente na Argentina e México onde há uma demanda em evolução por óleos vegetais de excelente qualidade.

As sementes desta espécie possuem conteúdos elevados de óleo (35 a 40%), sendo de ótima qualidade, tanto para consumo humano, como para uso industrial (Giayetto *et al.*, 1999). O óleo da semente de cártamo apresenta grande concentração de ácidos graxos insaturados com altos teores de ácidos linolêicos (70 a 75%) e olêicos (20%) (Vivas, 2002).

1.6.3. Crambe (*Crambe abyssinica*)

O crambe é um vegetal robusto da família das crucíferas, sendo normalmente utilizado como forragem para pasto. Possui um crescimento e produção em ciclo curto, entre 90 a 100 dias e se desenvolve em condições climáticas antagônicas (Oplinger *et al.*, 1991).

Essa planta demonstra uma grande capacidade para estabelecer-se como matéria prima para a produção do biodiesel pois é uma cultura de inverno, apresentando tolerância à geada depois de estabelecida, à seca, além da sua elevada precocidade. Esses argumentos a colocam como uma alternativa também na rotação de culturas. Além disso, deve-se evidenciar o seu alto teor de óleo que se situa entre 34% a 38% (Moura, 2009; Pitol *et al.*, 2010). Com a extração mecânica do óleo, o resíduo corresponde a 20% desse, sendo chamado de torta. Com a extração feita com solvente, o resíduo é o farelo, apresentando cerca de 2% de óleo. Os valores de proteína bruta acima de 20% indicam a torta e o farelo de crambe como alternativa às fontes tradicionais de proteína (farelo de soja e torta de algodão) para animais ruminantes (Pitol *et al.*, 2010). Outra justificativa para o uso do crambe é por esse não representar concorrência na alimentação pela presença de ácido erúico (Onorevoli, 2012).

No Brasil, o cultivo iniciou-se em 1995, na Fundação MS, no município de Maracajú –

MS (Jasper *et al.*, 2010; Onorevoli, 2012). Na Europa e nos Estados Unidos, o crambe concorre com diversas culturas como soja, milho e trigo. Apesar do esforço para a expansão da área cultivada, não foram registrados ganhos expressivos já que as condições climáticas não permitem o cultivo de uma segunda safra. No Brasil, o crambe apresenta-se como uma excelente alternativa para a rotação de culturas na segunda safra, pois possui ciclo curto (90 dias).

Outras formas de utilização do crambe são observadas na produção de lubrificantes industriais, inibidores de corrosão, ingredientes na manufatura da borracha sintética, isolante elétrico, na confecção de películas plásticas, surfactantes e agentes da flutuação (Oplinger *et al.*, 1991)

1.6.4. Girassol (*Helianthus annuus* L.)

O girassol pertence à família *Asteraceae* e seu gênero *Helianthus* é derivado do grego *hélíos* (sol) e de *anthus* (flor), ou seja, “flor do sol”. É originário da região compreendida entre o norte do México e o sul dos Estados Unidos (Leite *et al.*, 2005). Com ciclo de vida em torno de 130 dias, o girassol carece de pouca água, tolerando variações de temperatura (Smiderle *et al.*, 2005). Apresenta características agronômicas importantes, como maior tolerância à seca, ao frio e ao calor, quando comparado com a maioria das espécies cultivadas no Brasil (Oliveira & Vieira, 2004; Leite *et al.*, 2005). O principal uso do óleo girassol é em produtos alimentícios, servindo como base para temperos, doces, massas e outros. O girassol, também, é uma importante fonte de proteínas, onde o beneficiamento de uma tonelada de grãos obtém-se, em média, 300 kg de torta com 48-50% de proteína, que pode ser utilizada na alimentação animal (Embrapa, 2011).

Essa planta proporciona melhorias na fertilidade e estrutura dos solos. As sementes são ricas em óleo com quantidades superiores a 50%, podendo ser usadas para a produção do biodiesel. Em cada tonelada de sementes, extraem-se em média 400 kg de óleo, 250 kg de casca e 350 kg de torta para os animais, com 45% a 50% de proteína bruta (Lira, 2011). O óleo de girassol que compõe, aproximadamente, 40% da semente de *Helianthus annuus* destaca-se por suas excelentes características físico-químicas e nutricionais como alta digestibilidade, altos teor de tocoferóis e índice de ácidos graxos poliinsaturados (Bernardini, 1982) sendo considerado um óleo saudável, pois contém mais de 85% de ácidos graxos insaturados e baixo

conteúdo de saturados. O triacilglicerol predominante é a trilinoleína. É utilizado como óleo para salada, em frituras e em margarinas (Grompone, 2005).

O girassol possui ainda alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (65,3%) e de saturados (11,6%). O teor de poliinsaturados é constituído, em grande parte, pelo ácido linoléico (65%), sendo vital ao desempenho das funções fisiológicas humanas. Por isso, é considerado um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional e organoléptica do mundo (Castro *et al.*, 1999).

1.6.5. Linhaça (*Linum usitatissimum*)

A linhaça é uma semente oleaginosa originada do linho (*Linum usitatissimum*), que é uma planta herbácea (Bloedon & Szapary, 2004). A composição da semente de linhaça é de aproximadamente 41% de lipídeos, 20% de proteínas e 28% de fibra total, podendo sofrer variações. A quantidade de ácido alfa linolênico (ômega 3) e ácido graxo linoléico (ômega 6) corresponde a 57% e 16%, respectivamente, do teor de lipídios totais da linhaça (Morris, 2007; Riediger *et al.*, 2008; Tzang *et al.*, 2009) e esses são chamados de ácidos graxos essenciais, sendo indispensáveis para o funcionamento e crescimento normal de todos os tecidos.

A linhaça apresenta uma concentração baixa de ácidos graxos saturados. Apenas 9% são saturados, sendo que o nível de ácidos graxos monoinsaturados desejáveis é modesto, em torno de 18% e o perfil adequado de ácidos graxos poliinsaturados, em média 73% (Morris & Vaisey-Genser, 2003). O óleo de linhaça vem demonstrando vários benefícios à saúde humana como a redução dos níveis de colesterol e a melhora do perfil lipídico do plasma por causa da elevada relação Ômega-3/Ômega-6 entre as fontes vegetais (Riediger *et al.*, 2008; Tzang *et al.*, 2009). É um alimento rico ainda em fibras insolúveis, solúveis e vitamina E, além de reduzir o risco de doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, é um alimento densamente energético (Daun *et al.*, 2003).

No Brasil, a linhaça é produzida principalmente no noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Suas utilizações destacam-se na fabricação de tecidos, óleos para tinturas, cosméticos, medicamentos e para a alimentação animal e humana. O óleo possui coloração amarelo-dourado, marrom ou âmbar, e apresenta-se mais viscoso que a maioria dos demais óleos vegetais. Tal fato explica-se pelo seu elevado teor de ácidos graxos insaturados principalmente os ω -3 (Trucom, 2006).

1.6.6. Mamona (*Ricinus communis*)

A mamona, planta pertencente à família Euphorbiaceae, engloba muitas plantas nativas da região tropical (Savy Filho *et al.*, 1999), é uma oleaginosa de elevada complexidade morfológica e fisiológica, tratando-se de uma planta rústica, bastante tolerante à seca e exigente em radiação solar e luminosidade (Carvalho, 2005).

A mamona é uma importante fonte de óleo vegetal e medicinal e tem inúmeros benefícios para a humanidade. O óleo tem vários usos industriais; o óleo desidratado de mamona é usado na indústria de tintas e vernizes, manufatura de uma vasta gama de produtos sofisticados como fibras de nylon, lubrificante de motores a jato, fluidos hidráulicos, plásticos, couro artificial, manufatura de fibras óticas, vidros blindados e próteses ósseas e como um anticongelante para combustíveis e lubrificantes utilizados em aeronaves e foguetes espaciais (Sujatha *et al.*, 2008). O óleo de mamona possui uma grande versatilidade já que é utilizado como material de partida para muitos produtos químicos industriais devido a sua estrutura, como na fabricação de tintas, revestimentos, tintas gráficas, lubrificantes e uma vasta gama de outros produtos (Ogunniyi, 2006)

Atualmente, uma das principais aplicações da mamona é a produção do biodiesel (Souza *et al.*, 2010), já que essa não é uma *commodity* alimentícia, devido à sua toxicidade. O principal componente tóxico na farinha da semente de mamona é a ricina, um alcalóide ricinina e uma proteína alergênica polissacarídea CB-1A. Isso faz com que a farinha de alto teor protéico seja usada como fertilizante ou incinerada. Ricina, uma toxalbumina letal, inibe a síntese protéica inativando ribossomos e é mortal quando inalada, ingerida ou injetada (Sujatha *et al.*, 2008).

Algumas características inerentes ao biodiesel de óleo de mamona são totalmente diferentes das demais, particularmente, em relação à viscosidade. Tal característica é atribuída à presença de um maior teor de hidróxi-ácidos no óleo de mamona, cuja ocorrência se reflete em outras propriedades coligativas como a densidade e a viscosidade do óleo vegetal. Além disso, a presença de um grupo hidroxila no óleo de mamona contribui para a formação de um éster com alto poder lubrificante, sendo um excelente candidato a ser usado como aditivo para o óleo diesel (Goodrum & Geller, 2004).

1.6.7. Nabo Forrageiro (*Raphanus sativus*)

Raphanus sativus é uma planta pertencente à família *Cruciferae*, sendo anual, herbácea, ereta e alógama. Suas principais utilizações são como material para adubação verde de inverno

e planta para adubação verde. Também pode ser usada como planta de cobertura, em sistemas de cultivo conservacionistas como o plantio direto e o cultivo mínimo (Crusciol *et al.*, 2005).

Possui uma produtividade mínima de 500 Kg de semente por hectare e apresenta teor de óleo de 40 a 54%. Sua produção ocorre por simples extração mecânica. Apresenta ainda elevada capacidade de reciclagem de nutrientes principalmente nitrogênio, enxofre e fósforo, sendo uma excelente espécie para rotação de culturas. O cultivo ocorre em climas temperado, tropical e continental. Mostra-se como resistente a geadas tardias e a temperatura relativamente baixa durante o crescimento vegetativo favorece a floração e conseqüentemente o rendimento de grãos (Moura, 2009).

O nabo forrageiro apresenta altos teores de óleo nas suas sementes que são passíveis facilmente de extração. Também possuem potencial produtivo em épocas de pouca utilização ou pousio das terras agricultáveis. Através disso, poderá se tornar matéria-prima de substancial interesse aos produtores rurais para produção de óleo no Programa do Biodiesel (Silva *et al.*, 2011; Nery *et al.*, 2009).

A torta de nabo forrageiro mostrou-se bastante rica em potássio que é um dos elementos mais exigidos por ruminantes para o ganho de peso, e sua alta concentração na ração reduz o custo de suplementação. Também apresentou os maiores conteúdos de zinco quando comparados ao crambe e pinhão-manso (Souza *et al.*, 2009). Essa planta por não apresentar uma casca externa rica em fibras, como o nabo forrageiro e o crambe, justifica-se pela menor quantidade de fibras em seus grãos e na torta resultante (Crusciol *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2009).

1.6.8. Níger (*Guizotia abyssinica*)

Níger é uma oleaginosa cultivada no subcontinente indiano e países da África Oriental (Getinet & Sharma, 1996) pertencente à família *Asteraceae*. É uma espécie herbácea anual cujas sementes contêm 30% ou 40% de teor de óleo. Esse óleo é composto por 9,2% de ácido palmítico, 10,1% de ácido esteárico, 9,0% de ácido oléico e 71,7% de ácido linoleico, que o torna adequado para a produção comercial de biodiesel (Sarin *et al.*, 2009) e o resíduo remanescente após a extração do óleo é livre de quaisquer substâncias tóxicas, mas contém mais fibra bruta que outras oleaginosas (Pradhan *et al.*, 1995). O óleo pode ainda ser usado na culinária e fabricação de tintas e iluminação. As plantas de níger podem ser utilizadas na alimentação de ovinos, enquanto aos bovinos é fornecida como silagem (Getinet & Sharma,

1996). Podem ser usadas também na bordadura dos campos de cereais para evitar que animais danifiquem a produção (Sarin *et al.*, 2009).

De acordo com Carneiro *et al.* (2008), o níger deve ser considerado uma espécie promissora para a produção de fitomassa quando utilizada como cobertura do solo. As pesquisas com essa planta justificam-se pela potencialidade da espécie e pela escassez de informações referentes à qualidade fisiológica com que suas sementes são produzidas (Souza *et al.*, 2009), especialmente na região Centro-Oeste, onde as áreas anteriormente mantidas em pousio durante o inverno estão sendo destinadas à produção de plantas oleaginosas (Gordin *et al.*, 2012).

No estudo de Yerranguntla *et al.* (2012), a produção de biodiesel de *Guizotia abyssinica*, usando carbonato de manganês puro e cristalino, mostrou-se menos corrosivo, com menor custo, fácil de manusear e, acima de tudo, um catalisador verde ambientalmente correto, que permite obter 95% de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos.

1.6.9. Pinhão-manso (*Jatropha curcas*)

O Pinhão-manso é uma planta nativa que apresenta grande potencial para fornecimento de óleo, sendo adequado para o desenvolvimento na região nordeste do país porque é resistente à seca e exigente à insolação (Arruda, 2004). Essa planta pertence ao gênero *Jatropha*, ao grupo *Joannesieae* e família *Euphorbiaceae*. O nome do gênero *Jatropha* deriva da palavra grega *jatrós* (médico) e *trophé* (alimento), derivando o seu uso medicinal. Esse gênero exibe aproximadamente 170 espécies conhecidas (Kumar & Sharma, 2008). Diante do regime irregular de chuvas do sertão nordestino o pinhão-manso tem uma vantagem única dentre outras plantas oleaginosas: é a única com ciclo produtivo que se estende por mais de 40 anos (Arruda *et al.*, 2004).

O grande teor de lipídeos encontrado na semente do pinhão-manso faz com que esse se torne uma fonte promissora de óleo vegetal para a produção de biodiesel (Andrade *et al.*, 2008). A planta possui utilidade limitada como alimento por causa da presença da substância curcina no óleo. Apesar de ser utilizada na medicina doméstica, a ingestão em excesso de suas sementes causa intoxicação podendo ser letal devido à presença do ácido jatrópico de toxicidade igual ou superior ao ácido ricinoléico (Arruda *et al.*, 2004). Além do uso como matéria prima para a produção de biodiesel, podem-se destacar alguns outros usos da planta como cerca viva, adubo verde e fertilizante, sabão, pesticida, carvão vegetal e uso medicinal (Kumar & Sharma, 2008).

Melo *et al.* (2006) verificaram que as amêndoas das sementes de pinhão-mansinho apresentaram um teor médio de óleo de 42 %, em base seca na extração por hexano. A torta resultante desse processo, que contém ainda aproximadamente 8 % de óleo, é re-extraída com solventes orgânicos, geralmente o hexano, sendo o farelo residual ensacado para aproveitamento como fertilizante natural, em virtude dos teores elevados de nitrogênio, fósforo e potássio (Arruda *et al.*, 2004). Souza *et al.* (2009) concluíram que as tortas de pinhão-mansinho, nabo-forrageiro e crambe apresentaram potencial para utilização na alimentação animal ou humana, com altos teores de proteína bruta, carboidratos e fibras alimentares, embora a torta de pinhão-mansinho apresente as fibras como componente principal.

1.6.10. Soja (*Glycine max*)

A soja é uma planta que pertence à família das leguminosas, compreendendo mais de 7000 espécies (Penz & Brugalli, 2001). Essa leguminosa consegue captar o nitrogênio atmosférico através da fixação simbiótica dos seus nódulos radiculares. Com isso, torna-se uma excelente cultura de rotação. O seu valor nutricional é devido ao alto teor de proteínas de fácil digestão, rica em aminoácidos essenciais e fonte de óleo de boa qualidade (Araújo *et al.*, 1986).

O óleo de soja é obtido dos grãos da plantas e suas principais vantagens são o alto conteúdo de ácidos graxos essenciais: linoléico (C-18:2) e linolênico (C-18:3). A indústria produz também gordura totalmente hidrogenada de soja, sendo misturada em pequenas proporções com óleo líquido para conferir funcionalidade adequada para uso em margarinas e gorduras comestíveis (White, 2008). As isoflavonas, substâncias encontradas em frutas, nozes, vegetais e em leguminosas, principalmente na soja, possuem várias propriedades biológicas benéficas à saúde humana. Como exemplos, exercem efeito sobre a hipercolesterolemia, arteriosclerose e osteoporose, além de atividade anti-carcinogênica, dentre outros (Fujita *et al.*, 2002). Entre as biomassas vegetais, cana de açúcar (*Saccharum spp.*) e a soja (*Glycine max*) representam as principais matérias-primas para a produção de bioetanol e biodiesel, respectivamente (Kohlhepp, 2010).

1.6.11. Tremoço (*Lupinus albus*)

O tremoço é uma espécie anual, ereta, de crescimento determinado, adaptada a clima subtropical, apresentando múltiplo propósito. A planta tem grande potencial para cobertura de solo, consumo humano e animal dos grãos produzidos. Adapta-se a solos de baixa fertilidade e é

boa fixadora de nitrogênio. As espécies de tremoço utilizadas na região Sul são: tremoço branco (*Lupinus albus*), tremoço amarelo (*L. angustifolius*) e tremoço azul (*L. luteus*), sendo que o tremoço branco possui baixa toxicidade das sementes e massa seca, facilidade de manejo, possibilidade de consumo humano e animal, menor tamanho da semente, além de exigir menor gasto com a semente e boa adaptação às condições de clima frio. O tremoço amarelo e azul apresentam bom comportamento, quanto à produção de biomassa e boa fixação de nitrogênio, mesmo em condições de níveis baixos de fertilidade (Bevilaqua *et al.*, 2008).

Essa planta constitui uma das mais ricas fontes de proteínas entre as sementes de leguminosas, em que teores variáveis entre 28 e 51% de proteína tem sido reportados nas diferentes variedades (Chango *et al.*, 1995).

1.7. Pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos

As técnicas de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos tem o objetivo de facilitar a ação das enzimas pela remoção da lignina e pela redução da cristalinidade da estrutura celulósica (Castro, 2010). Tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos são os quatro tipos fundamentais de técnicas de pré-tratamento empregadas. Em geral, uma combinação desses processos é utilizada na etapa de pré-tratamento (Sarkar *et al.*, 2012).

Dependendo do pré-tratamento específico, diferentes efeitos podem ser observados no substrato o que pode contribuir para a melhoria da hidrólise. Alguns desses efeitos são: remoção de parte ou de toda a lignina que causa o aumento da porosidade no substrato, assim como o rompimento da estrutura da lignina e das suas ligações com o resto da biomassa. A remoção de hemicelulose também é um fator importante, pois impede o acesso de celulasas à celulose. O rompimento da estrutura da hemicelulose, a redução da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose, além da redução no tamanho das partículas são fatores importantes para a eficiência da hidrólise (Chundawat *et al.*, 2008; Van Dyk & Pletschke, 2012).

O pré-tratamento é realizado para produzir uma mudança no tamanho e estrutura macroscópica e microscópica da biomassa, bem como a estrutura e composição química submicroscópica. Isso torna a biomassa lignocelulósica susceptível a hidrólise rápida com o aumento do rendimento de açúcares monoméricos (Mosier *et al.*, 2005). Um pré-tratamento é eficaz para ser selecionado por diminuir a cristalinidade da celulose e por remover a lignina com a extensão máxima, de modo que o tempo de hidrólise, bem como carga de celulase seja minimizado (Eggman & Elander, 2005).

Devido aos avanços biotecnológicos feitos durante as últimas três décadas, e por causa da procura crescente em substituir e otimizar alguns processos tradicionais envolvendo micro-organismos ou as suas enzimas, enzimas tais como celulases, hemicelulases e pectinases tem sido continuamente investigados. Essas enzimas exibem potenciais aplicações em alimentos, vinho, animal, alimentação, têxteis, papel, combustível, e outras indústrias (Bhat 2000; Hoondal *et al.*, 2002; Lara-Marquez *et al.*, 2011). O pré-tratamento biológico parece ser uma técnica promissora e tem vantagens muito evidentes, incluindo nenhuma exigência química, a entrada de baixo consumo de energia, as condições ambientais amenas e forma de trabalho ambientalmente amigável (Salvachúa *et al.*, 2011).

A degradação do complexo lignocelulósico para libertar celulose pode ser realizada com a ajuda de micro-organismos, como os fungos. O pré-tratamento biológico processa a degradação da lignina e da hemicelulose e os fungos da podridão branca parecem ser mais eficazes dos micro-organismos. Ressalta-se que os fungos de podridão parda atacam celulose enquanto os de podridão branca e macia atacam tanto celulose quanto a lignina (Talebnia *et al.*, 2010).

1.8 Fontes de Nitrogênio

Moléculas orgânicas que nutrem qualquer organismo contêm grandes quantidades de carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo considerados como macroelementos essenciais. Esses elementos são requeridos para sustentar o crescimento normal e desenvolvimento fúngico porque eles fazem parte de componentes celulares e enzimas envolvidas na sua sobrevivência. A obtenção de hidrogênio e oxigênio provém da água ou quando compostos orgânicos são metabolizados. Já o carbono provém principalmente de substratos orgânicos utilizados por fungos. Outros elementos são também requeridos pelos fungos como macronutrientes, entre eles o nitrogênio, enxofre, potássio, magnésio, cálcio e fósforo (Griffin, 1994).

O nitrogênio é um macro elemento naturalmente encontrado na forma de amônio ou nitrato. Participante da síntese de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, o nitrogênio é de vital importância para o desenvolvimento do fungo. As fontes de nitrogênio podem ser inorgânicas na forma de sais de nitritos, nitratos ou amônio, ou orgânicas na forma de uréia, aminoácidos, extrato de peptona (animal ou vegetal) ou extrato de levedura. A escolha de um destes compostos depende do tipo de micro-organismo utilizado (Putzke & Putzke, 2002).

As proteínas correspondem cerca de 60 a 70% do nitrogênio total da célula fúngica. O nitrogênio que não existe como proteína pode ocorrer como ácido nucléico, quitina, fosfolípido, vitaminas e metabólicos não essenciais. Os fungos utilizam nitrogênio inorgânico na forma de nitrato, nitrito e amônia ou nitrogênio orgânico na forma de aminoácido, peptídeos e peptonas. Numerosos fungos, por não conseguir reduzir o íon nitrato, utilizam o nitrogênio orgânico que possui o mesmo estado de oxidação. Em um meio de cultura, o nitrogênio orgânico pode ser proposto como aminoácidos, peptídeos ou peptonas (Landecker, 1996).

Nem todos os fungos usam as fontes de nitrogênio com a mesma facilidade. Alguns requerem uma forma específica de assimilação. Numerosos fungos utilizam nitrato como forma de nitrogênio, mas a incapacidade de assimilá-lo é comum entre os basidiomicetos. O nitrato, para ser usado por alguns fungos, precisa ser reduzido em amônia antes de ser incorporado em compostos orgânicos. O nitrito pode servir como fonte de nitrogênio em alguns fungos que, inclusive, são capazes de usar nitratos. No entanto, o nitrito pode exercer efeitos tóxicos pela desaminação de aminoácidos ou por interferir no metabolismo do enxofre. Nitritos não são usados rotineiramente em laboratórios na preparação de meios de cultura. Numerosos fungos, por não conseguir reduzir o íon nitrato, utilizam o nitrogênio na forma de íon amônio ou na forma de nitrogênio orgânico que possui o mesmo estado de oxidação. Em um meio de cultura, o nitrogênio orgânico pode ser proposto como aminoácidos, peptídeos ou peptonas (Landecker, 1996).

De acordo com Boyle (1998), a maioria dos suplementos que contém nitrogênio aumenta o crescimento micelial enquanto outros elementos como vitaminas ou carboidratos tem um efeito menor. Complexos de nitrogênio como a caseína hidrolisada aumentam o crescimento micelial e inibem a degradação de lignina mais do que uma fonte simples como o glutamato. Dentre a ampla variedade de compostos nitrogenados que podem ser utilizados como fontes nutricionais, destacam-se o íon amônio, os hidrolisados de caseína, o extrato de leveduras, as peptonas e os aminoácidos (Pires *et al.*, 2010). Em relação ao uso dos aminoácidos pelos fungos, ocorre uma grande variação na resposta ao uso desses compostos, que difere entre as espécies. Observa-se, por exemplo, que quando a asparagina é adicionada ao meio de cultura, frequentemente o fungo apresenta bom crescimento. Isso também pode ser notado com o uso de glicina, ácido glutâmico e aspártico. Ao contrário, ao se usar leucina, o crescimento é fraco. O crescimento é melhor quando se usa diversos aminoácidos juntos do que separados (Chang *et al.*, 2001).

Lemos *et al.* (2001) relataram que a capacidade de uma célula para utilizar um composto particular depende, em primeiro lugar, da capacidade genética do organismo para sintetizar a enzima necessária, e em segundo lugar, da sua capacidade de resposta à indução.

A disponibilidade de fonte de nitrogênio pode influenciar a produção das enzimas extracelulares, podendo afetar significativamente o pH do meio de cultivo durante o decurso da fermentação e, por sua vez, influenciar substancialmente a atividade enzimática. A suplementação de fontes de nitrogênio não é sempre essencial no sistema de fermentação submersa, pois depende da disponibilidade de nitrogênio no substrato e requisitos nutricionais dos organismos (Pandya & Gupte, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Devido ao rápido crescimento da população e da industrialização, a demanda mundial por etanol aumenta continuamente. Culturas tradicionais, como milho e cana, são incapazes de atender à demanda global de produção de bioetanol, devido ao seu valor primário na alimentação humana e animal. Assim, as substâncias lignocelulósicas, como resíduos agrícolas, são matérias-primas atraentes para produção de bioetanol. Os resíduos agrícolas são de baixo custo, renováveis e abundantes. O bioetanol a partir de resíduos agrícolas é uma tecnologia promissora embora o processo tenha vários desafios e limitações, como o transporte de biomassa e manuseio, e os métodos de pré-tratamento eficientes para deslignificação total da lignocelulose (Sarkar *et al.*, 2012).

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima orgânica mais abundante no mundo. A produção de etanol a partir de recursos renováveis lignocelulósicos melhora a disponibilidade de energia, diminui a poluição do ar e diminui o acúmulo de CO₂ atmosférico (Prasad *et al.*, 2007). A biomassa é uma matéria-prima considerada barata, sustentável e renovável, além de ser uma opção com potencial para substituir uma grande diversidade de produtos fósseis no setor da energia, calor, combustíveis, materiais e produtos químicos (Menon & Rao, 2012).

O aproveitamento dessa biomassa lignocelulósica derivada do biodiesel torna-se o grande desafio ambiental do momento. Desta forma, o presente estudo justifica-se baseado na utilização dos resíduos de algumas plantas da produção do biodiesel que podem transformar-se em energia potencial através da ação enzimática fúngica sobre a parede celular vegetal, contribuindo para a produção do etanol de segunda geração. Além disso, podem ser utilizados também no clareamento de sucos de frutas e vinhos, melhora das propriedades nutricionais da silagem agrícola, grãos de ração para aves e degomagem de fibras vegetais. Se por um lado, há a produção de biodiesel pelo óleo das plantas oleaginosas, pelo outro, o próprio resíduo gerado por esse processo também possui inúmeras aplicações biotecnológicas. Esse processo de aproveitamento amplo da planta torna-se uma alternativa ecologicamente correta. Desta maneira, os diferentes resíduos agroindustriais estudados neste trabalho correlacionam o desenvolvimento sustentável com a produção de biocombustíveis, tornando-se fontes potenciais de energia através de uma aplicação ampla das matérias-primas, produzindo energia através do óleo das sementes e também pelos resíduos lignocelulósicos. Isso determina o aumento do valor

agregado desses substratos lignocelulósicos, proporcionando um desenvolvimento substancial de diversos setores biotecnológicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Caracterizar as atividades enzimáticas com possíveis aplicações biotecnológicas (etanol de segunda geração) produzidas pelos fungos *Penicillium corylophilum* e *Penicillium simplicissimum*.

3.2. Específicos

- Avaliar as atividades enzimáticas (endoglicanase, exoglicanase, β -glicosidase, FPase (*Filter Paper Activity*), xilanase, pectinase e mananase) produzidas pelos fungos *Penicillium corylophilum* e *Penicillium simplicissimum* em diferentes resíduos lignocelulósicos (algodão, cártamo, crambe, girassol, linhaça, mamona, nabo forrageiro, niger, pinhão-manso, soja e tremoço) utilizados na produção do biodiesel.
- Avaliar a principal atividade enzimática produzida pelos fungos. Em função da atividade escolhida, purificar parcialmente através das cromatografias de gel filtração, troca iônica e fase reversa essas enzimas.
- Analisar as enzimas semi-purificadas por espectrometria de massas.
- Avaliar estabilidade dessas enzimas frente às variações de pH e temperatura.
- Estudar a influência da composição do meio de cultivo (diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio) na produção de cada uma das enzimas estudadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo dos fungos filamentosos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos

As condições de cultivo dos fungos e os ensaios enzimáticos basearam-se em protocolos de Siqueira, 2010a. O fungo *Penicillium simplicissimum* foi adquirido no laboratório de Microbiologia Aplicada do UNIFOR-MG em Formiga-MG e o fungo *P. corylophilum* no laboratório de Microbiologia da UNESP- Ribeirão Preto. Os fungos foram repicados em meio básico (g/l): glicose: 10; fosfato de potássio: 1; sulfato de magnésio 7.H₂O: 0,5; sulfato de amônio: 1,0; cloreto de cálcio: 0,5; agar: 15) e incubados em câmeras tipo B.O.D. a 27°C por 7 dias. A inoculação foi feita por suspensão de esporos (10⁸ esporos/ml – relação de 1 ml de solução de esporos:100 ml de meio de cultura), cultivados em triplicata em 100 ml de meio suplementar (g/l: 7,0 g de KH₂PO₄; 2,0 g de K₂HPO₄; 0,1 g de MgSO₄ 7.H₂O; 1,0 g (NH₄)₂SO₄; 0,6 g de extrato de levedura e 1% de substrato lignocelulósico (algodão, cártamo, crambe, girassol, linhaça, mamona, niger, nabo forrageiro, pinhão-manso, soja e tremoço) como fonte de carbono, em pH 7,0 e a 120 rpm em Shaker rotatório (Figura 6). Como controle, foi empregada a celulose microcristalina a 1%. A temperatura dos cultivos foi de 28°C. Os cultivos foram filtrados, após 12, 24, 72 e 120 horas, à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro comum o que permitiu separar a massa micelial e os substratos do sobrenadante. Os filtrados resultantes foram utilizados como fonte de enzimas.

Nesse presente trabalho, o pré-tratamento físico foi empregado nos substratos lignocelulósicos (algodão, cártamo, crambe, girassol, linhaça, nabo forrageiro, niger, mamona, pinhão-manso, soja e tremoço) para que houvesse a padronização do tamanho das partículas do material vegetal. Para isso, foi utilizado um tamis de 850 mm/μm (20 ABNT). Ressalta-se que a disponibilidade da área de superfície para a atividade enzimática fúngica depende do tamanho das partículas do substrato. Resultados descritos na literatura como o trabalho realizado por Pandya & Gupte (2012) mostraram que a produção de xilanase é afetada pelo tamanho de partícula.

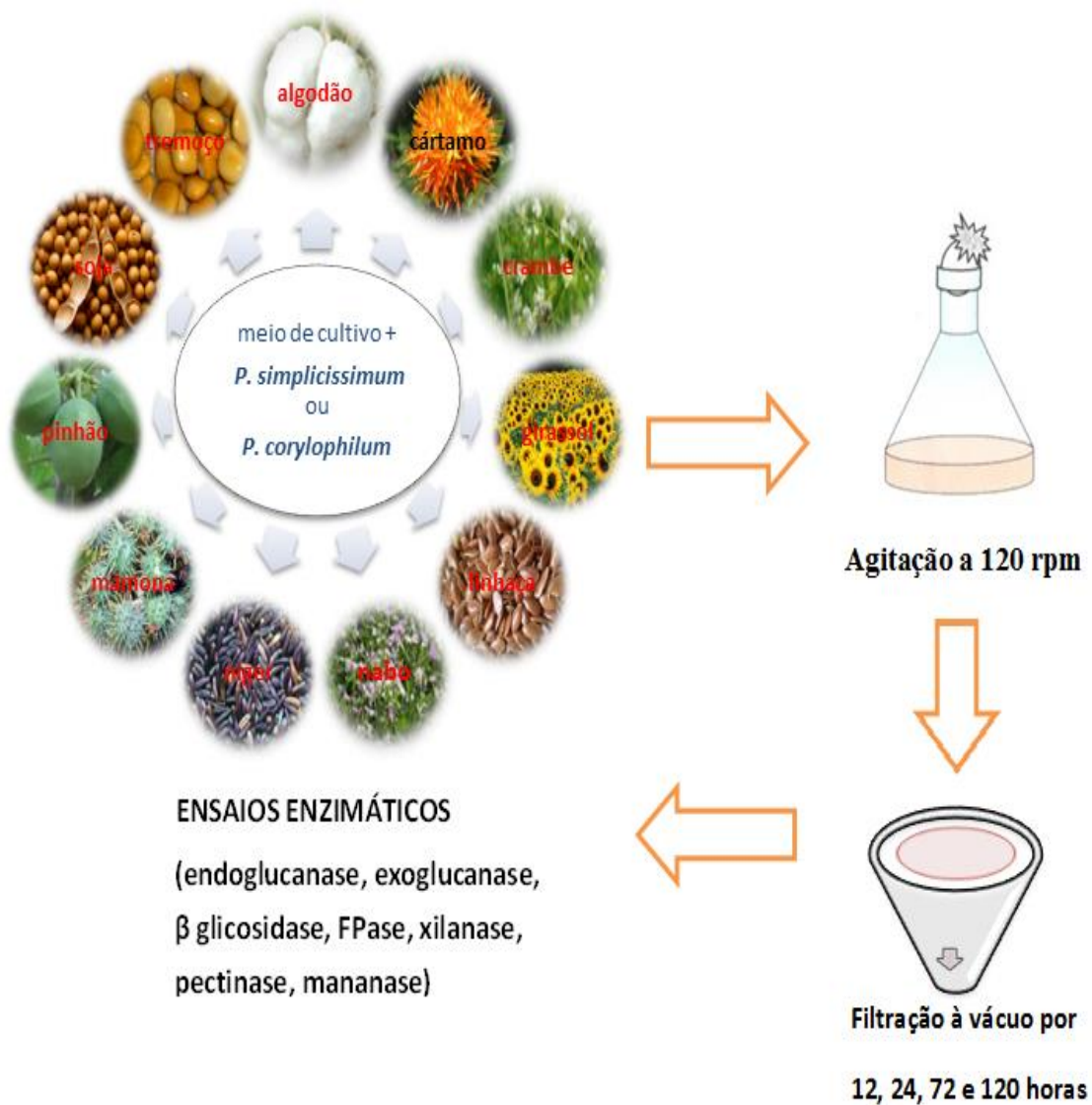


Figura 6: Fluxograma do ensaio do efeito da adição de substratos lignocelulósicos como fonte de carbono sobre a atividade enzimática

4.2. Determinação da atividade enzimática

A determinação da produção de açúcares redutores após a ação enzimática realizou-se de várias maneiras. O ensaio do ácido dinitrosalicílico (DNS) mensura a presença de açúcares redutores e é, por isso, mais apropriado para determinar a taxa de atividade da enzima, ou a redução no grau de polimerização do substrato (Van Dyk & Pletschke, 2012). A estequiometria da reação baseia-se na oxidação de um mol de aldeído do grupo funcional e a consequente redução simultânea de um mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). Como resultado,

quantidades iguais de glicose, celobiose e xilose produzem diferentes intensidades de cores e são calibradas individualmente.

Para a atividade de endoglicanase, utilizou-se um derivado de celulose substituída como substrato, a carboximetilcelulose (CMC), que é solúvel. CMC é o éter de celulose comercialmente mais importante, possuindo amplas aplicações científicas, especialmente devido às suas características polieletrólíticas. A enzima ataca o polímero randomicamente, produzindo uma mudança rápida no grau de polimerização. Após a reação, é determinada a formação de açúcares redutores, sendo esta atividade conhecida como CMCase.

Por outro lado, a medida da atividade enzimática (FPase) utilizando como substrato o papel de filtro Whatman N°1, sugerida pela IUPAC, é comumente utilizada como referência para a determinação da atividade celulósica global tanto em trabalhos acadêmicos quanto em preparações enzimáticas comerciais (Ghose, 1987).

Os ensaios enzimáticos para a determinação de endoglicanase (CMCase), xilanase, pectinase e mananase foram realizados pelo método de DNS, tendo 50 µL de enzima e 100 µL de substrato. O substrato específico para a xilanase foi a xilana *beechwood*, para a pectinase foi a pectina de *citrus peel* e para a mananase foi a galactomanana *locust bean gum*. Esse ensaio foi realizado com solução de 1% do substrato, reagindo por 30 minutos a 50°C. Após este tempo, foram adicionados 300 µL de DNS e os tubos com os ensaios foram fervidos por 10 minutos. Adicionou-se 1,5 ml de água para leitura do ensaio no espectrômetro (Quimis modelo 898U) a 540 nm.

Para o ensaio de FPase (celulase total), foram utilizadas tiras de 1x6cm de papel Whatman número 1 com aproximadamente 50 mg de massa como substrato e 150 µL de filtrado obtido dos diferentes substratos lignocelulósicos, incubadas por 1 hora e a 50°C.

Para a determinação de avicelase (exoglicanase), utilizaram-se 100 µl de solução 1% (m/v) de celulose microcristalina (avicel) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH=5 e 50 µL de solução de enzima por 2 horas, sob agitação (120 rpm) e a 50°C. Os ensaios de FPase e de avicelase foram interrompidos e analisados como descrito acima com relação a adição de DNS e ao aquecimento. Uma maneira de quantificar a atividade das exoglicanases é através da celulose microcristalina (Avicel) (Bon *et al.*, 2008).

