**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e
serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***

Thalita Peixoto Basso

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2010**

Thalita Peixoto Basso
Engenheiro Agrônomo

**Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em
comparação com cepas de *Trichoderma reesei***

Orientador:
Prof. Dr. **CLÁUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Basso, Thalita Peixoto

Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei* / Thalita Peixoto Basso. - - Piracicaba, 2010. 90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Arroz 2. Bagaços 3. Cana-de-açúcar 4. Enzimas celulolíticas 5. Farelos 6. Fungos celulolíticos 7. *Trichoderma* I. Título

CDD 589.24
B322a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Maria José e Luiz Carlos, pelo amor, compreensão e paciência

durante toda minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação em Ciências.

À coordenação do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de participação no curso.

Ao professor Dr. Cláudio Rosa Gallo, pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Dra. Sandra Helena da Cruz pela colaboração e incentivo desde o meu ingresso no curso de pós-graduação.

Ao meu pai Luiz Carlos Basso pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Ao meu irmão Thiago Olitta Basso pelo incentivo e colaboração.

Ao técnico e amigo Luís Lucatti (Cometa) pelo auxílio e amizade.

Ao técnico Ademir de Almeida Campos pela colaboração.

Ao técnico Luiz Humberto Gomes (Beto) pela colaboração e amizade.

Aos queridos amigos e companheiros de laboratório Marcus Vinícius (Polé), Nara Bortolazo, Natália Alexandrino, Renata Christofoleti, Juliana Bueno, Sthefania Vital, Flávia Salvato, Fernanda Gomes e Elisa Lucatti, e por último mas não menos importante, Francisco Andreote.

E meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Celulose: Estrutura	23
2.2 Celulose: Degradação química	25
2.3 Celulose: Degradação enzimática.....	26
2.4 Potencial de uso do bagaço de cana-de-açúcar.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Isolamento	33
3.2 Identificação - Análise molecular através da região 26S rDNA	33
3.2.1 Extração do DNA dos isolados.....	33
3.2.2 Amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR).....	34
3.2.3 Purificação e quantificação do produto de PCR para reação de sequenciamento	35
3.2.4 Sequenciamento e análise das sequências	35
3.3 Volume de extrator	36
3.4 Produção de celulase pelas cepas de <i>T. reesei</i> QM9414 e RUTC30.....	37
3.5 Produção de celulase em bagaço de cana-de-açúcar	37
3.6 Efeito do farelo de arroz na produção de celulase.....	38
3.7 Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar sobre a produção de celulase.....	38
3.8 Determinação da atividade enzimática	38
3.9 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Identificação	41
4.2 Volume de extrator	42
4.3 Produção de celulase pelas cepas de <i>T. reesei</i> QM9414 e RUTC30.....	46
4.4 Produção de celulase em bagaço de cana-de-açúcar	52
4.5 Efeito do farelo de arroz na produção de celulase.....	55

4.6 Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar sobre a produção de celulase	60
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	75

RESUMO

Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei*

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira, atuantes sobre bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz como substratos. Dez isolados fúngicos de amostras de bagaço de cana-de-açúcar e material vegetal em decomposição foram avaliados quanto à atividade celulolítica, tendo como referências os fungos *Trichoderma reesei* QM9414 e *T. reesei* RUTC30. A atividade celulolítica foi estimada pela capacidade hidrolítica do extrato enzimático dos fungos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar, com e sem pré-tratamento térmico e com diferentes proporções de farelo de arroz. A atividade celulolítica foi estimada tanto em papel de filtro, para celulase total, como a carboximetilcelulose sódica, para endoglucanase. Os isolados identificados por análise molecular através da região 26S rDNA foram: *Aspergillus giganteus* (S1), *Aspergillus fumigatus* (S2 e F4), *Trichoderma viride*/*Trichoderma hamatum* (S3 e S6), *Trichoderma koningiopsis* (TPB), *Paecilomyces variotti* (F1), *Moniliophthora perniciosa* (F2), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma* sp RA305 (MAD). O *Trichoderma reesei* QM9414 apresentou a maior atividade tanto para celulase total como para endoglucanase. O isolado F1 não diferiu estatisticamente para atividade de endoglucanase em relação à cepa QM9414 em substrato contendo somente bagaço. O isolado MAD não diferiu estatisticamente para atividade de celulase total e endoglucanase em relação à cepa QM9414 em substrato contendo 10% de farelo de arroz. Os isolados TPB e S2 apresentaram as maiores atividades para endoglucanase em bagaço de cana-de-açúcar tratado. Tais resultados mostram que a biodiversidade em nichos, como o bagaço de cana-de-açúcar e materiais vegetais em decomposição, podem fornecer linhagens de fungos celulolíticos com grande potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Celulase; Endoglucanase; Bagaço de cana-de-açúcar; *Trichoderma reesei*, *Aspergillus* sp; *Penicillium* sp; *Acremonium* sp; *Paecilomyces* sp; *Moniliophthora* sp

ABSTRACT

Cellulase activity of fungal isolates from sugar cane bagasse and decaying plant material as compared to *Trichoderma reesei* strains

The objective of this work was to evaluate the cellulolytic activity of fungi isolated from sugarcane bagasse and decaying plant material, growing on sugarcane bagasse and rice bran as substrate. Ten isolates from sugarcane bagasse and decayed plant material were evaluated for their cellulolytic activity as compared to the fungi *Trichoderma reesei* QM9414 and *T. reesei* RUTC30. The cellulolytic activity was estimated by the hydrolytic capacity of the enzymatic extract of fungi grown on sugarcane bagasse, with and without pre-heat treatment and with different proportions of rice bran. It was used as substrates both filter paper, for total cellulolytic activity, and sodium carboxymethyl cellulose, for endoglucanase activity. The isolates identified by molecular analysis using 26S rDNA region were: *Aspergillus giganteus* (S1), *Aspergillus fumigatus* (S2 and F4), *Trichoderma viride*/*Trichoderma hamatum* (S3 and S6), *Trichoderma koningiopsis* (TPB), *Paecilomyces variotti* (F1), *Moniliophthora perniciosa* (F2), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) and *Trichoderma* sp RA305 (MAD). *Trichoderma reesei* QM9414 showed the highest total cellulolytic activity and endoglucanase activity among all isolates. Isolate F1 was not statistically different for endoglucanase activity in relation to strain QM9414 using bagasse as substrate. Isolate MAD was not statistically different for total cellulose activity and endoglucanase activity in relation to strain QM9414 using substrate containing 10% of rice bran. Isolates TPB and S2 had the highest endoglucanase activities using sugarcane bagasse treated as substrate. These results show that biodiversity in niches, such as bagasse and decayed plant material, can provide strains of cellulolytic fungi with great biotechnological potential.

Keywords: Cellulase; Endoglucanase; Sugarcane bagasse; *Trichoderma reesei*; *Aspergillus* sp; *Penicillium* sp; *Penicillium* sp; *Acremonium* sp; *Paecilomyces* sp; *Moniliophthora* sp

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotos representativas dos isolados em BDA com 5 dias de crescimento a 28°C, (A) *Paecilomyces* sp (F1); (B) *Moniliophthora* sp (F2); (C) *Aspergillus* sp (F4); (D) *Acremonium* sp/*Penicillium* sp (G3); (E) *Aspergillus* sp (S1); (F) *Aspergillus* sp (S2); (G) *Trichoderma* sp (S3); (H) *Trichoderma* sp (S6); (I) *Trichoderma* sp (MAD); (J) *Trichoderma* sp (TPB); (K) *Trichoderma reesei* RUTC30; (L) *Trichoderma reesei* QM9414..... 42
- Figura 2 - Atividade de celulase total (FPase) para *T. reesei* QM9414 com 10 dias de incubação a 28°C, com diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de tampão para extração, (a) em IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si..... 43
- Figura 3 - Atividade de endoglucanase (CMCase) para *T. reesei* QM9414 com 10 dias de incubação a 28°C, empregando-se diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de tampão para extração, (a) em IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si..... 44
- Figura 4 - Atividade específica (IU/mg de proteína) para *T. reesei* QM9414 com 10 dias de incubação a 28°C, utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e com diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de extrator, tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si..... 46

Figura 5 - Atividade de celulase total (FPase) do *T. reesei* RUTC30 e QM9414 no transcorrer de 15 dias de crescimento em bagaço de cana-de-açúcar a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático, e (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios- padrão de 3 repetições e teste Tukey com interação entre dias e fungos com nível de significância de 5%. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro de um mesmo dia e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo..... 48

Figura 6 - Atividade de endoglucanase (CMCase) do *T. reesei* RUTC30 e *T. reesei* QM9414 durante 15 dias de crescimento em bagaço de cana-de-açúcar a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático , e (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com interação entre dias e fungos com nível de significância de 5%. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro de um mesmo dia e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo..... 50

Figura 7 - Atividade específica (IU/mg de proteína) para *T. reesei* RUTC30 e *T. reesei* QM9414 durante 15 dias de cultivo a 28°C, em bagaço de cana-de-açúcar, utilizando como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com interação entre dias e fungos com nível de significância de 5%. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro de um mesmo dia e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo..... 51

- Figura 8 - Atividade enzimática (celulase total) utilizando papel de filtro (FP) como substrato, de extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias e expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com nível de significância de 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si..... 53
- Figura 9 - Atividade enzimática de endoglucanase, utilizando carboximetilcelulose (CMC) como substrato, de extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com nível de significância de 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si..... 54
- Figura 10 - Atividade enzimática específica (IU/mg de proteína) tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC) de extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias a 28°C. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com nível de significância de 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si..... 55
- Figura 11 - Atividade de celulase total (FPAse), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de arroz e somente farelo de arroz como substrato, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato..... 57

Figura 12 - Atividade de endoglucanase (CMCase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de arroz e somente farelo de arroz como substrato, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g de substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato..... 59

Figura 13 - Atividade específica em relação à proteína presente no extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de arroz e somente farelo de arroz como substrato, durante 10 dias a 28°C, expressa em IU/mg proteína, tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato..... 60

Figura 14 - Atividade de celulase total (FPase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato..... 62

Figura 15 - Atividade de endoglucanase (CMCase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g de substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato..... 64

Figura 16 - Atividade específica em relação à proteína presente no extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C, expressa em IU/mg proteína, tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meio mineral de Mandels e Weber (1969).....	37
Tabela 2 – Método do ácido dinitrosalicílico (DNS) para estimar açúcar redutor.....	39
Tabela 3 – Nomenclatura e identificação molecular dos isolados de serapilheira.....	41
Tabela 4 – Nomenclatura e identificação molecular dos isolados de bagaço de cana-de-açúcar.....	41

1 INTRODUÇÃO

A Revolução Industrial deu início à exploração da vasta reserva de combustível fóssil, como o carvão mineral e o petróleo. Mais recentemente a emissão dos gases responsáveis pelo efeito estufa tem sido motivo de preocupação devido à combustão destes produtos. A queima dessas fontes não renováveis aumenta a quantidade de gases como dióxido de carbono na atmosfera causando o aquecimento global (GALBE; ZACCHI, 2002; GOMEZ et al., 2008).

Tendo como referência o ciclo do carbono, podemos citar que a queima de combustíveis fósseis é insustentável, já que as reservas são finitas e a capacidade do planeta de absorver os resíduos desse processo é limitada. Como medida, em 1992, na Cúpula das Nações Unidas ocorrida no Rio de Janeiro, os líderes dos países industrializados assinaram a Convenção de Estrutura das Mudanças Climáticas, com a meta de estabilizar as emissões de dióxido de carbono. Subseqüentemente, na Conferência do Clima em Quioto, em 1997, um protocolo foi assinado para reduzir a emissão de gases que causam o efeito estufa.

Desde então, a procura por biocombustíveis para substituição de derivados de petróleo é uma realidade mundial por motivos estratégicos, econômicos e ambientais. O programa nacional do álcool desenvolvido no Brasil nas décadas de 1970 e 1980 é citado internacionalmente como exemplo bem sucedido da produção e uso de combustíveis alternativos (BON et al., 2008).

No Brasil, os biocombustíveis são responsáveis por abastecer mais de 50% da frota de automóveis, graças à mistura E25 (gasolina com 25% de etanol), e a popularidade dos carros *fuel-flex*, que correspondem a 90% das vendas de automóveis novos (JAGGER, 2009). O etanol tem a vantagem de produzir menos dióxido de carbono que a gasolina, e parte significativa desse gás ser reabsorvido pela cana-de-açúcar na safra seguinte. A produção de biocombustíveis também tem a vantagem de diminuir a dependência por combustíveis fósseis (GALBE; ZACCHI, 2002; GOMEZ et al., 2008).

Os biocombustíveis são renováveis e podem ser produzidos a partir de produtos agrícolas. No entanto há grande preocupação no que diz respeito às fontes utilizadas para produção de álcool, como a cana-de-açúcar e o milho, que são commodities agrícolas. Há mais de 200 anos Malthus preconizou que a população crescería de forma mais acelerada que a produção de alimentos no mundo. Mesmo com os ganhos na Revolução Verde e mais recentemente com os avanços da biotecnologia agrícola, ainda é possível que haja dificuldade em suprir a demanda por alimentos devido ao rápido crescimento populacional. O uso de commodities agrícolas tendo

como destino a produção de biocombustíveis tem causado preocupação, particularmente nos Estados Unidos. O dilema entre alimentos e biocombustíveis tem gerado aumento nos preços dos alimentos derivados do milho, mesmo com pesados subsídios do governo americano. Em contraste, o biocombustível de segunda-geração, a partir da biomassa, pode evitar esse conflito entre a produção de alimentos e de combustíveis. Para a eficiente utilização da biomassa lignocelulósica, a hidrólise enzimática (mediante celulasas microbianas) se constitui em importante gargalo tecnológico (GALBE; ZACCHI, 2002; GOMEZ et al., 2008).

Combustíveis derivados de biomassa celulósica são essenciais para superar a dependência excessiva do petróleo. No entanto, necessita de instrumentos para a transformação biotecnológica, sendo o pré-tratamento um elemento chave para a conversão biológica da celulose e hemicelulose em açúcares. Dentre os tratamentos da biomassa tem-se: o biológico, o químico, o físico e os processos térmicos (YANG; WYMAN, 2008).

Com tais considerações o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira, tendo-se como referências as linhagens *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30, conhecidas por suas elevadas capacidades hidrolíticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Celulose: Estrutura

Em virtude da preocupação com a ecologia, no sentido de preservar o meio ambiente contra o despejo de resíduos poluidores, passou-se a motivar o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, dos quais a celulose é o mais abundante, compreendendo cerca de dois terços de toda matéria orgânica existente no planeta (SPANNO et al., 1975).

A biomassa lignocelulósica, normalmente é uma fonte de baixo custo e abundante, produzida pela própria planta e representada pela parede celular. Tal material tem potencial para produção de energia, podendo ser simplesmente queimada para geração de calor e eletricidade, como no caso das destilarias no Brasil. Mas também tem sido vista como uma promissora fonte para produção de biocombustíveis líquidos (GALBE; ZACCHI, 2002; GOMEZ et al., 2008).

A lignocelulose é composta por três constituintes principais: celulose (23-53%), hemicelulose (20-35%) e lignina, sendo os dois primeiros polissacarídeos. A celulose é composta por moléculas de glicose e a hemicelulose por uma cadeia altamente ramificada de xilose e arabinose e que contém também glicose, manose e galactose (WEISLOGEL et al., 1996).

A celulose é formada por microfibrilas que são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular, estando firmemente empacotadas em cadeias lineares de D-glicose com ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). Os glucanos (polímeros de glicose) que constituem a microfibrila estão fortemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada (cristalina), que exclui água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. Como resultado, a celulose é muito forte, muito estável e resistente à degradação. Devido à configuração espacial alternante das ligações glicosídicas que unem resíduos de glicose adjacentes, a unidade de repetição da celulose é considerada a celobiose, um dissacarídeo de D-glicose com ligações β -(1 $\rightarrow$ 4). A estrutura molecular exata das microfibrilas de celulose ainda é desconhecida. Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por regiões amorfas menos organizadas. Dentro dos domínios cristalinos, os glucanos adjacentes estão altamente ordenados e unidos entre si por ligações não-covalentes, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Quando a celulose é degradada, primeiramente são atacadas as regiões amorfas,

liberando pequenas cristalitas, consideradas como correspondentes aos domínios cristalinos da microfibrila. As evidências obtidas através da microscopia eletrônica indicam que as microfibrilas de celulose são sintetizadas por complexos protéicos grandes e ordenados denominados rosetas de partículas ou complexos terminais, que estão implantados na membrana plasmática (KIMURA et al., 1999). Essas estruturas contém muitas unidades de celulose sintase, a enzima que sintetiza os β -(1 $\rightarrow$ 4)D-glucanos individuais da microfibrila (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Nas paredes celulares primárias, as microfibrilas de celulose são implantadas em uma matriz altamente hidratada. Tal estrutura fornece resistência e flexibilidade. No caso das paredes celulares, a matriz consiste de dois grupos principais de polissacarídeos, em geral chamados de hemiceluloses e pectinas, mais uma pequena quantidade de proteína estrutural. A matriz de polissacarídeos consiste de uma variedade de polímeros, que podem variar de acordo com o tipo de célula e com a espécie vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo os mesmos autores, as hemiceluloses são polissacarídeos flexíveis que caracteristicamente ligam-se à superfície da celulose. Elas podem formar correntes que reúnem microfibrilas de celulose em uma rede coesa ou podem funcionar como um revestimento deslizante para impedir o contato direto entre microfibrilas. Uma outra denominação para tais moléculas é glucanos de ligação cruzada. O termo hemicelulose abrange vários tipos diferentes de polissacarídeos como pentoses e hexoses. As pectinas formam uma fase gel hidratada na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Elas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose. Elas estabelecem também a porosidade da parede celular para as macromoléculas. Como as hemiceluloses, as pectinas incluem vários tipos diferentes de polissacarídeos. A parede primária é composta de aproximadamente 25% de celulose, 25% de hemiceluloses e 35% de pectinas. Após cessada a expansão das paredes, as células, às vezes, continuam a sintetizar uma parede, conhecida como secundária. As paredes secundárias são muitas vezes bastante espessas, servindo ao suporte mecânico da planta. Frequentemente, tais paredes secundárias possuem várias camadas e diferem da parede primária em estrutura e composição. A orientação das microfibrilas de celulose pode ter um melhor alinhamento paralelo nas paredes secundárias que nas primárias. As paredes secundárias são muitas vezes impregnadas com lignina (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A lignina é um polímero fenólico com um padrão de ligações complexo e irregular, unindo as subunidades aromáticas de álcool. Tais subunidades, sintetizadas a partir da fenilalanina, são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidase e lacase. Como a lignina se forma na parede, ela remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica, que se liga firmemente à celulose e impede a expansão da parede. A lignina acrescenta uma resistência mecânica significativa às paredes celulares e reduz a sua suscetibilidade ao ataque enzimático e de patógenos; reduz também a digestibilidade de material vegetal por animais (TAIZ; ZEIGER, 2004). A lignina é sem dúvida o grande problema para a hidrólise, fazendo com que o material lignocelulósico seja recalcitrante para hidrólise (GOMEZ et al., 2008).

2.2 Celulose: Degradação química

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica baseia-se na transformação da celulose em açúcares fermentáveis a serem utilizados pelas leveduras em uma etapa posterior da fermentação alcoólica (BON et al., 2008). No entanto, matérias-primas como resíduos agroindustriais, apresentam uma complexa composição físico-química, a qual oferece resistência ao ataque bioquímico dificultando sua utilização para a hidrólise e posterior conversão em materiais com alto valor agregado. Para a produção do bioetanol, geralmente são necessárias três fases. A primeira é a deslignificação para liberar a celulose e hemicelulose da lignina. A segunda fase é a hidrólise dos polímeros de carboidrato (celulose e hemicelulose) em açúcares livres, e a terceira, é a fermentação de hexoses e pentoses para produção de etanol (CHAMPAGNE, 2008).

A transformação dos polímeros da celulose em glicose, é portanto uma etapa fundamental na produção de alimentos, energia, produtos químicos e farmacêuticos. A sacarificação da celulose pode ser levada a efeito por hidrólise ácida ou enzimática. O processo ácido, em que geralmente se emprega ácido sulfúrico ou ácido clorídrico, apresenta como desvantagem o baixo rendimento de álcool, devido à parcial degradação pelo ácido, formando compostos que além de não serem fermentescíveis, podem inibir a atividade da levedura. Ademais, o uso freqüente do ácido ocasiona corrosões nos equipamentos e aumenta os riscos de acidentes pelo seu manuseio (MENEZES, 1980).

Basicamente, há dois tipos de processos de hidrólise ácida: um utiliza ácido diluído, enquanto o outro emprega ácido concentrado para catalisar a sacarificação. Geralmente, o

processo que usa ácido sulfúrico proporciona rendimentos mais elevados. Entretanto, a separação do ácido do produto hidrolisado é um problema, porque o produto açucarado não é fermentescível em ácido concentrado; o ácido, sendo relativamente caro, deve ser retornado ao processo para que seja economicamente viável (MENEZES, 1980). Segundo o mesmo autor, as pesquisas com ácidos diluídos têm priorizado o emprego do ácido sulfúrico. Embora o rendimento seja geralmente inferior, o ácido sulfúrico diluído pode ser prontamente separado dos açúcares. Assim, adição de cal ao ácido diluído resulta na precipitação do gesso que pode ser filtrado da solução de açúcares remanescentes. Ademais, o restante do ácido diluído torna a reciclagem não necessária e torna o processo economicamente viável.

2.3 Celulose: Degradação enzimática

O processo de hidrólise enzimática envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas que apresentam um alto custo associado a uma baixa produção (ZHANG et al., 2006). No entanto, a vantagem da hidrólise enzimática da celulose em relação à hidrólise ácida é que a reação pode ser conduzida em condições relativamente moderadas, ou seja, a 50°C e à pressão atmosférica, sem a indesejável formação de produtos de decomposição do açúcar. Entretanto, também com os ácidos diluídos, essas enzimas são incapazes de catalisar uma rápida e completa hidrólise da celulose nativa em glicose. As taxas de conversão variam de acordo com o tipo de resíduo, concentração da enzima e duração da hidrólise (MENEZES, 1980).

De acordo com o mesmo autor, na hidrólise enzimática as enzimas celulolíticas quebram apenas as ligações glicosídicas β -(1→4) da molécula da celulose. Embora existam enzimas celulolíticas de diversas fontes e de elevada atividade, não tem sido possível degradar a celulose nativa de maneira rápida e total mediante o processo enzimático. Essa dificuldade também se deve, em parte, como já foi mencionado, à complexa estrutura polimerizada da celulose e a sua baixa solubilidade em água que dificultam o processo de degradação microbiana. Sabe-se que muitos microrganismos são capazes de hidrolisar as celulosas modificadas, mas são poucos os que atacam a celulose nativa cristalina.

O complexo celulolítico requer a ação coordenada de três tipos de atividades enzimáticas que são: endoglucanases, exoglucanases e β -D-glicosidases. As endoglucanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório, clivam ligações glicosídicas internas da celulose liberando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, novas cadeias finais. Essas

enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC). A celulose cristalina é menos hidrolisada devido ao maior grau de organização molecular que apresenta. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (MARTINS, 2005).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) atuam nas extremidades redutoras (CBH I) e nas extremidades não redutoras (CBH II) da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celobiose (OYEKOLA et al., 2007). Essas enzimas não atuam sobre celulose solúvel por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, como carboximetílico (CMC). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre CMC são característicos para as endoglucanases, enquanto que a atividade contra celulose microcristalina (Avicel®) caracteriza as celobiohidrolases, tornando possível a diferenciação entre essas enzimas (MARTINS, 2005).