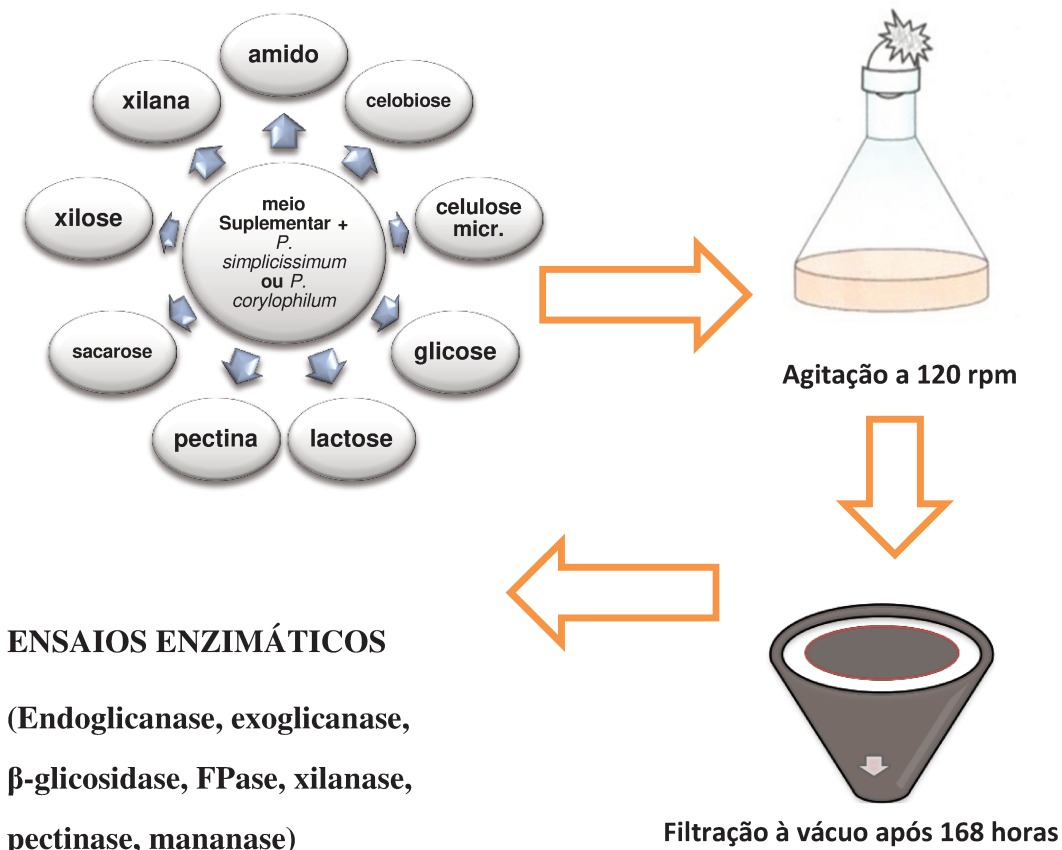
Para a determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos, foram construídas curvas de calibração com os monossacarídeos que formam as

cadeias principais dos respectivos polissacarídeos. Para isso, utilizou-se uma solução contendo 2 mg/ml de cada açúcar redutor (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico). A concentração do açúcar redutor foi alterada por adição de água destilada, em um volume final de 150 µL por reação. Obtendo-se 5 pontos no gráfico de regressão linear, permitindo determinação da equação da reta utilizada para quantificar o total de açúcar redutor após a adição de 300 µL de DNS, com aquecimento a 100°C por 10 minutos e leitura de absorbância a 540 nm. Para todos os ensaios enzimáticos, utilizou-se UI/ml como unidade de açúcar redutor liberada por tempo. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a atividade enzimática necessária para a liberação de 1 µmol de equivalentes de monômero (glicose, xilose, manose, ácido galacturônico) por unidade de volume e por minuto de reação, obtida nessas condições de análise (Martins, 2005). A determinação da atividade de β-glicosidase foi feita utilizando-se p-nitro-fenil-glicosídico (*pNPG*) como substrato (Iembo *et al.*, 2006). A mistura de incubação foi composta de 100 µL de enzima, 50 µL de *pNPG* e 850 µL de água destilada e incubada por 10 minutos, a 50°C. A reação foi interrompida com a adição de 1 ml de Na₂CO₃ (1 M), e as leituras da absorbância determinadas a 410 nm. Para a construção da curva de calibração de *pNPG* e determinação da equação da reta, utilizou-se uma solução estoque de *pNP* de 10 µmol/ml de água destilada em 900 µL de água destilada (V final 900 µL).

4.3. Efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase

Como fontes comerciais de carbono a 0,5 e 2,0% (m/v), foram adicionados individualmente ao meio suplementar o amido, a celobiose, a celulose microcristalina, a glicose, a lactose, a pectina, a sacarose e a xilana *beechwood*. Foi utilizado como controle apenas o meio suplementar sem a adição de fontes de carbono. A xilose foi testada em concentrações inferiores (0,01%, 0,02%, 0,04% e 0,08%) às encontradas na literatura a fim de se inferir sobre uma possível concentração indutora mínima (CIM).

As condições de cultivo e a determinação da atividade enzimática foram executadas conforme os itens 4.1 e 4.2. O tempo utilizado de 168 horas foi necessário para que se avaliasse apenas a indução ou não da atividade enzimática. Os protocolos experimentais estão ilustrados na Figura 7.



ENSAIOS ENZIMÁTICOS

(Endoglicanase, exoglicanase,
 β -glicosidase, FPase, xilanase,
pectinase, mananase)

Figura 7: Fluxograma do ensaio do efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase.

4.4. Avaliação da suplementação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de holocelulases

A avaliação da suplementação de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio na produção de holocelulases foi realizada de acordo com o protocolo experimental ilustrado na Figura 8. Foram testadas: peptona, extrato de levedura, nitrato de sódio, nitrato de sódio e peptona, nitrato de sódio e extrato de levedura, peptona e extrato de levedura, cloreto de amônio, sulfato de amônio, caseína, triptona, ureia, asparagina, cloreto de amônio e peptona, cloreto de amônio e extrato de levedura, sulfato de amônio e peptona, sulfato de amônio e extrato de levedura. Todas as fontes estavam na concentração de 1,0% (m/v) e foram

adicionadas individualmente ao meio suplementar. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada fonte.

Como fontes de carbono, foram utilizadas isoladamente em cada bloco experimental, linhaça ou pinhão-manso. Como controle, utilizou-se o meio suplementar acrescido apenas com uma das fontes de carbono. As condições de cultivo e a determinação da atividade enzimática foram realizadas de acordo com os itens 4.1 e 4.2.



Figura 8: Fluxograma da avaliação da suplementação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de holocelulases.

4.5. Purificação e caracterização parcial das xilanases presentes no extrato bruto de *Penicillium simplicissimum*

O processo de purificação dos componentes proteicos envolveu uma sequência de diferentes etapas cromatográficas (gel filtração, troca iônica, fase reversa), realizadas no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Dra. Fernanda Torres e do Dr. Daniel Santos e sob a supervisão da Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia.

4.5.1. Cromatografia de gel filtração

Cerca de 300 mg do extrato bruto selecionado com a melhor atividade enzimática (xilanase) foi liofilizado e dissolvido em 5ml de tampão acetato de sódio 0,05M, pH= 5,0, centrifugados a 10.000g por 10min a 4°C (centrífuga Mickro 200R Hettich rotor 2424). O sobrenadante límpido obtido foi aplicado a uma coluna de cromatografia de gel filtração, coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR GE Healthcare 120 ml (16 × 600 mm), em sistema de HPLC. A coluna foi previamente equilibrada, e eluída com o tampão acetato de sódio 0,05M, pH= 5,0, com fluxo constante de 0,3 ml/min. O perfil cromatográfico foi acompanhado por leituras de absorvância em 215 e 280 nm e as frações eluídas (1 ml) coletadas em coletor automático- modelo Frac-950, Amersham-Pharmacia (Upsala, Suécia). A presença de xilanases foi detectada por testes enzimáticos em todas as frações obtidas nesse primeiro passo cromatográfico.

4.5.2. Cromatografia de troca aniônica

As frações provenientes da cromatografia de gel filtração que apresentaram atividade de xilanase foram aplicadas em um segundo passo cromatográfico em coluna de troca aniônica. 10 ml (0,293 mg) da fração que apresentou atividade enzimática foi aplicada a uma coluna de troca aniônica, TSK gel DEAE- 2 SW Tosoh Bioscience 0,95 ml (2 × 250 mm), em sistema de HPLC. A coluna foi previamente equilibrada com o tampão A (fosfato de sódio 0,05M, pH=7,0), e as frações eluídas usando-se gradiente linear contínuo do tampão B (fosfato de sódio 0,05M, pH=7,0, NaCl 1M) de 0 a 100%, segundo o programa: 0% de B em 0,95 ml, 0 → 45% de B em 11,4 ml; 45 a 100% de B em 0,95 ml e 100% em 1,9 ml). O fluxo foi de 0,25 ml/min. O perfil cromatográfico foi acompanhado por leituras de absorvância em 215 e 280 nm

e as frações eluídas (0,150 ml) coletadas em coletor automático- modelo Frac-950, Amersham-Pharmacia (Upsala, Suécia). A presença de xilanases foi investigada como descrito anteriormente.

4.5.3. Cromatografias de fase reversa

As amostras que apresentaram atividade xilanásica foram liofilizadas e cerca de 544 mg (peso seco) foram ressuspensos em 8 ml de aplicados a coluna Discovery® BIO Wide Pore C18 (25 cm x 10 mm, 5µm; 19,4 ml). 0,1% de TFA em água Milli-Q® a 23°C. As proteínas foram eluídas da coluna usando-se gradiente linear contínuo do eluente B (0,1% TFA em ACN de 0 a 100%, segundo o programa: 0% de B de 10 min., 0 → 60% de B de 10 a 50 min.; 60 → 100% de B de 50 a 53 min.; 100% de B de 53 a 61 min. e 0% de B até 65 min.) O fluxo foi de 4ml/min; as proteínas foram detectadas pela absorvância a 214 e 280 nm e o material eluído foi coletado em coletor automático- modelo ÄKTA Frac-950 (GE Healthcare). O monitoramento do eluato também foi realizado por espectrometria de massas (MALDI-TOF).

4.5.4. Quantificação de proteínas

Para quantificar as frações provenientes de todos os passos cromatográficos essas foram submetidas à dosagem pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) em microplaca. Utilizou-se o reagente Comassie-blue G-250 (0,01% de Comassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol) e uma curva padrão de BSA foi determinada a partir de uma solução de 1 mg/ml.

4.5.5. Espectrometria de massas - MALDI-TOF-TOF MS

Para determinar os valores das massas moleculares das espécimes proteicas após a cromatografia de fase reversa foram realizadas análises por espectrometria de massas em MALDI TOF/TOF MS. Utilizou-se aparelho Ultraflex II (Bruker Daltonics, Alemanha), com o programa FlexControl 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras (1 µl) foram aplicadas na placa MTP AnchorChip 600/384 acrescida da solução matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) (1:1 v/v em acetonitrila 50%, TFA 0.3%), deixando essa mistura cristalizar. Foi realizada a calibração para a análise em três faixas de peso molecular: de 700 a 5000 Da, foi utilizado o *peptide calibration standard II*. Para a faixa de 5000 a 20000 Da, foi utilizado o *protein calibration standard I*. E para a faixa de 20000 a 80000 Da foi utilizado o *protein calibration standard II*. Todos os padrões empregados foram da Bruker Daltonics. Os espectros

de MS foram obtidos em modo positivo/linear, com a frequência do laser ajustada em 50Hz. Os dados foram analisados através do programa Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Alemanha).

Com relação às voltagens, foram utilizadas:

- 700 a 5000 Da: *Ion Source 1*: 19.05 kv e *Ion Source 2*: 16.59 kv; *Lens*: 8.92 kv; *Reflector 1*: 21.04 kv e *Reflector 2*: 9.71 kv.
- 5000 a 20000 Da: *Ion Source 1*: 19.31 kv e *Ion Source 2*: 18.34 kv; *Lens*: 8.30 kv;
- 20000 a 80000 Da: *Ion Source 1*: 19.31 kv e *Ion Source 2*: 17.35 kv; *Lens*: 6.98 kv.

4.5.6. Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em dias independentes e em triplicatas. Os resultados foram obtidos por análise de variância, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados das atividades enzimáticas dos fungos, quando inoculados em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, foram analisados por dupla variância seguida de teste de Bonferroni. Consideraram-se como diferenças estatísticas entre os grupos valores de $p < 0,05$. O efeito da adição de substratos comerciais sobre a atividade de xilanase em ambos os fungos estudados foram analisados por ANOVA One Way seguido de Teste de Dunnett's, sendo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análises físico-químicas dos substratos lignocelulósicos

As análises físico-químicas dos resíduos agroindustriais utilizados como fontes de carbono nesse trabalho foram realizadas pelo departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras-MG. Os resultados estão apresentados no Quadro 1.

Fontes de carbono	% FDA	% FDN	% Hemi celulose	% Celulose	% Lignina	Açúcares Totais (g/100g)	Pectina Total (mg/100g)	Pectina Solúvel (mg/100g)	% Solubilidade
<i>Algodão</i>	36,5	43,5	6,5	30,4	6,1	4,3	138	61,9	45,1
<i>Cártamo</i>	29	37,9	8,9	20,1	8,6	3,6	125,9	36,8	29,9
<i>Crambe</i>	21,0	29,4	8,4	10,2	10,8	9,0	130,6	35,8	27,3
<i>Girassol</i>	25,8	36,6	10,8	16,7	9,1	7,3	116,1	43,0	37,5
<i>Linhaça</i>	31,3	77,6	46,3	16,5	14,8	7,8	270,6	139,4	51,7
<i>Mamona</i>	47,4	50,5	3,1	41,9	5,5	3,5	225,2	28,9	12,8
<i>Nabo Forrageiro</i>	9,7	21,9	10,7	5,3	4,4	21,7	1243,5	1144,8	92,04
<i>Niger</i>	20,7	27,4	6,70	14,0	6,7	7,3	92,2	36,6	38,7
<i>Pinhão Manso</i>	14,3	36,4	22,0	6,1	8,5	2,6	104,8	25,2	24,5
<i>Soja</i>	6,07	9,14	2,53	6,6	0,075	12,0	154,4	56,7	37,4
<i>Tremoço</i>	13,2	24	10,8	8,8	4,4	13,5	190,8	57,3	30,3

Quadro 1: Análises físico-químicas dos substratos lignocelulósicos utilizados como fontes de carbono nos cultivos submersos (Fibra em detergente neutro – FDN; Fibra em detergente ácido – FDA).

Dos substratos lignocelulósicos mostrados, a holocelulose, somatório de celulose com hemicelulose, apresentou os maiores teores em torno de 63% para a linhaça, 45% para a mamona e 37% para o algodão. Os maiores índices de celulose foram mostrados pelos resíduos da mamona (41,9%), do algodão (30,4%) e do cártamo (20,1%). O maior percentual de lignina foi apresentado no resíduo da linhaça (14,8) e no crambe (10,8) ao passo que no resíduo dos grãos da soja, houve o menor com apenas 0,075.

Na avaliação dos resultados obtidos para os índices de pectina solúvel, os maiores índices foram obtidos a partir do resíduo do nabo forrageiro e da linhaça, com valores de 1144,8 e 139,4 mg/100 g, respectivamente, representando 92% e 51,7 de solubilidade. Para os índices de açúcares totais, os resíduos do nabo forrageiro e do tremoço apresentaram os maiores valores, sendo 21,7 e 13,5%, respectivamente.

5.2 Avaliação da produção de enzimas pelos fungos filamentosos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* após a adição de substratos lignocelulósicos em meios de cultivo

5.2.1. Atividades de endoglicanases

As atividades de endoglicanases dos fungos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* estão mostradas nas Figuras 9 e 10 respectivamente. Essa atividade foi determinada utilizando-se 11 diferentes resíduos lignocelulósicos (algodão, cártamo, crambe, girassol, linhaça, mamona, nabo forrageiro, niger, pinhão-manso, soja, tremoço) e a celulose microcristalina como controle. A atividade foi determinada por 120 horas.

A atividade do fungo *Penicillium corylophilum* (Figura 9) nos resíduos do pinhão-manso (0,203 UI/ml) e do niger (0,184 UI/ml) foram as mais significativas dos substratos analisados em 120 horas de cultivo. Entretanto, durante 72 horas, os substratos do girassol e do nabo forrageiro obtiveram uma atividade de 0,185 UI/ml e 0,184 UI/ml, respectivamente, mas essas atividades tornaram-se menores até as 120 horas. O substrato da mamona apresentou a menor atividade (0,047 UI/ml) durante o período testado e nessas condições experimentais.

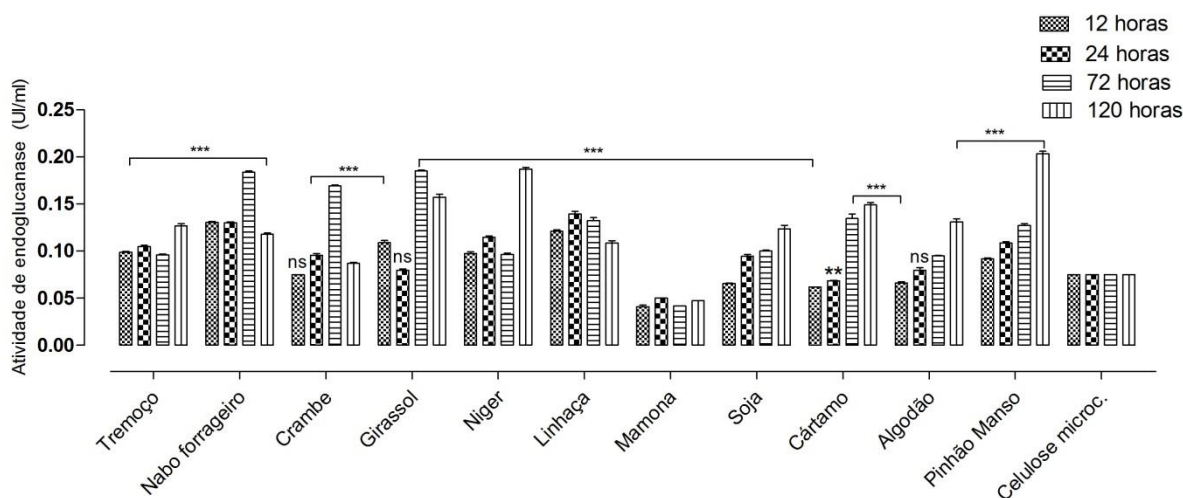


Figura 9: Atividade de endoglicanase do fungo *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

Aos analisar os resultados obtidos para as atividades do fungo *P. simplicissimum* (Figura 10) as que tiveram valores maiores em relação ao controle foram a linhaça (0,178 UI/ml) e o pinhão-manso (0,136 UI/ml) quando cultivados por 120 horas. Observa-se ainda que o nabo

forrageiro apresentou um crescimento estável durante o tempo experimental e que o resíduo de algodão a partir da segunda metade das 72 horas apresentou um crescimento exponencial, mas não atingido os maiores valores obtidos por pinhão-manso e linhaça.

A análise dos dados evidencia que em ambos os fungos, o substrato do pinhão-manso conseguiu resultados significantes em relação aos demais analisados.

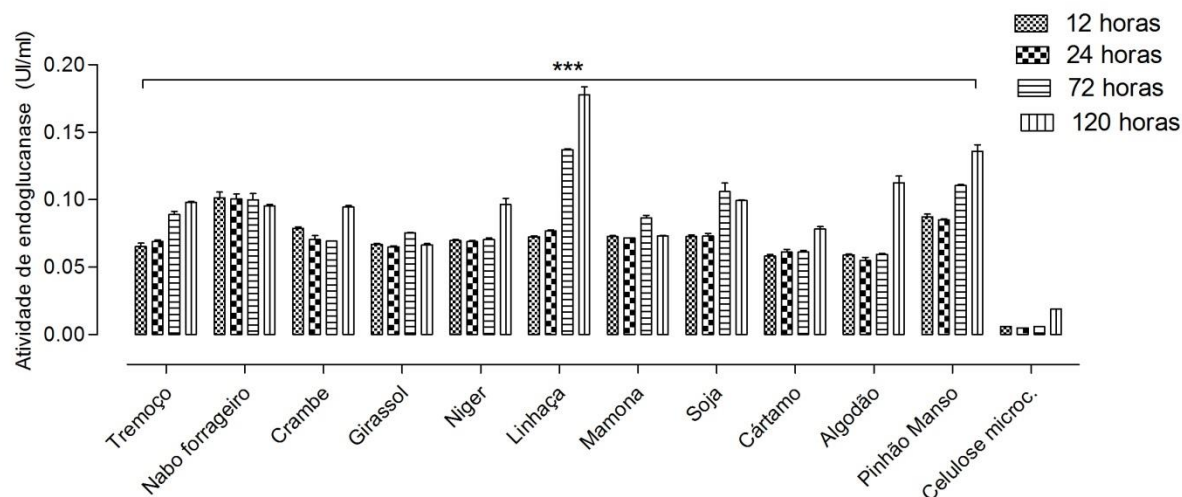


Figura 10: Atividade de endoglucanases do fungo *P. simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.2.2. Atividades de exoglicanases

As atividades de exoglicanases dos fungos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* estão apresentados nas Figuras 11 e 12 respectivamente. Ao contrário das endoglucanases, as atividades de exoglicanases dos fungos não se destacaram em nenhum substrato lignocelulósico avaliado durante todo o período de cultivo.

Nos substratos do tremoço e da linhaça do cultivo com *Penicillium corylophilum* (Figura 11), em 120 horas, as atividades (0,034 e 0,031 UI/ml respectivamente) sobressaíram-se um pouco mais em relação às outras. Em 24 horas de experimento, os resíduos de soja, cártamo e celulose microcristalina apresentaram resultados de atividade enzimática maiores do que 0,030 UI/ml. Ressalta-se também que o substrato do tremoço, entre 24 e 72 horas, obteve um aumento evidente na atividade enzimática e esse foi mantido até 120 horas.

Os melhores resultados do *P. simplicissimum* (Figura 12) ocorreram com os substratos

do cártamo (0,047 UI/ml), do crambe (0,046 UI/ml) e do algodão (0,043 UI/ml) após 120 de análise. Nesse cultivo com 24 horas de incubação, os substratos da soja, do crambe e do tremoço apresentaram atividades acima de 0,040 UI/ml.

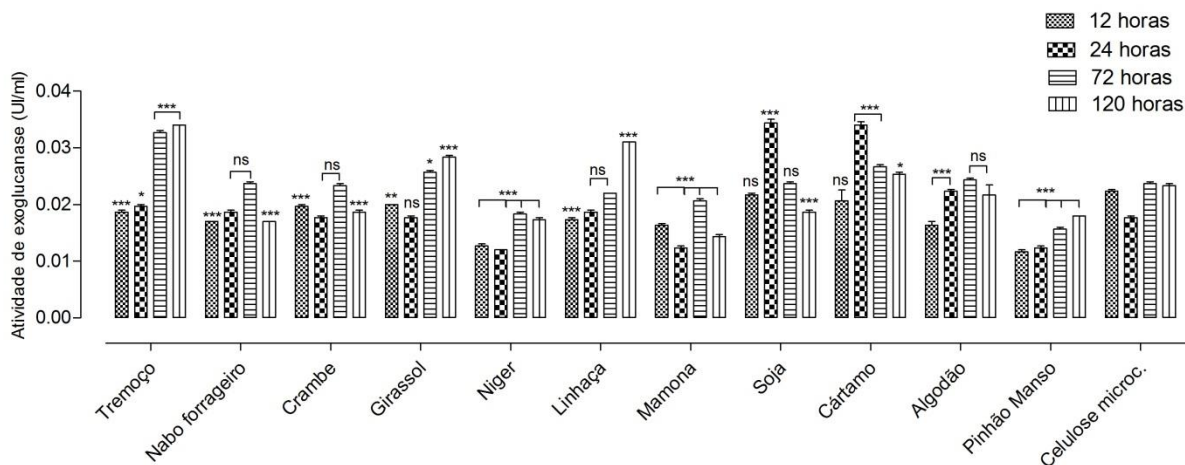


Figura 11: Atividade de exoglucanases do fungo *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

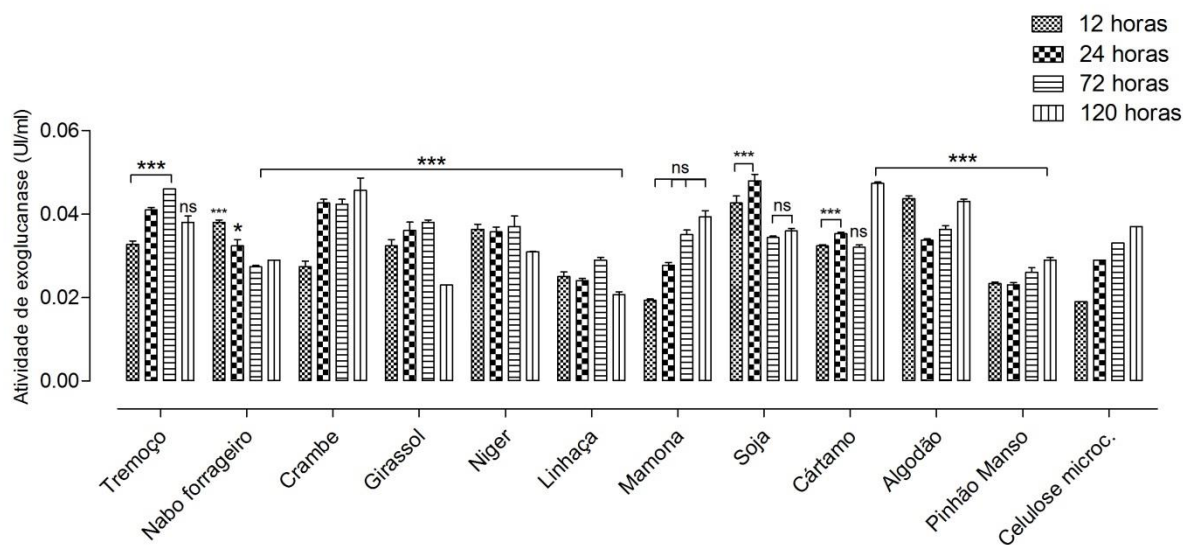


Figura 12: Atividade de exoglucanases do fungo *Penicillium simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.2.3. Atividades de FPase

As atividades de FPase dos fungos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* estão expostas nas Figuras 13 e 14 respectivamente. As maiores atividades enzimáticas do fungo

Penicillium corylophilum (Figura 13) foram observadas nos resíduos do niger (0,098 UI/ml) e do pinhão-manso (0,093 UI/ml) em 120 horas de análise, sendo que esse aumento começou a ser evidenciado a partir de 72 horas de cultivo. As atividades do crambe (0,109 UI/ml) e do cártamo (0,076 UI/ml) mostraram um crescimento exponencial após 24 horas e apresentaram um ligeiro decréscimo da atividade no intervalo de 72 a 120 horas.

A maior atividade enzimática (0,113 UI/ml) do fungo *Penicillium simplicissimum* (Figura 14) foi observada no resíduo do crambe com 120 horas de inoculação onde apresentou um crescimento efetivo logo após as primeiras 12 horas. Atividades expressivas também foram encontradas nos resíduos da linhaça, mamona e nabo forrageiro.

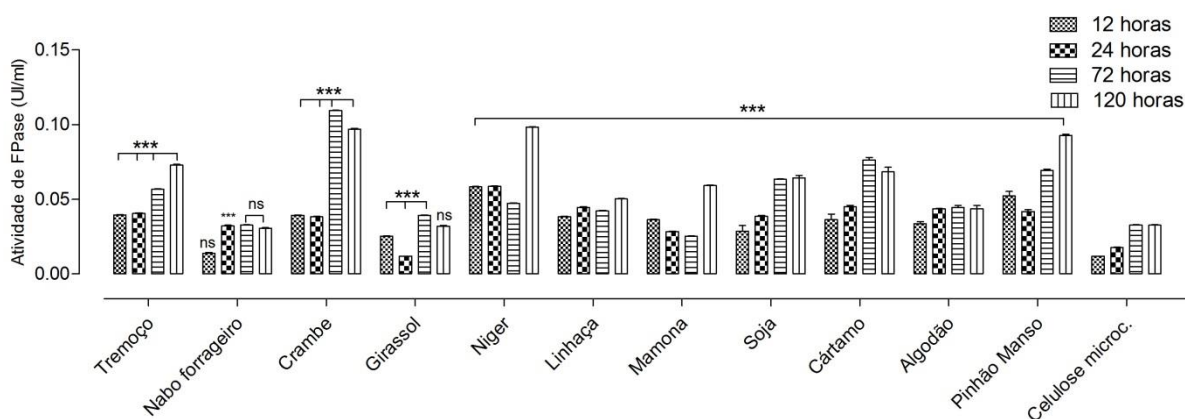


Figura 13: Atividade de FPase do fungo *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

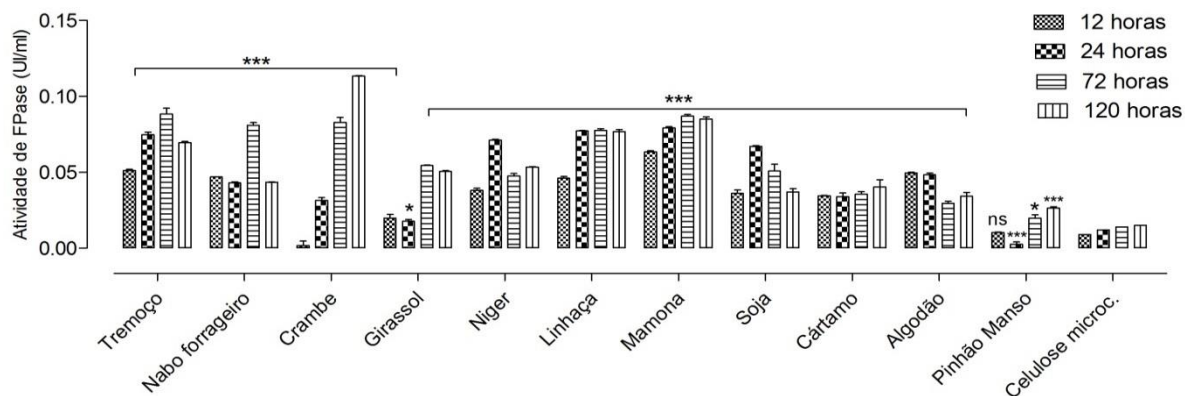


Figura 14: Atividade de FPase do fungo *Penicillium simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.2.4. Atividades de β -glicosidasas

Os ensaios enzimáticos da atividade de β -glicosidasas para os fungos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* que estão apresentadas nas Figuras 15 e 16, mostraram que em ambos os fungos o aumento da atividade enzimática deu-se apenas logo após 24 horas de cultivo. As atividades do fungo *P. corylophilum* (Figura 15) mostraram-se crescentes nos resíduos do pinhão-manso e soja já no intervalo entre 24 e 72 horas de cultivo. Com 120 horas, ocorreram seus maiores valores, sendo 1,0 UI/ml e 0,9 UI/ml, respectivamente.

Para o fungo *P. simplicissimum* (Figura 16), os substratos do algodão, cártamo e soja já demonstraram um aumento da atividade enzimática em relação aos demais substratos desde as primeiras horas de inoculação. Também as atividades mostraram-se crescentes nos resíduos do pinhão-manso e soja no intervalo entre 24 e 72 horas de cultivo. Observa-se que as melhores atividades ocorreram com 120 horas nos substratos do pinhão-manso, soja e cártamo, apresentando atividades de 0,776; 0,684 e 0,632 UI/ml. Os resíduos de algodão e linhaça, nesse experimento, apresentaram um crescimento da atividade após 24 horas, mas esses valores foram inferiores aos evidenciados acima.

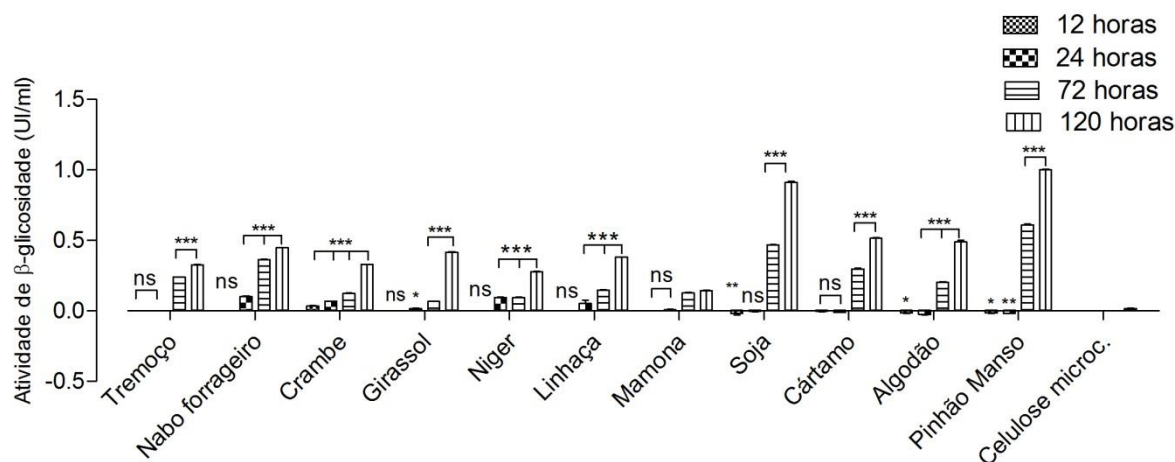


Figura 15: Atividade de β -glicosidase do fungo *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

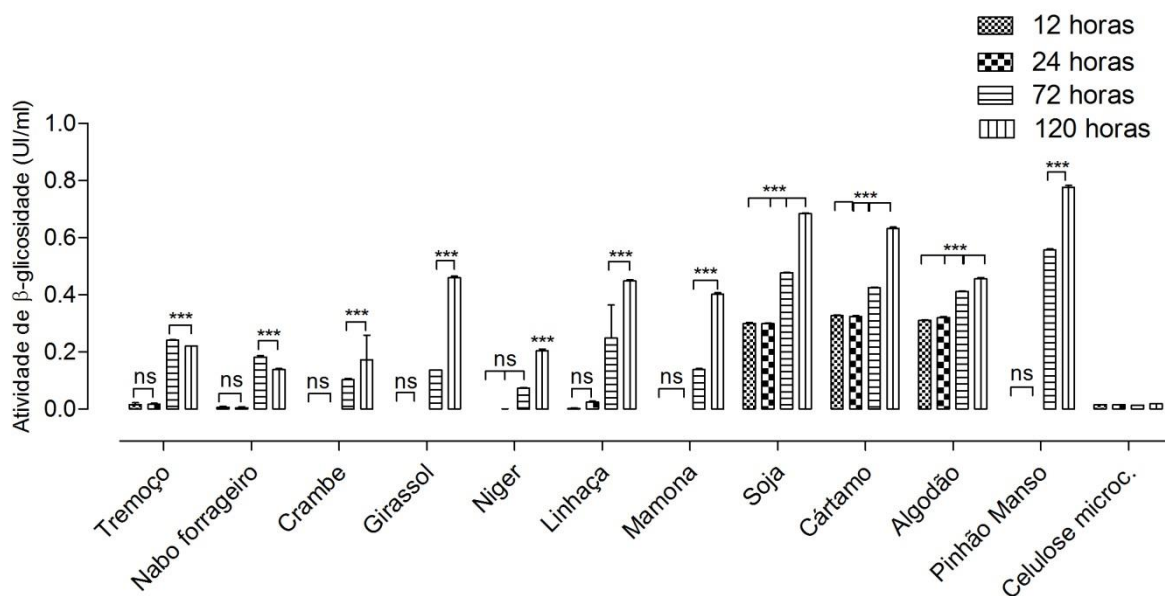


Figura 16: Atividade de β-glicosidase do fungo *Penicillium simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.2.5. Atividades de xilanases

As atividades de xilanase dos fungos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* estão apresentadas nas Figuras 17 e 18.

As atividades de *Penicillium corylophilum* (Figura 17) apresentaram crescimento evidente entre 24 e 72 horas de cultivo e continuaram aumentando no intervalo entre 72 e 120 horas, com exceção dos cultivos de nabo forrageiro, crambe e girassol, que nesse intervalo apresentaram um declínio. As principais atividades encontradas foram a 120 horas de cultivo nos substratos do algodão (0,959 UI/ml), tremoço (0,953 UI/ml) e linhaça (0,801 UI/ml). No cártamo, a melhor atividade enzimática (0,899 UI/ml) foi com 72 horas de inoculação.

A atividade de xilanase do *Penicillium simplicissimum* (Figura 18) mostrou-se crescente para todos os substratos no intervalo entre 24 e 72 horas. Além disso, apresentou-se muito superior na linhaça (3,97 UI/ml) quando comparado com os demais.

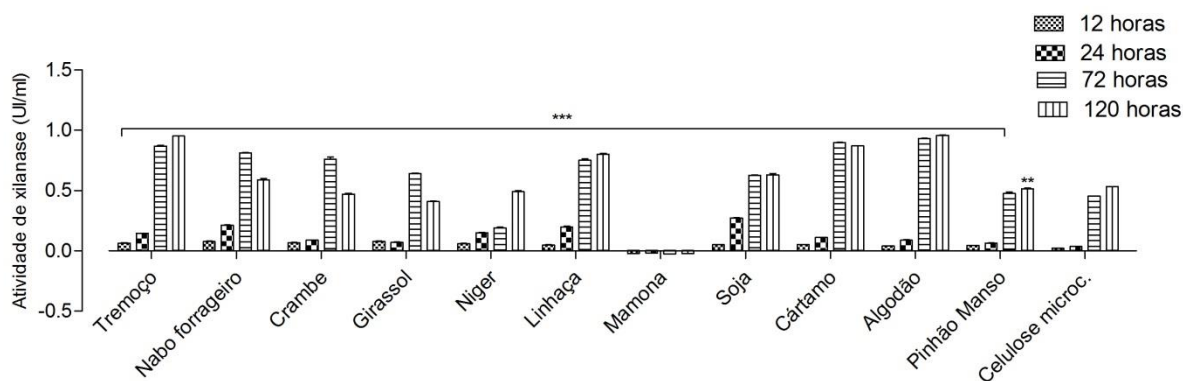


Figura 17: Atividade de xilanase do *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

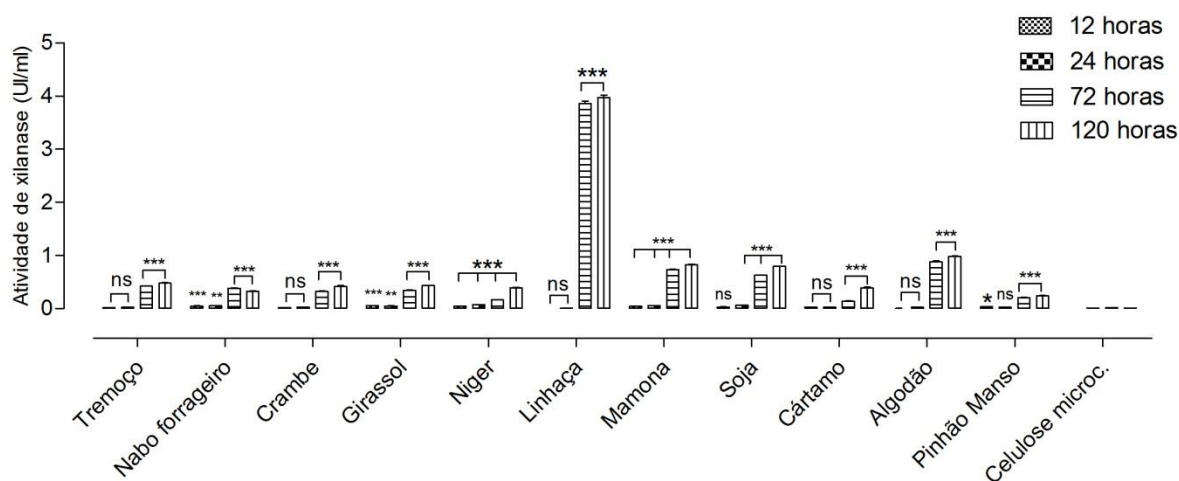


Figura 18: Atividade de xilanase do *Penicillium simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.2.6. Atividades de pectinases

As atividades de pectinase dos fungos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum*, estão apresentadas nas Figuras 19 e 20.

As atividades de *Penicillium corylophilum* (Figura 19) apresentaram-se crescentes no intervalo entre 24 e 72 horas para todos os substratos, sendo o crescimento mais evidente após 72 horas de inoculação na soja, no algodão e no niger. As atividades mais significativas foram nos substratos da soja (0,728 UI/ml), do algodão (0,659 UI/ml) e do cártamo (0,595 UI/ml) e niger

(0,526 UI/ml) em 120 horas de cultivo. Ressalta-se que a atividade do cártamo foi maior (0,595 UI/ml) a 72 horas.

As atividades para *P. simplicissimum* (Figura 20) também foram crescentes no intervalo entre 24 e 72 horas. A atividade da linhaça (0,574 UI/ml) foi a maior com 120 horas de cultivo, seguida pelo algodão (0,391 UI/ml).

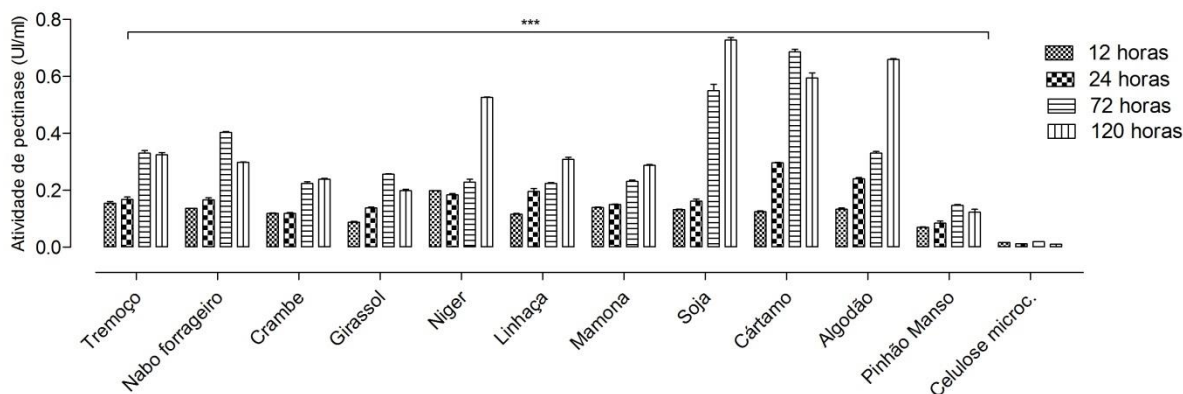


Figura 19: Atividade de pectinase do *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

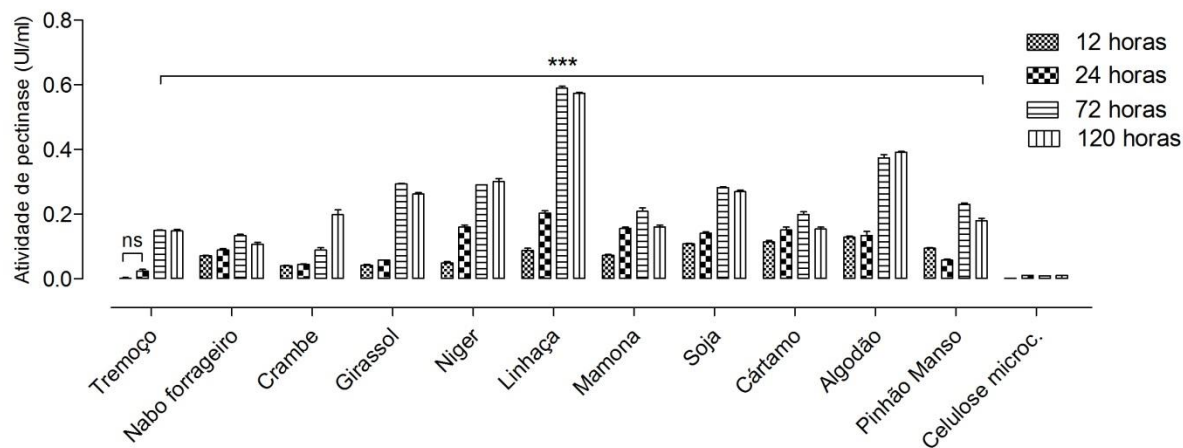


Figura 20: Atividade de pectinase do *Penicillium simplicissimum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.2.7. Atividades de mananases

As atividades de mananase dos fungos *Penicillium corylophilum* estão apresentadas na Figura 21.

As atividades de *Penicillium corylophilum* tiveram crescimento no intervalo entre 24 e 72 horas de cultivo, sendo que os resíduos de pinhão-manso e mamona tiveram uma atividade baixa durante todo o intervalo de tempo de incubação. Os resíduos do niger e soja apresentaram as melhores atividades de mananase (0,289 UI/ml) a 120 horas de inoculação, sendo que a soja já apresentou um aumento significativo após 24 horas de cultivo.

As atividades de mananase do *Penicillium simplicissimum* (dados não apresentados) foram perceptíveis apenas nos substratos da linhaça (0,011 UI/ml), soja (0,015 UI/ml), mamona (0,002 UI/ml) e pinhão-manso (0,006 UI/ml) a 120 horas de cultivo.

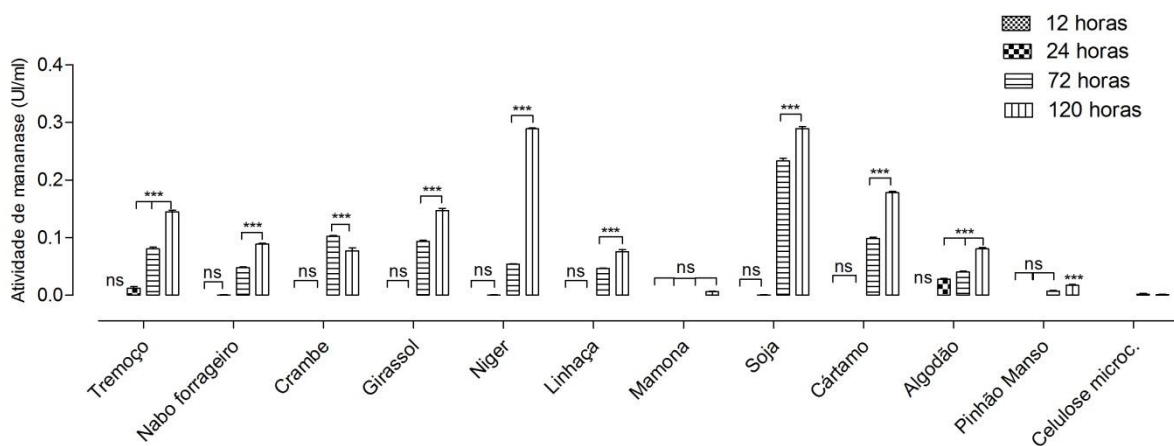


Figura 21: Atividade de mananase do *Penicillium corylophilum* em diferentes substratos lignocelulósicos. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.8. Avaliação da produção da xilanase pelos fungos filamentosos *Penicillium corylophilum* e *P. simplicissimum* após a adição de substratos comerciais como fonte de carbono

O efeito da adição de diferentes substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase foi investigada para o *P. simplicissimum*. Os resultados estão apresentados na Figura 22. O gráfico mostra que a atividade de xilanase quando se utilizou apenas o meio suplementar foi de 0,37 UI/ml. Analisando-se os diferentes substratos utilizados, os que proporcionaram uma maior atividade enzimática foram a xilana a 0,5 e 2,0 % (0,74 e 0,64 UI/ml) e a celulose microcristalina 2,0 % (0,62 UI/ml), seguido da celulose microcristalina a 0,5 % (0,4 UI/ml). Com relação à xilose, a concentração de 0,04% foi a que conseguiu aumentar a atividade de xilanase de uma forma mais expressiva (0,49 UI/ml) em 33%.

A adição de 0,5% de xilana ao meio de cultivo aumentou a produção enzimática em 100%. No entanto, uma maior concentração desse substrato a 2,0% parece ter provocado uma saturação de 15% em relação a melhor atividade. No caso da celulose microcristalina, o maior acréscimo da atividade xilanásica (68%) foi provocado pela maior concentração desse mesmo substrato a 2%. A adição de sacarose não alterou a produção enzimática de forma significativa. No entanto, os demais substratos como amido, celobiose, glicose, lactose e pectina proporcionaram valores inferiores àqueles quando se utilizou apenas o meio suplementar.

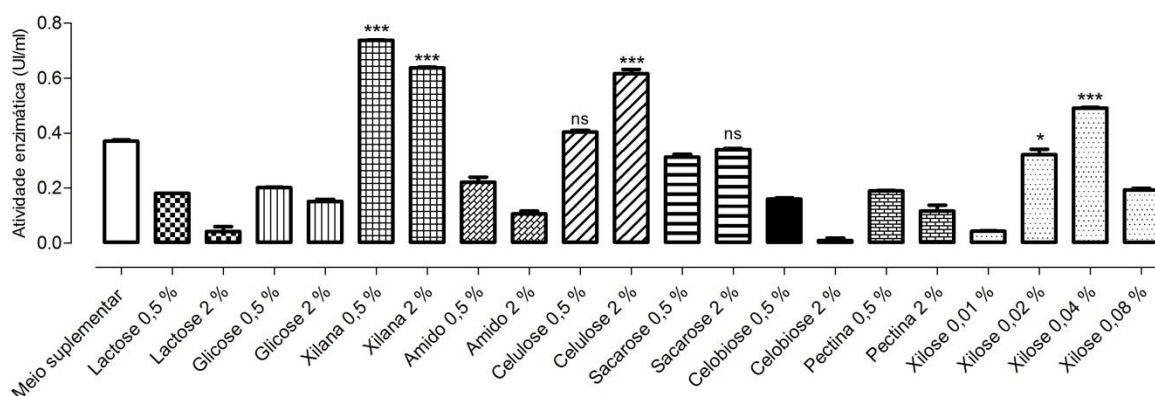


Figura 22: Efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase do fungo *P. simplicissimum*. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA One Way seguido de Teste de Dunnett's, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

O efeito da adição de diferentes substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase foi investigada também para o fungo *P. corylophilum* (Figura 23). Essa atividade, ao se considerar apenas os valores referentes ao meio suplementar, foi de 0,44 UI/ml. Os resultados enzimáticos mais expressivos foram apresentados pela xilana a 0,5% (0,73 UI/ml) e celulose microcristalina a 0,5% (0,55 UI/ml), valor esse não estatisticamente diferente do apresentado por esse mesmo resíduo à 2,0 %, de 0,5 UI/ml.

Nas concentrações testadas de amido, celobiose, glicose, lactose, pectina, sacarose e xilose, nenhuma foi capaz de provocar um aumento da atividade enzimática. Assim como no *P. simplicissimum*, esses outros substratos apresentaram uma inibição da atividade enzimática do fungo *P. corylophilum* durante todo o período do cultivo e nas concentrações analisadas.

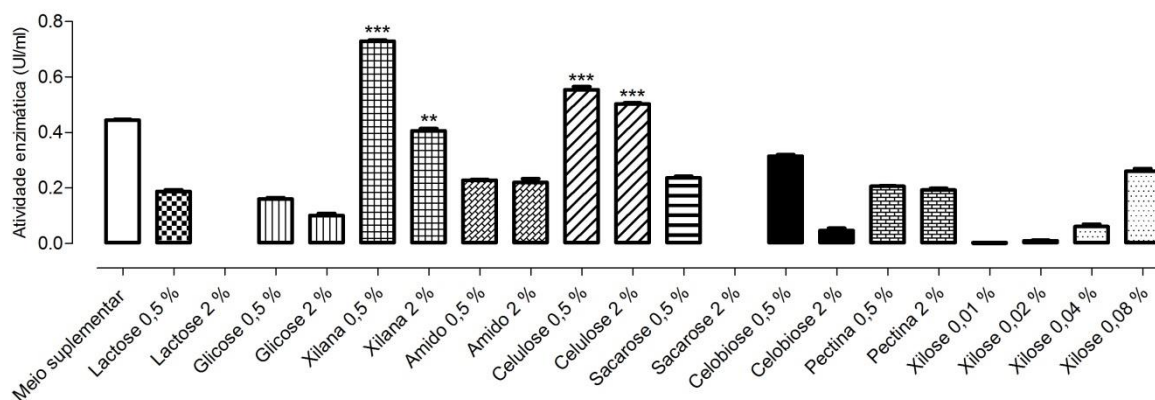


Figura 23: Efeito da adição de substratos comerciais como fonte de carbono sobre a atividade enzimática de xilanase do fungo *P. corylophilum*. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA One Way seguido de Teste de Dunnett's, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.9. Avaliação da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio na produção de holocelulases

5.9.1. Linhaça como fonte de carbono

5.9.1.1. Fungo *P. corylophilum*

A interferência da suplementação de diferentes fontes de nitrogênio com linhaça como fonte de carbono na produção de holocelulases foi investigada. Os resultados estão apresentados nas tabelas 1 e 2. De acordo com os resultados apresentados na tabela 1 e nas Figuras 24, 25, 26 e 27, observou-se que o NaNO_3 e o NH_4Cl provocaram um aumento tanto na enzima endoglicanase como na FPase em 168 horas de cultivo. Entretanto, a adição de peptona e de extrato de levedura, isoladamente ou em conjunto com NaNO_3 , não causou o aumento da atividade enzimática de nenhuma enzima estudada. O substrato asparagina também não influenciou a atividade de qualquer enzima analisada. O NH_4Cl apresentou um aumento da atividade de endoglicanase durante todo o período de incubação, sendo mais significativo apenas em 168 horas com um aumento de 22%. Com 168 horas de cultivo, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ demonstrou um acréscimo mais expressivo de 32% na atividade de endoglicanase e somente de 10% na atividade de β -glicosidase. A caseína também aumentou a atividade de endoglicanase nas horas analisadas ao passo que triptona foi o único substrato que teve significância na atividade de exoglicanase apenas com 48 horas de cultivo.

Tabela 1: Atividade enzimática de celulases do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio a 1%	Endoglucanase (CMCase)			Exoglucanase (Avicelase)			FPase (Celulases Totais)			β-Glicosidase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,087± 0,007	0,090± 0,003	0,180± 0,002	0,017± 0,003	0,029± 0,003	0,033± 0,002	0,006± 0,002	0,025± 0,002	0,063± 0,002	0,088± 0,007	0,320± 0,006	0,671± 0,022
Asparagina	0,078± 0,005	0,079± 0,006	0,096± 0,005	0,020± 0,004	0,021± 0,004	0,029± 0,004	0,009± 0,002	0,002± 0,002	0,014± 0,004	0,092± 0,006	0,266± 0,010	0,554± 0,019
Caseína	0,095± 0,004	0,108± 0,007	0,203± 0,006	0,019± 0,003	0,019± 0,002	0,031± 0,005	0,006± 0,003	0,002± 0,002	0,011± 0,003	0,077± 0,003	0,249± 0,009	0,447± 0,023
Extrato de Levedura	0,035± 0,003	0,043± 0,004	0,078± 0,008	0,003± 0,001	0,023± 0,002	0,017± 0,002	0,001± 0,002	0,003± 0,001	0,007± 0,003	0,019± 0,003	0,093± 0,003	0,160± 0,006
Peptona	0,039± 0,004	0,077± 0,009	0,075± 0,006	0,006± 0,002	0,025± 0,003	0,017± 0,004	0,002± 0,002	0,007± 0,002	0,029± 0,004	0,033± 0,004	0,117± 0,004	0,147± 0,007
Peptona + extrato de levedura	0,061± 0,007	0,083± 0,007	0,085± 0,007	0,006± 0,001	0,014± 0,002	0,018± 0,003	0,004± 0,001	0,003± 0,002	0,031± 0,005	0,035± 0,003	0,069± 0,002	0,100± 0,005
NaNO ₃	0,065± 0,005	0,079± 0,004	0,203± 0,009	0,024± 0,004	0,032± 0,003	0,028± 0,004	0,004± 0,002	0,009± 0,003	0,071± 0,004	0,070± 0,002	0,239± 0,005	0,391± 0,012
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,043± 0,002	0,030± 0,005	0,073± 0,006	0,014± 0,002	0,025± 0,002	0,018± 0,004	0,006± 0,003	0,007± 0,002	0,031± 0,005	0,016± 0,002	0,101± 0,005	0,030± 0,002
NaNO ₃ + peptona	0,100± 0,006	0,088± 0,005	0,076± 0,005	0,010± 0,001	0,027± 0,002	0,015± 0,003	0,006± 0,002	0,006± 0,002	0,009± 0,003	0,011± 0,002	0,024± 0,002	0,025± 0,004
NH ₄ Cl	0,131± 0,011	0,101± 0,005	0,220± 0,009	0,014± 0,002	0,019± 0,003	0,023± 0,005	0,005± 0,003	0,006± 0,003	0,072± 0,006	0,039± 0,004	0,158± 0,003	0,308± 0,009
NH ₄ Cl + extrato de levedura	0,091± 0,004	0,076± 0,005	0,088± 0,004	0,016± 0,004	0,024± 0,003	0,031± 0,004	0,000± 0,002	0,002± 0,002	0,006± 0,002	0,012± 0,002	0,040± 0,005	0,098± 0,009
NH ₄ Cl + peptona	0,091± 0,002	0,084± 0,004	0,093± 0,006	0,021± 0,003	0,021± 0,002	0,032± 0,003	0,000± 0,001	0,000± 0,001	0,005± 0,001	0,021± 0,006	0,015± 0,003	0,066± 0,008
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,157± 0,014	0,116± 0,007	0,237± 0,010	0,014± 0,003	0,005± 0,002	0,014± 0,004	0,004± 0,002	0,004± 0,001	0,039± 0,007	0,086± 0,006	0,312± 0,005	0,737± 0,026
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extrato de levedura	0,090± 0,006	0,079± 0,009	0,084± 0,007	0,019± 0,002	0,018± 0,003	0,029± 0,002	0,005± 0,002	0,009± 0,002	0,024± 0,004	0,009± 0,002	0,012± 0,004	0,039± 0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,086± 0,007	0,077± 0,008	0,087± 0,009	0,017± 0,003	0,024± 0,005	0,023± 0,002	0,001± 0,001	0,002± 0,001	0,009± 0,003	0,013± 0,002	0,023± 0,003	0,037± 0,004
Triptona	0,082± 0,005	0,087± 0,006	0,096± 0,007	0,024± 0,003	0,019± 0,003	0,031± 0,005	0,005± 0,002	0,001± 0,002	0,010± 0,002	0,036± 0,004	0,259± 0,008	0,479± 0,018
Ureia	0,083± 0,006	0,073± 0,005	0,090± 0,008	0,016± 0,002	0,025± 0,004	0,030± 0,004	0,003± 0,001	0,005± 0,002	0,012± 0,003	0,016± 0,002	0,058± 0,004	0,091± 0,007

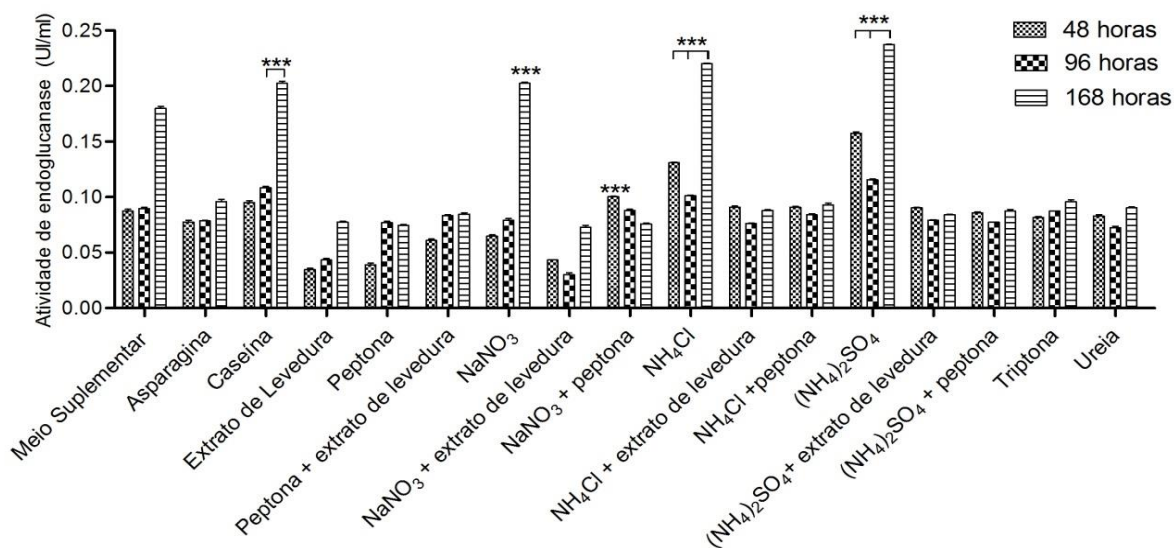


Figura 24: Atividade enzimática de endoglicanase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

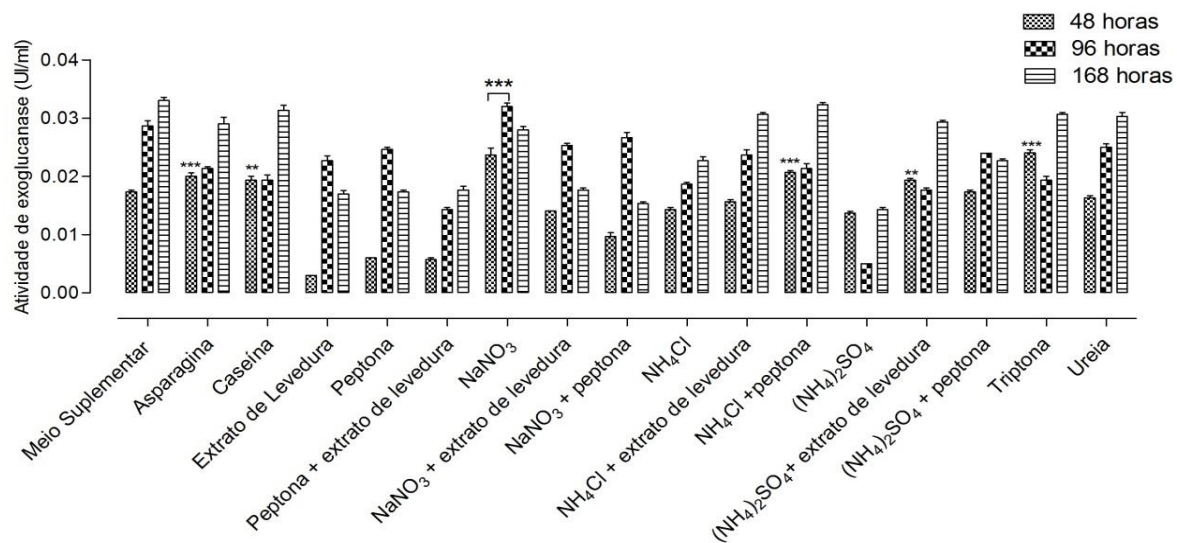


Figura 25: Atividade enzimática de exoglicanase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

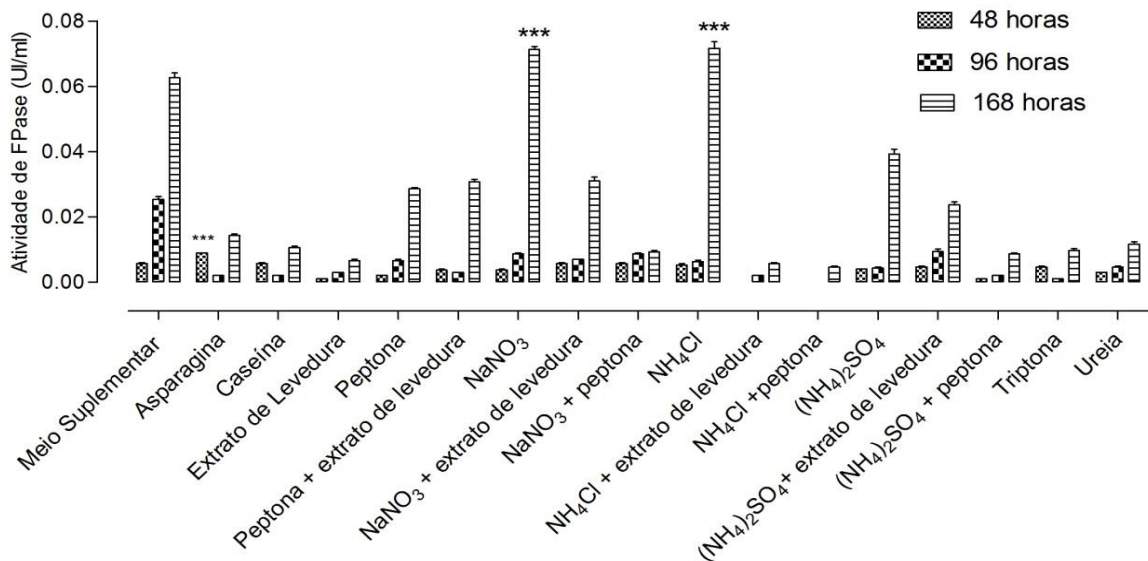


Figura 26: Atividade enzimática de FPase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

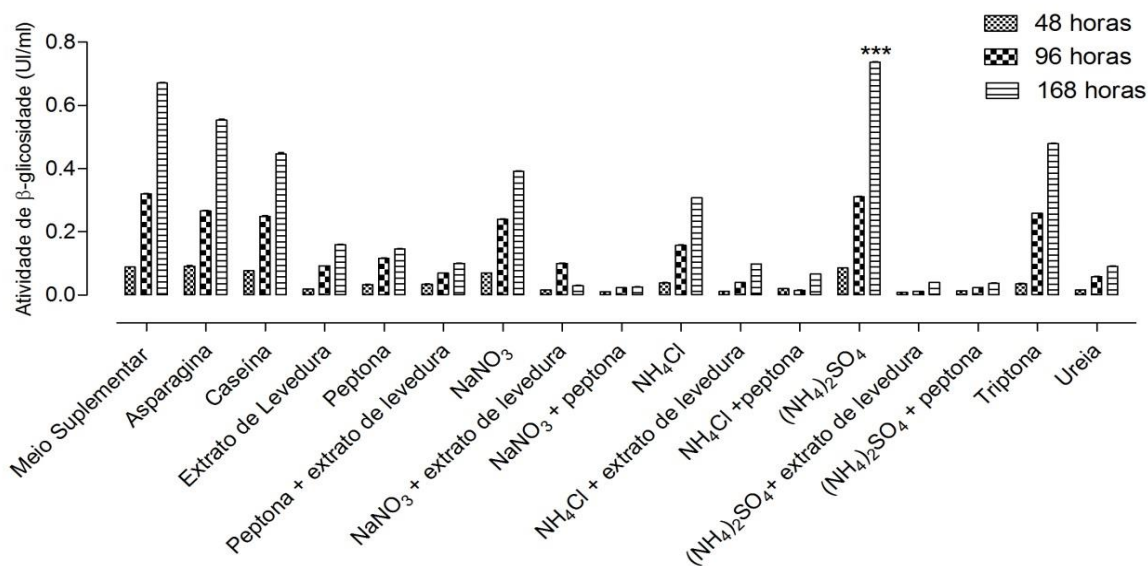


Figura 27: Atividade enzimática de β -glicosidase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os

resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

O efeito da suplementação com linhaça como fonte de carbono na produção de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase pelo fungo *Penicillium corylophilum* também foi investigada. Os resultados estão apresentados na tabela 2 e nas Figuras 28, 29 e 30. Observou-se que o NaNO_3 aumentou significativamente a atividade tanto da xilanase como da pectinase durante todo o tempo de cultivo analisado neste experimento. O aumento da atividade, provocado pela xilanase, foi de 42, 38 e 25% ao passo que pela pectinase foi de 30, 43 e 36%, respectivamente em 48, 96 e 168 horas de cultivo. O NH_4Cl também mostrou um aumento da atividade de pectinase no tempo completo de cultivo estudado. A ampliação da atividade foi de 47, 22 e 70%, respectivamente em 48, 96 e 168 horas de cultivo. A adição de peptona ao NH_4Cl provocou um aumento da atividade de pectinase de 34% e 22% em 96 e 168 horas de análise.

O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou uma atividade mais significativa de pectinase, obtendo 39, 30 e 18% respectivamente nas horas estudadas. A adição de peptona ao $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$ proporcionou o acréscimo de apenas 5% da atividade de pectinase. Caseína, triptona e uréia conseguiram aumentar a atividade de pectinase durante o período observado. O substrato asparagina não influenciou a atividade de nenhuma enzima estudada nessa tabela.

Tabela 2: Atividade enzimática de holocelulasas (xilanase e mananase) e pectinase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Xilanase			Pectinase			Mananase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,294± 0,007	0,336± 0,012	0,741± 0,008	0,124± 0,007	0,212± 0,007	0,279± 0,007	0,019± 0,005	0,036± 0,009	0,069± 0,008
Asparagina	0,094± 0,009	0,130± 0,01	0,234± 0,009	0,070± 0,005	0,209± 0,007	0,274± 0,01	0,009± 0,001	0,014± 0,003	0,014± 0,003
Caseína	0,221± 0,008	0,269± 0,016	0,413± 0,012	0,160± 0,005	0,217± 0,005	0,312± 0,011	0,009± 0,002	0,011± 0,001	0,011± 0,003
Extrato de Levedura	0,091± 0,005	0,102± 0,008	0,227± 0,007	0,119± 0,008	0,198± 0,005	0,270± 0,012	0,007± 0,003	0,007± 0,002	0,026± 0,006
Peptona	0,043± 0,003	0,112± 0,008	0,294± 0,008	0,082± 0,005	0,158± 0,007	0,178± 0,013	0,011± 0,002	0,009± 0,002	0,017± 0,003
Peptona + extrato de levedura	0,051± 0,005	0,081± 0,006	0,203± 0,007	0,116± 0,004	0,190± 0,008	0,270± 0,008	0,007± 0,001	0,006± 0,001	0,013± 0,004
NaNO ₃	0,417± 0,01	0,456± 0,023	0,923± 0,014	0,161± 0,009	0,302± 0,006	0,378± 0,007	0,009± 0,003	0,014± 0,004	0,025± 0,006
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,041± 0,004	0,059± 0,006	0,136± 0,006	0,117± 0,006	0,177± 0,006	0,239± 0,009	0,003± 0,002	0,005± 0,002	0,009± 0,002
NaNO ₃ + peptona	0,054± 0,005	0,063± 0,006	0,142± 0,005	0,102± 0,005	0,195± 0,007	0,229± 0,01	0,009± 0,002	0,005± 0,001	0,010± 0,003
NH ₄ Cl	0,094± 0,007	0,221± 0,011	0,652± 0,021	0,183± 0,008	0,259± 0,009	0,475± 0,022	0,009± 0,002	0,011± 0,002	0,029± 0,007
NH ₄ Cl+ extrato de levedura	0,085± 0,005	0,131± 0,012	0,255± 0,009	0,041± 0,004	0,181± 0,006	0,266± 0,009	0,011± 0,002	0,012± 0,002	0,033± 0,003
NH ₄ Cl + peptona	0,106± 0,009	0,151± 0,011	0,311± 0,010	0,062± 0,006	0,283± 0,012	0,343± 0,021	0,011± 0,002	0,014± 0,002	0,016± 0,002
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,169± 0,008	0,264± 0,013	0,703± 0,009	0,173± 0,005	0,277± 0,006	0,330± 0,015	0,019± 0,004	0,021± 0,004	0,049± 0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄ -extrato de levedura	0,139± 0,011	0,176± 0,005	0,302± 0,017	0,078± 0,005	0,195± 0,010	0,277± 0,007	0,007± 0,002	0,011± 0,001	0,024± 0,001
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,127± 0,012	0,182± 0,007	0,298± 0,080	0,060± 0,006	0,215± 0,006	0,296± 0,006	0,006± 0,002	0,003± 0,001	0,007± 0,002
Triptona	0,171± 0,004	0,182± 0,009	0,211± 0,014	0,041± 0,004	0,226± 0,004	0,299± 0,009	0,010± 0,001	0,009± 0,002	0,016± 0,002
Ureia	0,059± 0,005	0,115± 0,009	0,265± 0,010	0,157± 0,008	0,196± 0,006	0,302± 0,007	0,011± 0,002	0,012± 0,002	0,018± 0,002

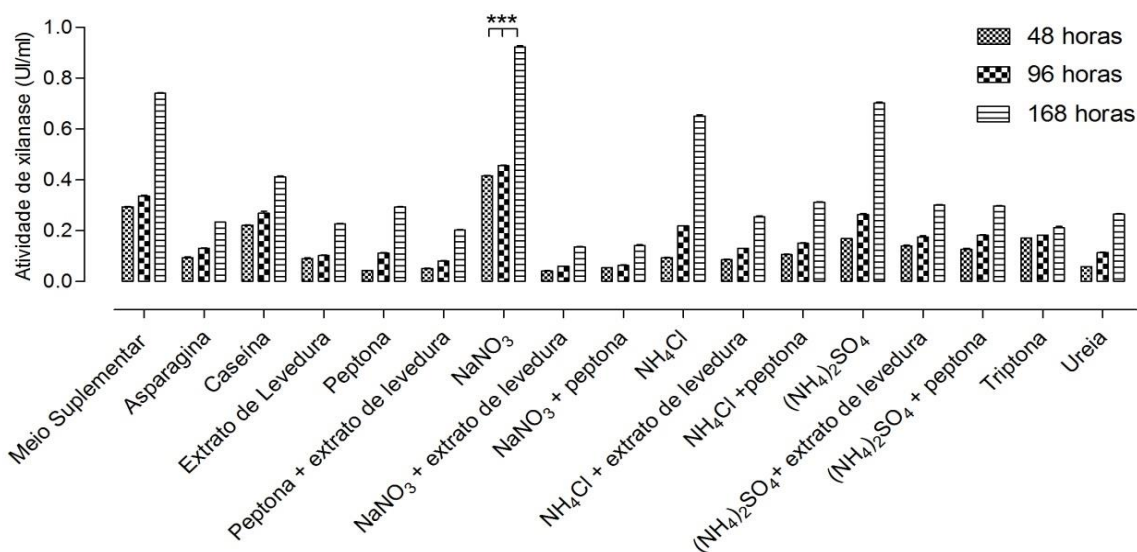


Figura 28: Atividade enzimática de xilanase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

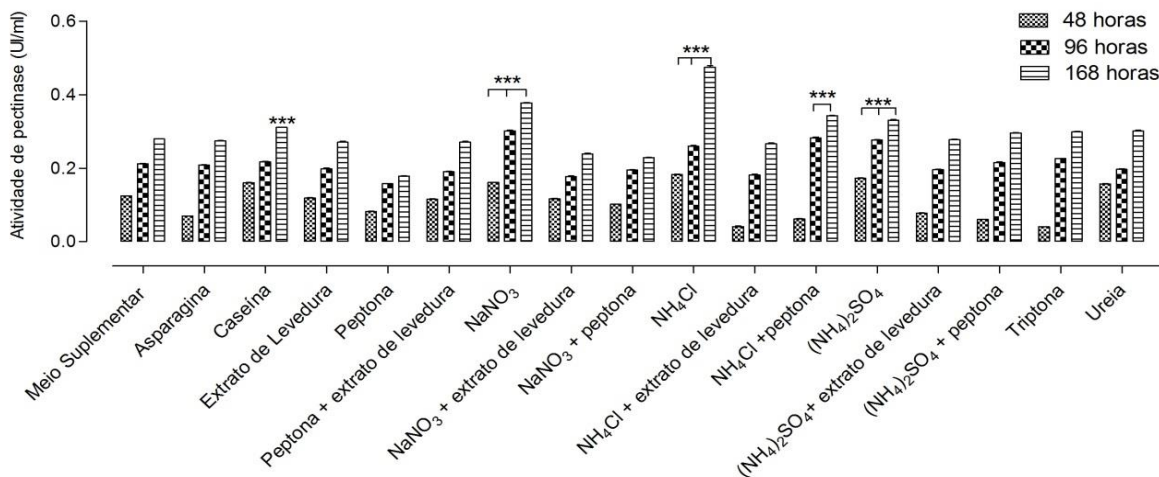


Figura 29: Atividade enzimática de pectinase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

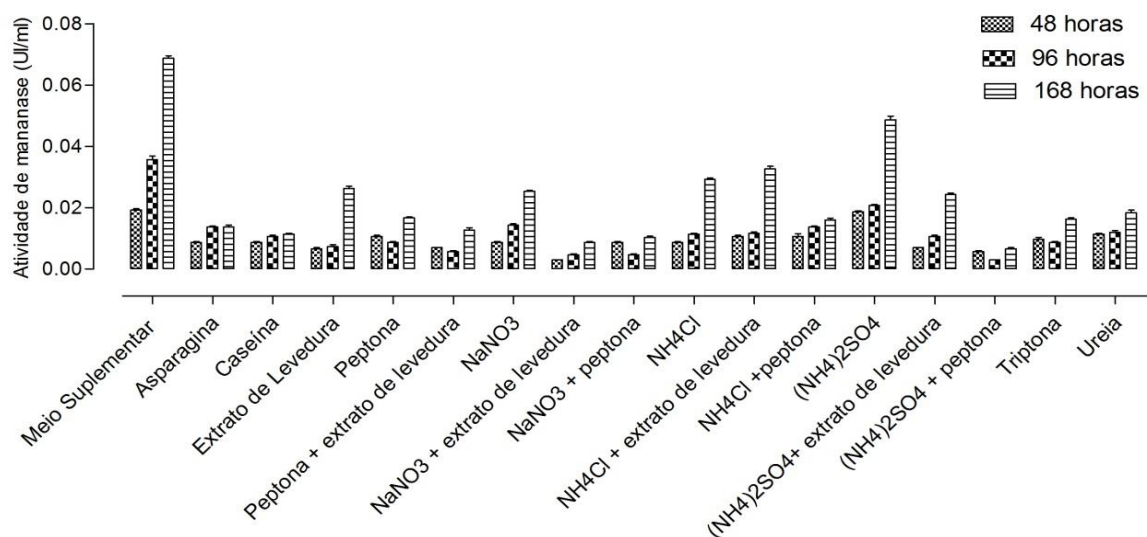


Figura 30: Atividade enzimática de mananase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.9.1.2. Fungo *P. simplicissimum*

Os resultados das atividades enzimáticas obtidos pelo *P. simplicissimum*, inoculado com a linhaça como fonte de carbono e adicionados individualmente várias fontes de nitrogênio, são mostrados na tabela 3 e 4.

Na tabela 3 e nas Figuras 31, 32, 33 e 34, quando o substrato NH_4Cl foi adicionado ao meio de cultivo, proporcionou o aumento da atividade de endoglicanase durante todo o período de incubação. Essa mesma atividade enzimática aumentou nas primeiras 96 horas de cultivo na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Na presença de caseína, o fungo *P. simplicissimum* obteve um ligeiro aumento de endoglicanase e de exoglicanase e mais expressivamente de β -glicosidase entre 96 e 168 horas de análise. O acréscimo de peptona ao substrato $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também conseguiu aumentar consideravelmente a atividade de β -glicosidase, provocando um aumento de atividade de 122 e 135% respectivamente com 96 e 168 horas de cultivo.

Os demais substratos acrescentados ao meio suplementar da tabela 3 não conseguiram alterar a atividade de nenhuma enzima analisada.