As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas endoglucanases e celobiohidrolases em glicose. Estritamente falando, β -glicosidases não são celulases legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional (MEDVE, 1997). A atividade das β -glicosidases pode ser determinada usando celobiose, a qual não é hidrolisada por endoglucanases nem exoglucanases (GHOSE, 1987).

A celulase total consiste de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, as quais sinergicamente hidrolisam a celulose cristalina. A atividade de celulase total é sempre determinada através de substrato insolúvel, incluindo o papel de filtro Whatman nº1. A União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) recomenda a utilização do papel de filtro como substrato ideal para determinação da atividade celulásica total (WOOD; BHAT, 1988), por estar facilmente disponível, ser barato e os ensaios fornecerem resultados reprodutíveis (COWARD-KELLY et al., 2003).

Ao longo dos anos, um grande número de microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos têm sido usados para cultivo em bagaço de cana-de-açúcar. No entanto, fungos filamentosos, especialmente os Basidiomycetos, são os mais utilizados para a produção de enzimas (PANDEY et al., 2000).

Trichoderma representa um gênero de fungos filamentosos que está amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solos e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. O fato das espécies do gênero se desenvolverem em um amplo espectro de substratos e condições ambientais, além de produzirem celulasas, torna este grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998; FOREMAN et al., 2003).

As espécies desse gênero produzem grandes quantidades de celulasas e outras enzimas hidrolíticas (KUBICEK, 1992), sendo *Trichoderma reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. O gênero é caracteristicamente reconhecido pela produção de diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (BÉGUIN, 1990).

O *Trichoderma reesei* QM9414 e o *Trichoderma reesei* RUTC30 são cepas mutagenizadas desenvolvidas com sucesso a partir do *Trichoderma reesei* QM 6a (anteriormente designado *Trichoderma viride* QM 6a) com a finalidade de obter microrganismos com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas (MANDELS, 1975). Além do *Trichoderma*, também *Penicillium*, *Aspergillus* e *Phanerochaete chrysosporium* (antigo *Sporotrichum pulverulentum*) produzem enzimas celulolíticas (PERSSON et al., 1991).

As celulasas têm sido produzidas por fermentação utilizando *Trichoderma reesei* QM9414 em farelo de arroz (LATIFIAN et al., 2007), bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz (MUTHUVELAYUDHAM; VIRUTHAGIRI, 2006); *Trichoderma reesei* RUTC30 em bagaço de cana-de-açúcar (MEKALA et al., 2008) e em farelo de trigo (SINGHANIA et al., 2007); *Trichoderma* sp e *Phanerochaete chrysosporium* em palha de arroz (KHAN et al., 2007); *Trichoderma reesei* ZU-02 em sabugo de milho (LIMING; XUELIANG, 2004); *Aspergillus niger* KK2 em farelo de trigo (KANG et al., 2004); *Aspergillus niger* IZ-9 em bagaço de cana-de-açúcar (AGUIAR; MENEZES, 2000); e *Penicillium achinulatum* em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (CAMASSOLA; DILLON, 2007).

As celulasas podem ser produzidas por fermentação submersa ou em estado sólido (INGRAM; DORAN, 1995; LEE, 1997), no entanto como citado anteriormente o custo da produção e o baixo rendimento dessas enzimas, são os maiores problemas para a aplicação industrial. No entanto, pesquisas quanto à habilidade dos microrganismos hidrolisarem celulose e hemicelulose utilizando substratos disponíveis têm sido feitas. Trabalhos têm sido direcionados tanto na produção de cepas lignocelulolíticas quanto no melhoramento do processo de fermentação (ESTERBAUER et al., 1991; HALTRICH et al., 1996).

Fermentação em estado sólido (FES) é o processo de fermentação que envolve a matriz sólida e ocorre em ausência ou quase ausência de água livre; no entanto, o substrato deve estar úmido o suficiente para o crescimento e metabolismo do microrganismo. A matriz sólida pode ser a fonte de nutrientes, ou simplesmente um suporte impregnado pelos nutrientes adequados que permite o desenvolvimento do microrganismo, sendo a umidade e o tipo do substrato empregado os fatores mais importantes que influenciam o processo de FES. A umidade depende do microrganismo utilizado, e também da natureza do substrato. Fungos necessitam de baixa umidade, entre 40-60% pode ser suficiente, mas a seleção do substrato depende de vários fatores principalmente relacionadas com o custo e disponibilidade, e portanto pode envolver a seleção de vários resíduos agro-industriais (SINGHANIA et al., 2009). Latifian et al. (2007) testaram diferentes umidades no farelo de arroz (40, 55, 70%) para o fungo *T. reesei* QM9414, e obtiveram melhores resultados de atividade de celulase com 70% de umidade.

Processos biotecnológicos como a FES são alternativas para utilização de resíduos agroindustriais como, palha de arroz (MUNIR et al., 2007), farelo de arroz (LATIFIAN et al., 2007) farelo de aveia (CAMASSOLA; DILLON, 2007), bagaço de cana-de-açúcar (MASSADEH et al., 2001; MUTHUVELAYUDHAM; VIRUTHAGIRI, 2006). Utilizado com diferentes microrganismos esse bioprocesso é uma alternativa para solucionar o problema da poluição ambiental (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A hidrólise e fermentação simultâneas (HFS) foi descrita pela primeira vez por Takagi et al. (1977), onde a hidrólise enzimática da celulose ocorre simultaneamente com a fermentação dos açúcares em etanol num mesmo reator. Então, as leveduras na presença das enzimas celulolíticas reduzem o acúmulo de açúcares no reator. Desse modo, a hidrólise é mais produtiva quando as etapas não ocorrem simultaneamente, devido ao não acúmulo de açúcares no meio. Outra vantagem desse processo é que se utiliza apenas um fermentador, reduzindo o

investimento, e a presença de etanol torna o meio menos vulnerável a invasão de microrganismos. No entanto, o processo de HFS requer condições semelhantes de pH, temperatura e concentração do substrato, para o bom desempenho tanto da hidrólise como da fermentação. Um problema é a diferença entre os ótimos de temperatura. Portanto é aconselhável a utilização de leveduras termotolerantes, já que o ótimo para a atividade celulolítica ocorre entre 40-45°C. Dentre os vários materiais lignocelulósicos utilizados está o bagaço de cana-de-açúcar (BALLESTEROS et al., 2004).

2.4 Potencial de uso do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos maiores resíduos lignocelulósicos da indústria de açúcar e álcool, sendo utilizado nas caldeiras como combustível. É composto de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Por ter baixa quantidade de cinzas (2,4%), tem a vantagem em comparação com outros resíduos, como a palha de arroz e de trigo, que tem respectivamente 17,5 e 11% de cinzas (PANDEY et al., 2000).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2010) a previsão para a próxima safra 2010/2011 é de 664 mil toneladas de cana-de-açúcar moída, quase 10% a mais que na anterior de pouco mais de 600 mil toneladas. Do total da cana-de-açúcar esmagada 45% serão destinadas à produção de açúcar, as quais devem produzir 38 mil toneladas do produto, 55% destinadas à produção de álcool, devendo gerar um volume total de 28 milhões de litros de álcool, sendo 8 milhões de litros de álcool anidro e 20 milhões de litros de álcool hidratado. A indústria sucroalcooleira produz grande quantidade de bagaço excedente, correspondendo a 25% do peso total da cana-de-açúcar, contendo cerca de dois terços da energia contida na cana. Desse modo o bagaço (juntamente com a palha), apresenta grande potencial para um processo de produção de etanol mediante uma hidrólise prévia (BIOTECH BRASIL, 2006).

A perspectiva de ampliação do mercado interno e externo para este combustível (etanol) está impulsionando a criação de alternativas economicamente viáveis e baseadas no uso de rejeitos da agroindústria, que são mais corretas para o meio ambiente. Não só o bagaço da cana-de-açúcar, mas também a palha pode ser utilizada na produção do bioetanol. Mesmo o uso do bagaço na co-geração de energia nas próprias usinas não é suficiente para consumir a produção anual deste resíduo. Este excedente de bagaço não utilizado aumentará proporcionalmente, caso haja aumento de produção de etanol no Brasil, o que já vem acontecendo. O etanol de biomassa

está perto de se tornar uma realidade em muitos países do mundo que investem seriamente neste processo. O aproveitamento de materiais lignocelulósicos na produção de etanol tem sido bastante estudado em países onde não se cultiva cana-de-açúcar (EDYE et al., 2006; GRAY et al., 2006).

Uma vantagem logística do Brasil com relação a esta tecnologia é que o bagaço é gerado na própria usina, prescindindo do caro transporte da biomassa para o local de processamento (BON et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento

Foram coletadas amostras de material vegetal em decomposição (4) no parque da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba e de bagaço de cana-de-açúcar (4) em diferentes usinas de açúcar na região de Piracicaba-SP. Uma porção de 5 g de amostra foi homogeneizada com 45 mL de água peptonada 0,1%, e alíquotas foram plaqueadas em meio BDA sólido (20% de batata, 2% de dextrose e 2% de agar) contendo tetraciclina (100mg/L) e incubadas a 28°C. Durante o crescimento em placas 10 isolados foram coletados buscando-se uma diversidade segundo a morfologia das colônias e repicados em BDA. Após crescimento a 28°C por 7 dias, discos de aproximadamente 1cm de diâmetro do meio contendo micélio foram recortados e armazenados à temperatura ambiente em vidros de cor âmbar contendo água esterilizada. Os isolados foram avaliados quanto à atividade celulolítica tomando-se os fungos *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30 como referências.

3.2 Identificação - Análise molecular através da região 26S rDNA

3.2.1 Extração do DNA dos isolados

A extração de ácido nucléico das hifas do fungo foi feita segundo o protocolo proposto por Raeder e Broda (1985). A massa micelial foi produzida em 30 mL de meio líquido BD (20% de batata e 2% de dextrose) mantidos a 28°C, sob agitação a 150 rpm por 3 dias, tendo como inóculo um disco de 1 cm de diâmetro de meio BDA contendo hifas do fungo.

O micélio produzido foi separado do meio de cultivo por filtração e lavado com água destilada para retirada de meio residual presente nas hifas. Na extração foi utilizado aproximadamente 0,3 g de micélio fresco que foi macerado com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana com o auxílio do pistilo. O macerado foi transferido para eppendorf de 2 mL e adicionou-se 500 µL de tampão Tris-HCl (trishidroximetilaminometano 1M, pH 8), 50 µL de SDS (sódio dodecil sulfato 10%) e 50 µL de mercapto-etanol. Os eppendorfs foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 minutos e posteriormente centrifugou-se a 12000g por 30 minutos para em seguida realizar a coleta de 600 µL da fase líquida (sobrenadante) separada do resto celular em um novo eppendorf de 2 mL. A seguir foi realizada a desproteinização do

sobrenadante com adição de 800 µL de clorofil (24clorofórmio: 25fenol: 1álcool isoamílico) e as amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 12000g por 5 minutos. Após a centrifugação formou-se um sistema bifásico e 400 µL da fase aquosa superior foi coletada e transferida para um novo eppendorf de 2 mL. Uma nova desproteinização foi realizada na fase aquosa adicionando-se 800 µL de CIA gelado (clorofórmio, álcool isoamílico) na proporção 24:1, com posterior homogeneização e centrifugação a 12000g por 5 minutos. Após centrifugação recolheu-se a fase superior da qual o DNA foi precipitado.