Tabela 3: Atividade enzimática de celulasas do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Endoglucanase (CMCase)			Exoglucanase (Avicelase)			FPase (Celulasas Totais)			β-Glicosidase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,098± 0,002	0,162± 0,002	0,188± 0,008	0,018± 0,003	0,022± 0,003	0,028± 0,004	0,007± 0,002	0,038± 0,004	0,054± 0,005	0,022± 0,002	0,085± 0,002	0,108± 0,007
Asparagina	0,067± 0,007	0,078± 0,006	0,102± 0,004	0,018± 0,002	0,020± 0,005	0,024± 0,003	0,002± 0,001	0,021± 0,004	0,025± 0,007	0,020± 0,002	0,009± 0,002	0,069± 0,002
Caseína	0,104± 0,004	0,168± 0,003	0,196± 0,005	0,022± 0,004	0,029± 0,003	0,041± 0,005	0,011± 0,003	0,044± 0,003	0,059± 0,002	0,024± 0,004	0,125± 0,006	0,223± 0,01
Extrato de Levedura	0,049± 0,002	0,091± 0,003	0,147± 0,004	0,015± 0,003	0,020± 0,003	0,030± 0,003	0,009± 0,003	0,009± 0,004	0,017± 0,004	0,004± 0,004	0,057± 0,007	0,093± 0,003
Peptona	0,052± 0,002	0,123± 0,004	0,151± 0,003	0,011± 0,002	0,013± 0,002	0,026± 0,004	0,000± 0,002	0,003± 0,002	0,009± 0,005	0,000± 0,002	0,051± 0,006	0,086± 0,007
Peptona + extrato de levedura	0,064± 0,003	0,136± 0,003	0,158± 0,006	0,009± 0,003	0,008± 0,002	0,022± 0,003	0,000± 0,002	0,004± 0,004	0,009± 0,002	0,004± 0,001	0,066± 0,005	0,103± 0,005
NaNO ₃	0,071± 0,003	0,139± 0,004	0,162± 0,007	0,009± 0,002	0,011± 0,001	0,021± 0,002	0,006± 0,001	0,006± 0,002	0,014± 0,003	0,006± 0,002	0,065± 0,005	0,094± 0,002
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,047± 0,003	0,111± 0,005	0,131± 0,004	0,012± 0,003	0,016± 0,004	0,027± 0,005	0,004± 0,001	0,005± 0,002	0,012± 0,003	0,005± 0,003	0,066± 0,006	0,096± 0,006
NaNO ₃ + Peptona	0,048± 0,002	0,108± 0,003	0,155± 0,005	0,013± 0,004	0,017± 0,004	0,026± 0,002	0,008± 0,002	0,012± 0,003	0,029± 0,003	0,004± 0,002	0,059± 0,007	0,095± 0,005
NH ₄ Cl	0,131± 0,004	0,178± 0,004	0,205± 0,008	0,015± 0,003	0,021± 0,004	0,027± 0,003	0,011± 0,002	0,021± 0,004	0,035± 0,006	0,010± 0,004	0,059± 0,005	0,105± 0,002
NH ₄ Cl+ extrato de levedura	0,078± 0,005	0,075± 0,007	0,097± 0,007	0,017± 0,003	0,022± 0,002	0,024± 0,002	0,003± 0,002	0,007± 0,003	0,011± 0,004	0,005± 0,003	0,036± 0,005	0,061± 0,005
NH ₄ Cl+peptona	0,074± 0,002	0,080± 0,008	0,098± 0,007	0,020± 0,006	0,024± 0,004	0,031± 0,004	0,004± 0,003	0,025± 0,005	0,033± 0,002	0,024± 0,003	0,039± 0,007	0,066± 0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,119± 0,003	0,170± 0,004	0,126± 0,009	0,009± 0,002	0,011± 0,002	0,025± 0,004	0,011± 0,003	0,019± 0,003	0,032± 0,005	0,009± 0,003	0,071± 0,004	0,106± 0,003
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extr. de levedura	0,078± 0,006	0,077± 0,008	0,101± 0,003	0,019± 0,004	0,023± 0,004	0,032± 0,005	0,002± 0,002	0,012± 0,004	0,027± 0,005	0,028± 0,005	0,064± 0,005	0,103± 0,002
(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ + peptona	0,071± 0,007	0,143± 0,005	0,174± 0,005	0,018± 0,003	0,015± 0,005	0,025± 0,005	0,001± 0,002	0,033± 0,003	0,046± 0,005	0,008± 0,002	0,189± 0,008	0,254± 0,009
Triptona	0,077± 0,003	0,104± 0,004	0,126± 0,004	0,022± 0,003	0,025± 0,004	0,033± 0,003	0,000± 0,002	0,006± 0,002	0,009± 0,002	0,021± 0,003	0,055± 0,006	0,089± 0,009
Ureia	0,069± 0,005	0,112± 0,006	0,134± 0,006	0,020± 0,005	0,023± 0,004	0,031± 0,003	0,002± 0,002	0,027± 0,004	0,039± 0,006	0,020± 0,004	0,050± 0,006	0,071± 0,006

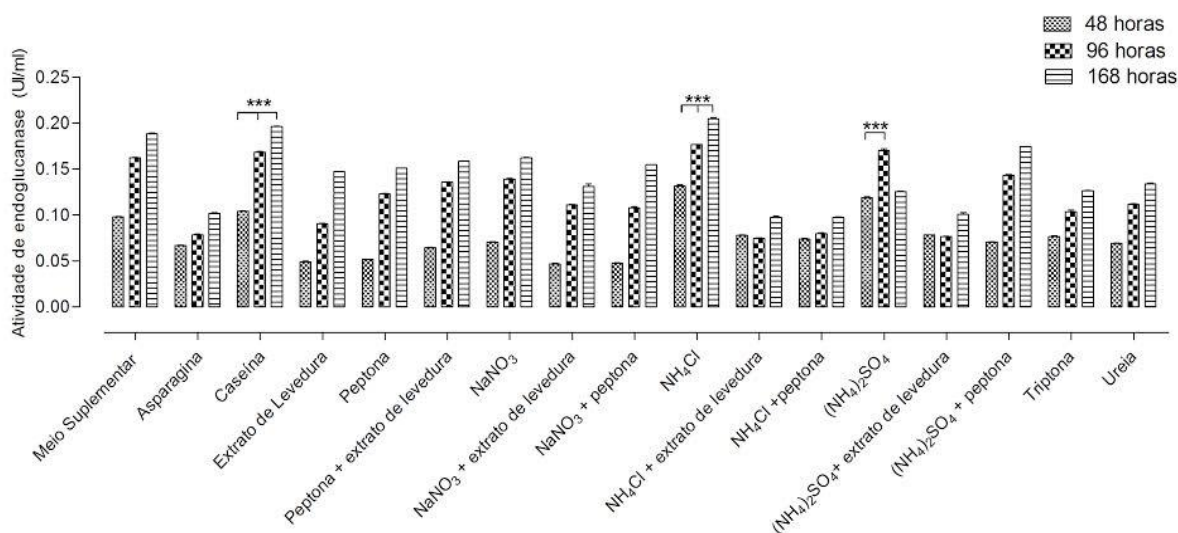


Figura 31: Atividade enzimática de endoglucanase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

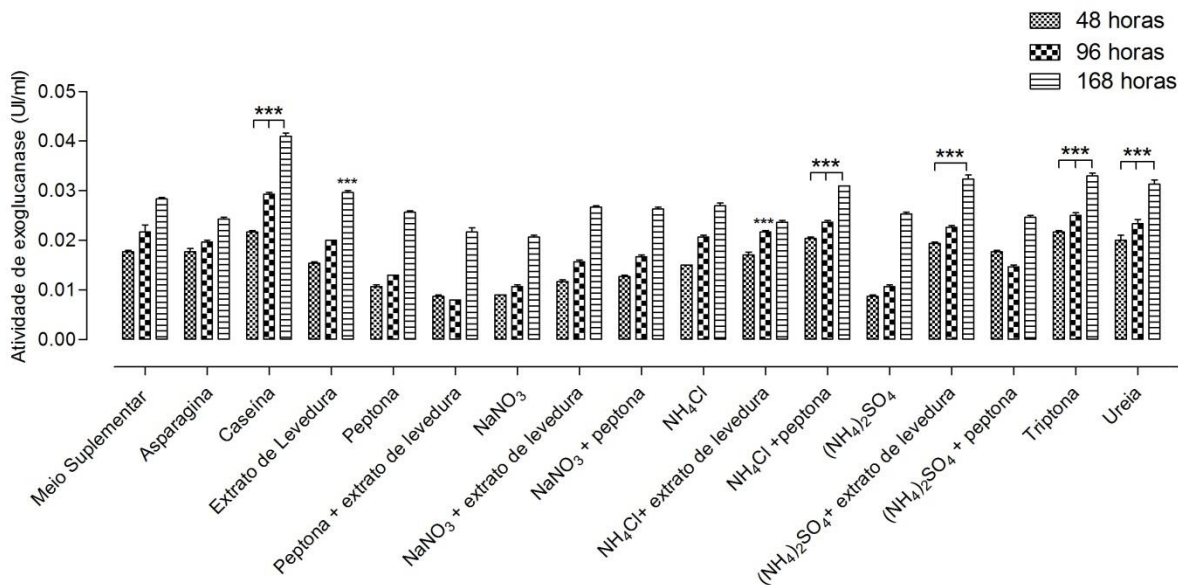


Figura 32: Atividade enzimática de exoglucanase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

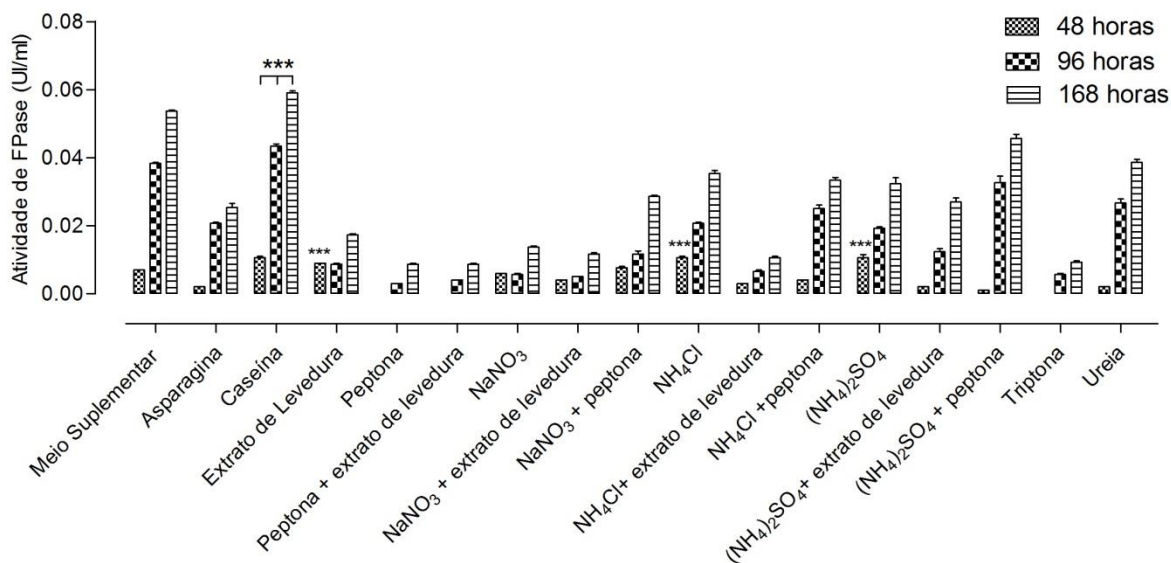


Figura 33: Atividade enzimática de FPase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

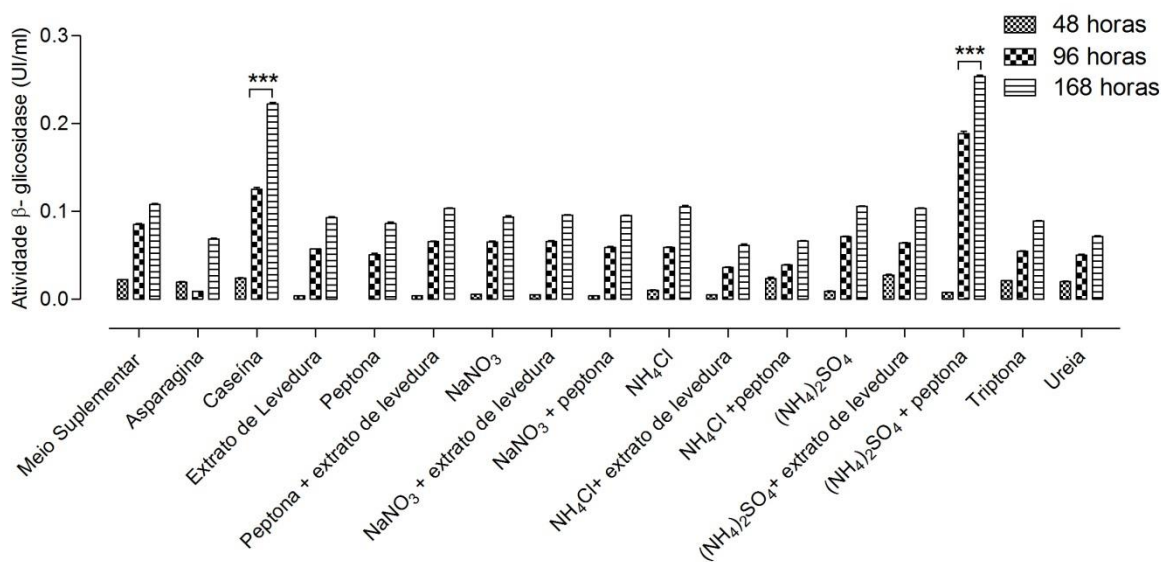


Figura 34: Atividade enzimática de β -glicosidase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

Os resultados das atividades enzimáticas de xilanase, pectinase e mananase, obtidos pelo *P. simplicissimum* quando inoculado com a linhaça, estão apresentados na tabela 4 e nas Figuras 35, 36 e 37. Nessa tabela, a adição de NH_4Cl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao meio de cultura provocou o aumento significativo da atividade de pectinase do fungo *P. simplicissimum* apenas nas últimas 168 horas de inoculação. Para a mananase, a presença de caseína provocou o acréscimo de atividade com 48 e 168 horas de inoculação.

Os substratos NaNO_3 , triptona e asparagina não modificaram a atividade de nenhuma enzima analisada na tabela 4. A adição individual de peptona ou de extrato de levedura ao NaNO_3 e ao NH_4Cl também não alterou os resultados enzimáticos. Quando adicionados conjuntamente ou isoladamente, a peptona e o extrato de levedura também não conseguiram alterar a produção enzimática.

Tabela 4: Atividade enzimática de holocelulases (xilanas e mananas) e pectinase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Xilanas			Pectinase			Mananas		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	1,77± 0,024	3,33± 0,039	3,51± 0,040	0,068± 0,003	0,261± 0,004	0,303± 0,004	0,010± 0,003	0,017± 0,004	0,022± 0,004
Asparagina	0,26± 0,02	0,35± 0,018	0,41± 0,029	0,065± 0,008	0,099± 0,003	0,124± 0,004	0,003± 0,002	0,011± 0,001	0,020± 0,002
Caseína	1,40± 0,023	2,76± 0,025	2,90± 0,021	0,052± 0,003	0,228± 0,008	0,254± 0,009	0,022± 0,002	0,011± 0,004	0,024± 0,004
Extrato de Levedura	0,67± 0,019	1,34± 0,015	1,78± 0,021	0,041± 0,004	0,102± 0,006	0,147± 0,004	0,003± 0,001	0,004± 0,001	0,013± 0,003
Peptona	0,91± 0,014	1,25± 0,029	1,82± 0,023	0,059± 0,005	0,142± 0,005	0,183± 0,007	0,006± 0,001	0,005± 0,003	0,012± 0,004
Peptona + extrato de levedura	0,81± 0,018	1,06± 0,028	1,13± 0,023	0,064± 0,006	0,126± 0,007	0,193± 0,004	0,006± 0,002	0,007± 0,003	0,011± 0,002
NaNO ₃	1,35± 0,026	1,67± 0,017	3,29± 0,014	0,054± 0,006	0,137± 0,008	0,296± 0,007	0,009± 0,002	0,011± 0,003	0,019± 0,003
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,87± 0,020	1,21± 0,019	1,36± 0,024	0,051± 0,005	0,141± 0,008	0,144± 0,006	0,005± 0,002	0,009± 0,002	0,017± 0,003
NaNO ₃ + Peptona	0,78± 0,018	1,47± 0,027	1,96± 0,038	0,047± 0,004	0,121± 0,007	0,138± 0,006	0,004± 0,002	0,006± 0,002	0,013± 0,004
NH ₄ Cl	0,44± 0,01	1,33± 0,027	2,24± 0,019	0,069± 0,005	0,255± 0,007	0,336± 0,011	0,008± 0,003	0,006± 0,001	0,013± 0,005
NH ₄ Cl+ extrato de levedura	0,31± 0,019	0,66± 0,016	0,79± 0,021	0,047± 0,004	0,164± 0,004	0,191± 0,005	0,010± 0,003	0,010± 0,003	0,007± 0,003
NH ₄ Cl+peptona	0,33± 0,027	0,78± 0,015	0,89± 0,023	0,066± 0,004	0,135± 0,007	0,171± 0,007	0,001± 0,001	0,005± 0,002	0,009± 0,002
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,31± 0,01	3,01± 0,023	3,40± 0,029	0,067± 0,004	0,234± 0,009	0,316± 0,006	0,007± 0,002	0,009± 0,002	0,017± 0,006
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extr. de levedura	0,36± 0,011	1,19± 0,022	1,47± 0,013	0,070± 0,007	0,150± 0,007	0,187± 0,008	0,001± 0,001	0,003± 0,001	0,007± 0,002
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,34± 0,012	3,76± 0,028	3,47± 0,039	0,014± 0,003	0,145± 0,006	0,189± 0,007	0,010± 0,001	0,018± 0,002	0,024± 0,005
Triptona	0,27± 0,016	0,39± 0,019	0,44± 0,014	0,046± 0,007	0,143± 0,007	0,175± 0,006	0,010± 0,001	0,013± 0,002	0,018± 0,006
Ureia	0,17± 0,019	3,29± 0,040	3,40± 0,037	0,083± 0,006	0,091± 0,006	0,109± 0,005	0,014± 0,003	0,012± 0,002	0,017± 0,006

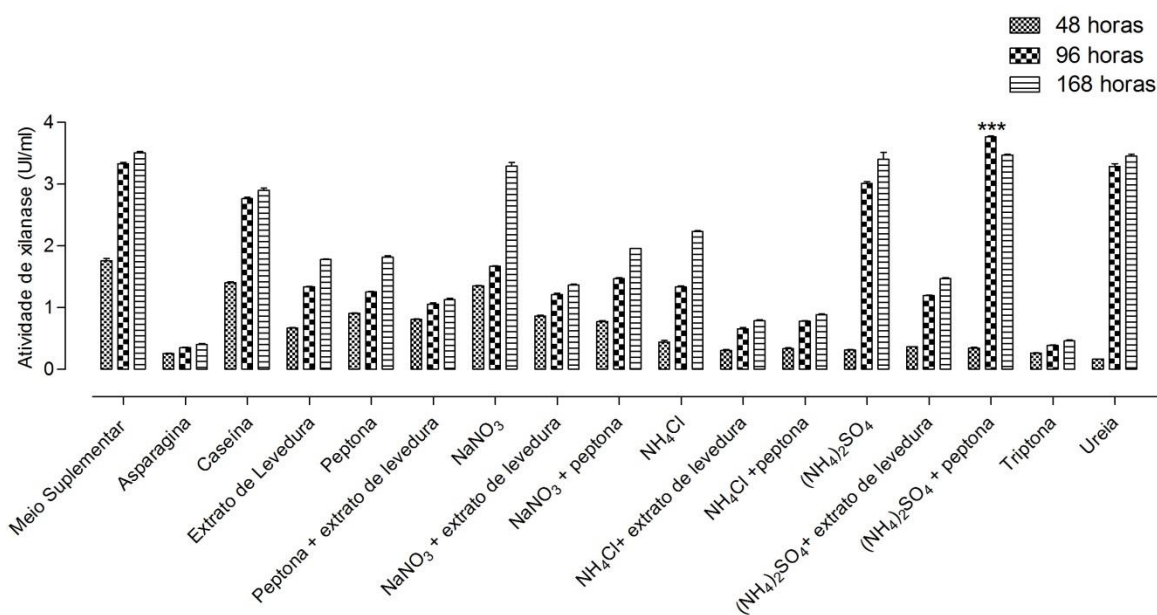


Figura 35: Atividade enzimática de xilanase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

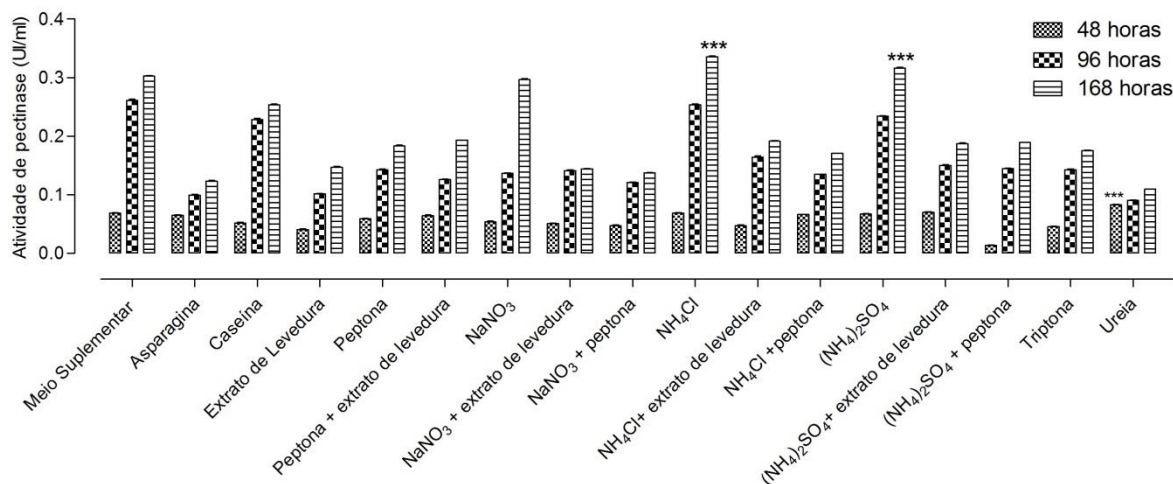


Figura 36: Atividade enzimática de pectinase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

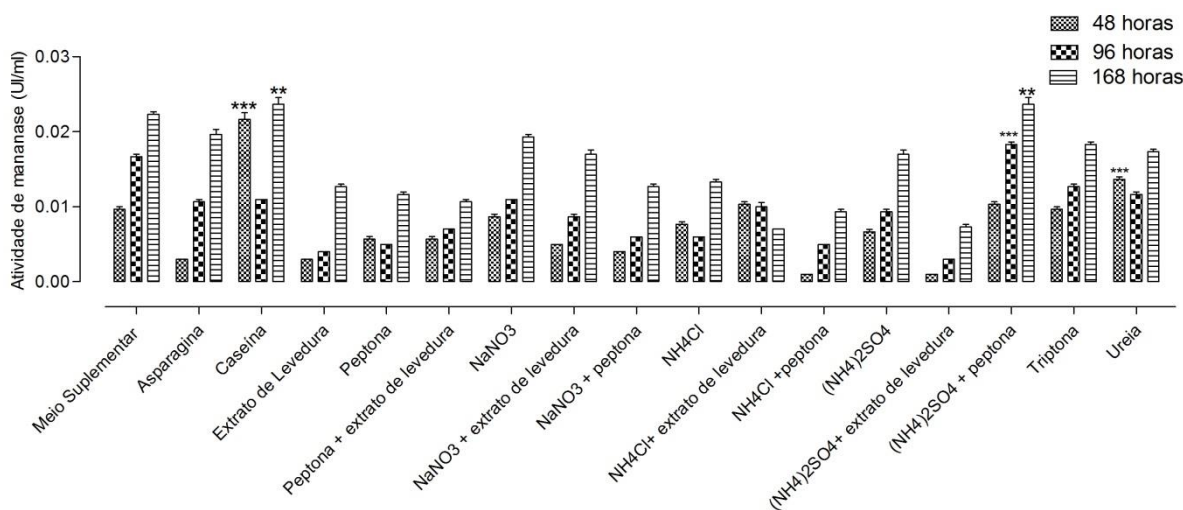


Figura 37: Atividade enzimática de mananase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando a linhaça como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.9.2. Pinhão-manso como fonte de carbono

5.9.2.1. Fungo *P. corylophilum*

Os resultados das atividades enzimáticas obtidos pelo *P. corylophilum*, inoculado com o pinhão-manso como fonte de carbono e adicionando individualmente várias fontes de nitrogênio, são mostrados nas tabelas 5 e 6.

De acordo com a tabela 5 e nas Figuras 38, 39, 40 e 41, durante todo o período de estudo, o NaNO₃ aumentou discretamente a atividade de endoglicanase, sendo que a adição tanto de peptona, quanto de extrato de levedura não aumentou nenhuma das atividades enzimáticas. A adição de peptona ao NaNO₃ proporcionou um aumento da atividade da enzima β -glicosidase de apenas 6% no último tempo analisado. Essa mesma enzima conseguiu aumentar a sua atividade em 53% quando o extrato de levedura foi acrescentado ao meio apenas nas primeiras 48 horas de cultivo. O extrato de levedura e a peptona, quando adicionados isoladamente ou ao mesmo tempo no meio suplementar, não acarretaram mudanças significativas em nenhuma das atividades enzimáticas.

O NH₄Cl, após adição de peptona e de extrato de levedura individualmente nas primeiras 48 horas de cultivo, aumentou discretamente a atividade de endoglicanase. Uma

atividade pouco significativa também foi observada na exoglicanase com 168 horas de análises quando apenas o extrato de levedura foi adicionado ao NH_4Cl .

Os substratos $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, asparagina e triptona mostraram um aumento dos dados de FPase, sem alterarem os valores de endo e exoglicanase.

A caseína aumentou os resultados da endoglicanase durante todo o período analisado.

Tabela 5: Atividade enzimática de celulases do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Endoglucanase (CMCase)			Exoglucanase (Avicelase)			FPase (Celulases Totais)			β-Glicosidase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,076± 0,002	0,123± 0,005	0,190± 0,002	0,015± 0,002	0,022± 0,004	0,031± 0,003	0,009± 0,002	0,011± 0,002	0,066± 0,004	0,032± 0,006	0,396± 0,011	0,722± 0,022
Asparagina	0,074± 0,005	0,070± 0,006	0,112± 0,006	0,009± 0,002	0,023± 0,001	0,025± 0,004	0,020± 0,004	0,010± 0,002	0,074± 0,004	0,013± 0,004	0,019± 0,003	0,111± 0,006
Caseína	0,082± 0,002	0,129± 0,002	0,203± 0,005	0,012± 0,001	0,027± 0,004	0,035± 0,003	0,003± 0,001	0,003± 0,002	0,005± 0,002	0,001± 0,001	0,106± 0,004	0,419± 0,010
Extrato de Levedura	0,022± 0,002	0,039± 0,002	0,077± 0,005	0,005± 0,001	0,007± 0,003	0,017± 0,003	0,000± 0,002	0,002± 0,002	0,000± 0,001	0,049± 0,007	0,221± 0,009	0,667± 0,010
Peptona	0,024± 0,004	0,044± 0,004	0,078± 0,005	0,009± 0,002	0,011± 0,002	0,019± 0,003	0,004± 0,003	0,005± 0,001	0,007± 0,002	0,019± 0,004	0,074± 0,003	0,108± 0,007
Peptona + extrato de levedura	0,029± 0,005	0,046± 0,005	0,083± 0,007	0,007± 0,002	0,006± 0,001	0,017± 0,002	0,016± 0,004	0,015± 0,004	0,020± 0,006	0,030± 0,003	0,278± 0,008	0,718± 0,011
NaNO ₃	0,091± 0,005	0,138± 0,006	0,212± 0,010	0,009± 0,002	0,021± 0,003	0,022± 0,003	0,005± 0,002	0,006± 0,002	0,011± 0,002	0,022± 0,003	0,106± 0,005	0,204± 0,009
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,045± 0,002	0,055± 0,002	0,079± 0,003	0,004± 0,002	0,007± 0,002	0,015± 0,002	0,006± 0,001	0,005± 0,002	0,023± 0,004	0,019± 0,003	0,039± 0,004	0,093± 0,004
NaNO ₃ + Peptona	0,026± 0,003	0,038± 0,005	0,080± 0,006	0,006± 0,001	0,006± 0,002	0,015± 0,001	0,007± 0,002	0,009± 0,003	0,021± 0,004	0,017± 0,002	0,041± 0,004	0,770± 0,019
NH ₄ Cl	0,059± 0,005	0,094± 0,008	0,155± 0,006	0,011± 0,002	0,012± 0,001	0,018± 0,003	0,005± 0,002	0,003± 0,002	0,002± 0,002	0,033± 0,006	0,079± 0,006	0,119± 0,004
NH ₄ Cl+ extrato de levedura	0,087± 0,005	0,085± 0,004	0,177± 0,006	0,012± 0,001	0,027± 0,002	0,036± 0,002	0,004± 0,002	0,004± 0,002	0,049± 0,005	0,008± 0,002	0,067± 0,006	0,156± 0,009
NH ₄ Cl+peptona	0,082± 0,003	0,084± 0,004	0,181± 0,005	0,016± 0,003	0,024± 0,003	0,029± 0,003	0,002± 0,002	0,006± 0,003	0,007± 0,002	0,007± 0,001	0,119± 0,005	0,219± 0,009
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,061± 0,007	0,086± 0,005	0,158± 0,007	0,012± 0,002	0,013± 0,002	0,019± 0,004	0,025± 0,005	0,036± 0,007	0,045± 0,008	0,021± 0,005	0,041± 0,005	0,146± 0,008
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extr. de levedura	0,081± 0,003	0,091± 0,006	0,178± 0,004	0,017± 0,004	0,021± 0,004	0,024± 0,004	0,000± 0,001	0,002± 0,001	0,003± 0,002	0,018± 0,004	0,087± 0,006	0,177± 0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,080± 0,002	0,086± 0,007	0,184± 0,008	0,015± 0,002	0,024± 0,003	0,026± 0,002	0,001± 0,001	0,002± 0,001	0,011± 0,004	0,000± 0,001	0,137± 0,005	0,197± 0,012
Triptona	0,078± 0,004	0,080± 0,004	0,124± 0,007	0,013± 0,002	0,024± 0,002	0,030± 0,002	0,024± 0,002	0,010± 0,003	0,076± 0,004	0,002± 0,002	0,097± 0,007	0,187± 0,008
Ureia	0,074± 0,004	0,077± 0,005	0,133± 0,004	0,012± 0,002	0,024± 0,003	0,028± 0,005	0,001± 0,002	0,003± 0,002	0,009± 0,002	0,010± 0,002	0,038± 0,005	0,141± 0,007

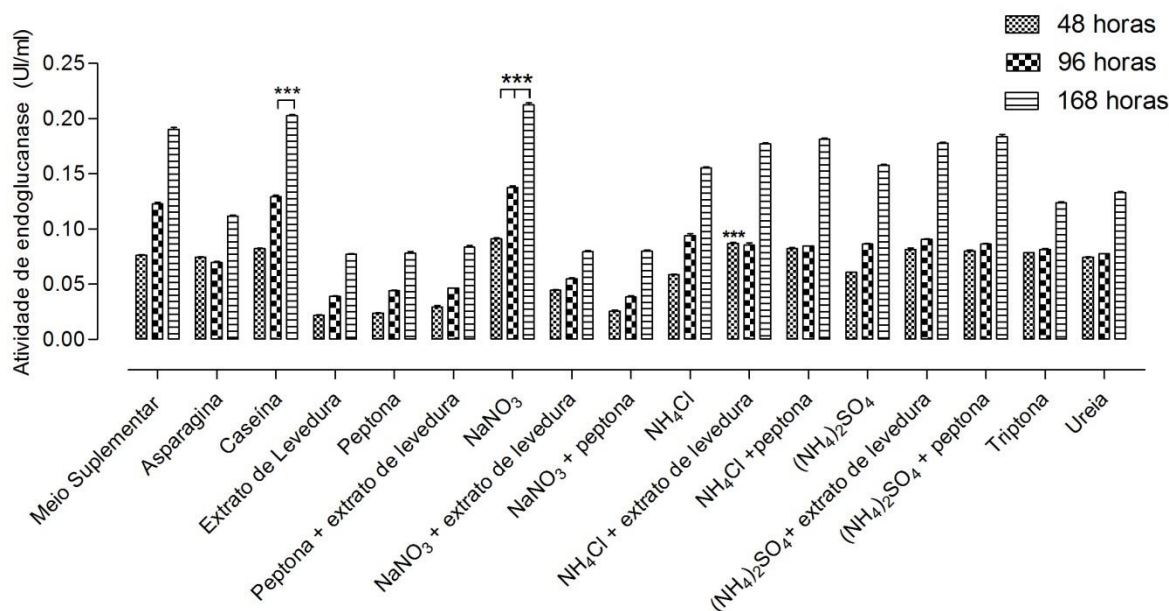


Figura 38: Atividade enzimática de endoglucanase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

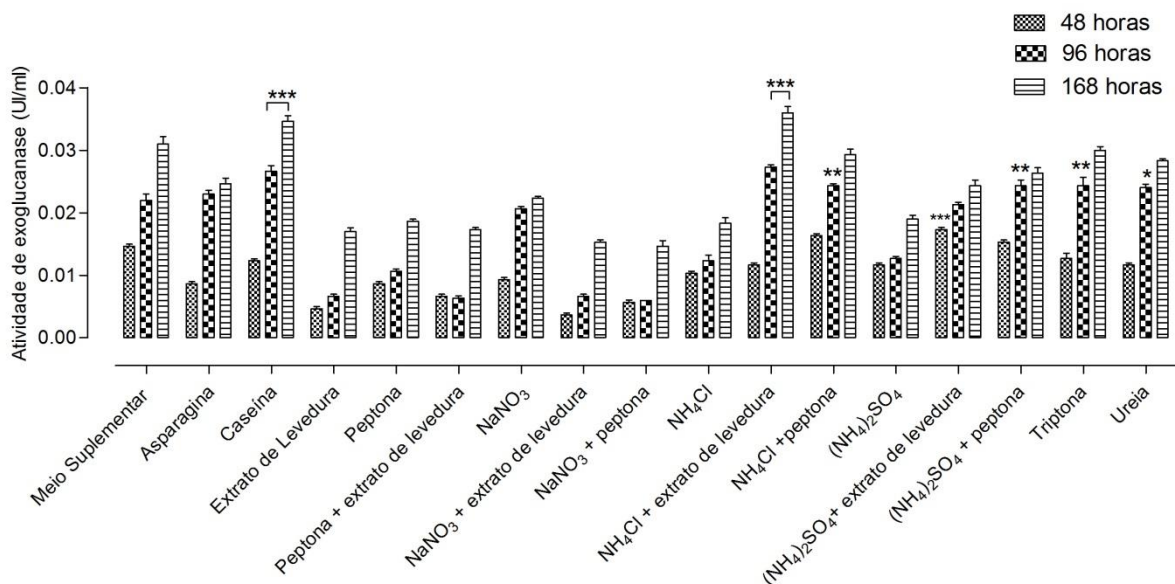


Figura 39: Atividade enzimática de exoglucanase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os

resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

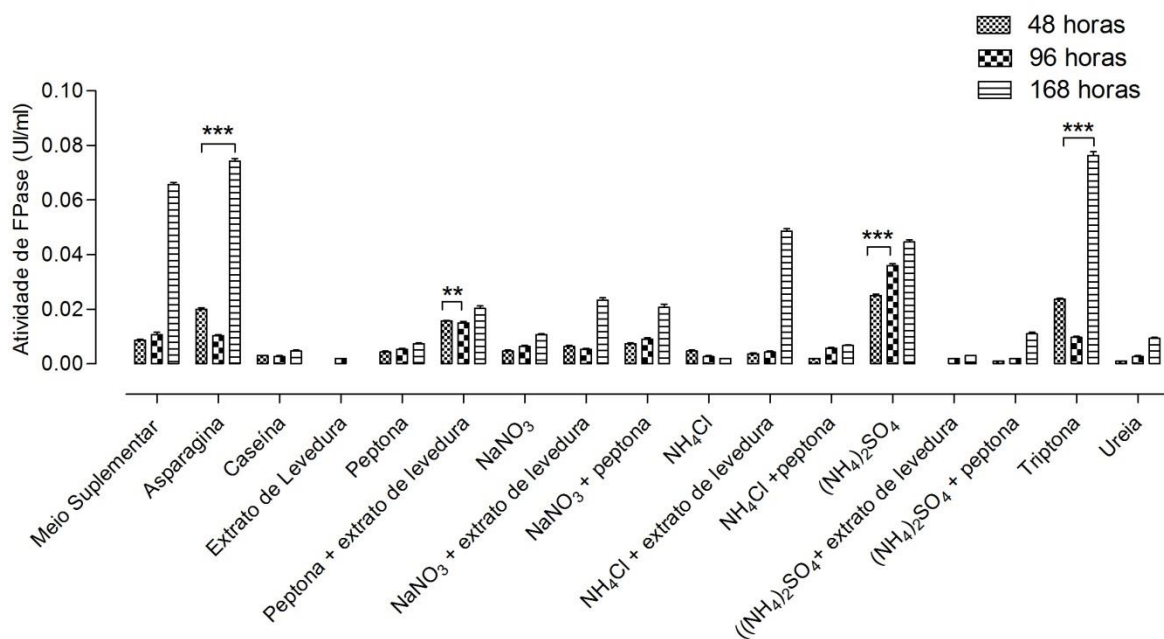


Figura 40: Atividade enzimática de FPase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

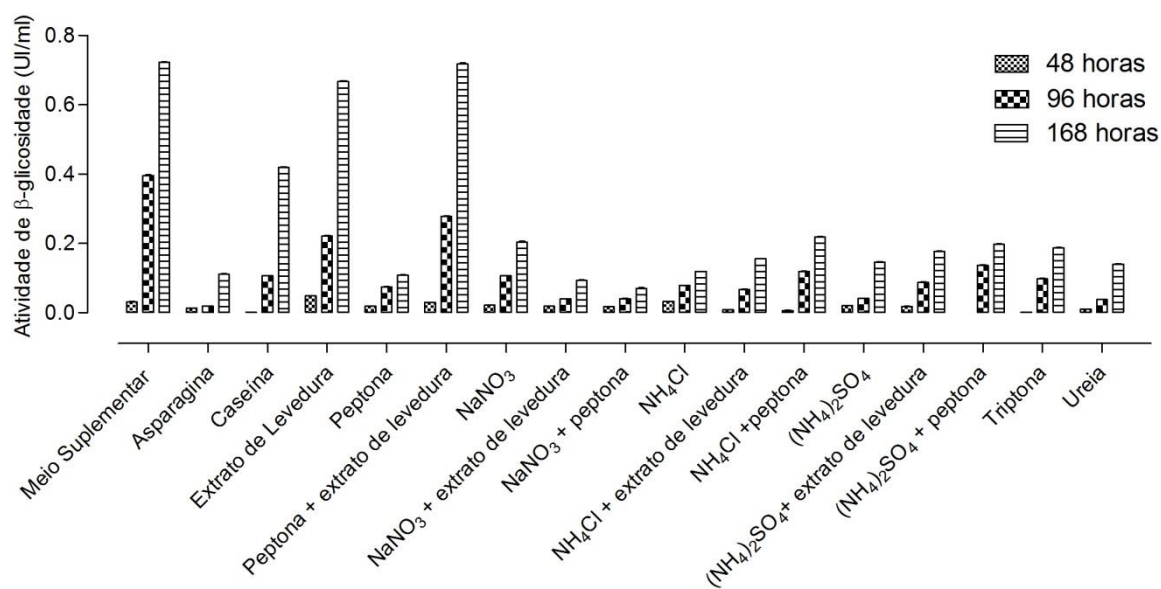


Figura 41: Atividade enzimática de β -glicosidase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

Os resultados das atividades enzimáticas de xilanase, pectinase e mananase produzidos pelo *P. corylophilum* estão mostrados na tabela 6 e nas Figuras 42, 43 e 44.

De acordo com essa tabela, o NaNO_3 aumentou mais expressivamente a atividade de pectinase em relação ao controle (meio suplementar) com 20, 25 e 37% nas respectivas horas de incubação. Provocou ainda um acréscimo considerável de mananase de 58 e 32% em 96 e 168 horas de análise. O NH_4Cl apresentou também um aumento da atividade de pectinase durante todo o tempo estudado com um considerável aumento de 100% com 168 horas de incubação. O acréscimo de peptona contribuiu para essa mesma atividade com apenas 4% no mesmo tempo de análise.

O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumentou todos os valores enzimáticos da pectinase durante o período das análises. A atividade de pectinase também sofreu um acréscimo nas primeiras 48 horas de cultivo quando foram adicionados peptona e extrato de levedura isoladamente ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Essa adição de peptona ainda proporcionou um aumento da atividade de mananase em 168 horas de inoculação. A caseína aumentou a atividade de pectinase em 96 e 168 horas de cultivo.

A atividade de xilanase só foi alterada pela triptona apenas nas primeiras 48 horas de análise ao passo que a ureia não alterou nenhuma enzima deste estudo.