O DNA foi precipitado adicionando-se o mesmo volume de iso-propanol absoluto gelado e mantendo as amostras em banho de gelo (0°C) por 5 minutos. O DNA precipitado foi centrifugado a 12000g por 5 minutos e a fase líquida descartada. O precipitado visualizado no fundo do eppendorf foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado. A solução de etanol foi descartada e o DNA foi mantido em condição ambiente para eliminação de etanol residual. O DNA extraído foi então ressuspensionado em 50 µL de água destilada esterilizada. A integridade do DNA isolado foi verificada após eletroforese com tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris Base, 89 mM Ácido Bórico, 20 mM EDTA, pH 8), à 50mV por 1 hora de 5 µL da solução de DNA e 3 µL tampão de peso em gel de agarose 1%, utilizando Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) como revelador.

3.2.2 Amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR)

O fragmento da região do gene rDNA 26S de cada isolado foi realizada com o DNA extraído. A reação de PCR para amplificação da região rDNA 26S foi realizada em solução contendo: 25 ng de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer e 1,5 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 50 µL com água deionizada esterilizada. A reação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida de um ciclo com uma primeira etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto e uma segunda etapa de anelamento a 55°C durante 1 minuto e finalizando com terceira etapa de extensão de 72°C durante 1 minuto; este ciclo se repete por 35 vezes. Ao final da ciclagem houve uma etapa de extensão final de 72°C durante 7 minutos. As reações foram conduzidas no termociclador modelo GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os iniciadores específicos NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') e NL1 (5'-

GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3') amplificam fragmentos de 600 pares de bases (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; LEAL Jr et al., 2008).

Os fragmentos produzidos foram visualizados após eletroforese do volume total da reação com tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM Tris Base, 89 mM Ácido Bórico, 20 mM EDTA, pH 8), à 50 mV por 1 hora em gel de agarose 1%, utilizando Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) como revelador.

3.2.3 Purificação e quantificação do produto de PCR para reação de seqüenciamento

Após certificar-se dos fragmentos desejados produzidos pela reação de PCR uma nova reação foi conduzida para obtenção de material para o seqüenciamento. Antes de seguir para o seqüenciamento o produto de PCR obtido da reação foi purificado para eliminação de nucleotídeos, enzimas e iniciadores que pudessem interferir na reação do seqüenciamento. Na reação de PCR obtido da reação de 50 µL o fragmento de DNA amplificado foi precipitado adicionando 100 µL de isopropanol 65%, gelado, incubado à -4°C por 1 hora, e posteriormente homogeneizado. O DNA foi recuperado após centrifugação a 12000g por 20 minutos e a fase alcoólica foi descartada. O fragmento de DNA precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70%, gelado e recuperado após centrifugação a 12000g por 12 minutos, com posterior descarte do etanol 70%. Após evaporação do etanol residual em condição ambiente, o precipitado foi ressuspensionado em 30 µL de água deionizada esterilizada. O fragmento purificado foi visualizado após eletroforese de 5 µL da solução de DNA purificada, à 50 mV por 1 hora, em gel de agarose 1% e utilizando Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) como revelador. A quantificação do produto de PCR foi determinada por espectrofotometria, segundo Maniatis et al. (1982).

3.2.4 Seqüenciamento e análise das seqüências

Os produtos da amplificação do gene 26S rDNA foram seqüenciados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (CBTEC/USP). A reação de seqüenciamento de DNA foi realizada com 2 µL (aproximadamente 60 ng de DNA) dos produtos amplificados e purificados. O oligonucleotídeo iniciador utilizado para a reação foi o NL1. O seqüenciamento foi realizado utilizando o protocolo padrão do Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham

Biosciences). O seqüenciador utilizado foi o ABI Prisma-3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As seqüências foram analisadas através do software Chromas Lite versão 2.01. Os cromatogramas obtidos foram examinados para verificação da qualidade utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). A identificação dos fungos foi realizada através da utilização da ferramenta BLAST (Nacional Center for Biotechnology Information). As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados público GeneBank do NCBI para a certificação da região amplificada. O alinhamento foi realizado no programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007).

3.3 Volume de extrator

Em um experimento preliminar avaliou-se o volume de tampão para uma extração enzimática eficiente. Para tal, a linhagem *T. reesei* QM9414 foi repicada em tubo inclinado (slants), em BDA, e incubada à 28°C até esporulação. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de 10 mL de Triton-100 0,1%, resultando na concentração de 2×10^7 esporos/mL (em câmara de Neubauer)

Em frascos erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 2,5g do bagaço de cana-de-açúcar (previamente seco em estufa) e 25 mL da solução de sais segundo Mandels e Weber (1969) (Tabela 1). Após esterilização em autoclave (121°C por 30 minutos) inoculou-se o substrato de bagaço com 1 mL da suspensão de esporos, incubando-se a 28°C. No 10º dia de incubação, 10, 20, 30 e 40 mL de tampão citrato 0,05M (pH=4,8) foram adicionados a cada frasco e homogeneizado mediante agitação a 150 rpm a temperatura ambiente por 1 hora. A fase líquida foi separada através de filtração obtendo-se o extrato enzimático no qual foram estimadas as atividades enzimáticas.

Tabela 1 – Meio mineral de Mandels e Weber (1969)

Componentes	Unidade	Concentração
Solução de Sais		
KH ₂ PO ₄	g/L	2,0
(NH ₄)SO ₄	g/L	1,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	g/L	0,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	0,3
Elementos Traços		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	5,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	mg/L	1,6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	1,4
CoCl ₂	mg/L	2,0
Tween-80	mL/L	1,0
Peptona	g/L	1,0

Fonte: MANDELS; WEBER, 1969

3.4 Produção de celulase pelas cepas de *T. reesei* QM9414 e RUTC30

Em um segundo experimento comparou-se as duas linhagens de *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30, por serem elas amplamente utilizadas na literatura pesquisada. Para tal, os fungos foram repicados em tubos inclinados (slants), em BDA e incubados nas mesmas condições anteriores até esporulação. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de 10 mL de Triton-100 0,1%, resultando em concentrações (esporos/mL) de 2×10^7 e 6×10^7 para as linhagens RUTC30 e QM9414, respectivamente. Aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação, 40 mL de tampão citrato 0,05M (pH=4,8) foram adicionados a cada frasco e homogeneizado mediante agitação a 150 rpm a temperatura ambiente por 1 hora. A fase líquida foi separada através de filtração obtendo-se o extrato enzimático no qual foram estimadas as atividades enzimáticas.

3.5 Produção de celulase em bagaço de cana-de-açúcar

Um terceiro experimento foi conduzido, em idênticas condições, porém, com os isolados F1, F2, F4, G3, MAD e *Trichoderma reesei* QM9414, cujas suspensões de esporos apresentaram

concentrações próximas de 10^7 esporos/mL. Amostras foram removidas apenas após 10 dias de incubação.

3.6 Efeito do farelo de arroz na produção de celulase

No quarto experimento, mantendo-se as mesmas condições, avaliou-se diferentes formulações de substrato (tratamentos: 1- 100% bagaço de cana-de-açúcar; 2- 90% bagaço de cana-de-açúcar e 10% farelo de arroz; 3- 80% bagaço de cana-de-açúcar e 20% farelo de arroz; 4- 100% farelo de arroz) com os isolados F2, F4 e MAD e tomando-se como referências as cepas QM9414 e RUTC30, cujas suspensões de esporos apresentaram concentrações ao redor de 10^7 esporos/mL.

3.7 Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar sobre a produção de celulase

Finalmente, no quinto experimento, avaliou-se os isolados/fungos QM9414, RUTC30, F2, F4, G3, MAD, S1, S2, S3 e S6 (todos com concentrações próximas de 10^7 esporos/mL), utilizando bagaço de cana-de-açúcar quimicamente tratado. Para tal tratamento, 100 g de bagaço foram impregnados com 1.200 mL de ácido sulfúrico 1% (m/v) durante 24 horas e autoclavado por 60 minutos a 121°C, sendo a fração sólida separada por prensagem. O bagaço de cana-de-açúcar tratado teve a sua acidez sulfúrica parcialmente neutralizada (até pH=5,0) e acrescido da solução de sais e inóculo, mantendo-se as mesmas proporções de líquido/bagaço seco dos ensaios anteriores.

3.8 Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade de celulase total (FPase) utilizou-se do procedimento recomendado por Ghose (1987), empregando-se como substrato o papel de filtro Whatman nº1 cortado em tiras de 1x6 cm (correspondendo à aproximadamente 50 mg). O substrato foi colocado em tubos com capacidade de 25 mL, adicionando-se 1 mL de tampão citrato 0,05M (pH=4,8) e 0,5mL do extrato enzimático. A reação enzimática se processou a 50°C por 60 minutos em banho-maria. A seguir foi dosada a quantidade de glicose liberada, estimada como redutores avaliados pela reação com 3,0 mL do ácido dinitrosalicílico (DNS). As amostras foram

fervidas (100°C) por 5 minutos, resfriadas a 20°C, acrescidas de 20 mL de água destilada e avaliadas as absorvâncias em espectrofotômetro a 540nm (MILLER, 1959) (Tabela 2).

Tabela 2 – Método do ácido dinitrosalicílico (DNS) para estimar açúcar redutor

Reagentes DNS	
Dissolver	
Água destilada	1.416 mL
3,5-ácido dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
Adicionar	
Potássio sódio tartarato	306 g
Fenol (fundido a 50°C)	7,6 mL
Metabissulfito de sódio	8,3 g

Fonte: MILLER, 1959

Para a dosagem de endoglucanase (CMCase) igualmente empregou-se o protocolo de Ghose (1987) tendo a carboximetilcelulose sódica a 2% em tampão citrato 0,05M (pH=4,8) como substrato. Em tubos com capacidade de 25 mL, 0,5 mL de substrato foi incubado com 0,5 mL do extrato enzimático. Após a reação enzimática de hidrólise (a 50°C por 30 minutos) a glicose liberada foi estimada pela reação com ácido dinitrosalicílico.

Para ambas as atividades enzimáticas (celulase total e endoglucanase) conduziram-se controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima) e do substrato (branco da reação), separadamente, nos valores de absorvância obtidos.

Os valores de absorvância (a 540nm) foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose mediante reta padrão previamente estabelecida (GHOSE, 1987). Considerou-se que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 μ mol de glicose liberada por minuto (equivalente a 0,18 mg de glicose por minuto). As atividades enzimáticas foram expressas igualmente em atividade específica, ou seja, em relação ao conteúdo de proteínas nos extratos enzimáticos. Para tal, os teores de proteínas foram estimados mediante o método de Bradford (1976) empregando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.9 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos com delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições. O primeiro experimento foi conduzido em fatorial com 4 níveis (4 diferentes volumes de extrator); o segundo em parcelas subdivididas, sendo as parcelas principais os dias (3, 6, 9, 12 e 15 dias) e as subparcelas as cepas de *T. reesei* (QM9414 e RUTC30); o terceiro em fatorial com 6 níveis; no quarto e quinto ensaios considerou-se como parcelas principais os fungos e as subparcelas os substratos.