Tabela 6: Atividade enzimática de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Xilanase			Pectinase			Mananase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,101± 0,008	0,302± 0,008	0,496± 0,009	0,067± 0,006	0,246± 0,002	0,279± 0,006	0,029± 0,003	0,042± 0,003	0,073± 0,004
Asparagina	0,048± 0,007	0,043± 0,005	0,086± 0,004	0,026± 0,006	0,202± 0,007	0,223± 0,006	0,006± 0,001	0,010± 0,003	0,024± 0,004
Caseína	0,104± 0,003	0,143± 0,003	0,289± 0,009	0,046± 0,003	0,292± 0,010	0,341± 0,011	0,005± 0,002	0,033± 0,003	0,060± 0,004
Extrato de Levedura	0,017± 0,004	0,029± 0,002	0,052± 0,005	0,034± 0,002	0,060± 0,004	0,206± 0,002	0,011± 0,003	0,020± 0,004	0,023± 0,004
Peptona	0,021± 0,002	0,036± 0,003	0,051± 0,006	0,030± 0,004	0,062± 0,006	0,216± 0,005	0,019± 0,003	0,025± 0,005	0,044± 0,006
Peptona + extrato de levedura	0,018± 0,002	0,047± 0,003	0,126± 0,004	0,036± 0,005	0,271± 0,006	0,379± 0,006	0,01± 0,002	0,014± 0,002	0,024± 0,003
NaNO ₃	0,081± 0,002	0,255± 0,012	0,310± 0,006	0,081± 0,004	0,307± 0,007	0,373± 0,006	0,026± 0,004	0,066± 0,005	0,096± 0,003
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,019± 0,003	0,029± 0,002	0,052± 0,003	0,023± 0,002	0,087± 0,003	0,231± 0,005	0,001± 0,003	0,007± 0,003	0,006± 0,002
NaNO ₃ + peptona	0,02± 0,002	0,033± 0,004	0,074± 0,002	0,029± 0,003	0,083± 0,003	0,173± 0,007	0,004± 0,002	0,007± 0,003	0,019± 0,003
NH ₄ Cl	0,088± 0,004	0,201± 0,004	0,282± 0,006	0,088± 0,005	0,311± 0,007	0,558± 0,019	0,007± 0,003	0,014± 0,002	0,029± 0,003
NH ₄ Cl+ extrato de levedura	0,068± 0,006	0,138± 0,007	0,159± 0,005	0,045± 0,004	0,216± 0,006	0,250± 0,006	0,003± 0,002	0,004± 0,002	0,027± 0,003
NH ₄ Cl+peptona	0,059± 0,003	0,116± 0,003	0,149± 0,003	0,052± 0,006	0,248± 0,002	0,289± 0,004	0,007± 0,002	0,014± 0,004	0,037± 0,004
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,071± 0,006	0,174± 0,005	0,244± 0,007	0,092± 0,007	0,326± 0,011	0,479± 0,013	0,021± 0,004	0,034± 0,003	0,062± 0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extr.de levedura	0,113± 0,007	0,163± 0,008	0,211± 0,007	0,084± 0,006	0,186± 0,008	0,221± 0,009	0,005± 0,002	0,021± 0,002	0,049± 0,003
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,090± 0,003	0,145± 0,009	0,201± 0,007	0,086± 0,007	0,196± 0,007	0,237± 0,009	0,008± 0,002	0,045± 0,005	0,082± 0,002
Triptona	0,134± 0,006	0,141± 0,003	0,247± 0,01	0,053± 0,003	0,249± 0,003	0,269± 0,007	0,006± 0,002	0,004± 0,004	0,019± 0,002
Ureia	0,041± 0,003	0,052± 0,004	0,112± 0,007	0,060± 0,004	0,171± 0,005	0,204± 0,005	0,004± 0,002	0,005± 0,002	0,017± 0,003

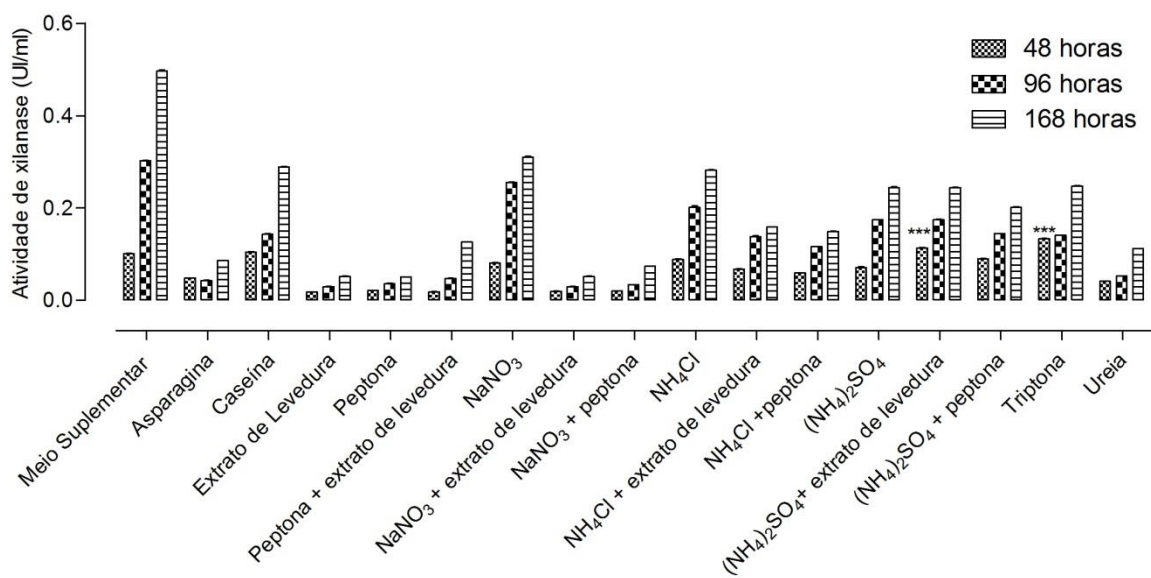


Figura 42: Atividade enzimática de xilanase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

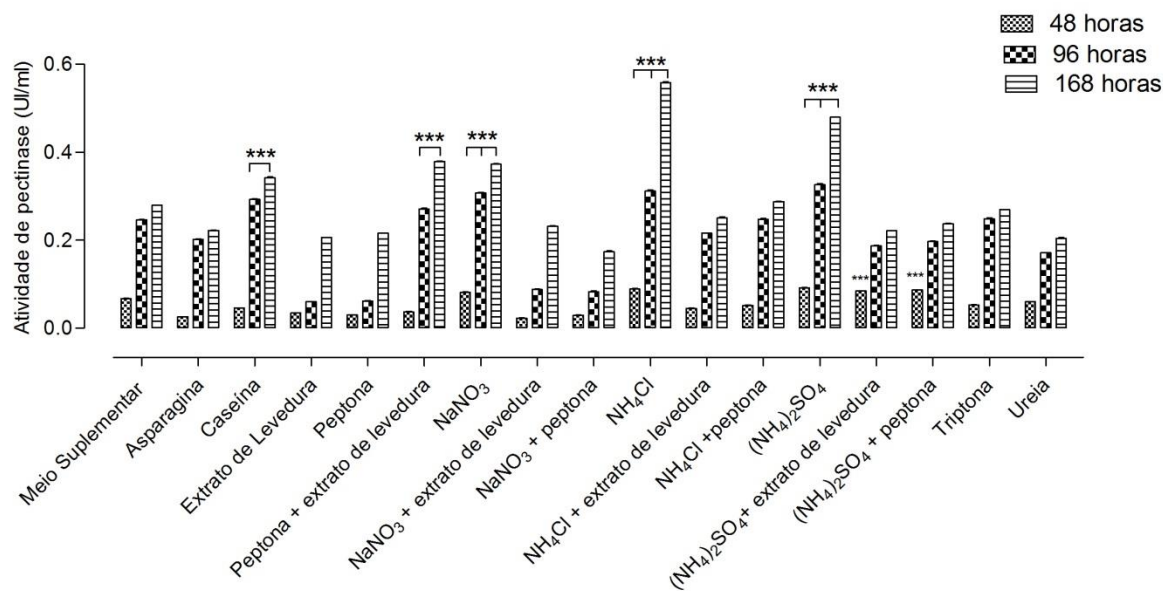


Figura 43: Atividade enzimática de pectinase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

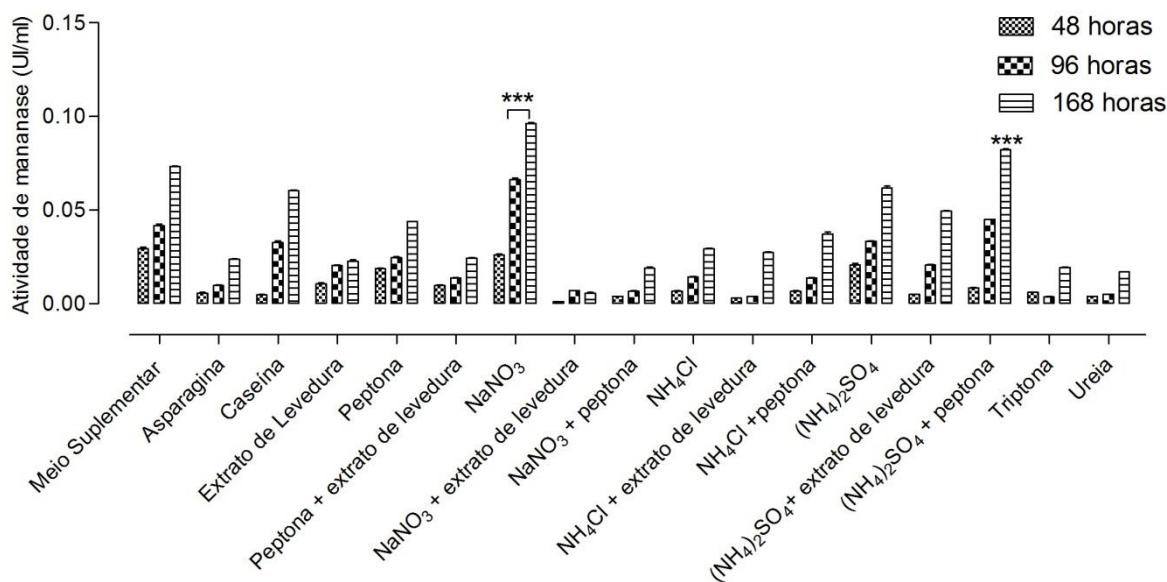


Figura 44: Atividade enzimática de mananase do fungo *Penicillium corylophilum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.9.2.2. Fungo *P. simplicissimum*

Os resultados das atividades enzimáticas obtidos pelo *P. simplicissimum*, inoculado com o pinhão-manso como fonte de carbono e adicionados individualmente várias fontes de nitrogênio, são mostrados nas tabelas 7 e 8.

De acordo com a tabela 7 e com as Figuras 45, 46, 47 e 48, o substrato NaNO₃ não aumentou a atividade de nenhuma das enzimas testadas assim como a adição de peptona a esse substrato. No entanto, o acréscimo de extrato de levedura proporcionou um aumento dos resultados de FPase durante as horas analisadas. Isoladamente, peptona e extrato de levedura não modificaram a produção enzimática em relação ao controle (meio suplementar). Mas, em conjunto, apresentaram um aumento da atividade de FPase em todos os tempos de incubação. O substrato NH₄Cl também provocou um acréscimo da atividade de FPase em todo o período de cultivo. Entretanto, a adição de peptona ou extrato de levedura não proporcionou nenhum efeito aditivo enzimático em relação ao controle. A caseína possibilitou um aumento da atividade de endoglicanase por todo o período observado. A adição de peptona ao (NH₄)₂SO₄ mostrou um aumento da atividade de endoglicanase e de β-glicosidase no segundo e terceiro tempo de

análise. A produção de β -glicosidase foi extremamente significativa pois provocou uma ampliação da atividade de 80 e 133% com 96 e 168 horas de cultivo.

Tabela 7: Atividade enzimática de celulasas do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Endoglucanase (CMCase)			Exoglucanase (Avicelase)			FPase (Celulasas Totais)			β-Glicosidase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,070± 0,005	0,082± 0,003	0,120± 0,007	0,019± 0,003	0,023± 0,002	0,031± 0,003	0,011± 0,002	0,019± 0,003	0,024± 0,002	0,047± 0,003	0,183± 0,003	0,234± 0,007
Asparagina	0,062± 0,005	0,066± 0,004	0,074± 0,004	0,021± 0,002	0,022± 0,004	0,03± 0,005	0,008± 0,002	0,009± 0,003	0,012± 0,003	0,040± 0,003	0,045± 0,003	0,063± 0,005
Caseína	0,078± 0,003	0,122± 0,005	0,147± 0,006	0,017± 0,004	0,022± 0,002	0,021± 0,006	0,012± 0,002	0,012± 0,002	0,014± 0,003	0,016± 0,002	0,016± 0,003	0,087± 0,004
Extrato de Levedura	0,021± 0,003	0,032± 0,003	0,076± 0,005	0,008± 0,002	0,006± 0,001	0,028± 0,004	0,007± 0,001	0,009± 0,002	0,018± 0,005	0,015± 0,001	0,129± 0,004	0,223± 0,008
Peptona	0,036± 0,002	0,066± 0,006	0,075± 0,006	0,006± 0,002	0,005± 0,002	0,009± 0,002	0,011± 0,004	0,009± 0,003	0,013± 0,003	0,019± 0,002	0,111± 0,002	0,224± 0,004
Peptona + extrato de levedura	0,044± 0,004	0,051± 0,004	0,099± 0,008	0,005± 0,001	0,006± 0,002	0,011± 0,002	0,024± 0,002	0,036± 0,005	0,069± 0,005	0,014± 0,002	0,099± 0,003	0,237± 0,004
NaNO ₃	0,027± 0,003	0,061± 0,002	0,085± 0,006	0,006± 0,001	0,007± 0,002	0,013± 0,003	0,006± 0,001	0,004± 0,001	0,010± 0,003	0,019± 0,002	0,131± 0,004	0,233± 0,008
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,033± 0,003	0,057± 0,003	0,094± 0,005	0,006± 0,001	0,007± 0,002	0,012± 0,002	0,027± 0,004	0,027± 0,003	0,055± 0,004	0,017± 0,002	0,108± 0,004	0,229± 0,003
NaNO ₃ + Peptona	0,011± 0,003	0,024± 0,002	0,073± 0,007	0,006± 0,001	0,008± 0,001	0,015± 0,002	0,011± 0,002	0,007± 0,004	0,016± 0,002	0,018± 0,001	0,112± 0,003	0,234± 0,006
NH ₄ Cl	0,057± 0,003	0,078± 0,005	0,115± 0,007	0,004± 0,001	0,007± 0,002	0,014± 0,003	0,024± 0,003	0,029± 0,004	0,057± 0,006	0,013± 0,001	0,091± 0,004	0,219± 0,005
NH ₄ Cl + extrato de levedura	0,070± 0,004	0,085± 0,005	0,098± 0,007	0,023± 0,004	0,027± 0,002	0,033± 0,004	0,005± 0,002	0,006± 0,002	0,019± 0,002	0,024± 0,003	0,032± 0,001	0,069± 0,002
NH ₄ Cl-peptona	0,071± 0,003	0,071± 0,003	0,089± 0,007	0,019± 0,003	0,021± 0,004	0,027± 0,006	0,002± 0,001	0,009± 0,002	0,011± 0,002	0,008± 0,002	0,037± 0,005	0,084± 0,004
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,051± 0,002	0,074± 0,003	0,114± 0,009	0,002± 0,001	0,008± 0,001	0,011± 0,002	0,011± 0,002	0,008± 0,002	0,012± 0,002	0,027± 0,003	0,147± 0,005	0,235± 0,009
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extr. de levedura	0,077± 0,005	0,070± 0,004	0,097± 0,006	0,020± 0,005	0,019± 0,002	0,023± 0,004	0,001± 0,001	0,009± 0,002	0,014± 0,002	0,011± 0,001	0,031± 0,005	0,074± 0,003
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,069± 0,006	0,110± 0,007	0,134± 0,008	0,021± 0,003	0,016± 0,004	0,024± 0,003	0,008± 0,002	0,018± 0,003	0,033± 0,003	0,006± 0,002	0,330± 0,012	0,544± 0,018
Triptona	0,070± 0,003	0,084± 0,003	0,091± 0,007	0,013± 0,002	0,017± 0,002	0,022± 0,004	0,019± 0,004	0,013± 0,002	0,024± 0,004	0,026± 0,003	0,011± 0,001	0,077± 0,004
Ureia	0,059± 0,002	0,070± 0,003	0,084± 0,004	0,022± 0,002	0,024± 0,003	0,029± 0,003	0,004± 0,001	0,004± 0,001	0,009± 0,002	0,032± 0,002	0,033± 0,005	0,054± 0,002

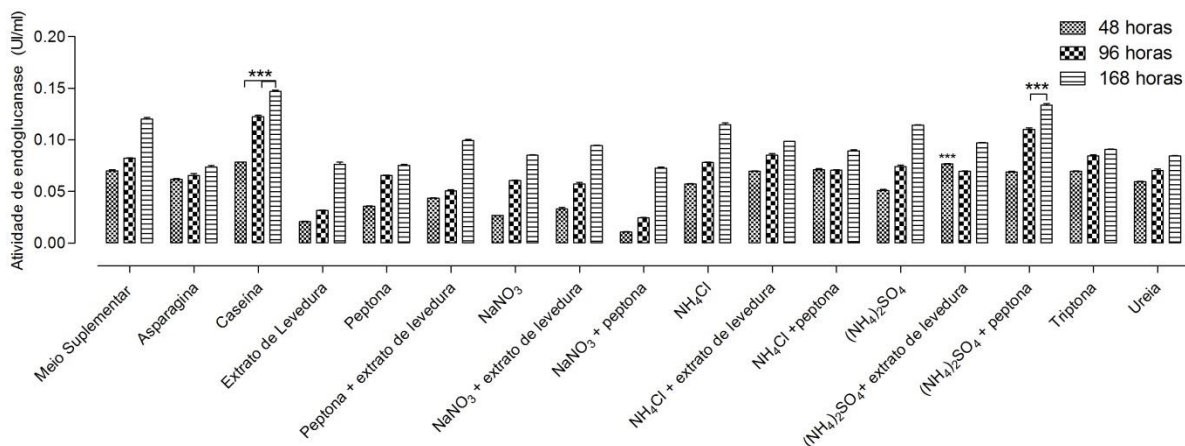


Figura 45: Atividade enzimática de endoglucanase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

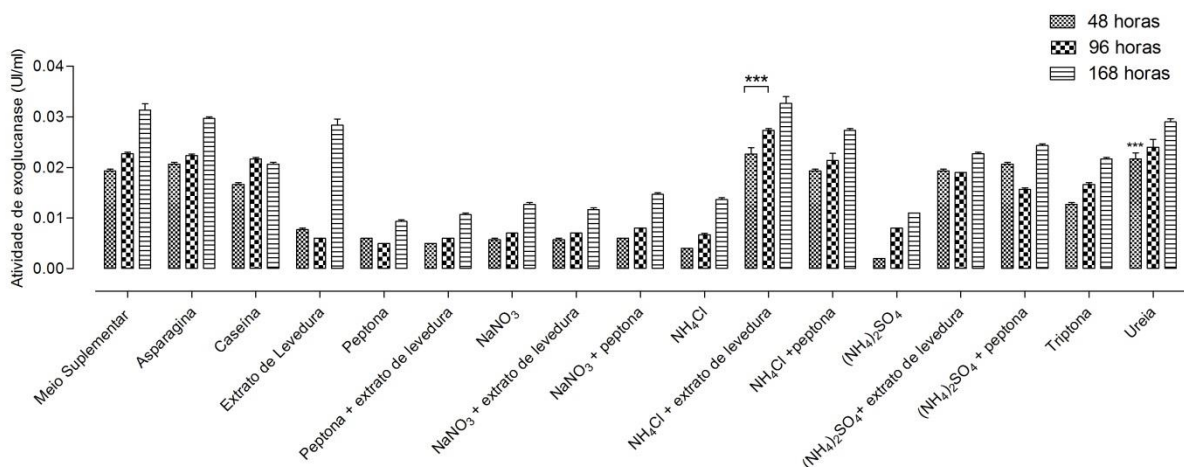


Figura 46: Atividade enzimática de exoglucanase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

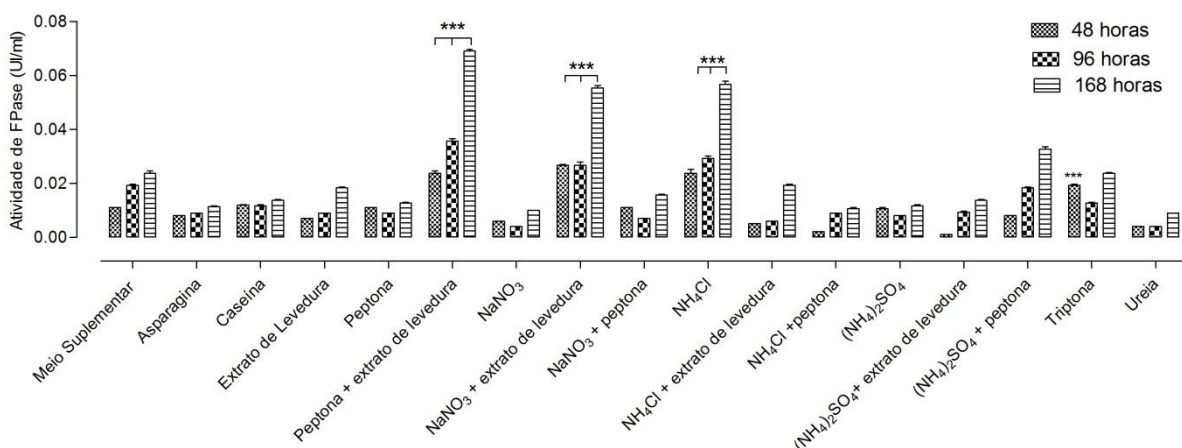


Figura 47: Atividade enzimática de FPase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

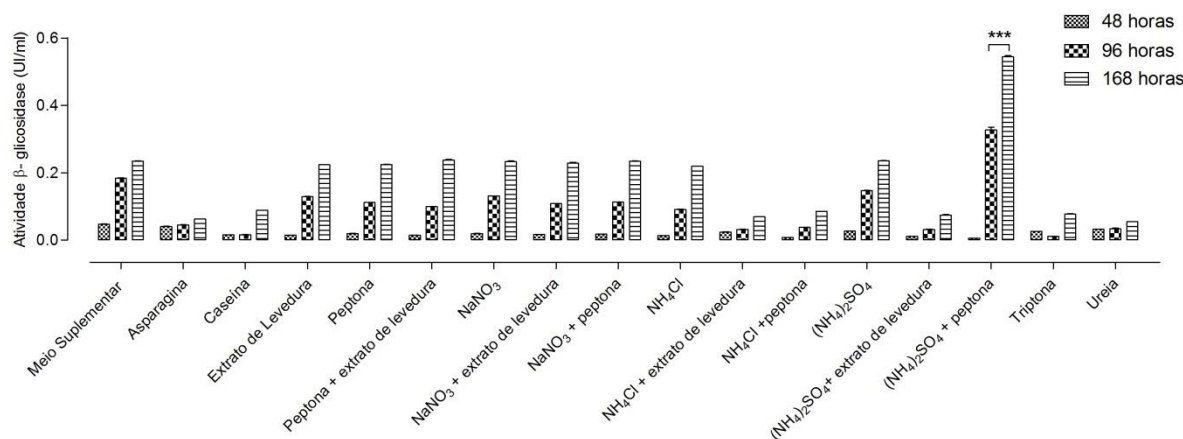


Figura 48: Atividade enzimática de β -glicosidase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

Os resultados das atividades enzimáticas de xilanase, pectinase e mananase produzidos pelo *P. simplicissimum* estão mostrados na tabela 8 e nas Figuras 49, 50 e 51. O substrato $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumentou significativamente ($p < 0,001$) as atividades de xilanase e de pectinase durante as horas analisadas. A caseína possibilitou o aumento da atividade de mananase apenas em 48 horas de inoculação. Triptona, ureia e asparagina influenciaram negativamente a atividade das enzimas estudadas na tabela 8 pelo fungo *P. simplicissimum*.

Tabela 8: Atividade enzimática de holocelulases (xilanase e mananase) e pectinase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml.

Fontes de Nitrogênio 1%	Xilanase			Pectinase			Mananase		
	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H	48 H	96 H	168 H
Meio Suplementar	0,257± 0,011	0,375± 0,007	0,479± 0,009	0,077± 0,004	0,275± 0,008	0,374± 0,007	0,007± 0,002	0,028± 0,003	0,027± 0,004
Asparagina	0,033± 0,002	0,052± 0,003	0,081± 0,007	0,065± 0,004	0,124± 0,006	0,206± 0,007	0,003± 0,002	0,021± 0,002	0,024± 0,008
Caseína	0,070± 0,006	0,279± 0,009	0,369± 0,007	0,052± 0,005	0,272± 0,008	0,355± 0,007	0,016± 0,002	0,018± 0,002	0,024± 0,005
Extrato de Levedura	0,023± 0,003	0,044± 0,002	0,078± 0,001	0,084± 0,005	0,144± 0,003	0,239± 0,006	0,000± 0,001	0,006± 0,001	0,023± 0,004
Peptona	0,021± 0,005	0,042± 0,008	0,074± 0,007	0,035± 0,003	0,074± 0,006	0,184± 0,004	0,001± 0,001	0,008± 0,002	0,025± 0,005
Peptona +extrato de levedura	0,036± 0,006	0,055± 0,005	0,086± 0,006	0,059± 0,006	0,167± 0,004	0,288± 0,008	0,002± 0,001	0,004± 0,002	0,013± 0,002
NaNO ₃	0,047± 0,009	0,131± 0,005	0,150± 0,005	0,071± 0,008	0,171± 0,008	0,334± 0,007	0,004± 0,002	0,007± 0,002	0,022± 0,005
NaNO ₃ + extrato de levedura	0,029± 0,007	0,048± 0,003	0,060± 0,004	0,055± 0,003	0,104± 0,004	0,277± 0,006	0,001± 0,001	0,005± 0,002	0,022± 0,005
NaNO ₃ + Peptona	0,024± 0,004	0,042± 0,007	0,060± 0,007	0,041± 0,004	0,099± 0,005	0,191± 0,003	0,000± 0,001	0,004± 0,001	0,025± 0,003
NH ₄ Cl	0,136± 0,006	0,401± 0,007	0,454± 0,004	0,074± 0,006	0,262± 0,008	0,379± 0,007	0,000± 0,001	0,005± 0,002	0,017± 0,003
NH ₄ Cl+ extrato de levedura	0,066± 0,004	0,059± 0,002	0,077± 0,003	0,047± 0,002	0,105± 0,006	0,199± 0,007	0,007± 0,003	0,018± 0,003	0,019± 0,003
NH ₄ Cl+peptona	0,032± 0,002	0,065± 0,006	0,097± 0,005	0,066± 0,004	0,143± 0,005	0,189± 0,008	0,001± 0,002	0,022± 0,004	0,021± 0,003
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,308±0,009	0,444± 0,011	0,554± 0,005	0,095± 0,009	0,338± 0,007	0,411± 0,009	0,000± 0,001	0,000± 0,002	0,014± 0,002
(NH ₄) ₂ SO ₄ + extr. de levedura	0,045± 0,004	0,066± 0,006	0,102± 0,006	0,070± 0,003	0,197± 0,007	0,259± 0,008	0,001± 0,002	0,023± 0,005	0,026± 0,003
(NH ₄) ₂ SO ₄ + peptona	0,081± 0,004	0,250± 0,004	0,334± 0,007	0,014± 0,002	0,176± 0,007	0,255± 0,009	0,002± 0,001	0,026± 0,004	0,027± 0,008
Triptona	0,054± 0,003	0,053± 0,002	0,071± 0,005	0,046± 0,002	0,133± 0,006	0,174± 0,006	0,004± 0,001	0,019± 0,006	0,025± 0,005
Ureia	0,034± 0,003	0,039± 0,004	0,044± 0,002	0,083± 0,006	0,142± 0,005	0,175± 0,004	0,006± 0,003	0,020± 0,004	0,019± 0,003

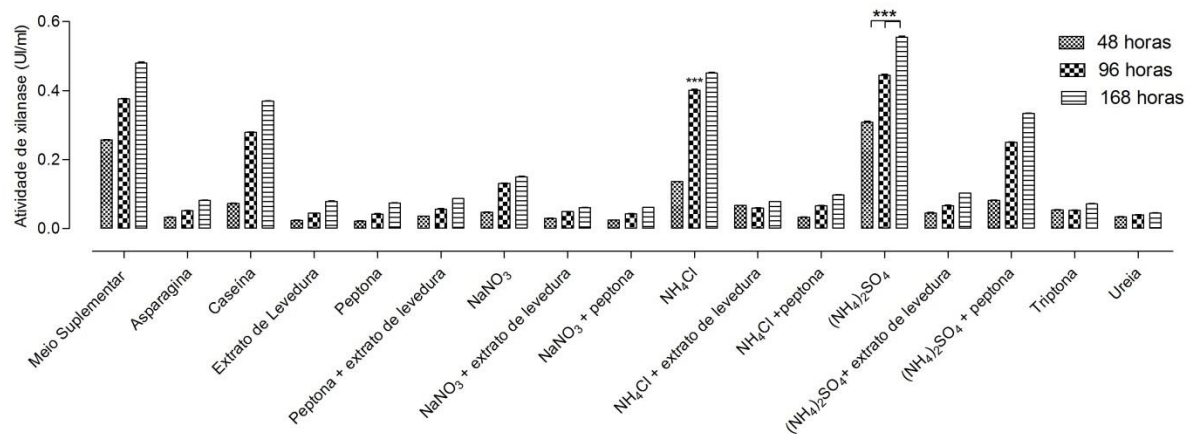


Figura 49: Atividade enzimática de xilanase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

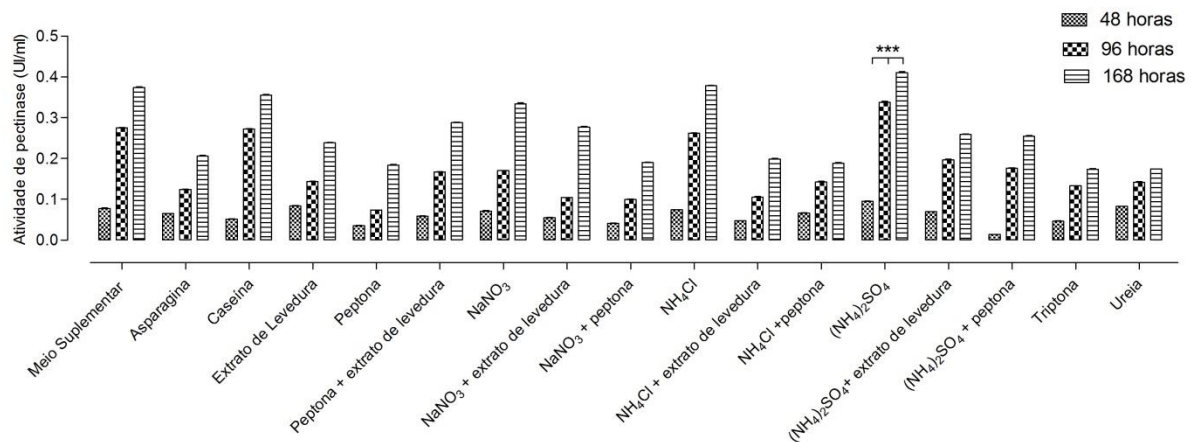


Figura 50: Atividade enzimática de pectinase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

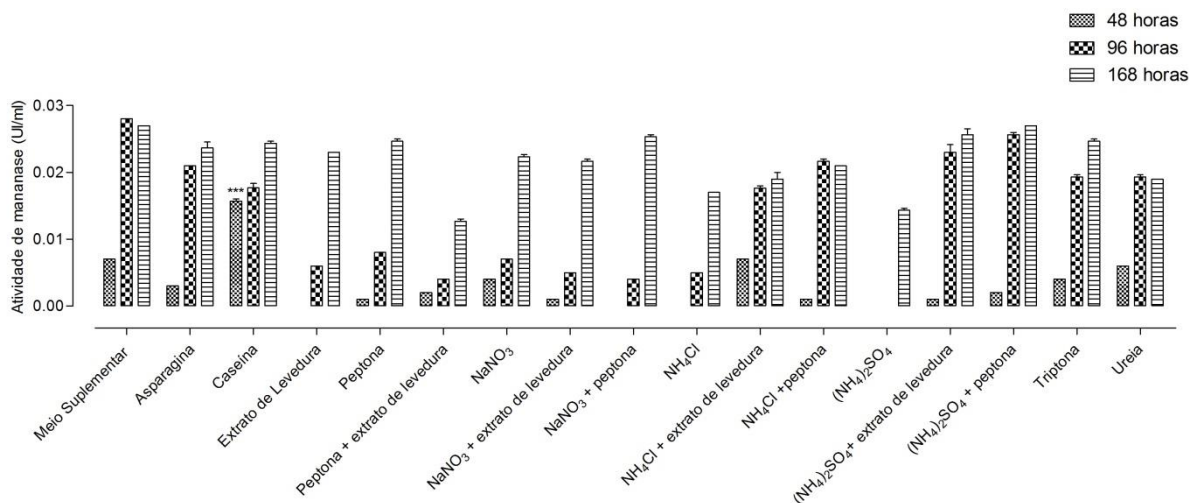


Figura 51: Atividade enzimática de mananase do fungo *Penicillium simplicissimum* cultivado em meio de fermentação submersa com diferentes fontes de nitrogênio, utilizando o pinhão-manso como fonte de carbono. Os resultados estão expressos em UI/ml. Os dados foram analisados por ANOVA Two way seguido de teste Bonferroni, sendo *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, e * $p < 0,05$.

5.10. Caracterização bioquímica parcial das xilanases provenientes do cultivo com *Penicillium simplicissimum* no substrato da linhaça

De todas as atividades enzimáticas testadas nos diversos substratos lignocelulósicos, a produção de xilanase pelo *Penicillium simplicissimum* no substrato da linhaça (Figura 18), cultivado por três dias, foi a que mais se destacou em relação à literatura consultada com outros fungos e substratos lignocelulósicos. Diante disso, os testes de purificação enzimática foram realizados a partir dessas condições.

5.10.1. Cromatografia de gel filtração do extrato fúngico *P. simplicissimum*, cultivado no resíduo lignocelulósico da linhaça

Com o intuito de se fazer uma caracterização enzimática parcial, o extrato bruto do fungo *P. simplicissimum* contendo xilanase foi liofilizado e utilizado nos protocolos de purificação proteica parcial. As amostras do extrato bruto (300 mg) foram aplicadas em uma coluna cromatográfica de gel filtração em resina Sephacryl S-200.

A Figura 52 ilustra o perfil após esse primeiro passo cromatográfico, nela observam-se várias frações durante a eluição. Todas essas frações obtidas foram investigadas quanto à atividade de xilanase.

Dentre as frações testadas, as frações que apresentaram atividade de xilanase (indicadas pelos asteriscos) acima de 0,5 UI/ml foram reunidas e aplicadas no segundo passo cromatográfico em coluna de troca aniônica.

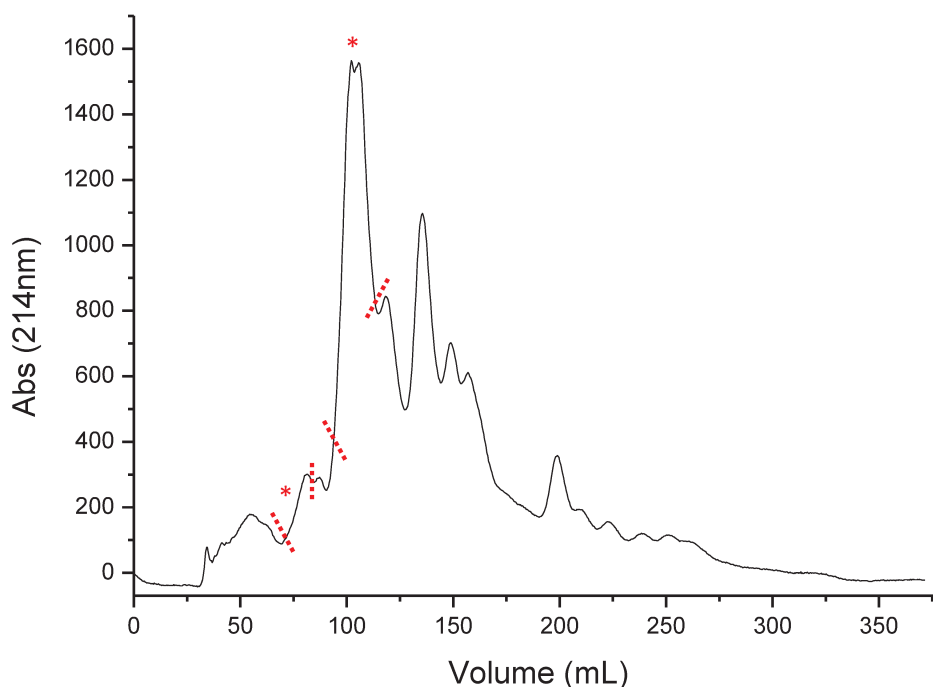


Figura 52: Cromatografia de gel filtração do extrato bruto de *P. simplicissimum*. Coluna: HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR GE Healthcare 120 ml (16 × 600 mm). Tampão: acetato de sódio 0,05M, pH= 5,0. Fluxo: 0,3 ml/min. Linhas tracejadas e asteriscos indicam as regiões com atividades de xilanase.

5.10.2 Cromatografia de troca aniônica das frações com atividade de xilanase

As frações que apresentaram atividade enzimática de xilanase provenientes da cromatografia do item anterior foram submetidas a uma cromatografia de troca aniônica. O perfil cromatográfico está apresentado na Figura 53. Das frações obtidas nessa cromatografia, a atividade enzimática de xilanase foi obtida apenas na fração anterior ao gradiente salino (fração

única no não ligante destacada pelo asterisco). Isto caracteriza uma composição catiônica da amostra.

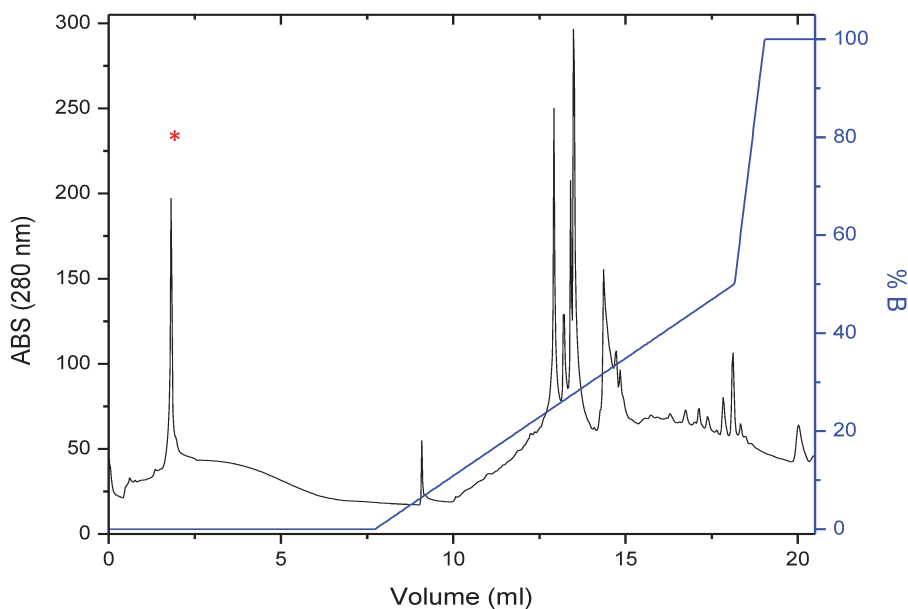


Figura 53: Cromatografia de troca aniônica das frações com atividade xilanásica provenientes da cromatografia de filtração em gel. Coluna: TSK gel SW Tosoh Bioscience 0,95 ml (2 × 250 mm). Tampões: A) fosfato de sódio 0,05M, pH=7,0. B) fosfato de sódio 0,05M, pH=7,0, NaCl 1M. Fluxo: 0,25 ml/min.

5.10.3. Curva de calibração de soroalbumina bovina para dosagem de proteínas pelo método Bradford

A curva de calibração está apresentada na Figura 54. Conforme pode ser observado, a correlação entre absorbância a 595nm e a concentração de albumina bovina se mostrou linear.