As comparações de médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância. O programa estatístico utilizado para executar as análises foi o ESTAT (Sistema para análise estatística, versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, 1992).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação

Os isolados foram identificados através da análise molecular pela região 26S rDNA e os resultados mostrados nas Tabelas 3 e 4:

Tabela 3 – Nomenclatura e identificação molecular dos isolados de serapilheira

Nomenclatura	Pares de bases	Seqüência que apresentou maior	Identidade
Isolados		identidade	
S1	510	<i>Aspergillus giganteus</i> (EF669981)	99%
S2	550	<i>Aspergillus fumigatus</i> (HM807348)	99%
S3	440	<i>Trichoderma viride</i> (GQ408917)	99%
		<i>Trichoderma hamatum</i> (HM466686)	99%
S6	380	<i>Trichoderma viride</i> (GQ408917)	99%
		<i>Trichoderma hamatum</i> (HM466686)	99%
MAD	470	<i>Trichoderma</i> sp RA 305 (GQ169750)	100%
TPB	545	<i>Trichoderma koningiopsis</i> (FJ430784)	99%

Tabela 4 – Nomenclatura e identificação molecular dos isolados de bagaço de cana-de-açúcar

Nomenclatura	Pares de bases	Seqüência que apresentou maior	Identidade
Isolados		identidade	
F1	507	<i>Peecilomyces variotti</i> (FJ345354)	98%
F2	400	<i>Moniliophthora perniciosa</i> (AY916742)	98%
F4	440	<i>Aspergillus fumigatus</i> (HM807348)	93%
G3	540	<i>Acremonium cellulyticus</i> (AB474751)	99%
		<i>Penicillium verruculosum</i> (AF510496)	99%

A Figura 1 mostra os isolados com 5 dias de crescimento em BDA:

Figura 1 – Fotos representativas dos isolados em BDA com 5 dias de crescimento a 28°C, (A) *Paecilomyces variotti* (F1); (B) *Moniliophthora perniciosa* (F2); (C) *Aspergillus fumigatus* (F4); (D) *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3); (E) *Aspergillus giganteus* (S1); (F) *Aspergillus fumigatus* (S2); (G) *Trichoderma viride*/*Trichoderma hamatum* (S3); (H) *Trichoderma viride*/*Trichoderma hamatum* (S6); (I) *Trichoderma* sp RA305 (MAD); (J) *Trichoderma koningiopsis* (TPB); (K) *Trichoderma reesei* RUTC30; (L) *Trichoderma reesei* QM9414

4.2 Volume de extrator

As atividades de celulase total (FPase), expressas em IU/mL, apresentadas pelo *T. reesei* QM9414, foram decrescentes à medida que se aumentou o volume de tampão extrator (Figura 2a), enquanto as atividades expressas em IU/g de bagaço de cana-de-açúcar aumentaram (Figura

2b). Tais resultados evidenciam que à medida que se aumenta o volume de extrator, mais enzima é solubilizada/deslocada do substrato sólido. No entanto, esta maior extração da enzima igualmente sofre o efeito da maior diluição no maior volume de extrator. Urbánszki, et al. (2000) através da fermentação e hidrólise simultânea com *T. reesei* RUTC30, utilizando grãos, fibra de milho e palha de trigo obtiveram 24, 30 e 59 IU/g, com 10, 80 e 160mL de extrator/g de substrato, respectivamente, igualmente evidenciando uma maior extração da enzima com maior volume de extrator. Tais valores se mostraram bem acima dos apresentados na presente pesquisa, porém foram utilizados diferentes substratos.

(a)

(b)

Figura 2 - Atividade de celulase total (FPase) para *T. reesei* QM9414 com 10 dias de incubação a 28°C, com diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de tampão para extração, (a) em IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si

Os valores de atividades de CMCase igualmente demonstram uma maior extração da enzima com os maiores volumes de tampão extrator, pois as atividades expressas em IU/g de bagaço se elevaram significativamente (Figura 3b). As atividades expressas em IU/mL de extrato não sofreram redução significativa com volumes de até 30 mL de extrator (Figura 3a), demonstrando o volume de extrator como fator importante na comparação de resultados.

Tais resultados demonstram que as atividades enzimáticas normalmente são subestimadas, pois as proteínas enzimáticas ficam associadas ao material sólido do meio de cultivo.

(a)

(b)

Figura 3 - Atividade de endoglucanase (CMCase) para *T. reesei* QM9414 com 10 dias de incubação a 28°C, empregando-se diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de tampão para extração, (a) em IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si

As atividades enzimáticas específicas, com base nos teores de proteínas nos extratos, mostraram uma tendência de aumento à medida que se aumentou o volume de extrato até 40 mL, tanto para a atividade de celulase total (Figura 4a) como para a endoglucanase (Figura 4b). Tais resultados indicam que o aumento do volume de tampão para 40 mL realmente provocou uma maior extração seletiva das enzimas, e não apenas de proteínas.

Por outro lado, extrações com volumes bem elevados acabam por diluir os extratos enzimáticos, induzindo à uma avaliação errônea das atividades de celulase, pois não se observa uma linearidade na atividade de celulase em função da diluição das enzimas (Ghose, 1987). Com tais considerações, buscando uma extração eficiente das enzimas e, tanto quanto possível, fazer uma comparação com algumas referências da literatura, optou-se nos experimentos seguintes, por utilizar 40 mL de volume de tampão extrator.

(a)

(b)

Figura 4 - Atividade específica (IU/mg de proteína) para *T. reesei* QM9414 com 10 dias de incubação a 28°C, utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e com diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de extrator, tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si

4.3 Produção de celulase pelas cepas de *T. reesei* QM9414 e RUTC30

Os crescimentos dos fungos *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30 foram visíveis empregando-se o bagaço de cana-de-açúcar embebido com a solução de sais minerais, colonizando toda a superfície do meio já com 9 dias, porém sem diferenças para os dois fungos avaliados. As atividades enzimáticas de celulase total dos respectivos extratos foram superiores (uma ordem de grandeza maior) para a linhagem QM9414 em comparação com a linhagem RUTC 30 (Figura 5). Latifian et al. (2007), trabalhando com *T. reesei* QM9414, obtiveram

atividade máxima de 1,2 IU/g após 8 dias a 30°C empregando farelo de arroz como substrato, enquanto neste trabalho se observa uma atividade de 2,3 IU/g no 15º dia, com bagaço de cana-de-açúcar como substrato (Figura 5b).

Já Lopes et al. (2008) utilizando a linhagem T676 de *T. reesei* isolada da Amazônia obtiveram atividade celulósica total de 0,042 IU/ml de extrato enzimático, empregando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, valores bem inferiores aos apresentados neste trabalho (Figura 5a).

(a)

(b)

Figura 5 - Atividade de celulase total (FPase) do *T. reesei* RUTC30 e QM9414 no transcorrer de 15 dias de crescimento em bagaço de cana-de-açúcar a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático, e (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios- padrão de 3 repetições e teste Tukey com interação entre dias e fungos com nível de significância de 5%. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro de um mesmo dia e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo

As atividades enzimáticas de endoglucanase da linhagem QM9414 igualmente se mostraram superiores, porém na mesma ordem de grandeza, no caso menos do que o dobro daquela apresentada pela linhagem RUTC30 (Figura 6). Enquanto a atividade de celulase total foi crescente ao longo do período estudado (Figura 5) a atividade de endoglucanase se apresentou quase que constante no caso da linhagem QM9414 (Figura 6). Na Figura 6a se observa maior atividade de CMCase de 0,3 IU/mL no 9º dia para *T. reesei* RUTC30, valor este que difere

estatisticamente apenas do 3º dia, pois a atividade manteve-se constante a partir do 6º até o 15º dia. A atividade máxima de endoglucanase para *T. reesei* QM9414 foi de 0,5 IU/mL no 15º dia.

Silva et al. (2008) isolaram de canavial uma linhagem de fungo que apresentou atividade de endoglucanase (CMCase) de 0,0046 IU/mL, cerca de 4 vezes superior à do *T. reesei* RUTC30. Nesse ensaio foram obtidos valores de atividade de endoglucanase para *T. reesei* RUTC30 bem acima dos mostrados por Silva et al. (2008)

Na Figura 6b, as atividades máximas de CMCase são 3,5 IU/g de bagaço de cana-de-açúcar para *T. reesei* RUTC30 e 5,7 IU/g de bagaço de cana-de-açúcar para *T. reesei* QM9414 no 15º dia.

Rodríguez-Zúñiga et al. (2008) obtiveram atividade de endoglucanase de 6,53 IU/g em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor utilizando *Aspergillus niger* com 3 dias de fermentação, enquanto que nesse ensaio foi obtido valor de atividade de endoglucanase superior a 5,0 IU/g com bagaço de cana-de-açúcar in natura.

Assim, os atuais valores de atividade enzimática poderiam ser superiores quando do emprego do bagaço de cana-de-açúcar tratado, especificamente em relação à endoglucanase.

(a)

(b)

Figura 6 - Atividade de endoglucanase (CMCase) do *T. reesei* RUTC30 e *T. reesei* QM9414 durante 15 dias de crescimento em bagaço de cana-de-açúcar a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático, e (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com interação entre dias e fungos com nível de significância de 5%. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro de um mesmo dia e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo

A atividade específica em relação a celulase total apresentou uma queda para as duas linhagens a partir do 3º dia, com diferença estatística entre as cepas ao longo do cultivo (Figura 7a), sugerindo que nos primeiros dias de cultivo a fração protéica é mais rica em enzimas celulolíticas totais.

A atividade específica em relação a endoglucanase apresentou uma queda ao longo dos 15 dias tanto para *T. reesei* QM9414 quanto para *T. reesei* RUTC30, porém não diferindo entre si estatisticamente. Como a atividade de endoglucanase se manteve constante, com base na massa de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 6b), a queda observada na atividade específica (em relação à proteína presente, Figura 7b) pode ser consequência de uma maior liberação de proteínas no meio de crescimento ao longo das amostragens, proteínas essas sem atividade celulolítica.

(a)

(b)

Figura 7 - Atividade específica (IU/mg de proteína) para *T. reesei* RUTC30 e *T. reesei* QM9414 durante 15 dias de cultivo a 28°C, em bagaço de cana-de-açúcar, utilizando como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com interação entre dias e fungos com nível de significância de 5%. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro de um mesmo dia e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo

4.4 Produção de celulase em bagaço de cana-de-açúcar

Uma vez constatada a superioridade da linhagem QM9414 sobre a RUTC30, quanto à atividade celulolítica, crescendo em bagaço de cana-de-açúcar, a mesma foi empregada como referência na avaliação dos isolados. Embora todos os isolados tenham apresentado boa capacidade de colonização do bagaço de cana-de-açúcar, as atividades celulolíticas totais se mostram inferiores à exibida pela linhagem referência (Figura 8). Após 10 dias da inoculação, a atividade alcançada pelo *T. reesei* QM9414 foi de 0,16 IU/mL de extrato, de 0,06 IU/mL para a linhagem F4 (*Aspergillus fumigatus*) e 0,05 IU/mL para o isolado MAD (*Trichoderma sp*). Lopes et al. (2008) obtiveram atividade de celulase total de 0,04 IU/mL para o *Trichoderma* T676 após 3 dias de incubação também em bagaço de cana-de-açúcar, valores próximos do *Paecilomyces variotti* (F1), *Aspergillus fumigatus* (F4), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma sp* (MAD) isolados no presente estudo (Figura 8a). Por outro lado o resultado de Silva et al. (2008) com valor de 0,007 IU/mL para linhagem isolada de canavial, se mostrou bem abaixo dos apresentados no presente trabalho.

Com relação à atividade de celulase total, Aguiar e Menezes (2000), utilizando *Aspergillus niger* IZ-9 com 7 dias de incubação, obtiveram valores de 0,05 IU/mL, também em bagaço de cana-de-açúcar, valor próximo dos apresentados pelos isolados deste trabalho (Figura 8a).

O *T. reesei* QM9414 também apresentou maior valor de atividade de celulase total em relação à massa de substrato, 4 IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Os demais isolados apresentaram valores de atividade enzimática inferiores ao fungo referência (Figura 8b). Comparativamente, Latifian et al. (2007) obtiveram atividade de celulase total de 1 IU/g de farelo de arroz utilizando o *T. reesei* QM9414, enquanto Camassola e Dillon (2007) relataram atividade de celulase total de 1 IU/g de bagaço pré-tratado, utilizando *Penicillium echinulatum*, com 5 dias de incubação, valores inferiores aos dos isolados *Paecilomyces variotti* (F1), *Aspergillus fumigatus* (F4), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma sp* (MAD) em bagaço sem tratamento. Kang et al. (2004), utilizando o mutante *Aspergillus niger* KK2, com 2 dias de incubação, obtiveram valores de atividade de celulase total de 5 IU/g de palha de arroz, próximos dos alcançados com *T. reesei* QM9414 no presente trabalho, de 4 IU/g de bagaço.

(a)

(b)

Figura 8 - Atividade enzimática (celulase total) utilizando papel de filtro (FP) como substrato, de extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias e expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com nível de significância de 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si

O isolado *Paecilomyces variotti* (F1) não diferiu estatisticamente quanto à atividade de endoglucanase em relação à cepa QM9414 (Figura 9). Os demais isolados apresentaram atividades superiores às encontradas por Silva et al. (2008), cujo valor foi de 0,0046 IU/mL.

Os isolados F1, G3 e MAD apresentaram valores para endoglucanase de 7,4, 6,6 e 6,9 IU/g de bagaço de cana-de-açúcar in natura, respectivamente (Figura 9b), valores superiores aos

encontrados por Rodríguez-Zúniga et al. (2008) de 6,5 IU/g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor utilizando *Aspergillus niger* com 3 dias de incubação.

(a)

(b)

Figura 9 - Atividade enzimática de endoglucanase, utilizando carboximetilcelulose (CMC) como substrato, de extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e, (b) IU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com nível de significância de 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si

Dentre os fungos testados, o *Aspergillus fumigatus* (F4) não diferiu estatisticamente do *T. reesei* QM9414 em relação à atividade específica de celulase total (Figura 10a). Quanto à atividade específica de endoglucanase o isolado F4 apresentou o maior valor, sugerindo uma maior concentração desta proteína enzimática na fração protéica do referido extrato (Figura 10b).

(a)

(b)

Figura 10 - Atividade enzimática específica (IU/mg de proteína), utilizando como substrato (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC) de extratos enzimáticos obtidos do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias a 28°C. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey com nível de significância de 5%. Médias com letras iguais não diferem entre si

4.5 Efeito do farelo de arroz na produção de celulase

Uma vez constatada atividade celulolítica nos isolados crescendo em bagaço de cana-de-açúcar, foram escolhidos os isolados *Moniliophthora perniciosa* (F2), *Aspergillus fumigatus* (F4) e *Trichoderma* sp (MAD), os quais foram avaliados em substrato contendo farelo de arroz, tendo-se como referência as linhagens QM9414 e RUTC30. Todos os isolados apresentaram boa

capacidade de colonização independentemente das adições de farelo de arroz e as atividades celulolíticas totais dos isolados se mostram inferiores à exibida pela linhagem referência QM9414 (Figura 11). Após 10 dias da inoculação, a atividade alcançada pelo *T. reesei* QM9414 foi de 0,11 IU/mL de extrato crescendo em bagaço de cana-de-açúcar, diferindo estatisticamente apenas do tratamento contendo somente farelo (0,06 IU/mL); igualmente o isolado *Trichoderma* sp (MAD) apresentou a menor atividade de celulase total em meio contendo somente farelo de arroz, sendo que no tratamento com 10% de farelo não houve diferença significativa entre QM9414 e MAD. O *T. reesei* RUTC30 não respondeu aos diferentes tratamentos, não havendo diferença significativa entre as atividades de celulase total, assim como os isolados F2 e F4 (Figura 11a). Esses resultados mostram que somente o farelo de arroz como substrato provocou uma diminuição da atividade celulolítica total para o isolado MAD e para o fungo QM9414, e que teores ideais de farelo de arroz podem ser benéficos para produção de celulase total. Os resultados mostram que cada linhagem reagiu diferentemente quanto à suplementação com farelo e sugerem que teores de farelo menores do que 10% deveriam ser também avaliados.

Munir et al. (2007) alcançaram máxima atividade de celulase em papel de filtro, com valores de 0,77 IU/mL, 0,60 IU/mL e 1,43 IU/mL com *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma ssp* e *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente, em quatro dias de fermentação com 100% de farelo de arroz, resultados superiores aos apresentados nesse trabalho.

A atividade de celulase total foi máxima para o *T. reesei* QM9414 (2,96 IU/g) e mínima para o *T. reesei* RUTC30 (0,31 IU/g), F2 (0,49 IU/g) e F4 (0,35 IU/g), em meio contendo somente bagaço de cana-de-açúcar. Já no substrato contendo 10% de farelo de arroz, as atividades de celulase total foram máximas para *T. reesei* QM9414 (2,6 IU/g) e para o isolado MAD (2,1 IU/g) não diferindo estatisticamente entre si (Figura 11b). Souza et al. (2008) obtiveram atividade de celulase total em torno de 3 IU/g de matéria seca com *T. reesei* RUTC30 em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo na proporção de 20:80 com 5 dias de incubação, e 2 IU/g de matéria seca quando utilizado somente farelo de trigo.

(a)

(b)

Figura 11 - Atividade de celulase total (FPase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de arroz e somente farelo de arroz como substrato, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato

Em meio contendo somente bagaço de cana-de-açúcar a atividade de endoglucanase foi máxima para o *T. reesei* QM9414 (0,4 IU/mL), diferindo estatisticamente somente do tratamento onde havia apenas farelo. Para a linhagem RUTC30 e para o isolado *Trichoderma* sp (MAD) as atividades de endoglucanase foram máximas nos tratamentos com 10% (0,22 e 0,32 IU/mL respectivamente) e 20% de farelo (0,21 e 0,31 IU/mL respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si os tratamentos. Para os isolados *Moniliophthora perniciosa* (F2) e

Aspergillus fumigatus (F4) as atividades de endoglucanase mostraram-se maiores no tratamento com 20% de farelo (0,26 IU/mL para ambos), não diferindo estatisticamente dos tratamentos com 10% de farelo e 100% de farelo de arroz. No substrato contendo 10% de farelo as atividades de endoglucanase foram máximas para *T. reesei* QM9414 (0,37 IU/mL) e para o isolado *Trichoderma* sp (MAD) (0,32 IU/mL) (Figura 12a).

Em meio contendo somente bagaço de cana-de-açúcar a atividade de endoglucanase foi máxima para o *T. reesei* QM9414 (10 IU/g) e máxima também em meio com 20% de farelo (9,7 IU/g). No substrato contendo 10% de farelo as atividades de endoglucanase foram máximas para *T. reesei* QM9414 (8,8 IU/g) e para o isolado MAD (7,4 IU/g), não diferindo entre si estatisticamente (Figura 12b).

Munir et al. (2007) obtiveram máxima atividade de endoglucanase com 4 dias de incubação em farelo de arroz com *Trichoderma harzianum* (1,9 IU/mL), *Trichoderma* sp (1,5 IU/mL) e *Phanerochaete chrysosporium* (2,4 IU/mL), ou seja, valores acima dos encontrados nesse trabalho.

Souza et al. (2008) obtiveram atividade de endoglucanase de 5 IU/g de farelo de trigo utilizando *T. reesei* RUTC30 com 5 dias de incubação, valores bem próximos dos encontrados nesse trabalho utilizando 10% de farelo de arroz (5,2 IU/g) (Figura 12b).

De modo geral, os fungos QM9414 e RUTC30 não se beneficiaram da adição de farelo de arroz, enquanto que para os isolados a suplementação com 10 e 20% de farelo mostrou-se eficiente.

(a)

(b)

Figura 12 - Atividade de endoglucanase (CMCase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de arroz e somente farelo de arroz como substrato, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g de substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato

Dentre os isolados testados, o *Aspergillus fumigatus* (F4) apresentou os maiores valores em relação às atividades específicas de celulase total e de endoglucanase, sugerindo uma maior concentração das referidas enzimas na fração protéica do extrato enzimático, notadamente com 20% de farelo (Figura 13). Como as atividades de celulase total (Figura 11) e endoglucanase (Figura 12) se mostram próximas com 10 e 20% de farelo, é possível que um favorecimento no crescimento do fungo tenha ocorrido com 20% de farelo, de modo a canalizar mais proteínas para a biomassa microbiana, aumentando-se assim a atividade específica das referidas enzimas, sem no entanto produzir mais moléculas enzimáticas.

(a)

(b)

Figura 13 - Atividade específica em relação à proteína presente no extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 0, 10 e 20% de farelo de arroz e somente farelo de arroz como substrato, durante 10 dias a 28°C, expressa em IU/mg proteína, tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato

4.6 Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar sobre a produção de celulase

As produções de celulase total nos tratamentos avaliados não mostraram diferenças marcantes no 10º dia de incubação. O bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente apresentou

níveis de produção enzimática para celulase total semelhantes ao do bagaço de cana-de-açúcar não tratado. Somente para QM9414 e para os isolados *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma* sp (S6) houve diferença significativa entre os tratamentos, o substrato de bagaço de cana-de-açúcar não tratado apresentou-se superior em relação a atividade de celulase total (Figura 14).

Aguiar e Menezes (2000) utilizando bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento, tratado com NaOH e tratado com NaOH e H₂SO₄, obtiveram atividades de celulase total de 0,05, 0,15 e 0,25 IU/mL respectivamente, em bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Aspergillus niger* IZ9 com 7 dias de fermentação.

(a)

(b)

Figura 14 - Atividade de celulase total (FPase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato

Para produção de endoglucanase, o bagaço de cana-de-açúcar não tratado se mostrou melhor para a cepa RUTC30 e para o isolado S3; para os isolados TPB e S2 o bagaço de cana-de-açúcar tratado se sobressaiu quanto a atividade de endoglucanase. Para os demais isolados não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Figura 15).

Aguiar e Menezes (2000) alcançaram atividade de endoglucanases ao 7º dia de fermentação de 0,20, 0,23 e 0,25 IU/mL respectivamente para os bagaços sem tratamento, tratado com NaOH e tratado com NaOH e H₂SO₄ utilizando *Aspergillus niger* IZ9.

Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006) mostraram que a adição de xilose ao bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com hidróxido de sódio à quente e em seguida lavado, induz a produção de enzimas celulolíticas, contradizendo os dados deste trabalho no qual o bagaço de cana-de-açúcar tratado não foi o que teve a maior produção de celulases, embora o pré-tratamento tenha sido diferente.

Apesar de relatos na literatura afirmando que o bagaço de cana-de-açúcar tratado tem vantagens sobre o bagaço de cana-de-açúcar não tratado quimicamente quanto a produção de celulase total e endoglucanase, esse tratamento não foi efetivo neste trabalho.

Camassola e Dillon (2009) trabalhando com *Penicillium echinulatum* constataram que o tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju* PS2001 em bagaço de cana-de-açúcar não foi efetivo na produção de enzimas celulolíticas.

(a)

(b)

Figura 15 - Atividade de endoglucanase (CMCase), de extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C, expressa em: (a) IU/mL de extrato enzimático e (b) IU/g de substrato. Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato

A maioria dos isolados não apresentou diferença significativa entre as atividades específicas de celulase total do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado. A linhagem QM9414 apresentou as maiores atividades específicas de celulase total no bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado, diferindo estatisticamente dos demais fungos (Figura 16a).

Quanto a atividade específica de endoglucanase, as linhagens QM9414, RUTC30, *Moniliophthora perniciosa* (F2), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3), *Aspergillus fumigatus* (S2) e *Trichoderma* sp (S6) não diferiram entre si, apresentando os maiores valores de atividade no bagaço de cana-de-açúcar não tratado. Os isolados *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Aspergillus fumigatus* (S2) não diferiram estatisticamente da linhagem QM9414 em bagaço de cana-de-açúcar tratado (Figura 16b).

(a)

(b)

Figura 16 - Atividade específica em relação à proteína presente no extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos em bagaço de cana-de-açúcar não tratado e tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C, expressa em IU/mg proteína, tendo como substrato: (a) papel de filtro (FP) e, (b) carboximetilcelulose (CMC). Médias e desvios-padrão de 3 repetições e teste Tukey 5% com interação entre fungos e substratos. Médias com letras maiúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo fungo e médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si para um mesmo substrato

5 CONCLUSÕES

As maiores atividades enzimáticas foram observadas com maior volume de extrator para o *T. reesei* QM9414, mostrando ter ocorrido maior extração para as referidas enzimas.

Grandes diferenças nas atividades celulolíticas foram observadas nas linhagens empregadas de *Trichoderma reesei* (QM9414 e RUTC30).