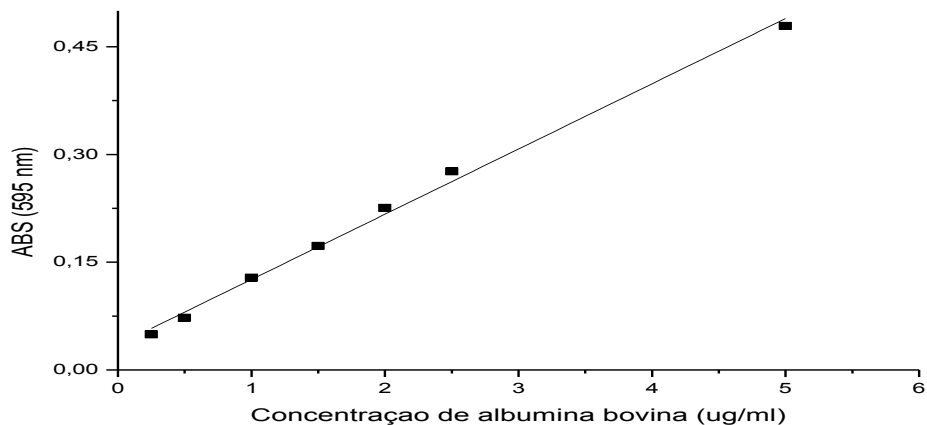


Figura 54: Curva padrão de BSA para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford. R^2 : 0,99.

5.10.4. Atividade específica do extrato bruto e das frações após os dois primeiros passos cromatográficos

A atividade xilanásica específica foi determinada para as amostras do extrato bruto liofilizado do fungo *P. simplicissimum* e para as frações provenientes das cromatografias de gel filtração (CGF) e troca iônica (CTI). O resultado apresentado na Figura 55 representa a atividade xilanásica específica em microgramas de proteína. Para melhor visualização dos resultados, esses foram apresentados em escala logarítmica, sendo: Liofilizado 3×10^{-3} , CGF: 0,621 e CTI: 19,2 atv/µg de proteína. Observa-se que a atividade xilanásica específica teve um aumento significativo a medida que foram sendo realizados os diferentes passos cromatográficos, sendo de 6400 vezes em relação ao liofilizado e a fração após CTI (quadro 2). Esse resultado evidencia o aumento gradual do grau de pureza das amostras com purificação de um *pool* de enzimas com atividade de xilanase.

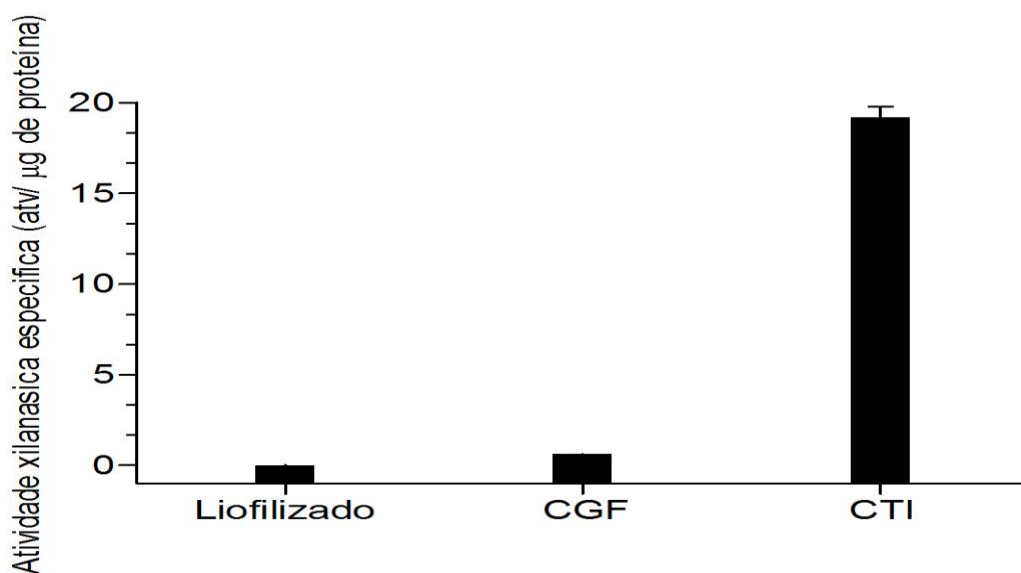


Figura 55: Experimento representativo da atividade xilanásica específica. Foram testadas amostras do extrato bruto liofilizado e frações com atividade xilanásica após as cromatografias de gel filtração (CGF) e cromatografia de troca iônica (CTI). Resultados da relação atividade por µg de proteína expressa em escala logarítmica. Volume final: 50 µl.

Amostra	Concentração (µg/µl)	Rendimento (%)	Atividade UI/ml	Atividade específica (atv/µg prot.)
Extrato bruto liofilizado	1,0	100	0,075	3×10^{-3}
Após Gel filtração	$2,93 \times 10^{-2}$	3	0,91	0,621
Após Troca iônica	$4,5 \times 10^{-3}$	0,45	4,32	19,2

Quadro 2: Rendimentos e atividades específicas após as etapas de purificação.

5.10.5. Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

A atividade enzimática é influenciada por alguns fatores como o pH e a temperatura (Duarte *et al.*, 2012). Para fins comparativos, as atividades xilanásicas das frações provenientes da cromatografia de troca aniônica foram avaliadas em diferentes pH e temperaturas, conforme protocolo descrito por Siqueira *et al.*, 2010a.

Como ilustrado na Figura 56, a atividade de xilanase das frações após a cromatografia de troca aniônica foi avaliada em diferentes valores de pH. Observa-se que a maior atividade enzimática (3,01 UI/ml) foi encontrada no pH=4,0, seguido dos pH=5,0 (2,8 UI/ml); 6,0 (2,02

UI/ml) e 7,0 (1,33 UI/ml). Em contrapartida em pH=3,0 (0,2 UI/ml) e em pH básico 8,0 e 9,0 (0,31 e 0,02 UI/ml respectivamente), as frações apresentaram atividades muito inferiores.

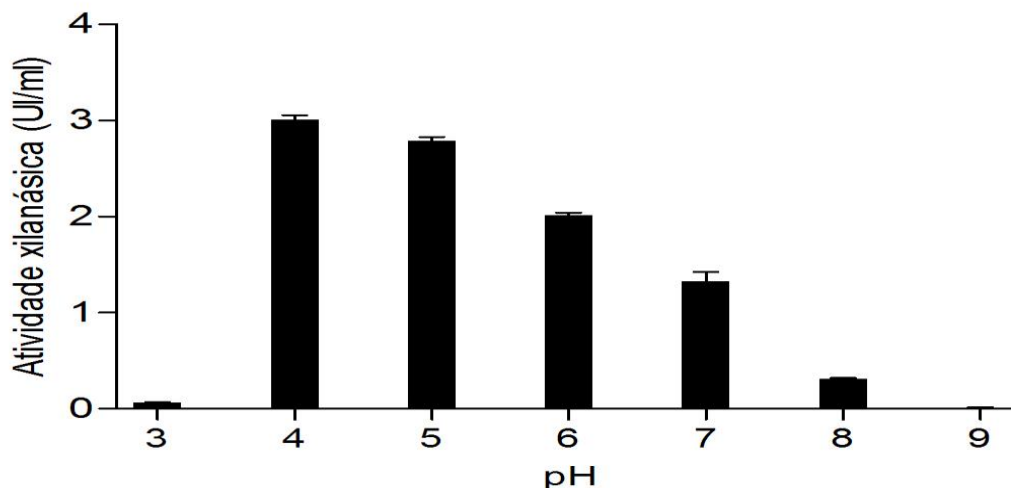


Figura 56: Experimento representativo da atividade de xilanase em diferentes pH. As frações contendo as xilanases foram pré incubadas em diferentes pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0. Condições: tempo de incubação: 30 minutos; temperatura: 50 °C; Tampões: acetato de sódio 50 mM pH 3,0-6,0; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e Tris-HCl 50 mM pH 8,0; 9,0. Comprimento de onda: 540 nm. Volume final de incubação: 150 µL. Para cada pH foram realizados experimentos em triplicata.

A atividade enzimática das frações após a cromatografia de troca aniônica também foi testada em diferentes temperaturas (30 a 80°C) a pH=4,0 como ilustrado na Figura 57. Observa-se que a maior atividade enzimática (4,32 UI/ml) foi encontrada a 50°C, seguido das temperaturas 40°C (3,62 UI/ml) e 30 °C (2,33 UI/ml). Na temperatura de 80°C, a amostra, contendo as xilanases, perdeu aproximadamente 95% da atividade.

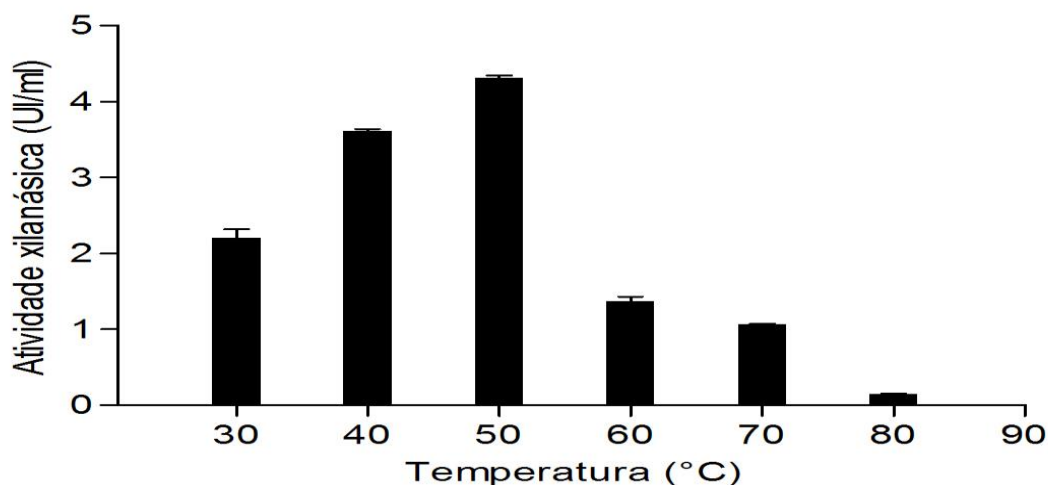


Figura 57: Experimento representativo da atividade xilanásica em diferentes temperaturas em pH=4,0. As frações contendo as xilanases foram pré incubadas em diferentes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Condições: tempo de incubação:30 minutos; solução de incubação: acetato de sódio 50 mM pH 4,0; Comprimento de onda: 540 nm; Volume final de incubação: 150 µL. Para cada temperatura foram realizados experimentos em triplicata.

Os testes de termorresistência também foram estimados. Este serviu para testar a viabilidade do complexo enzima-substrato (xilanase-xilana). A fração após cromatografia de troca iônica, contendo a enzima xilanase, foi analisada com seu substrato e esse complexo foi submetido a diferentes temperaturas. Os resultados estão apresentados na Figura 58.

Observa-se que o complexo manteve-se estável nas temperaturas 40 e 50°C e perdeu quase 100% da atividade a 80°C.

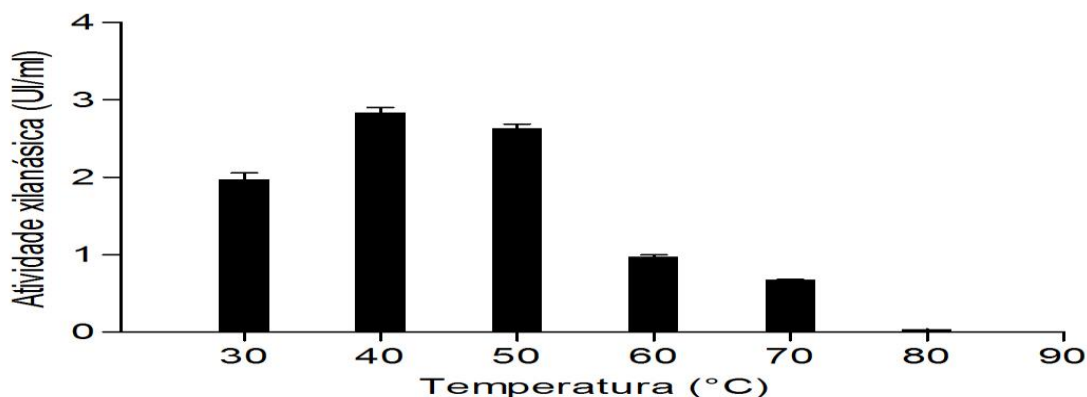


Figura 58: Experimento representativo da atividade de xilanase em diferentes temperaturas em pH=4,0 do complexo enzima-substrato. As frações contendo as xilanases foram submetidas ao ensaio enzimático e após pré incubadas em diferentes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Condições: tempo de incubação: 30 minutos; solução de incubação: acetato de sódio 50 mM pH 4,0; Comprimento de onda: 540 nm; Volume final de incubação: 150 µL. Para cada temperatura foram realizados experimentos em triplicata.

5.10.6 Caracterização estrutural das xilanases do extrato do fungo *P. simplicissimum*

Na tentativa de determinar a estrutura primária das xilanases presentes no extrato do fungo *P. simplicissimum*, realizaram-se várias tentativas de purificação das isoformas proteicas em diferentes colunas de troca iônica. Devido ao insucesso desses procedimentos e a complexidade molecular desse extrato, realizou-se então, uma clivagem enzimática com tripsina das xilanases presentes na fração proteica proveniente da cromatografia de troca aniônica. Os produtos da clivagem foram, então, aplicados a uma coluna de fase reversa. O perfil cromatográfico está apresentado na Figura 59 na qual observa-se a presença de várias frações com intensidade de absorvância a 280 nm menores que 25 mAU e uma fração principal com absorvância acima de 125 mAU. Todas as frações foram analisadas por espectrometria de massas em equipamento MALDI-TOF-TOF, mas não obtivemos sucesso na visualização desses produtos trípticos. Acredita-se que isso ocorreu devido ao fato da concentração proteica nesse passo ser insuficiente para a visualização, além da característica da amostra que pode apresentar uma baixa ionização nessas condições experimentais.

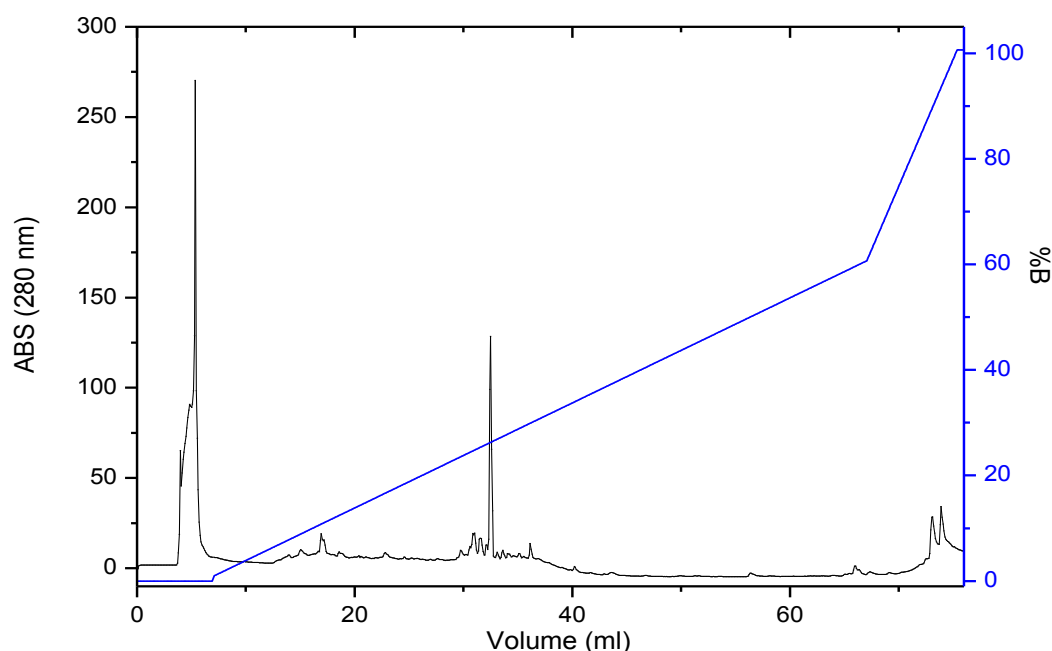


Figura 59: Cromatografia de fase reversa das frações com atividade xilanásica provenientes da cromatografia de troca aniônica após tripsinólise. Coluna: Discovery® BIO Wide Pore C8 (25 cm x 4.6mm, 5µm; 4,2 ml). Soluções: A) 0,1% de TFA em água Milli-Q®. B) 0,1% TFA em ACN. Fluxo: 1 ml/min. Absorvância: 214 nm.

Em outra estratégia, realizou-se uma cromatografia de fase reversa utilizando-se agora as frações provenientes do primeiro passo cromatográfico em cromatografia de gel filtração (Figura 60a). Todas as frações que apresentaram absorvância acima de 150 mAU foram analisadas por espectrometria de massas. Na Figura 60b, a fração destacada foi a que apresentou uma melhor resolução após as análises por espectrometria de massas e o espectro está apresentado na Figura 61.

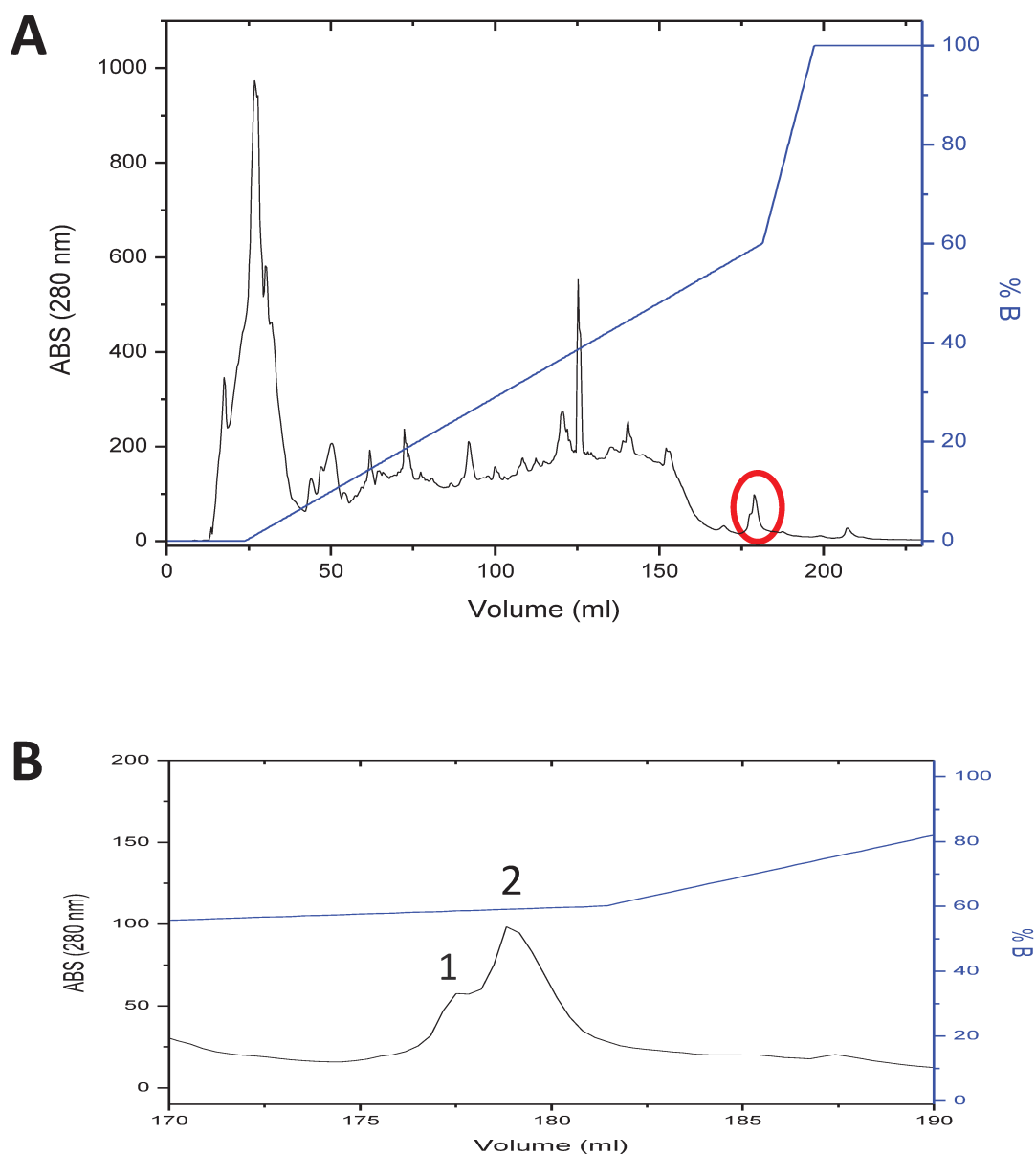


Figura 60: Cromatografia de fase reversa das frações com atividade xilanásica provenientes da cromatografia de gel filtração. A) Perfil total da cromatografia. B) Destaque da região circulada. Coluna: Discovery® BIO Wide Pore C18 (25 cm x 10mm, 5µm; 19,4 ml). Soluções: A) 0,1% de TFA em água Milli-Q®. B) 0,1% TFA em ACN. Fluxo: 1 ml/min.

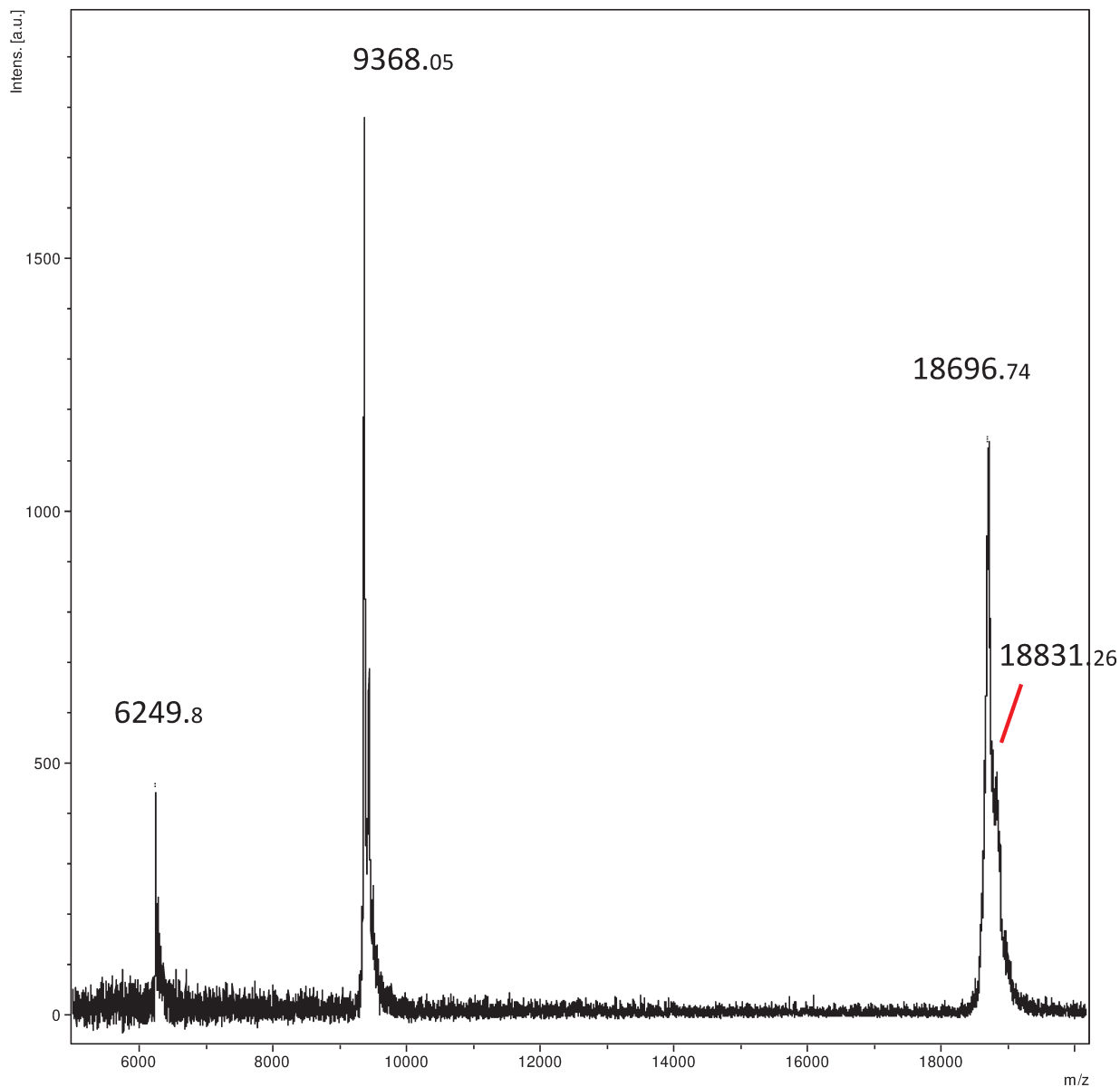


Figura 61: Espectrometria de massas: análises foram realizadas em MALDI TOF/TOF MS, aparelho Ultraflex II com o programa FlexControl 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros de MS foram obtidos em modo positivo/linear, com a frequência do laser ajustada em 50Hz. Os dados foram analisados através do programa Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Alemanha).

6. DISCUSSÃO

A conversão efetiva do material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis através da hidrólise enzimática requer, geralmente, a realização de um pré-tratamento, uma vez que a presença da lignina e da hemicelulose dificultam o acesso das enzimas, reduzindo a eficiência da hidrólise (Mosier *et al.*, 2004). O pré-tratamento visa, além do rompimento das estruturas da lignina e da hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade do material (Mosier *et al.*, 2004). A redução de tamanho das partículas das matérias-primas (moagem, corte ou trituração) e o pré-tratamento são necessários antes da transformação enzimática (Viikari *et al.*, 2012).

Após o pré-tratamento, o meio de cultivo adequado e escolhido para a ação enzimática fúngica sobre os substratos lignocelulósicos foi a fermentação submersa. De acordo com Verniz *et al.* (2012), a principal característica da fermentação submersa é a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis e insolúveis. O processo de fermentação submersa é utilizado para cultivos em grande escala, porque proporciona a homogeneidade do meio, além de facilidade no controle de parâmetros como pH e temperatura.

Outro fator, além do tamanho das partículas, que altera a atividade enzimática é a morfologia vegetal. As inúmeras espécies de plantas possuem morfologias diferentes. A proporção dos principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) também difere de planta para planta (Oliveira *et al.*, 2006). A presença de lignina no substrato tem também um efeito inibitório sobre as enzimas envolvidas na hidrólise. Berlin *et al.* (2006) descobriram que as celulasas, xilanases e β -glicosidases são inibidas por substratos ricos em lignina, com a β -glicosidase sendo o menos afetado. Dos substratos analisados nessa tese, o maior percentual de lignina foi encontrado no substrato da linhaça (14,8%) (quadro 1). Isso não afetou a atividade de endoglicanase, de xilanase e de pectinase do fungo *P. simplicissimum*, nas condições experimentais utilizadas, pois as respectivas atividades enzimáticas foram relevantes (Figuras 10, 18 e 20).

Dos diferentes substratos lignocelulósicos avaliados nesse presente trabalho, apenas a linhaça mostrou valores de holocelulose (63%) (quadro 1) comparáveis aos da literatura. Em trabalho realizado por Holtz *et al.* (2007), os resíduos provenientes do beneficiamento de algodão na indústria têxtil utilizados como nutrientes para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*

DSM 1833 apresentaram teores de holocelulose em torno de 71,5%. Em outro trabalho realizado por Zambom *et al.* (2001), a casca de soja apresentou o teor de holocelulose de aproximadamente 60% e no estudo feito por Duarte *et al.* (2012), o resíduo não tratado de algodão sujo mostrou uma concentração de 75,5%.

Mesmo com uma das mais baixas concentrações de celulose dos substratos lignocelulósicos analisados nesse estudo (quadro 1), o substrato do pinhão-manso a 1%, apresentando apenas 6,1% de celulose, proporcionou a atividade mais relevante de endoglicanase no fungo *P. corylophilum* (0,203 UI/ml) e a segunda no *P. simplicissimum* (0,136 UI/ml), mostradas nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Siqueira *et al.* (2010d) utilizaram os resíduos do milho, do algodão e da cana-de-açúcar como substratos lignocelulósicos a 5% por 120 horas. O teor de celulose foi de 75,9%, 65,7% e 34,6%, respectivamente. A atividade de endoglicanase obtida pelo *Agaricus brasiliensis* no resíduo da cana foi 0,142 UI/ml. Nossos resultados mostram que a atividade de endoglicanase no pinhão-manso foi obtida em uma concentração de substrato lignocelulósico e de celulose bem menores àquela apresentada por Siqueira *et al.* (2010d), corroborando com uma indução enzimática em uma menor concentração de substrato. Esse é um dos preceitos da biotecnologia para a produção de energia onde se busca uma menor quantidade de biomassa (substrato lignocelulósico) para a produção de enzimas fúngicas, evidenciando uma maior capacidade de biocatálise. No trabalho desenvolvido por Duarte *et al.* (2012), a atividade de endoglicanase de *Aspergillus oryzae*, cultivado em resíduo de algodão a 1% por 6 dias, foi de 0,095 UI/ml.

A atividade de endoglicanase do fungo *P. corylophilum* (Figura 24) foi influenciada positivamente pelo acréscimo de caseína e de NaNO₃ tanto na linhaça (tabela 1) como no pinhão-manso (tabela 5). No entanto, os resultados mais expressivos de aumento de atividade enzimática foram encontradas no NH₄Cl e no (NH₄)₂SO₄ com 22 e 32% respectivamente, tendo a linhaça (tabela 1) como fonte de carbono durante todo o tempo de análise. Para o fungo *P. simplicissimum*, tanto na linhaça (tabela 3 e Figura 31) como no pinhão-manso (tabela 7 e Figura 45), a adição de caseína produziu um aumento da atividade de endoglicanase. Quando o NH₄Cl foi utilizado apenas com a linhaça (tabela 3), esse fungo aumentou a produção de endoglicanase. No estudo realizado por Gaspar Júnior *et al.* (2011), a adição de caseína não apresentou efeito significativo sobre o crescimento micelial. De acordo com Eguchi *et al.* (1995), a adição de caseína foi importante para a formação do corpo de frutificação de *Agaricus brasiliensis*.

Cada catálise enzimática feita por uma endoglicanase resulta em novos sítios para as exoglicanases, refletindo o sinergismo do complexo celulolítico (Ogeda & Petri, 2010). Na atividade de exoglicanase para a maioria dos substratos ponderados e em ambos os fungos estudados, houve uma diminuição da atividade enzimática após 72 horas de cultivo (Figuras 11 e 12), refletindo possivelmente a diminuição das extremidades microcristalinas reductoras e não reductoras. Como controle, foi utilizada a atividade da celulose microcristalina que é o substrato específico da exoglicanase. Como resultados, no *P. corylophilum* (Figura 11), vários resíduos (tremoço, linhaça, girassol, cártamo e algodão) obtiveram valores superiores aos da celulose microcristalina enquanto que no *P. simplicissimum* (Figura 12), foram a mamona, o algodão, o crambe e o cártamo. No sinergismo exo-endo, as endoglicanases fornecem novos sítios para o ataque das exoglicanases de acordo com Lynd *et al.* (2002). Nesse presente trabalho, esse sinergismo foi observado discretamente apenas nos resíduos do girassol e da linhaça para *P. corylophilum* (Figura 11) e no algodão, na mamona e no cártamo para o *P. simplicissimum* (Figura 12).

Observa-se que o substrato da celulose microcristalina proporcionou um aumento bem mais evidente da atividade de exoglicanase (Figuras 11 e 12) do que a apresentada pela endoglicanase (Figuras 9 e 10) em ambos os fungos analisados. Isso pode ser explicado devido ao fato da celulose microcristalina ser o substrato específico para a exoglicanase. As principais atividades de exoglicanase foram observadas no fungo *P. simplicissimum* (Figura 12) e ocorreram com os substratos do cártamo (0,047 UI/ml) e do crambe (0,046 UI/ml) após 120 horas de análise. Com o substrato da soja, a atividade mais relevante (0,048 UI/ml) foi encontrada com apenas 24 horas de cultivo. Atividades elevadas de exoglicanases em um tempo curto de reação são extremamente importantes e significativamente relevantes para a indústria de biocombustíveis por ocasionarem uma degradação mais rápida das extremidades da molécula de celulose. De acordo com Dermibas & Dermibas (2007), isso resulta em uma liberação mais efetiva de celobiose para a ação enzimática das β -glicosidases, com conseqüente liberação das moléculas de glicose para a fermentação. Somente a triptona e o NaNO_3 , cultivadas na linhaça nas primeiras horas de cultivo (Figura 25 e tabela 1), conseguiram influenciar a atividade de exoglicanase do *P. corylophilum*. Já a adição de caseína e de NH_4Cl , acrescido de extrato de levedura, no substrato do pinhão-manso, influenciaram essa mesma atividade enzimática a partir de 48 horas de cultivo (tabela 5 e Figura 39).

As atividades enzimáticas de exoglicanases, observadas também em um trabalho utilizando extratos brutos de *A. nainiana*, *A. awamori* e *Trichoderma reesei* RUT C30 na hidrólise do bagaço da cana, foram respectivamente 0,05, 0,10 e 0,21 UI/ml após sete dias de inoculação (Siqueira, 2010a). Esse mesmo autor, ao estudar as atividades de holocelulases de *Aspergillus flavus* crescido em meio líquido por 7 dias a 28°C (pH= 7,0) em diferentes fontes de carbono a 1%, observou uma atividade enzimática máxima de exoglicanase (0,07 UI/ml) no resíduo do algodão e uma possível explicação para essa atividade é a maior concentração de celulose (65,7%). A atividade de exoglicanase, obtida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, foi de 0,009 UI/ml no trabalho realizado por Duarte *et al.*, 2012. No ensaio realizado por Siqueira *et al.* (2010d), a atividade de exoglicanase (0,19 UI/ml) para o fungo *Aspergillus flavus* foi em meio líquido com 5% no engaço da bananeira por 120 horas de cultivo. Desta forma, o aumento da concentração do substrato pode ser um fator importante para o acréscimo da atividade de exoglicanase.

As celulases atuam de maneira sinérgica, evidenciando que a atividade das enzimas que trabalham em conjunto é mais elevada do que a soma das suas atividades individuais (Van Dyk & Pletschke, 2012). A atividade de FPase demonstra essa ação integrada celulolítica total. A atividade mais expressiva de FPase tanto para o *Penicillium corylophilum* como para o *P. simplicissimum* (Figuras 13 e 14) foi conseguida no resíduo do crambe (0,113 UI/ml e 0,109 UI/ml respectivamente) apesar da baixa concentração de celulose (10,2%) e também apesar da alta concentração de lignina (10,8%). Isto justifica-se possivelmente pela medida da atuação das enzimas do complexo celulolítico (exo e endoglicanases) que apresentam melhores resultados quando analisadas conjuntamente (FPase). Quando testadas isoladamente, essas enzimas apresentaram resultados mais baixos. Esse foi o caso do substrato do crambe em ambos os fungos estudados que não demonstraram atividades relevantes das celulases (exo e endoglicanases) nos seus substratos específicos (celulose microcristalina e carboximetilcelulose, respectivamente). Além disso, para o *Penicillium corylophilum*, a alta atividade de endoglicanase (Figura 9), observada nos resíduos do pinhão-manso (0,203 UI/ml) e do niger (0,187 UI/ml), pode ter contribuído para o aumento das suas respectivas atividades de FPase (0,093 UI/ml e 0,098 UI/ml). Com 72 horas de cultivo, o aumento da atividade de endoglicanase também parece ter proporcionado um aumento da atividade de FPase no substrato do crambe. A atividade mais expressiva de exoglicanase nos resíduos do tremoço e na linhaça não refletiram no aumento da FPase nesse fungo.

Ao contrário, para o *P. simplicissimum*, o aumento da atividade de endoglicanase (Figura 10) no resíduo do pinhão (0,136 UI/ml) não contribuiu para o aumento da sua atividade de FPase (0,026 UI/ml). Apenas a atividade de exoglicanase no substrato do crambe (0,047 UI/ml) corroborou com o aumento da sua atividade de FPase (0,113 UI/ml). Isso também contraria os dados encontrados para o *Penicillium corylophilum* pois, para esse fungo, a maior contribuição para o aumento da atividade de FPase veio da endoglicanase. Siqueira *et al.* (2010a) também observaram essa relação entre as atividades de endoglicanase (0,19 UI/ml) e de FPase (0,06 UI/ml) de *Aspergillus flavus* em todos os substratos analisados. A atividade de FPase de *Aspergillus oryzae*, avaliado por Duarte *et al.* (2012), foi de 0,081 UI/ml.

Com relação à suplementação das fontes de nitrogênio nos meios de cultivo, observou-se também uma relação entre o aumento das atividades de FPase e de endoglicanase. A atividade celulásica total, FPase, produzida pelo *P. corylophilum* (tabela 1 e Figura 26), só ocorreu quando houve uma elevação da atividade de endoglicanase provocada pela adição de NaNO₃ e de NH₄Cl na linhaça. A ação sinérgica de celulases e enzimas acessórias é um fator fundamental da hidrólise enzimática (Viikari *et al.*, 2012). Isso mostra uma correlação direta entre ambas já que esses substratos não inibiram e nem aumentaram a atividade de exoglicanase. No mecanismo sinérgico exo-endo, as endoglicanases clivam randomicamente cadeias na superfície da celulose, fornecendo assim numerosos sítios adicionais para ataque das celobio-hidrolases (exoglicanases). Logo, cada evento hidrolítico catalisado por uma endoglicanase resulta em novos sítios para as celobio-hidrolases (Ogeda & Petri, 2010). A maioria dos micro-organismos celulolíticos apresentam atividade de endoglicanase mas nem sempre apresentam de exoglicanase, e portanto, a atividade de FPase é um diferencial (Bhat, 2000).

A adição de fontes de nitrogênio mostrou que a atividade celulásica total (FPase), produzida pelo *P. simplicissimum*, aconteceu apenas quando foi cultivado no pinhão-mansinho (tabela 7 e Figura 47) na presença dos substratos: NaNO₃ acrescido de extrato de levedura, peptona com extrato de levedura e NH₄Cl. Dentro desse contexto, não houve um consequente aumento da atividade de endoglicanase e/ou de exoglicanase. Isso reflete a ação observada apenas no ensaio da FPase pois o fungo aumentou a atividade total, sem concomitantemente aumentar a ação das outras celulases (exo e endoglicanases) isoladamente nos seus respectivos substratos específicos. Houve uma potencialização de esforços enzimáticos para uma melhor degradação da celulose presente no substrato específico (papel de Whatman n°1) que

possibilitou a observação da atividade celulásica total. De acordo com Van Dyk & Pletschke (2012), se nenhuma sinergia é encontrada, não significa que uma enzima não é necessária para a hidrólise de um substrato, uma vez que podem ser necessários para a degradação total do substrato. Provavelmente indica que as enzimas não precisam cooperar a fim para fazer isso e, portanto, trabalham de forma independente.

A hidrólise completa de polímeros de celulose requer a ação coordenada de todas as celulasas como a β -glicosidase que é necessária para hidrolisar oligômeros pequenos em monômeros (Maijala *et al.*, 2012). Apesar da β -glicosidase não atuar diretamente na celulose, ela é considerada como componente do sistema celulase por causa do estímulo à hidrólise de celulose (Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000). Nesta tese, a atividade expressiva de β -glicosidase do *Penicillium simplicissimum* foi observada no substrato da soja (0,684 UI/ml) e cártamo (0,632 UI/ml) desde as primeiras vinte e quatro horas até o final do cultivo (Figura 16). Uma possível explicação para as atividades de β -glicosidase seria a presença de sólidos solúveis (carboidratos) nos substratos analisados. Os sólidos solúveis podem ser os monossacarídeos (glicose e frutose), além dos dissacarídeos (sacarose, lactose, galactose, maltose, celobiose) presentes nas paredes celulares vegetais. Os dados do quadro 1 mostram os resultados da porcentagem de açúcares totais presentes nos resíduos lignocelulósicos. Observa-se que essa concentração é baixa no algodão (4,3%) e no cártamo (3,6%) embora esteja presente em maior quantidade na soja (12%) o que justifica a atividade significativa de β -glicosidase nesse substrato. Por outro lado, a concentração desses açúcares no pinhão-manso (2,6%) é a menor dentre os substratos analisados e sua atividade foi a maior tanto no *Penicillium simplicissimum* (0,776 UI/ml) (Figura 16) como no *P. corylophilum* (1,00 UI/ml) (Figura 15). Além disso, as análises enzimáticas feitas nesses mesmos substratos (algodão, cártamo e soja) pelo *P. corylophilum* (Figura 15) não mostraram essa atividade enzimática inicial. Substratos que possuem uma concentração maior desses açúcares como o tremço (13,5%) e o nabo forrageiro (21,7%) não apresentaram uma atividade significativa de β -glicosidase em nenhum dos fungos estudados.