A linhagem *Trichoderma reesei* QM9414 apresentou maiores atividades de celulase total e endoglucanase em comparação com a linhagem *Trichoderma reesei* RUTC30, sendo as enzimas excretadas nos primeiros 3 dias de cultivo.

Apesar da linhagem *Trichoderma reesei* QM9414 ter apresentado maiores valores para atividade enzimática, em relação aos isolados *Paecilomyces variotti* (F1), *Aspergillus fumigatus* (F4), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma* sp (MAD), esses também mostraram ser bons produtores de enzimas celulolíticas, com valores superiores a de muitos fungos mencionados na literatura. Entretanto, devido a multiplicidade de procedimentos metodológicos e de substratos utilizados, torna-se difícil uma comparação de resultados.

O farelo de arroz pode ser um bom indutor da produção de enzimas celulolíticas, cuja proporção no substrato com bagaço de cana-de-açúcar é dependente do fungo utilizado.

O isolado *Trichoderma* sp (MAD) mostrou-se eficiente quanto a atividade celulolítica na presença de farelo de arroz, não diferindo estatisticamente da cepa *Trichoderma reesei* QM9414.

O tratamento térmico do bagaço de cana-de-açúcar facilitou a produção de endoglucanase para as linhagens *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma* sp RA305 (MAD), *Trichoderma koningiosis* (TPB), *Moniliophthora perniciosa* (F2), *Aspergillus fumigatus* (F4), *Acremonium cellulyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3), *Aspergillus fumigatus* (S2), e *Trichoderma* sp (S6).

A grande biodiversidade de fungos celulolíticos encontradas em nichos naturais e industriais, pode permitir o isolamento e seleção de linhagens com grande potencial de utilização biotecnológica, como a produção de celulases para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, jan./jun. 2000.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10872. **Process biochemistry**, London, v. 39, p. 1843-1848, 2004.
- BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.
- BIOTECH BRASIL: **Biotecnologia pode impulsionar a produção de álcool no Brasil**. 10/08/2006. Disponível em: <<http://www.biotechbrasil.bio.br>>. Acesso em: 10 maio 2009.
- BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA, N. Jr. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 253-269.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium achinulatum*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 29, p. 642-647, 2009.
- 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**, Oxford, v. 103, p. 2196-2204, 2007.
- CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, New York, v. 27, p. 51-57, 2008.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB **Brasil bate mais um recorde na produção de cana**. 30/04/2010. 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 10 maio 2010 .
- COWARD-KELLY, G.; AIELLO-MAZZARI, C.; KIM, S.; GRANDA, C.; HOLTZAPFLE, M. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulose activity. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 82, p. 745-749, 2003.

EDYE, L.A.; DOHERTY, W.; BLINCO, J.A.; BULLOCK, G. E. The sugar cane biorefinery: energy crops and processes for the production of liquid fuels and renewable commodity chemicals. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 108, n. 285, p. 31-41, 2006.

ESPOSITO, E., SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

ESTAT 2,0: sistema de análise de variância estatística. Jaboticabal: UNESP, Pólo Computacional, Distrito de Ciências Exatas, 1992.

ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HERMANN, A.; HAYN, M. Production of *Trichoderma* cellulose in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, Essex, v. 36, p. 51-65, 1991.

FOREMAN, P.K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N.S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T.D.; ENGLAND, D.J.; KELLEY, A.S.; MEERMAN, H.J.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H.A.; TEUNISSEN, P. J. M.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 34, p. 31988-31997, 2003.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 618-628, 2002.

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

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 3, p. 473-485, 2008.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nuclein Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.

INGRAM, L.O.; DORAN, J.B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 2-3, p. 235-241, 1995.

JAGGER, A. Brazil invests in second-generation biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 3, p. 8-10, 2009.

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

KHAN, MD. M. H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, MD. Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzymes. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, p. 381-386, 2007.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 2075-2085, 1999.

KUBICEK C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei* : structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlin, v. 45, p. 1-27, 1992.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 331-371, 1998.

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

LEAL Jr., G.A.; GOMES, L.H.; EFRAIM, P.; TAVARES, F.C.A.; FIGUEIRA, A. Fermentation of cação (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 788-798, 2008.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, p. 259-262, 2004.

LOPES, D.O.; CELLIGOI, M.A.P.C.; VARGAS, L.H.M.; BUZZATO, J.B. Produção de celulase por *Trichoderma* da Amazônia T676 em fermentação em estado sólido de bagaço de cana. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8., 2008, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 168-169.

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

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 95, p. 391-414, 1969.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.

- MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicilium echinulatum***. 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MASSADEH, M.I.; YUSOFF, W.M.W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, p. 1771-1774, 2001.
- MEDVE, J. **Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II**. 1997. 49 p. Thesis (Doctor in Biochemistry) - Department of Biochemistry, Lund University, Lund, 1997.
- MEKALA, N.K.; SINGHANIA, R.R.; SUKURAMAN, R.K.; PNADEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RutC-30: statistical optimization of process parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 151, p. 122-131, 2008.
- MENEZES, T.J.B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 233 p.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MUNIR, M.D.; KHAN, H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, M.D.Z. Use off ungi for the bioconversion of rice straw into cellulose enzymes. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, p. 381-386, 2007.
- MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.
- OYEKOLA, O.O.; NGESI, N.; WHITELEY, C.G. Isolation, purification and characterization of an endoglucanase and β -glucosidade from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 873-878, 2007.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. **Process Biochemistry**, London, v. 26, n. 2, p. 65-74, 1991.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RODRÍGUEZ-ZÚNIGA, U.F.; LEMO, V.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Produção de celulases por fermentação semi-sólida do bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8., 2008, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 175.

SILVA, E.S.; BALDINI, M.L.P.; LEITE, S.H.; SALOMONI, R.; MAIORANO, A.E.; PODRIGUES, M.F.A. Obtenção de novos microrganismos para produção de enzimas celulolíticas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8., 2008, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 115.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Improved cellulose production by *Trichoderma reesei* RutC-30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 142, p. 60-70, 2007.

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

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

SOUZA, T.F.C.; PINHEIRO, I.R.; KILIKIAN, B.V. Produção de celulases por *Trichoderma reesei* RUTC30 em cultivos semi-sólidos utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8., 2008, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 111.

SPANO, L.A.; MEDEIROS, J.; MANDELS, M. Enzymatic hydrolysis of cellulosic waste to glucose. **Resource Recovery and Conservation**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 279-294, 1975.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 343-353.

TAKAGI, M.; ABE, S.; SUZUKI, S.; EMERT, G.H.; YATA, N. A method for production of ethanol directly from cellulose using cellulase and yeast. In: Proceedings of Bioconversion Symposium, 1977, Delhi. **Anais...** 1977. p. 551-71.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.; MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G.; TENGERTDY, R.P. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, p. 65-69, 2000.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Amsterdam, v. 2, p. 26-40, 2008.

WEISLOGEL, A.; TYSON, S.; JOHNSON, D. **Biomass feedstock resources and composition, in handbook on bioethanol: production and utilization**. Washington: Taylor & Francis Group, 1996, 256 p.

WOOD, T.M.; BHAT, K.M. Methods for measuring cellulose activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, p. 87-112, 1988.

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

ANEXOS

Anexo A - Atividade enzimática do *Trichoderma reesei* QM9414 no 10º dia de incubação a 28°C, empregando-se diferentes volumes (10, 20, 30 e 40 mL) de extrator

Volume (mL)		FP			CMC		
		IU/mL extrator	IU/g bagaço	IU/mg poteína	IU/mL extrator	IU/g bagaço	IU/mg poteína
10		0,083	0,999	0,273	0,358	4,291	0,586
		0,083	0,999	0,296	0,364	4,369	0,648
		0,082	0,998	0,284	0,360	4,329	0,618
	Média	0,083	0,999	0,285	0,361	4,330	0,617
	Desvpad	0,000	0,000	0,016	0,004	0,055	0,043
20		0,063	1,006	0,227	0,350	5,604	0,632
		0,078	1,243	0,268	0,370	5,917	0,638
		0,069	1,124	0,247	0,359	5,777	0,634
	Média	0,070	1,125	0,248	0,360	5,778	0,635
	Desvpad	0,010	0,167	0,029	0,013	0,221	0,004
30		0,065	1,295	0,304	0,348	5,954	0,816
		0,067	1,332	0,287	0,345	6,897	0,743
		0,065	1,313	0,295	0,345	6,424	0,779
	Média	0,066	1,314	0,296	0,346	6,425	0,780
	Desvpad	0,001	0,026	0,012	0,002	0,040	0,051
40		0,057	1,376	0,328	0,315	7,563	0,901
		0,061	1,465	0,357	0,333	7,982	0,973
		0,058	1,420	0,341	0,323	7,771	0,936
	Média	0,059	1,421	0,342	0,324	7,772	0,937
	Desvpad	0,003	0,063	0,021	0,012	0,295	0,051

Anexo B – Atividade enzimática das cepas *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30 no transcorrer de 15 dias de crescimento em bagaço de cana-de-açúcar a 28°C

(continua)							
Dias	Fungos	FP			CMC		
		IU/mL extrator	IU/g bagaço	IU/mg poteína	IU/mL extrator	IU/g bagaço	IU/mg poteína
3	QM9414	0,089	1,066	0,747	0,456	5,471	3,831
		0,086	1,031	0,601	0,415	4,974	2,899
		0,086	1,037	0,588	0,434	5,205	2,950
	Média	0,087	1,044	0,645	0,435	5,216	3,227
		Desvpad	0,002	0,019	0,088	0,021	0,248
	RUTC30	0,016	0,197	0,482	0,189	2,263	5,547
		0,013	0,157	0,139	0,182	2,183	1,935
		0,012	0,147	0,100	0,164	1,970	1,346
	Média	0,013	0,152	0,120	0,178	2,139	2,943
		Desvpad	0,001	0,007	0,028	0,013	0,151
6	QM9414	0,140	1,677	0,463	0,459	5,505	1,519
		0,124	1,484	0,414	0,420	5,046	1,406
		0,094	1,699	0,350	0,412	7,421	1,527
	Média	0,132	1,580	0,438	0,440	5,276	1,463
		Desvpad	0,011	0,137	0,035	0,027	0,325
	RUTC30	0,012	0,145	0,072	0,289	3,463	1,728
		0,013	0,150	0,070	0,288	3,454	1,608
		0,009	0,167	0,047	0,287	5,164	1,449
	Média	0,012	0,148	0,071	0,288	3,458	1,668
		Desvpad	0,000	0,004	0,002	0,006	0,085
9	QM9414	0,130	1,565		0,459	5,513	
		0,122	1,466	0,330	0,452	5,423	1,221
		0,114	1,597	0,337	0,437	6,123	1,294
	Média	0,126	1,516	0,330	0,456	5,468	1,260
		Desvpad	0,006	0,070	0,005	0,064	0,054
	RUTC30	0,016	0,197	0,065	0,303	3,633	1,966
		0,015	0,174	0,072	0,278	3,338	1,370
		0,010	0,136	0,042	0,289	4,047	1,268
	Média	0,015	0,186	0,068	0,290	3,486	1,668
		Desvpad	0,001	0,016	0,005	0,017	0,421

Anexo B – Atividade enzimática das cepas *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30 no transcorrer de 15 dias de crescimento em bagago de cana-de-açúcar a 28°C

(continuação)