A literatura sugere que a indução de β -glicosidase requer condições operacionais específicas e o farelo de trigo, principalmente devido a sua composição mineral, favorece a indução dessa enzima no meio de fermentação (Camassola & Dillon, 2007). No presente estudo, o substrato do pinhão-manso também parece exercer esse papel indutor pois apresentou as melhores atividades enzimáticas em ambos os fungos estudados. Observa-se ainda uma

correlação direta das elevadas atividades tanto de endoglicanase como de β -glicosidase dos fungos estudados nesse substrato, exemplificando o sinergismo do complexo celulolítico. É descrito que uma vez que o acúmulo de celobiose pode conduzir à inibição da atividade catalítica de endo e exoglicanase, as β -glicosidases desempenham um papel crítico na inibição deste passo limitante da velocidade do processo celulolítico (Jabbour *et al.*, 2012).

Ressalta-se ainda uma relevante atividade enzimática de β -glicosidase do fungo *Penicillium simplicissimum* nas primeiras vinte e quatro horas de análise (Figura 12) nos resíduos do algodão (0,311 UI/ml), cártamo (0,327 UI/ml) e soja (0,301 UI/ml). Esses dados podem se correlacionar com as atividades de exoglicanase iniciais (também em 24 horas) nesses mesmos substratos, fornecendo as moléculas de celobiose como substratos específicos para a atuação da β -glicosidase como também mencionado por Meinke *et al.* (1995). Atividades de β -glicosidase foram observadas nos extratos brutos de *A. nainiana*, *A. awamori* e *Trichoderma reesei* RUT C30, utilizados na hidrólise do bagaço da cana, e obtiveram respectivamente 0,05, 0,10 e 0,10 UI/ml (Siqueira, 2010a).

A ampliação dos resultados enzimáticos de β -glicosidase do *P. corylophilum* foi discreta. Os principais substratos responsáveis por esse acréscimo foram o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na linhaça (tabela 1 e figura 27) e a adição de peptona ao NaNO_3 no pinhão-manso (tabela 5 e Figura 41) após 168 horas de inoculação. O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi o substrato que mais alterou a capacidade enzimática do *P. simplicissimum*. No caso da β -glicosidase, os melhores resultados foram obtidos quando essa fonte de nitrogênio foi adicionada isoladamente no pinhão-manso, ao passo que, na linhaça, a ampliação dessa atividade enzimática só foi obtida quando foi acrescido peptona ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. No estudo realizado por Joo *et al.*, 2009, várias fontes de nitrogênio foram testadas para avaliar a produção de β -glicosidase pelo fungo *Fomitopsis pinicola*. Ureia e extrato de levedura obtiveram os resultados mais expressivos. Em todas as tabelas apresentadas nesta tese, a adição de ureia e de extrato de levedura ao meio de cultivo não provocou nenhuma alteração nas enzimas avaliadas.

Outras enzimas componentes do sistema celulolítico são as xilanases que facilitam o acesso das celulases à celulose pelo rompimento das ligações cruzadas entre a hemicelulose e a celulose nas paredes celulares vegetais. Atividades expressivas de xilanase do *Penicillium simplicissimum* (Figura 20) foram observadas no resíduo do algodão (0,984 UI/ml), da mamona (0,827 UI/ml) e da soja (0,792 UI/ml). A atividade enzimática mais relevante desse fungo foi

encontrada no resíduo da linhaça (3,87 UI/ml e 3,97 UI/ml), cultivados em 72 e 120 horas, respectivamente. No *P. corylophilum*, as principais atividades (Figura 17) foram encontradas no algodão (0,959 UI/ml) e no tremoço (0,953 UI/ml). A atividade pouco expressiva da xilanase produzida pelo fungo *P. corylophilum*, quando cultivado na mamona, pode ser explicada pela baixa concentração de hemicelulose com apenas 3,1%, sendo o substrato lignocelulósico com a menor quantidade desse complexo dentre todos os substratos analisados.

Nossos resultados demonstram que o sinergismo xilanase/endoglicanase foi produzido apenas pelo *P. simplicissimum* e observado exclusivamente no substrato da linhaça após 120 horas de cultivo (Figura 18). A interação sinérgica das xilanas e celulases melhora significativamente a acessibilidade de celulose, principalmente através do aumento da porosidade, sendo que o efeito de bloqueio provocado pelas moléculas de xilana é um dos principais mecanismos que limitam o acesso das celulases para a celulose (Hu *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2011) mostraram que a adição de xilanase poderia aumentar significativamente a atividade da celulase. Segundo esse mesmo autor, a hidrólise de celulose ocorre mais rapidamente, uma vez que a adição de xilanase remove a barreira de hemicelulose, que por sua vez expõe mais as cadeias de celulose, permitindo assim uma maior acessibilidade às cadeias de celulose. Siqueira *et al.* (2010a) observaram que as maiores atividades de xilanase (1,22 UI/ml) e de endoglicanase (0,19 UI/ml) de *Aspergillus flavus*, ocorreram no cultivo do bagaço da cana a 1%, dentre todos os substratos testados. Isso pode ser explicado pelo fato da presença de xilanas no complexo enzimático ser de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal como alegado por Santos (2012).

Dos trinta e oito resíduos lignocelulósicos apresentados por Sánchez (2009), os índices de hemicelulose apenas das folhas em geral (80-85%), da grama de pomar (40%) e da polpa do café (43,6%) mostraram concentrações comparáveis aos dos resultados encontrados na linhaça (46,3%) que apresentamos nesse estudo. Além da maior concentração de hemicelulose a linhaça apresentou também a maior atividade enzimática de xilanase (3,97 UI/ml). Badhan *et al.* (2007) observaram resultados similares em que a palha de trigo foi a melhor indutora da produção de xilanase entre os materiais lignocelulósicos, provavelmente por causa do elevado teor de hemicelulose (50%).

Siqueira (2010a) estudou também as atividades de holocelulases de *Aspergillus flavus* e a atividade de xilanase foi mais significativa (1,22 UI/ml) no cultivo com bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados dos resíduos

agroindustriais do piolho-de-algodão-sujo e do engaço de bananeira também foram representativos (0,69 e 0,51 UI/ml, respectivamente) enquanto que para celulose microcristalina, os valores não foram significativos quando comparados com as demais fontes de carbono. Dessa maneira, esse autor concluiu que a celulose não induziu o fungo a produzir xilanase. Nas análises bromatológicas desse autor, a alta atividade de xilanase pode ser explicada pelo bagaço de cana possuir a maior concentração de hemicelulose (16,2 %). Duarte *et al.* (2012), trabalhando com o fungo *Aspergillus oryzae*, observou que a atividade de xilanase de 0,488 UI/ml.

Os resultados obtidos durante esse trabalho sugerem que a utilização da biomassa lignocelulósica, a partir de resíduos agro-industriais, aumenta a produção de xilanases, o que corrobora com aqueles apresentados por Siqueira *et al.* (2010c) e Duarte *et al.* (2012). Embora esses autores tenham trabalhado com bagaço de cana, talos de bananeira e algodão sujo para o cultivo de vários fungos, observa-se que o resíduo da linhaça também pode ser utilizado para produzir uma grande quantidade dessa enzima. A utilização de resíduos agrícolas abundantes e de baixo custo como substratos para a produção de xilanase reduz substancialmente os custos de produção dessa enzima (Murthy & Naidu, 2010; Duarte *et al.*, 2012). Desde que o custo do substrato desempenhe um papel crucial na economia do processo de produção de xilanase, a xilana pura não é adequada para os processos de produção em larga escala, devido ao seu elevado custo. Recentemente, vários substratos mais viáveis financeiramente, materiais lignocelulósicos, principalmente insolúveis, tais como casca de cevada, sabugo de milho, feno, farelo de trigo ou de palha, vem sendo utilizados por vários pesquisadores (Oliveira *et al.*, 2006). Dessa forma, os materiais utilizados durante nosso trabalho inserem-se nesta conjuntura de aproveitamento de substratos lignocelulósicos nos quais o fungo *P. simplicissimum*, cultivado na linhaça, obteve um resultado bastante expressivo.

No estudo realizado por Romanowska *et al.* (2006) e por Bakri *et al.* (2010), vários substratos na concentração de 1% foram testados como fontes indutoras de xilanase. A xilana *beechwood* foi a pior fonte indutora, sendo inclusive menor que a celulose microcristalina. Através dos resultados desta tese, em todas as concentrações testadas e em ambos os fungos utilizados, a xilana *beechwood* conseguiu a maior indução enzimática dentre todos os substratos analisados, inclusive a celulose microcristalina (Figuras 22 e 23).

Bakri *et al.* (2003) observaram que o maior efeito enzimático de xilanase foi observado na concentração de 0,4% de xilana pelo fungo *P. canescens* no meio de cultivo com palha de trigo a 5%. A adição de pequenas quantidades de xilana purificada em

cada substrato lignocelulósico complexo analisado foi considerado vantajoso e aumentou consideravelmente a produção de xilanase, uma vez que xilana e os seus derivados têm um papel importante como indutor da formação de xilanase. Os dados deste presente estudo corroboram com os resultados do trabalho realizado por Bakri e colaboradores pois a menor concentração de xilana (0,5%) também mostrou uma atividade maior de xilanase para ambos os fungos testados.

A hidrólise enzimática pode ser afetada por diversos fatores como a concentração de substrato. Um aumento na concentração do substrato pode resultar em um aumento no rendimento e na taxa de hidrólise quando esse substrato encontra-se em níveis baixos. No entanto, altas concentrações de substrato podem causar uma inibição, diminuindo a taxa de hidrólise (Cheung & Anderson, 1997). Diante disso e de acordo com os dados obtidos durante esse trabalho, o aumento da concentração de xilana para 2% causou uma inibição da atividade enzimática, o que proporcionou a diminuição da atividade de xilanase, como observado nas Figuras 22 e 23.

A xilose tem sido descrita como uma boa fonte de carbono e possui um efeito indutor na produção de xilanase por vários micro-organismos como *Thermomyces lanuginosus* (Purkarthofer *et al.*, 1993). A produção de xilanase pelo fungo *P. canescens* em cultura submersa aumentou na presença de concentrações de 2% de xilose. Nas concentrações de 4 a 10%, provocou uma redução na produção de xilanase (Bakri *et al.*, 2003). O efeito da concentração de xilose na produção de xilanase sob condições fermentativas sólidas a 30° C, pH=6,0, utilizando *Aspergillus tubingensis* JP-1 com palha de trigo como substrato, também foi avaliado por Pandya & Gupte (2012). Na faixa examinada de 0,1-1,0%, a concentração ótima de xilose foi de 0,5%, o que sugeriu um efeito indutor. Como a produção de xilanase diminuiu com concentrações inferiores e superiores a 0,5%, isso indica a presença de fenômenos de repressão como uma concentração de xilose excedente a ótima. Gessesse & Mamo (1999) relataram que a produção de xilanase é fortemente reprimida pela xilose em concentrações acima de 1%. A noção comum é que a xilose a baixas concentrações atua como um indutor e em concentrações mais elevadas como uma fonte de carbono repressora (Aro *et al.*, 2005). No presente trabalho, observou-se que 0,04% de xilose já foi suficiente para incrementar o aumento da atividade de xilanase (0,492 UI/ml) pelo *P. simplicissimum* (Figura 22). Em contrapartida, no estudo conduzido por Bakri *et al.* (2010), 1% de xilose provocou uma atividade de xilanase de 1,82 UI/ml. Percebe-se, então, quando se compara os resultados do artigo anterior com os obtidos nesse trabalho, que mesmo numa

concentração 25 vezes menor de xilose (0,04%), houve uma indução da produção enzimática.

Arabi *et al.* (2011) analisaram a produção de xilanase por *Cochliobolus sativus* Cs6 no meio basal suplementada com açúcares a 2%: glicose, sacarose, maltose, xilose, dextrose, amido, manitol e xilana, tendo a palha de trigo como substrato lignocelulósico. Xilana e amido apresentaram os melhores resultados após 8 dias de incubação. Esses dados contradizem os obtidos para o fungo *P. corylophilum* (Figura 23) onde na concentração de 2% de xilana, houve uma diminuição acentuada da produção de xilanase em relação a 0,5% desse mesmo substrato. Além disso, o amido nas duas concentrações testadas também causou uma baixa atividade enzimática em ambos os fungos. Os dados de Arabi *et al.* (2011), entretanto, corroboram com os desse estudo com relação ao *P. simplicissimum* (Figura 22) pois a concentração de xilana a 2,0% proporcionou uma atividade de xilanase maior do que o controle do meio suplementar, confirmando o aumento dessa produção de xilanase. No entanto, há uma diminuição de 13% de atividade em relação à concentração de 0,5% de xilana. Com relação aos substratos (sacarose, maltose e glicose), ambos os fungos estudados nesta pesquisa não conseguiram aumentar a atividade de xilanase em nenhuma das concentrações testadas, contrariando os resultados obtidos acima por Arabi *et al.* (2011) e por Abdel-Sater & El-Said (2001).

A adição de celobiose (Figuras 22 e 23) não estimulou o aparecimento de uma atividade enzimática de xilanase mais significativa em nenhum fungo analisado, possivelmente por causa da concentração de celobiose ter sido bem maior (0,5 e 2,0%) que a utilizada no estudo realizado por Sun *et al.* (2008), no qual a adição de 0,05% de celobiose no meio de cultivo promoveu o aumento da atividade de xilanase. Esses autores também observaram que a presença de amido a 2% isoladamente não sustenta o crescimento micelial robusto ou não proporciona a liberação substancial de xilanas e celulasas por *P. decumbens*. Esses dados apresentados coincidem com os dessa tese na qual a concentração de 2% de amido isoladamente não promoveu o aumento da atividade de xilanase.

Observa-se ainda pela análise das Figuras 22 e 23 que a celulose microcristalina proporcionou o aumento da atividade de xilanase em ambos os fungos analisados e nas concentrações testadas de 0,5 e 2,0%. Ao contrário, a pectina foi ineficaz em incrementar a produção de xilanase nas concentrações utilizadas e nos dois fungos estudados. Em estudo realizado por Siqueira *et al.* (2010a), as atividades de xilanase dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* foram significativas nos cultivos com diversos substratos lignocelulósicos enquanto que para a celulose microcristalina, os valores não foram

significativos quando comparados com as demais fontes de carbono e desse modo, a celulose não induziu o fungo a produzir xilanase.

Com relação às fontes de nitrogênio acrescidas ao meio de cultivo, o único substrato que conseguiu alterar significativamente a atividade de xilanase do *P. corylophilum* por todo o período de estudo foi o NaNO_3 quando esse foi inoculado no substrato da linhaça após 168 horas de cultivo (tabela 2 e Figura 28). No nosso estudo, a concentração utilizada de NaNO_3 foi de 1,0% o que pode ter influenciado negativamente a ação enzimática de xilanase do *P. simplicissimum* nos dois substratos utilizados da linhaça e do pinhão-manso (tabelas 4 e 8). Bakri *et al.* (2008), demonstraram que a produção de xilanase era muito dependente de NaNO_3 e que a concentração ótima era de 0,6%. No estudo conduzido por Arabi *et al.* (2011), o aumento da quantidade de NaNO_3 provocou uma redução na esporulação de *Cochliobolus sativus*, reduzindo assim a atividade de xilanase.

Complementarmente, o acréscimo de peptona e extrato de levedura, isoladamente ou em conjunto com NaNO_3 , não promoveram o aumento da atividade de xilanase pelos fungos estudados tanto na linhaça como no pinhão-manso durante o período completo das análises (tabelas 2, 4, 6 e 8). Abdel-Sater & El-Said (2001) verificaram que NaNO_3 e peptona isoladamente foram as principais fontes de nitrogênio para a produção de xilanase por *Trichoderma harzianum*. Bakri *et al.* (2008) avaliaram o efeito do nitrato de sódio combinado com 0,5% de fontes de nitrogênio na produção de xilanase, utilizando palha de trigo como substrato. Os resultados mostraram que as combinações de peptona e extrato de levedura com o nitrato de sódio resultou num aumento da produção de xilanase após 8 dias de cultura.

Goyal *et al.* (2008)

também avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de xilanase por *Trichoderma viride* (S34) a 25 °C e pH= 4,0. As fontes de nitrogênio inorgânico foram melhores do que os orgânicos. Isto pode ser atribuído ao fato de que o fungo foi isolado a partir do solo em que o nitrogênio inorgânico é usado como adubo. Por isso, assimila as fontes inorgânicas de forma mais eficiente em comparação com os orgânicos. NaNO_3 foi a melhor fonte de nitrogênio, seguido de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ e $\text{NH}_4 \text{Cl}$. Uréia e peptona apresentaram atividades enzimáticas baixas quando comparados aos outros substratos. Os resultados deste presente trabalho concordam com Goyal *et al.* (2008), pois os fungos *P. corylophilum* e *P. simplicissimum* foram isolados do solo, o que justifica a maior facilidade em assimilar as fontes inorgânicas. Ureia e peptona, isoladamente, não obtiveram qualquer incremento na atividade

enzimática de xilanase (tabelas 4 e 6). Outra atividade expressiva de xilanase (3,76 UI/ml), obtida pelo *P. simplicissimum* no resíduo da linhaça a 1%, ocorreu com a inoculação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ acrescido de peptona com 96 horas de cultivo (tabela 4). Ao contrário do estudo feito por Bakri *et al.* (2003), a melhor fonte indutora foi uma fonte inorgânica, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em conjunto com uma fonte orgânica, peptona. Fontes orgânicas como peptona e extrato de levedura, adicionadas juntas ou isoladamente, não influenciaram positivamente a atividade da xilanase. Ao contrário do observado com o *P. canescens* que foi inoculado com a palha de trigo a 5% e por 12 dias, a fonte de carbono utilizada pelo *P. simplicissimum* foi de apenas 1% de linhaça e por 4 dias de cultivo.

Além das xilanases, mencionadas acima, as pectinases são exemplos de enzimas auxiliares que atuam sobre o substrato, liberando açúcares fermentescíveis, podendo aumentar o rendimento do bioetanol (Santos *et al.*, 2013).

De acordo com o quadro 1, tanto o algodão como a soja possuem concentrações elevadas de pectina solúvel de 61,9 mg/100g e de 56,7 mg/100g respectivamente, o que pode ser o reflexo das maiores atividades de pectinase apresentadas pelo *Penicillium corylophilum* (Figura 19). Resíduos com quantidades variáveis de pectina solúvel como tremoço (57,3 mg/100g), linhaça (139,4 mg/100g) e nabo forrageiro (1144,8 mg/100g) não obtiveram o mesmo desempenho enzimático utilizando-se esse mesmo fungo. A concentração de pectina solúvel na linhaça (139,4 mg/100g) e no algodão (61,9 mg/100g) pode ter contribuído para a elevada atividade de pectinase pelo *Penicillium simplicissimum* (Figura 20). Observa-se que as melhores atividades de endoglicanase, xilanase e pectinase produzidas pelo fungo *Penicillium simplicissimum* correlacionam-se com o resíduo de linhaça (Figuras 12, 18 e 20).

A atividade de pectinase foi investigada por Duarte *et al.* (2012) para o fungo *Aspergillus oryzae*, sendo de 0,258 UI/ml. Siqueira *et al.* (2010a) avaliaram também a produção de pectinases por *A. flavus* em meio líquido e obtiveram atividades de 1,14 UI/ml e 1,08 UI/ml quando cultivados no resíduo do algodão e no bagaço da cana, respectivamente.

Independentemente da fonte de carbono estudada (linhaça ou pinhão-mansão), a atividade de pectinase do fungo *P. corylophilum* aumentou com a adição individual de várias fontes de nitrogênio ao meio de cultura como NaNO_3 , NH_4Cl , NH_4Cl com peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com peptona e caseína (tabelas 2 e 6; Figuras 29 e 43). O substrato NH_4Cl proporcionou a maior produção de pectinase para esse fungo com 70% de

aumento de atividade na linhaça e com 100% no pinhão-mansão em 168 horas de cultivo.

Em ambos os fungos testados e nas duas fontes de carbono analisadas (linhaça e pinhão-mansão), a adição do substrato $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao meio de cultivo conseguiu aumentar a atividade da pectinase praticamente durante todo o período de execução do experimento. Quando a linhaça foi utilizada com o NH_4Cl em ambos os fungos, houve um acréscimo da produção de pectinase (tabelas 2, 4, 6 e 8).

Outras enzimas biotecnologicamente importantes na indústria do papel e da celulose são as mananases, pois essas enzimas favorecem o processo celulolítico (Puchart *et al.*, 2004). Durante esse trabalho, não observamos uma relação direta entre o resíduo da linhaça que apresentou a maior concentração de hemicelulose (46,3% no quadro 1) e a atividade enzimática de mananase nos dois fungos estudados. Para a atividade enzimática no *P. corylophilum* (Figura 21), os resíduos da soja (0,289 UI/ml) e do niger (0,289 UI/ml), que obtiveram os melhores resultados, representam apenas 14,0% e 6,6 % respectivamente de hemicelulose. A atividade mais expressiva de mananase produzida por esse fungo foi encontrada quando o NaNO_3 foi inoculado no resíduo de pinhão-mansão com 96 e 168 horas de inoculação. O substrato $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, acrescido de peptona produziu uma atividade mais discreta (tabela 6).

Duarte *et al.* (2012) também investigaram a atividade de mananase no filtrado da cultura de *Aspergillus oryzae*, sendo de 0,098 UI/ml. Além disso, no trabalho de Siqueira *et al.*, 2010a, a mananase apresentou resultados significativos quando o *A. flavus* foi cultivado no engaço de bananeira (0,26 UI/ml) e bagaço de cana-de-açúcar (0,21 UI/ml). A produção dessa enzima foi também avaliada por Siqueira *et al.* (2010d) em diferentes resíduos lignocelulósicos. A atividade enzimática mais expressiva do *A. brasiliensis* CS1 foi no resíduo do algodão a 10% (0,206 UI/ml) e para o *P. ostreatus* H1 foi no bagaço de cana (0,196 UI/ml). Mas o pico de atividade de mananase foi obtido no engaço da bananeira a 10% (0,497 UI/ml).

Após a finalização de todas as atividades enzimáticas produzidas por ambos os fungos nos respectivos substratos lignocelulósicos, a atividade de xilanase pelo *P. simplicissimum* no substrato da linhaça obteve a mais relevante atividade dentre as demais atividades analisadas com relação à literatura consultada. Diante disso, o filtrado resultante desse cultivo após 72 horas foi selecionado para os experimentos de purificação enzimática e caracterização bioquímica parcial da enzima.

Os protocolos utilizados para a purificação parcial das xilanases provenientes do extrato bruto

de *P. simplicissimum* foram realizados em três passos cromatográficos: gel filtração, troca aniônica e fase reversa. A atividade de xilanase foi investigada tanto no extrato bruto liofilizado quanto nas frações advindas dos dois primeiros passos cromatográficos. O perfil cromatográfico após gel filtração está apresentado na Figura 52 e a atividade enzimática de xilanase mais expressiva foi apresentada em duas regiões destacadas no cromatograma. A estratégia nesse trabalho de liofilizar o extrato bruto mostrou-se mais viável pela manutenção da atividade enzimática após o procedimento, pela facilidade na obtenção do liofilizado e pela concentração do extrato bruto disponibilizado inicialmente para os passos cromatográficos. Uma estratégia de ultrafiltração do extrato bruto foi realizada, mas não se mostrou satisfatória.

Um segundo procedimento cromatográfico (Figura 53) em coluna de troca aniônica utilizou as frações que apresentaram atividade de xilanase provenientes da cromatografia de gel filtração. Aqui, todas as frações foram também testadas quanto a atividade enzimática e essa atividade só foi evidente naquelas que eluíram antes do início do gradiente salino (fração única). Nesse momento, esse procedimento mostrou-se viável por ter possibilitado uma possível melhora no grau de pureza das amostras ao separar aquelas proteínas que apresentaram carga final positiva das demais negativas interagidas com a resina, nas condições experimentais utilizadas.

Diferentes

autores utilizaram protocolos semelhantes na tentativa de isolar parcialmente diversas xilanases. Siqueira *et al.* (2010b) estudaram a purificação parcial do extrato de *Aspergillus terreus*, crescido no engaço da bananeira por sete dias. As frações do extrato bruto produzidas por ultrafiltração apresentaram atividades de holocelulases (celulases, xilanases e mananases) tanto no concentrado como no ultrafiltrado, sugerindo multiplicidade enzimática. O concentrado apresentou atividade de xilanase e endoglicanase após a cromatografia de filtração em gel Sephacryl (S-400). Em outra coluna de filtração, S-200, uma fração proteica apresentou três frações com atividade de xilanase.

Em outro estudo de Siqueira *et al.* (2010a), duas frações provenientes de uma cromatografia de gel filtração em resina S-400, a partir do concentrado do extrato bruto de engaço de bananeira, foram reunidas e aplicadas em duas colunas de cromatografia de troca iônica: CM-Sepharose e Q-Sepharose. Esse procedimento foi uma tentativa de melhorar o grau de purificação das holocelulases. As enzimas eluíram da coluna CM- Sepharose (pH= 5) antes do gradiente salino, mas apresentaram ligação à coluna de Q-Sepharose (pH= 7), eluindo apenas após o início do gradiente salino.

Esses autores observaram, então, que as holocelulases de *A. flavus*, incluindo as xilanases, produzidas no engaço de bananeira e em cultivo submerso, tinham caráter catiônico semelhante ao observado também nesse presente trabalho.

De acordo com Moreira *et al.* (2008), avaliando atividades enzimáticas do extrato bruto e de frações obtidas por cromatografias de gel filtração em colunas Sephacryl S-400 e S-100, obteve-se uma multiplicidade de xilanases com atividades de 0,24 (UI/ml) no farelo de trigo, 0,35 (UI/ml) no engaço da bananeira e 0,235 (UI/ml) no bagaço da cana.

Duarte *et al.* (2012) utilizaram duas estratégias de cromatografia, gel filtração e troca aniônica, para a purificação parcial de xilanases do fungo *Aspergillus oryzae*. Na cromatografia de troca aniônica, as frações obtidas também eluíram anteriormente ao gradiente salino em pH=7,0, corroborando com os resultados observados durante o presente trabalho.

Realizaram-se também estudos da atividade xilanásica específica das frações cromatográficas. Conforme observado na Figura 55, a atividade xilanásica específica aumentou consideravelmente após os passos cromatográficos de gel filtração e troca iônica (CTI), sendo inicialmente 3×10^{-3} atv/ μg de proteína no liofilizado e 19,2 na fração proveniente da CTI. Em um estudo realizado por Duarte *et al.*, 2012, a atividade de xilanase diminuiu 18 vezes com a liofilização. Já de acordo com Siqueira *et al.* (2010a), a atividade de xilanase, produzidas pelo fungo *A. flavus* no engaço de bananeira, após uma cromatografia de gel filtração (S-400), teve uma perda de atividade de 47% em comparação com as atividades do extrato bruto. Esses autores sugerem que a queda da atividade enzimática é devida a presença de inibidores de xilanase que foram produzidos com a degradação dos materiais lignocelulósicos e podem ter sido concentrados durante o processo de liofilização.

Dois fatores são largamente descritos por interferirem nas atividades enzimáticas, o pH e a temperatura, por causarem a modificação da carga final da enzima ou uma desestruturação da estrutura tridimensional da molécula (Moreira *et al.*, 2008). A atividade enzimática de xilanase das frações provenientes da cromatografia de troca aniônica foi investigada em diferentes pH e temperaturas (Fig. 56 e 57). Nos experimentos onde ocorreu a variação do pH da solução, os resultados demonstram que as xilanases parcialmente purificadas apresentam uma melhor atividade em pH=4, com uma atividade relevante a pH=5,0 e perdendo gradativamente essa atividade em pH=6, 7, 8 e 9, como também

em pH ácido, 3, nas condições experimentais utilizadas.

Goyal *et al.* (2008) estudaram o efeito do pH sobre a produção de xilanase de *T. viride* (S34), a 25 °C, utilizando de palha de milho a 1% como fonte de carbono. De acordo com os resultados obtidos por esses autores a produção máxima ocorreu em um pH ácido (4,0), diminuindo com o aumento do pH, resultado esse que corrobora com os obtidos nesse trabalho de doutorado.

Resultados semelhantes foram obtidos em outro trabalho com um fungo denominado *Penicillium oxalicum* GZ-2. Esse extrato bruto enzimático, obtido da cultura submersa com de palha de trigo 2%, exibiu também atividade mais elevada de xilanase em pH= 4,0 e reteve mais do que 80% de atividade no intervalo entre os pH 3,0 e 5,0 (Liao *et al.*, 2012). Em trabalho de Duarte *et al.* (2012) uma xilanase produzida pelo *Aspergillus oryzae* apresentou sua maior atividade enzimática em pH=6,0 e em trabalho desenvolvido por Kansoh & Nagieb (2004), uma xilanase de *Streptomyces galbus* apresentou atividade ótima em pH=6,5 e manteve-se estável no intervalo de pH 5,0-8,0, após incubação a 4 ° C durante 1 hora, com mais de 80% da sua atividade mantida. Terrasan *et al.* (2010) também avaliaram a produção de enzimas de xilanase por *Penicillium janczewskii* em diferentes pH na cultura submersa com grão de cerveja gasto (*brewer's spent grain*) a 2% durante 7 dias a 25 °C. Os maiores níveis (15,19 UI/ml) foram observados em pH 6,0 que foram estatisticamente maiores do que os observados em outros valores de pH.

Nesse trabalho, foram realizados também testes de ensaios enzimáticos com as frações contendo xilanases após a cromatografia de troca aniônica variando-se a temperatura de incubação. Nesses observou-se que a atividade de xilanase foi maior em temperatura de 50°C. Nesses experimentos, as frações apresentaram baixa atividade enzimática de xilanase após serem incubadas a 80°C, provavelmente as enzimas desnaturaram-se completamente, ou parcialmente, sendo esse valor muito inferior quando comparada com as temperaturas de 40 e 50°C. Esses dados indicam que as enzimas testadas parecem não ter termorresistência nessa temperatura. Com esses resultados, propõe-se que esses, pH=4,0 e 50°C, sejam os parâmetros ótimos dessas enzimas nas condições experimentais testadas. O complexo enzima-substrato também foi testado quanto a sua termorresistência e esse apresentou melhor atividade a 40°C, seguido de 50 e 30°C (Figura 58), apresentando uma queda brusca de atividade a 60 e 70°C e a perda quase total a 80°C.

Outros trabalhos de diferentes pesquisadores também investigaram os diversos

comportamentos enzimáticos variando-se a temperatura. Duarte *et al.* (2012), trabalhando com uma xilanase de baixa massa molecular (21.5 kDa) parcialmente purificada e caracterizada, obteve como resultado de temperatura ótima de atuação 50 °C, conforme foi encontrado nesse trabalho. Em outro trabalho, uma enzima xilanase, produzida pelo fungo *A. niger* IBT-90 e cultivada no farelo de trigo, manteve a sua atividade na hidrólise da xilana *birchwood* na faixa de temperatura de 4-50°C, sendo que a temperatura ótima para a sua ação foi de 50°C (Romanowska *et al.*, 2006), resultado esse que corrobora com o encontrado nesse trabalho para a temperatura na qual houve uma maior atividade enzimática. Outro trabalho no qual testou-se o extrato bruto de *P. oxalicum* GZ2 contendo xilanases apresentou uma temperatura ótima de 50°C (Liao *et al.*, 2012). Nesse trabalho, a atividade enzimática foi menor que 50% entre 20 e 30°C ou acima de 70°C, mantendo-se estáveis a 50-55°C. No entanto, essa atividade foi quase toda perdida em temperaturas acima de 65°C. Complementarmente, Abdel-Sater & El-Said (2001) sugerem que os melhores resultados do efeito da temperatura para xilanases produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos estão na faixa entre 40° e 60°C. Em 2004, Kansoh & Nagieb, trabalhando com xilanases e mananases de *Streptomyces galbus* observaram que essas possuem uma atividade ótima em 40 e 50°C respectivamente. No entanto, ambas as enzimas obtiveram apreciáveis atividades acima de 60°C. Resultados semelhantes foram obtidos por Siqueira *et al.*, 2010a, no qual a melhor atividade para xilanase do fungo *A. flavus* no substrato bagaço de cana foi na faixa de temperatura entre 50° e 60°C. No entanto, a atividade de xilanase no engaço de bananeira mostrou os melhores resultados em ampla faixa de temperatura, mantendo-se praticamente estável entre 40°-70°C na amostra de extrato bruto, enquanto essa atividade em frações provenientes de cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-400) foi entre 40° e 55°C.

De acordo com Kulkarni *et al.* (1999), a temperatura ótima para as xilanases de fontes bacterianas e fúngicas varia entre 40 e 60°C. Resultados completamente diferentes foram relatados para xilanases isolada do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, no qual a enzima mantém-se estável entre 40 e 85°C com seu nível ótimo atrelado a 80 °C.

Na tentativa de determinação da estrutura primária total ou parcial das xilanases presentes nesse substrato realizou-se clivagem da fração proveniente da cromatografia de troca aniônica com a enzima tripsina e a purificação desses fragmentos em cromatografia de fase reversa (Figura 59). Esse protocolo não se mostrou satisfatório acredita-se que pela baixíssima

quantidade de amostra recuperada após a cromatografia, impossibilitando as análises de sequência por degradação de Edman e espectrometria de massas.

Outra tentativa de visualização e determinação da massa molecular da xilanases foi feita após outra cromatografia de fase reversa, dessa vez, utilizando as frações provenientes da cromatografia de gel filtração (Figuras 60 A e B). Aqui obtivemos sucesso na visualização das espécies moleculares, mas até o momento não conseguimos nenhum resultado em sequenciamento *de novo* dessas amostras.

Análises por espectrometria de massas após cromatografia de fase reversa foram realizadas. Observa-se na Figura do espectro de massas (Figura 61), a presença de espécies moleculares de 6249,8; 9368,05; 18696,7 e 18831,28 Da. Sugere-se que as relações m/z de 18696,7 e 18831,28 Da correspondem aos espécimes carregadas com uma carga positiva. Complementarmente, aquele que apresentou relação m/z de 9368,05 Da está carregado com duas cargas positivas e o de 6249,8 Da com três cargas positivas. Todavia, sugere-se que a presença de espécimes multi carregados seja característica da técnica de espectrometria de massas. Na fração analisada, observou-se também a presença de espécimes moleculares de relação m/z de 6198,89; 9296,31; 18559,0 Da (não mostradas).

Em estudo coordenado por Duarte *et al.* (2012), o sobrenadante da cultura de *A. oryzae* foi filtrado e fracionado por ultrafiltração, seguida de três passos de cromatografia, o que resultou no isolamento de uma solução homogênea de xilanase de baixo peso molecular (Xil-O1) com uma massa de 21,5 kDa, determinado pela eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) co-polimerizado com 0,1% de xilana *oat spelt*.

Por serem decompositores, os fungos produzem celulases, ligninases, e hemicelulases que degradam uma multiplicidade de resíduos lignocelulósicos e resíduos orgânicos, exercendo uma função vital no ciclo do carbono (Donini, 2006). Um complexo celulásico eficiente deve consistir em uma combinação de enzimas, conteúdo endo e exocelulases, xilanase, β -glicosidase, pectinases, ligninases dentre outras, cuja avaliação está diretamente relacionada em função da composição do substrato submetido à hidrólise enzimática (Gusakov *et al.*, 2007). A ação sincronizada das celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases são vitais para a transformação de resíduos lignocelulósicos em biocombustíveis, através da hidrólise enzimática seguida da fermentação (Singhania *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÕES

A utilização do substrato lignocelulósico da linhaça, como fonte de carbono para o cultivo submerso do *Penicillium simplicissimum*, é uma escolha ecologicamente correta, exequível e de baixo custo para a produção de xilanases. Além disso, correlaciona o desenvolvimento sustentável com a produção de biocombustíveis pois proporciona o aproveitamento extenso da planta (sem que haja o aumento da área plantada) tanto através do óleo (biodiesel) como do resíduo gerado por esse processo através do etanol de segunda geração. Outras aplicações biotecnológicas como a suplementação na ração animal e na indústria têxtil, dentre outros, também possibilita um acréscimo substancial do valor agregado desse substrato, possibilitando uma ampliação da utilização biotecnológica através da hidrólise enzimática fúngica, em especial do *Penicillium simplicissimum* no substrato da linhaça.

Concentrações menores que 1% de xilose devem ser testadas em outros micro-organismos a fim de se inferir uma concentração indutora mínima já que 0,04% já foi suficiente para aumentar a atividade de xilanase do *P. simplicissimum*.

Celulose microcristalina e xilana foram os substratos que apresentaram os resultados mais expressivos da indução da produção de xilanase, sendo que a concentração de 0,5% de xilana mostrou a melhor atividade enzimática em ambos os fungos estudados.

As enzimas endoglicanase e pectinase foram as que mais tiveram suas atividades afetadas pela adição das fontes de nitrogênio deste estudo. Em ambos os fungos analisados como também nas duas fontes de carbono testadas (linhaça e pinhão-mansão), a suplementação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e caseína propiciaram um aumento da atividade enzimática de pectinase e de endoglicanase respectivamente. Torna-se imprescindível, então, avaliar a influência da adição dessas fontes de nitrogênio por técnicas de biologia molecular na expressão das enzimas, possibilitando que esse conhecimento possa ser aplicado nas respectivas atividades enzimáticas de outros fungos utilizados biotecnologicamente.

Purificou-se parcialmente enzimas xilanases, utilizando cromatografias de gel filtração e troca aniônica. As frações após a última cromatografia apresentaram uma atividade de xilanase maior do que a apresentada pelo substrato liofilizado. A otimização dos processos de produção e purificação de xilanase do extrato bruto de *P. simplicissimum* torna-se ainda mais importante visto que a atividade xilanásica aumentou consideravelmente durante as etapas de purificação.

Diante disso, a determinação de parte da sequência primária das xilanases purificadas também será um passo importante.

As xilanases parcialmente purificadas apresentam atividade ótima em pH=4 e temperatura de 50°C. O complexo enzima-substrato mostrou-se estável a 40°C.

As frações contendo xilanases após cromatografia de gel filtração seguida de fase reversa, após análises por espectrometria de massas apresentam relação massa/carga de 18831, 26 Da.

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-SATER, M. A.; EL-SAID, A. H. M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.47, p. 15-21, 2001.

ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of cellulase activities**. Chemical analysis and testing task: laboratory analytical procedure. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 1996. (NREL LAP, 6).

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, B. R.; SHAIKH, B. H. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67-72, 2004.

ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, E.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Snake venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 3556-3571, 2008.

ALEN, R. Structure and chemical composition of wood. In: STENIUS, P. (Ed.). **Forest Products Chemistry**. Helsinki: Fapet Oy, 2000. p. 12-57.

ALVES, A. C. N.; MATTOS, W. R. S.; SANTOS, F. A. P.; LIMA, M. L. P.; PAZ, C. C. P.; PEDROSO, A. M. Substituição parcial de silagem de milho por farelo de glúten de milho desidratado na alimentação de vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1590-1596, 2007.

AMIRI, F.; YAGHMAEI, S.; MOUSAVI, S. M. Bioleaching of tungsten-rich spent hydro cracking catalyst using *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p.1567-73, 2011.

ANDRADE, G. A.; CARAMORI, P. H.; SOUZA, F. S.; MARUR, C. J.; RIBEIRO, A. M. A. Temperatura mínima letal para plantas jovens de pinhão-manso. **Bragantia**, v. 67, p. 799-803, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052008000300031>.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia**: tópicos de microbiologia industrial. São Paulo: E. Blücher, 1990. v. 2.

ARABI, M. I. E.; JAWHAR, M.; BAKRI, Y. Effect of additional carbon source and moisture level on xylanase production by *Cochliobolussativus* in solid fermentation. **Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 150-153, 2011.

ARAUJO, M. F.; GOMES, J. C.; SANT'ANNA, R.; SILVA, D. J. Caracterização química de um isolado protéico de soja produzido no Brasil. **Revista Ceres**, v. 33, n. 188, p. 320-329, 1986.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, N. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SONIA, K. G.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Role of Transglycosylation products in the expression of multiple Xylanases in *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Current Microbiology**, v. 54, p. 405-409, 2007.

BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, Y.; HAN, X.; YANG, Q. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 IN submerged fermentation. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 528-540, 2013.

BAI, Z. H.; ZHANG, H. X.; QI, H. Y.; PENG, X. W.; LI, B. J. Pectinase production by *Aspergillus niger* sing wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 49-52, 2004.

BALAT, M.; KIRTAY, E.; BALAT, H. Main routes for the termo conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: pyrolysis systems. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 3147-3157, 2009.

BANERJEE, S.; MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; PANDEY, R. A. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 77-93, 2010.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, nov. 2010.

BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **BNDS Setorial**, p. 5-38, 2007.

BAKRI, Y.; JACQUES, P.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, 2003.

BAKRI, Y.; JAWHAR, M.; ARABI, M. I. E. Improvement of xylanase production by *cochliobolus sativus* in solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 602-604, 2008.

BAKRI, Y.; MASSON, M.; THONART, P. Isolation and identification of two new fungal strains for xylanase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1626-1634, 2010.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326–38, 2001.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 38, n. 7, p. 565-598, 1998.

BELÉN DÍAZ, A.; DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, p. 72–78, 2012.

BELTRÃO N. E. M. **Informações sobre o biodiesel em especial feito com óleo de mamona**. Brasília: EMBRAPA, 2003. (Comunicado Técnico, 177). Disponível em: <<http://www.balcom.org.br:8080/trade/upload/2985821148509292935.PDF>>. Acesso em: 9 abr. 2010.

BENEN, J. A.; VISSER, J. Polygalacturonases. In: WHITAKER, J.; VORAGEN, A.; WONG, D. (Ed.). **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Gekker, 2003. p. 857–866.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198–209, 2006.

BERNARDINI, E. Cottonseed. In: _____. **Oilseeds, oils and fats: raw materials**. Rome: Publishing House, 1982. p. 147-164.

BEVILAQUA, G. A. P. et al. **Indicações técnicas para a produção de sementes de plantas recuperadoras de solo para agricultura familiar**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

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

BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal Biotechnology**, v. 57, p. 151-166, 1997.

BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O. Flaxseed and cardiovascular risk. **Nutrition Reviews**, v. 62, p. 18-27, 2004.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. C. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciencia, 2008.

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

- BONACIN, G. A.; RODRIGUES, T. de J. D.; CRUZ, M. C. P.; BANZATTO, D. A. Características morfofisiológicas de sementes e produção de girassol em função de boro no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 111-116, 2009.
- BOYLE, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biology Biochemistry**, v. 30, n. 6, p. 817-823, 1998.
- BRANDL, H.; BOSSHARD, R.; WEGMANN, M. Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 319-326, 2001.
- BURGSTALLER, W.; SCHINNER, F. Leaching of metals by fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 91-116, 1993.
- BURKART, A. **Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina):** parte VI, tomo VI: dicotiledôneas metaclamídeas. Buenos Aires: INTA, 1974.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; PEBERDY, J. F.; FU, S. Y.; YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 537-542, 1996.
- CAI, Y. J.; CHAPMAN, S. J.; BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. Production and distribution of endoglycanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 553-559, Feb. 1999.
- CALDERELLI, V. A. S.; BENASSI, M. de T.; VISENTAINER, J. V.; MATIOLI, G. Quinoa and flaxseed: potential ingredients in the production of bread with functional quality. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 981-986, 2010.
- CAMARGO, J. A.; RODRIGUES, C. P. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para cogeração de energia elétrica e etanol celulósico.** São Joaquim da Barra: [s. n.], 2008.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2196-2204, 2007.
- CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, jan. 2010.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.
- CARDOSO, O. A. V.; FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 2, p. 309-314, 2003.
- CARDOSO, P. G.; RIBEIRO, J. B.; TEIXEIRA, J. A.; QUEIROZ, M. V.; ARAUJO, E. F. Overexpression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 159-166, 2007.
- CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, E. C.; COELHO, G. D.; BROCHETO-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 359-364, 2005.
- CARNEIRO, M. A. C.; CORDEIRO, M. A. S.; ASSIS, P. C. R.; MORAES, E. S.; PEREIRA, H. S.; PAULINO, H. B.; SOUZA, E. D. Produção de fitomassa de diferentes espécies de cobertura e suas alterações na atividade microbiana de solo de cerrado. **Bragantia**, v. 67, n. 2, p. 455-462, 2008.
- CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 445-76, 1996.
- CARVALHO, B. C. L. **Manual do cultivo da mamona**. Salvador: EDBA, 2005.
- CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. A.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA JUNIOR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 151-158, 2010.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CASTRO, C.; BALLA, A.; CASTIGLIONI, V. B. R.; SFREDO, G. J. Doses e métodos de aplicação de nitrogênio em girassol. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 827-833, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161999000400009>.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CERQUEIRA-LEITE, R. C.; LEAL, M. R. L. V. L.; CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.

CHANGO, A. et al. Fractionation by thermal coagulation of lupin proteins: physicochemical characteristics. **Food Research International**, v. 28, n. 1, p. 91-99, 1995.

CHANG, H.L.; CHAO, G.R.; CHEN, C.C. and MAU, J.L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. **Food Chemistry**. v.74, p. 203-207, 2001. .

CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHEUNG, S. W.; ANDERSON, B. C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 81-96, 1997.

CHUNDAWAT, S. P.; BALAN, V.; DALE, B. E. High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1281-94, 2008.

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

COLUSSI, F.; SERPA, V.; DELABONA, P. S.; MANZINE, L. R.; VOLTATODIO, M. L.; ALVES, R.; MELLO, B. L. S.; PEREIRA JUNIOR, N.; FARINAS, C. S.; GOLUBEV, A. M.; SANTOS, M. A. M.; POLIKARPOV, I. Purification, and biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 808-817, 2011.

COPELAND, R. A. **Enzymes**: a practical introduction to structure, mechanism and data analyses. New York: Wiley-VHC, 2000.

CORREIA, I. M. S. **Extração e pirólise do óleo de girassol (*Helianthus annuus L.*) visando a produção de biocombustíveis**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

COSTA, L. M.; RESENDE, O.; OLIVEIRA, D. E. C. Isotermas de dessecção e calor isostérico dos frutos de crambe. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 17, n. 4, p. 412-418, 2013.

COWAN, W. D. Animal feed. In T. Godfrey & S. West (Eds.). **Industrial enzymology**, p. 360–371, 1996.

CRAMBE alternativa para a produção de óleo. Disponível em: <<http://www.ruralbioenergia.com.br/crambe.asp>>. Acesso em: 23 jun. 2010.

CRUSCIOL, C. A. C. et al. Persistência de palhada e liberação de nutrientes do nabo forrageiro no plantio direto. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n. 2, p. 161-168, 2005.

DAUN, J. K. et al. Structure, composition, and variety development of flaxseed, 1-40 p. In: THOMPSON, L. U.; CUNNANE, S. C. (Ed.). **Flaxseed in human nutrition**. 2. ed. Champaign, IL.: AOCS Press, 2003. p. 1-40.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DEMIRBAS, A. H.; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing Countries. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2386-2398, 2007.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-33, 2005.

DHAWAN, S.; KAUR, J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 197-216, 2007.

DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Óleo bruto de girasol como matéria-prima a produção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS VEGETAIS E BIODIESEL, 1., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras, 2004.

DOSS, R. P. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 404-408, 1999.

DUARTE, G. C.; MOREIRA, L. R. S.; GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, L. R.; AMARAL, L. I. V.; RICART, C. A. O.; FERREIRA FILHO, E. X. Use of residual biomass from the Textile Industry as carbon source for production of a low-molecular-weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, p. 754-772, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/app2040754>.

DUNCAN, S.M.; SCHILLING, J.S. Carbohydrate-hydrolyzing enzyme ratios during fungal degradation of woody and non-woody lignocellulose substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, 47 (2010) 363–371.

DURRANT, A. J.; WOOD, D. A.; CAIN, R. B. Lignocelulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid state fermentation. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 751-755, 1991.

DUTTA, P. C.; HELMERSSON, S.; KEBEDU, E.; ALEMA, G.; APPELQVIST, L. A. Variation in lipid composition of niger seed (*Guizotia abyssinica* Cass) samples collected from different regions in Ethiopia. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 8, p. 839-843, Aug. 1994.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 275-282, 2008.

EGGMAN, T.; ELANDER, R. T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 2019-25, 2005.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Algodão Bt**. 2009. Disponível em: <www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=bioss:::23>.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Girassol**: diferentes usos. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=66&cod_pai=160> Acesso em: 11 jun. 2011.

EMBRAPA Soja. **Cultivo de girassol**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaogirassol/index.htm>>.

ERIKSSON, K. E. L.; BERMEK, H. Lignin, lignocellulose, ligninase. **Applied Microbiology: Industrial**, p. 373-84, 2009.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. **Cellulose hydrolysis**. Berlin: Springer, 1987.

FARINAS, C. S.; SANTOS, R. R. M.; PESSOA, J. D. C.; BERTUCCI NETO, V. **Tecnologias para inovação nas cadeias euterpe**: resíduo da agroindústria do açaí para produção de celulases. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

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

FERRARI NETO, J.; CRUSCIOL, C. A. C.; SORATTO, R. P.; COSTA, C. H. M. Plantas de cobertura, manejo da palhada e produtividade da mamoneira no sistema plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 978-985, 2011.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3, p. 465-484.

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

FERREIRA, S.; DURATE, A. P.; RIBEIRO, M. H. L.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 192-200, 2009.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915-22, 2010.

FRANCO, M. N.; BON, E. P. S.; MACRAE, A.; COELHO, R. R. R. Caracterização das celulasas de *Streptomyces* sp. M23 produzidas a partir de cultivo em bagaço de cana de açúcar. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2009, Natal. **Anais...** Natal: SINAFERM, 2009.

FUJITA, A. et al. Comparação da produção de beta-glicosidase por fermentação submersa e semi-sólida de micro-organismos isolados a partir de produtos de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBCTA, 2002. 1 CD-ROM.

FUNDAÇÃO MS. **Crambe cultivar FMS-Brilhante**: uma opção rentável para a safrinha 2011 no Mato Grosso do Sul. Disponível em: <<http://www.fundacaoms.org.br>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

GARCIA, J. S. **Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de xianálise de proteínas e metaloproteínas**. Campinas: IQ-UNICAMP, 2006.

GASPAR JÚNIOR, P. J.; TOMIZAWA, M. M.; SCHWAN, R. F.; RINKER, D. L.; DIAS, E. S. Nutritional requirements for growth of *Agaricus brasiliensis*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 1, p. 93-97, 2011.

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

GETINET, A.; SHARMA, S. M. **Niger, *Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. (Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 5).

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

GIAYETTO, O.; FERNANDEZ, E. M.; ASNAL, W. E.; CERIONI, G. A.; CHOLAKY, L. Comportamento de cultivares de Cartamo (*Carthamus tinctorius* L.) en la region de Rio Cuarto, Cordoba (Argentina). **Revista Investigación Agraria**: produccion y proteccion vegetales, v. 14, n. 1-2, p. 203-215, 1999.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009.

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

GOODRUM, J. W.; GELLER, D. P. Influence of fatty acid methyl esters from hydroxylated vegetable oils on diesel fuel lubricity. **Bioresource Technology**, 2004.

GORDIN, C. R. B.; MARQUES, R. F.; MASETTO, T. E.; SCALON, S. P. Q. Germinação, biometria de sementes e morfologia de plântulas de *Guizotia abyssinica* Cass. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 619-627, 2012.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 37-50, 1991.

GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SAREEN, V. K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma Viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 535-541, 2008.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; VINHA, F. N. M.; SOUZA, D. T.; BISPO, A. S. R.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglycanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, n. 1-3, p. 321-9, 2009.

GROMPONE, M. A. Sunflower oil. In: SHAHIDI, F. **Bailey's industrial oil and fat products, edible oil and fat products: chemistry, chemical properties, and health effects**. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. v. 2.

GROOT, P. W. J.; BASTEN, D. E. J. W.; SONNENBERG, A. S. M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V.; VISSER, J. An endo -1, 4- β -xylanase-encoding gene from *Agaricus bisporus* is regulated by compost-specific factors. **Journal of Molecular Biology**, v. 277, p. 273-284, 1998.

GUSAKOV, A. V.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A. P. Design of highly efficient cellulose mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 1028-1038, 2007.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2006.

HANIF, A.; YASMEEN, A.; RAJOKA, M. I. Induction, production, repression, and de repression of exoglycanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 311-9, 2004.

HARRISON, M. J. et al. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 119-127, 1998.

HAYES, D. Enzyme-Catalyzed modification of oilseed materials to produce eco- friendly products: review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 12, p. 1077-1103, 2004.

HEIDORNE, F. O.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. L.; MILAGRES, A. M. F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436-442, 2006.

HEINZ, R. et al. Decomposição e liberação de nutrientes de resíduos culturais de crumbe e nabo forrageiro. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 9, p. 1549-1555, 2011.

HELDWEIN, A. B. et al. Estimativa do saldo de radiação em girassol como função da radiação solar global. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 16, n. 2, p. 194-199, 2012.

HENDRIKS, A. W.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HINZ, S. W. A.; POUVREAU, L.; JOOSTEN, R.; BARTELS, J.; JONATHAN, M. C.; WERY, J.; SCHOLS, H. A. Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 318–323, 2009.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HOLTZ, M.; SILVEIRA, M. L. L.; WISBECK, E. Caracterização e utilização do resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de corpos frutíferos de *Pleurotus Ostreatus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Anais...** Campinas: Esphera, 2007. v. 6.

HOONDAL, G.; TIWARI, R.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 409–418, 2002.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 36-50, 2011.

IEMBO, I.; AZEVEDO, M. O.; BLOCH JUNIOR, C.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and partial characterization of a new β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 475-479, 2006.

ILLMAN, B. L.; MEINHOLTZ, D. C.; HIGHLEY, T. **Generation of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus, *Postia placenta***. Stockholm, Sweden: International Research Group on Wood Preservation, 1988. (Document n. IRG/WP/1360).

JABBOUR, D.; KLIPPEL, B.; ANTRANIKIAN, G. A novel thermostable and glucosetolerant beta-glucosidase from *Fervidobacterium slandicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1947-1956, 2012.

JASPER, S. P. et al. Análise energética da cultura do Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) produzida em plantio direto. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 395-403, maio/jun. 2010.

JAYANI, R. S.; SHIVALIKA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 495-509, 2004.

JOO, A.; JEYA, M.; LEE, K.; SIM, W.; KIM, J.; KIM, I.; KIM, Y.; OH, D.; GUNASEKARAN, P.; LEE, J. Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 285-294, 2009.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 33, 188–203, 2014.

KABEL, M. A.; WAARD, P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Location of O-acetylsubstituents in xylo-oligosaccharides obtained from hydrothermally treated Eucalyptus wood. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 69-77, 2003.

KANSOH, A. L.; NAGIEB, Z. A. Xylanase and Mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 103–114, 2004.

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

KLEYWEGT, G. J. et al. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglycanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 angstrom resolution, and a comparison with related enzymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 383-397, 1997.

KLIPPEL, B.; ANTRANIKIAN, G. Lignocellulose converting enzymes from thermophiles. In: HORIKOSHI, K. (Ed.). **Extremophiles Handbook**. Berlin: Springer, 2011. p. 443-474.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, n. 1263, p. 147-150, 2004.

KOHEL, R. J. Cotton. In: ROBBELEN, G.; DOWNEY, R. K.; ASHRI, A. (Ed.). **Oil crops of the world**. New York: McGraw-Hill, 1989, p. 404-415.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KOUKIEKOLO, R.; CHO, H-Y.; KOSUGI, A.; INUI, M.; YUKAWA, H.; DOI, R. H. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3504-11, 2005.

KUBICEK, C. P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R. L.; KUBICEK-PRANZ, E. M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 90-99, 1993.

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

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products**, n. 28. p. 1-10, 2008.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 302-14, 2009.

- LAGHETTI, G. et al. Yield and oil quality in selected lines of *Crambe abyssinica* grow in Italy. **Industrial crops and products**, v. 4, n. 2. p. 203-212, 1995.
- LANDECKER, E. M. **Fundamentals of the fungi**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River, 1996.
- LARA-MARQUEZ, A.; ZAVALA-PARAMO, M. G.; LOPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO, H. C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 859–868, 2011.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Salvier, 2006. v. 1.
- LEE, J. M.; SHIN, J. W.; NAM, J. K. Molecular cloning and expression of the *Trichoderma harzianum* C4 endo-beta-1,4-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 823-828, 2009.
- LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005.
- LEITE, R. M. V. B. C.; HENNING, A. A.; RODRIGUES, S. R.; OLIVEIRA, M. F. Detecção e variabilidade de *Plasmopara halstedii* no Brasil e avaliação da resistência de genótipos de girassol ao míldio. **Summa phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 335-340, 2007.
- LEMONS, J. L. S.; FONTES, M. C. A.; PEREIRE, N. J. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 681-689, 2001.
- LESLIE, M. A., MORAN, E. T., JR., & BEDFORD, M. R. (2007). The effect of phytase and glucanase on the ileal digestible energy of corn and soybean meal fed to broilers. **Poultry Science**, 86, 2350–2357.
- LI, H.; KIM, N-J.; JIANG, M.; KANG, J. W.; CHANG, H. N. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3245–51, 2009.
- LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 117-124, 2012.
- LICHSTON, J. E.; SOUZA, V. H. M.; SIQUEIRA, M.; MEDEIROS, M. N. F.; LIMA, E. R.; LIMA, J. P. M. S.; COSTA, M. Adaptações anatômicas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) contra dessecação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4., 2010, SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2010.

LINDER, M.; SALOVUORI, I.; RUOHONEN, L.; TEERI, T. T. Characterization of a double Cellulose-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21268-21272, Aug. 1996.

LIRA, M. A. **Avaliação das potencialidades da cultura do girassol, como alternativa de cultivo no semiárido nordestino**. Natal: EMPARN, 2011.

LIU, S.; LU, H.; HU, R.; SHUPE, A.; LIN, L.; LIANG, B. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 785-810, 2012.

LIU, Z-F.; ZENG, G-M.; ZHONG, H.; YUAN, X-Z.; JIANG, L-L.; FU, H-Y MA, X-L.; JZHANG, J-C. Effect of saponins on cell surface properties of *Penicillium simplicissimum*: Performance on adsorption of cadmium (II). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 364-369, 2011.

LOPEZ-CASADO, G.; URBANOWICZ, B. R.; DAMASCENO, C. M. B.; ROSE, J. K. C. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 329-337, 2008.

LUKONGE, E.; LABUSCHAGNE, M. T.; HUGO, A. The evaluation of oil and fatty acid composition in seed of cotton accessions from various countries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 340-347, 2007.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

MACCABE, A. P.; OREJAS, M.; TAMAYO, E. N.; VILLANUEVA, A.; RAMON, D. Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 96, p. 43-54, 2002.

MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente)-Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 461-488, Sept. 2000.

MAIJALA, P.; KANGO, N.; SZIJARTO, N.; VIKARI, L. Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 905-917, 2012.

MANDALARI, G.; BISIGNANO, R. B.; LO CURTO, K. W.; WALDRON, C. B. Faults production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea*

var. thermoidea on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5130–5133, 2008.

MARTINS, L.F. 2005. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum***. 139 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARTOS, M. A.; VAZQUEZ, F. M.; BENASSI, F. O.; HOURS, R. A. Production of pectinase by *A. niger*: influence of fermentation conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 567–572, 2009.

MASETTO, T. E. et al. Potencial hídrico do substrato e teor de água das sementes na germinação do crambe. **Revista brasileira de sementes**, v. 33, n. 3, p. 511-519, 2011.

MATHEWSON, P. R. **Enzymes**. St. Paul: Eagan Press, 1998.

MAUAD, M. et al. Matéria seca e acúmulo de macronutrientes na parte aérea das plantas de Crambe. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 5, p. 771-778, 2013.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Ed.). **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington, DC: American Chemical Society, 1994. p. 292-324. (Symposium Series, 566).

MEDEIROS, R.; HANADA, R.; FERREIRA-FILHO, E. X. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, n. 2, 97-100, 2003.

MEDEIROS, R.; SILVA JUNIOR, F.; SALLES, B.; ESTELLES, R.; FERREIRA FILHO, E. X. The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine free bleaching for Eucalyptus pulp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 204-206, 2002.

MEDVE, J.; KARLSSON, J.; LEE, D.; TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglicanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 5, p. 621-634, Sept. 1998.

MEINKE, A.; DAMUDE, H. G.; TOMME, P.; KWAN, E.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. Jr.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Enhancement of endo- β -1,4-glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4383-4386, Mar. 1995.

MELO, J. C.; STRAGEVITCH, L.; PACHECO FILHO, J. G. A.; BRANDER JR, W.; CAMPOS, R. J. A.; SCHULER, A. R. P. Avaliação preliminar do potencial do pinhão-mansão para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Anais...** Brasília, 2006.

MELLO, R. et al. Composição química, digestibilidade e cinética de degradação ruminal das silagens de híbridos de girassol em diferentes épocas de semeadura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1523-1534, 2006.

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

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.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SORENSEN, H. R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 337-44, 2009.

MILÉO, P. C.; MULINARI, D. R.; BAPTISTA, C. A. R. P.; ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R. Mechanical behaviour of polyurethane from Castor oil reinforced sugarcane straw cellulose composites. **Procedia Engineering**, v. 10, p. 2072-2077, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959.

MILLER, G. L.; BLUM, R.; GLENNON, W. E.; BURTON, A. L. Measurement of carboxymethyl cellulose activity. **Analytical Biochemistry**, v. 2, p. 127-132, 1960.

MILROY, S. P.; BANGE, M. P. Reduction in radiation use efficiency of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) underrepeated transient waterlogging in the field. Nuclear radiation, plant biochemistry. **Field Crops Research**, v. 140, p. 51-8, 2013.

MORAES, M. S. A.; GEORGES, F.; RODRIGUES, S. A.; DAMASCENDO, F. C.; MACIEL, G. P. S.; ZINI, C. A.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Analysis of products from pyrolysis of Brazilian sugar cane straw. **Fuel Processing Technology**, v. 93, p. 35-43, 2012.

MOHAMED, S. A.; FARID, N. M.; HOSSINY, E. H.; BASSUINY, R. I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 54-64, 2006.

MONTE, J. R.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Use of a mixture of thermophilic enzymes produced by the fungus *Thermoascus aurantiacus* to enhance the enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse cellulose. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, p. 468-476, 2010.

MOREIRA, L. R. S.; MATTOS, I.; MONCLARO, A. V.; SANTOS, S. S. T.; JENSEN, A. T.; SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA FILHO, E. X. The use of lignocellulosic substrates as carbon sources for production of xylan-degrading enzymes from *Acrophialophora nainiana*. **Current Topics in Biochemical Research**, v. 10, n. 2, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA FILHO, E. X. An overview of mannan structure and mannan degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 165-178, 2008.

MORRIS, D. H. **Linaza**: una recopilación sobre sus efectos em la salud y nutrición. Canada: Flax Council of Canada, 2007.

MORRIS, D. H.; VAISEY-GENSER, M. Flaxseed. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 2525-2531, 2003.

MOSIER, N. S.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 2005, p. 673-686, 2004.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-86, 2005.

MOURA, N. C. Viabilização de matérias-primas vegetais para a produção e uso de biodiesel no Paraná. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IAPAR, 17., 2009, Londrina. **Anais...** Londrina: ProICI, 2009.

MURTHY, P.; NAIDU, M. Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 657-664, 2010.

NAGELLA, P. et al. Analysis of genetic diversity among Indian niger [*Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass.] cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 140-144, 2008.

NASCIMENTO, R. P.; ALVES JUNIOR, N.; PEREIRA JUNIOR, N.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Brewer s spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 529-535, 2009.

NEIVA JÚNIOR, A. P.; VAN CLEEF, E. H. C. B.; PARDO, R. M. P.; SILVA FILHO, J. C.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. Subprodutos agroindustriais do biodiesel na alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: MCT/ABIPTI, 2007.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; FRAGA, A. C. Adequação do teste de germinação para sementes de nabo forrageiro. **Revista brasileira de sementes**, v. 31, n. 2, p. 177-187, 2009.

NEVES, V. A.; SILVA JUNIOR, S. I.; SILVA, M. A. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas do tremoço-doce (*Lupinus albus* L.), var. Multolupa. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 4, p. 832-840, 2006.

NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M.; HO, T. H. D. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 1310-1317, 2010.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, 1998. 69-71 p.

NOBRE, R. G. et al. Teor de óleo e produtividade da mamoneira de acordo com a adubação nitrogenada e irrigação com água salina. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 47, n. 7, p. 991-999, 2012.

OECD-Organization for Economic Co-operation and Development. FAO-Food Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural Outlook: 2007-2016**.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, 2010.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: a vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 862-867, 2006.

OLIVEIRA, M. F.; VIEIRA, O. V. **Extração de óleo de girassol utilizando miniprensa**. Londrina: Embrapa Soja, 2004.

OLSSON, L.; JØRGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol production from lignocellulosic material. In: _____. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 957-993.

ONOREVOLI, B. Rice husk ash as an adsorbent for purifying biodiesel from waste frying oil. **Fuel** (Guildford), v. 92, p. 56-61, 2012.

OPLINGER, E. S.; OELKE, E. A.; KAMINSKI, A. R.; PUTNAM, D. H.; TEYNOR, T. M.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. **Crambe, alternative field crops manual**. St. Paul: University of Wisconsin, University of Minnesota, 1991.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse: a review. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDYA, J. J.; GUPTE, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 35, p. 769-779, 2012.

PEDRO NETO, M. et al. Biologia e tabela de vida do ácaro-vermelho *Tetranychus bastosi* em pinhão-manso. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 48, n. 4, p. 353-357, 2013.

PENZ JUNIOR, A. M.; BRUGALLI, I. Soja e seus derivados na alimentação de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2001. p. 85-108.

PEREIRA, H.; GRACA, J.; RODRIGUES, J. C. Wood chemistry in relation to quality. In: BARNETT, J. R.; JERONIMIDIS, G. (Ed.). **Wood Quality and Its Biological Basis**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. p. 53-86.

PEIJI, G.; YINBO, Q.; XIN, Z.; MINGTIAN, Z.; YONGCHENG, D. Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 581-4, 1997.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996. v.1.

PETERS, D. Raw materials. **Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology**, v. 105, p. 1-30, 2007.

PETROVIC, S. E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I. F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 299-304, 1990.

PICART, P.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 108-113, 2007.

PIRES, A.; MACEDO, A. C.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6506-6509, 2010.

PIROTA, R. D. P.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXAO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, 2013.

PITARELO, A. P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, p. 1502-1509, 2012.

PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e produção: Crambe 2010**. Maracaju, MS: Ed. Maracaju, 2010.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

PRADE, R. A.; ZHANG, D-F.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and plantmicrobe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 361-391, 1999.

PRADHAN, K.; MISHRA, R. C.; PAIKARY, R. K. Genetic variability and character association in niger. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 55, p. 457-459, 1995.

PRASAD, K. et al. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. **Atherosclerosis**, v. 136, n. 2, p. 367-375, 1998.

PRATES, F. B. S. et al. Crescimento de mudas de pinhão-mansão em resposta a adubação com superfosfato simples e pó-de-rocha. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 207-213, 2012.

PRIMIERI, C.; VIANA, O. H.; LUNELLI, I. E.; SANDERSON, K.; BLANCO, I. B.; BOLIGON, F.; BORSOL, A.; SANTOS, R. F. Cultura do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst): como matéria prima alternativa para produção de biodiesel. In: CONGRESSO SOBRE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA E ENERGIA NO MEIO RURAL (AGRENER), 8., 2010, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 2010. v. 1.

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

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; SVOBODA, P.; POHL, J.; ÖGEL, Z. B.; BIELY, P. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1674, p. 239-250, 2004.

PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 200-206, 2002.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. H.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, W. J. JR.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R. M.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Industrial Crops and Products**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

KASHYAP, D. R.; SONI, S. K.; TEWARI, R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 251-254, 2003.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. New York: W.H. Freeman, 1999.

REINIKAINEN, T. et al. Investigations of the function of mutated cellulose binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 14, n. 4, p. 475-482, Dec.1992.

RIBEIRO, M. C. F. et al. Crescimento e produtividade da mamoneira irrigada com diferentes diluições de esgoto doméstico tratado. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 16, n. 6, p. 639-646, 2012.

RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R.; FITZ, E.; PIERCE, G. N.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. Low n-6: n-3 fatty acid ratio, with fish or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 153-160, 2008.

RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de Bioetanol**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

RONDELLI, V. M. et al. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, n. 2, p. 212-214, 2011.

ROMANOWSKA, I.; POLAK, J.; BIELECKI, S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 665-671, 2006.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90-95, 2012.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 30, p. 271-291, 2003.

SAKATA's reliable seeds. **Flower seed**. Yokohama, Japan: Sakata Seed Corporation, 1998.

SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulase e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, nov. 2010.

SALVACHÚA, D.; PRIETO, A.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7500-6, 2011.

SANCHES, R. A. **Procedimento para o desenvolvimento de tecidos de malha a partir de planejamento de experimentos**, Campinas, SP. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

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

SANTOS, C. M. C.; GONZALES, W. A. **Biotransformação do efluente líquido do biodiesel de dendê por *Penicillium corylophilum***. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, Seção de Química, 2002.

SANTOS, J. B. et al. Comportamento morfofisiológico da mamoneira BRS Energia submetida à irrigação com água salina. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 17, n. 2, p. 145-152, 2013.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SARIN, R.; SHARMA, M.; KHAN, A. A. Studies on *Guizotia abyssinica* L. oil: biodiesel synthesis and process optimization. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4187-4192, 2009.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; BARBOZA, M. Z.; MIGUEL, A. M. R. O.; NAZARIO, L. H.; CARVALHO, L. O.; RIBEIRO, F. M. Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico-mamona. **Documento Técnico Cati**, n. 107, p. 29-39, 1999.

SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 109-119.

SEABRA, J. E. A.; TAO, L.; CHUM, H. L.; MACEDO, I. C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane millclustering. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1065-1078, 2010.

SENTHILKUMAR, S. R.; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 12, p. 1380-6, 2005.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 233-243, 2005.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-28, 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0).

SHAMALA, T. R.; SREEKANTIAH, K. R. Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 178-182, 1986.

SHREEVE, J. Redesigning life to make ethanol. **Technology Review**, July/Aug. 2006.

SILVA, M. G.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; FONSECA, M. J. V.; SAID, S.; SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Microbiological Research**, v. 159, p. 317-322, 2004.

SILVA, A. R. B.; SILVA, T. R. B.; SILVA, M. L. L.; VIANNA, J. F.; MARTINEZ, M. M.; VIANAS, L. H.; SILVA, R. F. **Comportamento de cultivares de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) em função da variação do espaçamento entre linhas**. Disponível em: <<http://www.portaldobiodiesel.gov.br>>. Acesso em: 11 jan. 2011.

SILVA, L. D.; LOPES, F. C.; SILVEIRA, S. T.; BRANDELLI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 295-305, 2009.

SILVA, M. G.; D'ANGELIS, C. E. M.; FURTADO, N. A. J. C.; BASTOS, J. K. **Produção de extratos de culturas de *Penicillium corylophilum* dierckx em meio fermentativo e detecção da atividade antimicrobiana**. Fortaleza: SBPC, 2005. (57ª Reunião Anual da SBPC).

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

SINHA, A. K.; VIKAS, K.; HARINDER, P.S. M.; GUDRUN, DE B.; KLAUS, B. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. **Food Chemistry**, v.127, p. 1409–1426, 2011.

SIQUEIRA, F. G. **Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases**. 2010. 277 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010a.

SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA-FILHO, E. X. Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 7, p. 54-60, 2010b.

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

SIQUEIRA, F. G.; SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, E. G.; CARVALHO, M. A.; PERETTI, M. P.; TEIXEIRA, R. S. S.; DIAS, E. S.; FÉLIX, C. R.; FERREIRA-FILHO, E. X. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grow on agro-industrial residues. **Biodegradation**, 2010d.

SIVARAM, V.; JAYARAMAPPA, K. V.; MENON, A.; CEBALLOS, R. M. Use of bee-attractants in increasing crop productivity in Niger (*Guizotia abyssinica*. L). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 3, p. 365-370, 2013.

SMIDERLE, O. J.; MOURAO JUNIOR, M.; GIANLUPPI, D. Avaliação de cultivares de girassol em savana de Roraima. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 331-336, 2005.

SMITH, G. J.; KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 348-352, 1999.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KAHN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, 2009.

SØRENSEN, H. R.; PEDERSEN, S.; JØRGENSEN, C. T.; MEYER, A. S. Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant “minimal” enzyme cocktail containing α -xylosidase and novel endo-1,4- α -xylanase and α -L-arabinofuranosidase activities. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 100–107, 2007.

SOUZA, A. D. V.; FAVARO, S. P.; ITAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crumbe. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SOUZA, L. A.; CARVALHO, M. L. M.; KATAOKA, V. Y.; OLIVEIRA, J. A. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista brasileira de sementes**, v. 31, n. 1, p. 60-67, 2009.

SOUZA, B. L. P.; DILLON, A. J. P. Avaliação da produção de celulasas em produtos de fusão de protoplastos entre *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum* em cultivo semi-sólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, DIVISÃO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA, 16., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2007.

SOUZA, G.; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de compostos poluentes por enzimas Lignocelulolíticas. In: SIMPÓSIO TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR, 6., 2013, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Equilíbrio, 2013. v. 1. p. 67-75.

SOUZA, R. A.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L. Seleção e caracterização de comunidades microbianas termofílicas lignocelulolíticas. In: ENCONTRO NACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA, 7., 2012, Lavras. **Anais...** Lavras, 2012.

SOUZA, N. C. et al. Produtividade da mamona irrigada com esgoto doméstico tratado. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 14, n. 5, p. 478-484, 2010.

SREENATH, H. K.; YANG, V. W.; BURDSALL, H. H.; JEFFRIES, T. W. Toner removal by alkaline-active cellulases from desert Basidiomycetes. In: JEFFRIES, T. W.; VIIKARI, L. (Ed.). **The enzymes for pulp and paper processing**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 267-279.

SRINIVASAN, N.; D'SOUSA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaetechrysosporium* BKM-F1767. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4274-7, 1995.

SRISODSUK, M. et al. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 20756-20761, 1993.

STAJIĆ, M.; PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; VUKOJEVI, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65-73, 2006.

STEINER, W.; LAFFERTY, R. M.; GOMES, I.; ESTERBAUER, H. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 169-178, 1987.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 801-804, 2007.

STRECK, N. A.; BELLE, R. A.; ROCHA, E. K.; SCHUH, M. Estimating leaf appearance rate and phyllochron in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Ciencia Rural**, v. 35, n. 6, p. 1448-1450, 2005.

STRYER, L.; TYMOCZKI, J. L.; BERG, J. M. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

STUBBS, H. J.; BRASCH, D. J.; EMERSON, G. W.; SULLIVAN, P.A. Hydrolase and transferase activities of the β -1,3-exoglycanase of *Candida albicans*. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, p. 889-895, 1999.

- SUGUI, J. A.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Partial characterization of the extracellular matrix released by *Colletotrichum graminicola* onto artificial hydrophobic surface. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 52, n. 6, p. 411-425, 1998.
- SUJATHA, M.; REDDY, T. P.; MAHASI, M. J. Role of biotechnological interventions in the improvement os castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 424-425, 2008.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.
- SUMNER, J. Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal diabetic urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 47, p. 5-9, 1921.
- SUN, X.; LIU, Z.; QU, Y.; LI, X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, p. 239-248, 2008.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials forethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.
- SZTAJER, H.; MALISWESKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 895-898, 1989.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for etanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, n. 4, p. 707-38, 2007.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-53, 2010.
- TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 18-27, 2005.
- TEIXEIRA, R. S. S.; SIQUEIRA, F. G.; SOUZA, M. V.; FERREIRA FILHO, E. X.; SILVA, E. P. Bon Purification and characterization studies of a thermostable β -xylanase from *Aspergillus awamori*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1041-1051, 2010.
- TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4139-4143, 2010.

- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde, 2006.
- TZANG, B. S.; YANG, S. F.; FU, S. G., YANG, H. C.; SUN, H. L.; CHEN, Y. C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1450-1455, 2009.
- UNGARO, M. R. G. **Cultura do girassol**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2000. (Boletim Técnico, 188).
- VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes: factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1458-1480, 2012.
- VAN ZYL, W. H.; ROSE, S. H.; TROLLOPE, K.; GORGENS, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1203-13, 2010.
- VARNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 185-93, 2010.
- VASCONCELOS, W. E.; RIOS, M. S.; SOUSA, A. H.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, G. M. C.; MARACAJÁ, P. B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 3, n. 2. 2003.
- VATANPARAST, M.; HOSSEININAVEH, V.; GHADAMYARI, M.; SAJJADIAN, S. M. Pectinase and cellulase activity in the digestive system of the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, p. 555-561, 2012.
- VIIKARI, L.; VEHEMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13-24, 2012.
- VIVAS, M. J. Culturas alternativas: cártamo, sésamo e camelina. **Melhoramento**, v. 38, p. 183-192, 2002.
- VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

WAGNER, G. H.; WOLF, D. C. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p. 218-256.

WEI, H.; XU, Q.; TAYLOR II, L. E.; BAKER, J. O.; TUCKER, M. P.; DING, S-Y. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 330–8, 2009.

WENDE, G.; FRY, S. C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side chains of grass xylans. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1011-1018, 1997.

WHITE, P. J. Fatty acids in oilseeds (vegetable oils). In: CHOW, C. K. (Ed.). **Fatty acids in foods and their health implications**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

WILLATS, W. G.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 97–104, 2006.

WU, J.; JU, L. K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. **Biotechnology Progress**, n. 14, p. 649–652, 1998.

WULFF, N. A.; CARRER, H.; PASCHOLATI, S. F. Cloning and expression of cellulase Xf-818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 715-721, 2003.

YAGUE, E.; ZUNIC-MEHAK, M.; MORGAN, L.; WOOD, D. A.; THURSTON, C. F. Expression of Cel 2 and Cel 4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and β -mannanase, respectively, is regulated by the carbon source. **Microbiology**, v. 143, p. 239-244, 1997.

YANG, S. Q.; YAN, Q. J.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; TIAN, H. M.; WANG, Y. Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1794-1800, 2006.

YERRANGUNTLA, R. R.; ZUBAIDHA, P. K.; JAKKU, N. R.; KONDHARE, D.; DESHMUKH, S.; SAIPRAKASH, S. P. Production of Biodiesel from *Guizotia abyssinica* seed oil using crystalline Manganese carbonate ($MnCO_3$) a Green catalyst. Catalysis for sustainable energy. **Research Article**, p. 22-27, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2478/cse-2012-0003>.

YIN, Y. L., BAIDOO, S. K., SCHULZE, H., & SIMMINS, P. H. Effects of supplementing diets containing hullless barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with β -glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. **Livestock Production Science**, 71, 97–107, 2001.

YU, D.; MURZIN, I.; L. SIMAKOVA Catalysis in biomass processing. **Catalysis in Industry**, v. 3, n. 3, p. 218-249, 2011.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C.; SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.

ZHANG, M.; SU, R.; QI, W. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1407–1414, 2010.

ZHANG, J.; TUOMAINEN, P.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9090-9095, 2011.

ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.

ZHANG, Y-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-81, 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, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 235-241, 2007.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigor and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma spp.* **Process Biochemistry**, v. 36, p. 79-84, 2000.

ZOBIOLE, L. H. S.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Marcha de absorção de macronutrientes na cultura do girassol. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 34, n. 2, p. 425-434, 2010.