Dias	Fungos						
		IU/mL extrator	FP IU/g bagaço	IU/mg poteína	IU/mL extrator	CMC IU/g bagaço	IU/mg poteína
12	QM9414	0,166	1,992	0,445	0,433	5,196	1,161
		0,164	1,973	0,419	0,409	4,903	1,042
		0,149	2,082	0,411	0,418	5,852	1,155
	Média	0,165	1,982	0,432	0,421	5,050	1,102
	Desvpad	0,001	0,014	0,018	0,017	0,207	0,084
	RUTC30	0,016	0,186	0,094	0,274	3,284	1,659
		0,021	0,254	0,093	0,280	3,357	1,227
		0,009	0,130		0,272	3,801	
	Média	0,018	0,220	0,093	0,277	3,321	1,443
	Desvpad	0,004	0,048	0,001	0,004	0,051	0,305
15	QM9414	0,195	2,342	0,452	0,487	5,839	1,126
		0,187	2,238	0,504	0,470	5,640	1,270
		0,000	0,000	0,000	0,479	5,746	1,098
	Média	0,190	0,035	0,319	0,478	5,742	1,165
	Desvpad	0,110	1,323	0,277	0,008	0,099	0,092
	RUTC30	0,013	0,154		0,281	3,368	
		0,009	0,104	0,031	0,288	3,460	1,015
		0,013	0,155		0,286	3,428	
	Média	0,011	0,002	0,031	0,285	3,419	1,015
	Desvpad	0,002	0,029		0,004	0,047	

Anexo C – Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, F1, F2, F4, G3 e MAD em bagaço de cana-de-açúcar durante 10 dias a 28°C

Fungos	FP			CMC		
	IU/mL extrator	IU/g bagaço	IU/mg poteína	IU/mL extrator	IU/g bagaço	IU/mg poteína
QM9414		0,160	4,159	0,657	0,306	7,960
		0,192	4,991	0,648	0,325	8,444
		0,125	3,239	0,554	0,334	8,679
F1	Média	0,159	4,130	0,623	0,322	8,361
	Desvpad	0,034	0,876	0,057	0,014	0,366
		0,050	1,311	0,360	0,278	7,222
		0,067	1,749	0,485	0,275	7,154
		0,062	1,611	0,450	0,300	7,811
	Média	0,060	1,557	0,431	0,284	7,396
F2	Desvpad	0,009	0,224	0,065	0,014	0,361
		0,013	0,345	0,187	0,159	4,134
		0,019	0,501	0,252	0,164	4,273
		0,024	0,614	0,205	0,192	4,992
	Média	0,019	0,487	0,214	0,172	4,466
	Desvpad	0,005	0,135	0,034	0,018	0,461
F4		0,069	1,786	0,825	0,249	6,464
		0,071	1,854	0,607	0,215	5,599
		0,056	1,457	0,647	0,249	6,480
	Média	0,065	1,699	0,682	0,238	6,181
	Desvpad	0,008	0,212	0,117	0,019	0,504
		0,068	1,764	0,233	0,247	6,424
G3		0,043	1,110	0,185	0,259	6,723
		0,060	1,556	0,246	0,254	6,612
	Média	0,057	1,477	0,223	0,253	6,586
	Desvpad	0,013	0,334	0,032	0,006	0,151
		0,051	1,334	0,222	0,262	6,800
		0,045	1,179	0,214	0,272	7,066
MAD		0,054	1,415	0,215	0,265	6,884
	Média	0,050	1,310	0,217	0,266	6,917
	Desvpad	0,005	0,120	0,004	0,005	0,136

Anexo D – Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, RUTC30, F2, F4 e MAD em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de arroz, durante 10 dias a 28°C

(continuação)

Fungo	Substrato	FP			CMC		
		IU/mL	IU/g	IU/mg	IU/mL	IU/g	IU/mg
F2	100% B	0,025	0,653	0,226	0,222	5,766	1,993
		0,016	0,426	0,356	0,176	4,585	3,828
		0,016	0,408	0,249	0,147	3,813	2,326
	Média	0,019	0,496	0,277	0,182	4,721	2,716
		Desvpad	0,005	0,137	0,069	0,038	0,984
			0,005	0,137	0,069	0,038	0,984
	10% F	0,042	1,013	0,270	0,224	5,379	1,434
		0,033	0,784	0,211	0,213	5,113	1,373
		0,037	0,899	0,239	0,219	5,246	1,372
	Média	0,037	0,899	0,240	0,219	5,246	1,404
		Desvpad	0,005	0,114	0,042	0,006	0,133
			0,005	0,114	0,042	0,006	0,133
	20% F	0,037	0,879	0,226	0,229	5,490	1,411
		0,055	1,329	0,299	0,295	7,082	1,595
		0,046	1,104	0,261	0,262	6,286	1,410
	Média	0,046	1,104	0,262	0,262	6,286	1,503
		Desvpad	0,009	0,225	0,052	0,047	1,126
			0,009	0,225	0,052	0,047	1,126
	100% F	0,021	0,419	0,161	0,245	4,907	1,880
		0,034	0,682	0,244	0,254	5,073	1,820
		0,033	0,658	0,240	0,245	4,899	1,786
	Média	0,029	0,586	0,215	0,248	4,960	1,828
		Desvpad	0,007	0,145	0,047	0,005	0,098
			0,007	0,145	0,047	0,005	0,098
F4	100% B	0,013	0,344	0,099	0,164	4,274	1,227
		0,014	0,370	0,172	0,159	4,133	1,925
		0,013	0,336	0,334	0,161	4,199	4,173
	Média	0,013	0,350	0,202	0,162	4,202	2,442
		Desvpad	0,001	0,018	0,120	0,003	0,070
			0,001	0,018	0,120	0,003	0,070
	10% F	0,028	0,661	0,152	0,205	4,912	1,128
		0,029	0,694	0,152	0,224	5,383	1,180
		0,040	0,963	0,191	0,275	6,599	1,307
	Média	0,032	0,773	0,152	0,235	5,631	1,154
		Desvpad	0,007	0,166	0,000	0,036	0,871
			0,007	0,166	0,000	0,036	0,871
	20% F	0,040	0,970	1,025	0,288	6,909	7,304
		0,039	0,945	0,623	0,257	6,164	4,065
		0,046	1,094	0,857	0,234	5,625	4,409
	Média	0,042	1,003	0,824	0,260	6,233	5,684
		Desvpad	0,003	0,079	0,284	0,027	0,644
			0,003	0,079	0,284	0,027	0,644
	100% F	0,009	0,178	0,128	0,195	3,899	2,796
		0,014	0,273	0,184	0,261	5,215	3,530
		0,024	0,485	0,249	0,243	4,853	2,499
	Média	0,016	0,312	0,187	0,233	4,656	2,941
		Desvpad	0,008	0,157	0,061	0,034	0,680
			0,008	0,157	0,061	0,034	0,680

Anexo D – Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, RUTC30, F2, F4 e MAD em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de arroz, durante 10 dias a 28°C

(conclusão)							
Fungo	Substrato	FP			CMC		
		IU/mL	IU/g	IU/mg	IU/mL	IU/g	IU/mg
MAD	100% B	0,051	1,331	0,427	0,245	6,367	2,044
		0,037	0,965	0,262	0,188	4,885	1,326
		0,078	2,026	0,378	0,217	5,636	1,052
	Média	0,055	1,440	0,356	0,217	5,629	1,474
		Desvpad	0,021	0,539	0,085	0,028	0,741
	10% F	0,076	1,831	0,418	0,330	7,910	1,805
		0,117	2,807	0,553	0,331	7,933	1,562
		0,067	1,605	0,270	0,305	7,323	1,230
	Média	0,087	2,081	0,413	0,322	7,722	1,532
		Desvpad	0,027	0,639	0,142	0,014	0,346
	20% F	0,071	1,696	0,390	0,306	7,338	1,686
		0,066	1,585	0,320	0,342	8,205	1,656
		0,043	1,029	0,203	0,277	6,644	1,308
	Média	0,060	1,437	0,304	0,308	7,395	1,550
		Desvpad	0,015	0,358	0,095	0,033	0,782
	100% F	0,010	0,208	0,089	0,116	2,316	0,995
		0,016	0,322	0,132	0,103	2,070	0,850
		0,011	0,229	0,089	0,152	3,033	1,182
	Média	0,013	0,253	0,104	0,124	2,473	1,009
		Desvpad	0,003	0,061	0,025	0,500	0,166

B= bagaço de cana-de-açúcar; F= farelo de arroz

Anexo E – Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, MAD, RUTC30, TPB, F2, F4, G3, S1, S2, S3 e S6 em bagaço de cana-de-açúcar não tratado, durante 10 dias a 28°C

(continua)						
Fungo		FP			CMC	
		IU/mL	IU/g	IU/mg	IU/mL	IU/g
QM9414		0,197	2,962	0,564	0,353	5,298
		0,289	4,333	0,693	0,379	5,690
		0,258	3,870	0,746	0,400	6,005
MAD	Média	0,248	3,721	0,668	0,378	5,664
	Desvpad	0,046	0,697	0,094	0,024	0,354
		0,025	0,369	0,060	0,218	3,275
		0,018	0,269	0,046	0,204	3,055
		0,016	0,235	0,043	0,196	2,947
	Média	0,019	0,291	0,050	0,206	3,092
RUTC30	Desvpad	0,005	0,070	0,009	0,011	0,167
		0,006	0,091	0,023	0,218	3,273
		0,005	0,068	0,016	0,243	3,643
		0,003	0,038	0,009	0,239	3,582
	Média	0,004	0,066	0,016	0,233	3,500
	Desvpad	0,002	0,026	0,007	0,013	0,198
TPB		0,011	0,159	0,033	0,176	2,647
		0,015	0,228	0,047	0,142	2,130
		0,015	0,223	0,046	0,156	2,335
	Média	0,014	0,203	0,042	0,158	2,371
	Desvpad	0,003	0,039	0,008	0,017	0,261
		0,005	0,075	0,017	0,244	3,660
F2		0,003	0,049	0,010	0,239	3,580
		0,002	0,035	0,009	0,227	3,401
	Média	0,004	0,053	0,012	0,236	3,547
	Desvpad	0,001	0,020	0,004	0,009	0,132
		0,025	0,372	0,058	0,237	3,562
		0,018	0,277	0,043	0,232	3,485
F4		0,009	0,135	0,023	0,231	3,467
	Média	0,017	0,261	0,041	0,234	3,505
	Desvpad	0,008	0,119	0,017	0,003	0,051
		0,067	1,010	0,191	0,274	4,116
		0,061	0,919	0,161	0,312	4,680
		0,069	1,039	0,187	0,338	5,071
G3	Média	0,066	0,989	0,180	0,308	4,622
	Desvpad	0,004	0,062	0,017	0,032	0,480

Anexo E – Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, MAD, RUTC30, TPB, F2, F4, G3, S1, S2, S3 e S6 em bagaço de cana-de-açúcar não tratado, durante 10 dias a 28°C

(continuação)

Fungo	FP			CMC		
	IU/mL	IU/g	IU/mg	IU/mL	IU/g	IU/mg
S1		0,005	0,071	0,027	0,075	1,129
		0,003	0,046	0,022	0,038	0,566
		0,007	0,102	0,033	0,132	1,974
	Média	0,005	0,073	0,028	0,082	1,223
	Desvpad	0,002	0,028	0,006	0,047	0,709
S2		0,014	0,215	0,093	0,203	3,044
		0,015	0,226	0,071	0,231	3,464
		0,017	0,260	0,082	0,234	3,515
	Média	0,016	0,234	0,082	0,223	3,341
	Desvpad	0,002	0,023	0,011	0,017	0,259
S3		0,010	0,144	0,039	0,114	1,711
		0,014	0,217	0,065	0,152	2,281
		0,006	0,093	0,025	0,136	2,041
	Média	0,010	0,151	0,043	0,134	2,011
	Desvpad	0,004	0,062	0,020	0,019	0,287
S6		0,050	0,756	0,176	0,273	4,098
		0,054	0,806	0,157	0,253	3,789
		0,058	0,877	0,234	0,263	3,947
	Média	0,054	0,813	0,189	0,263	3,945
	Desvpad	0,004	0,061	0,040	0,010	0,154

Anexo F – Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, MAD, RUTC30, TPB, F2, F4, G3, S1, S2, S3 e S6 em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C

(continua)						
Fungo		FP			CMC	
		IU/mL	IU/g	IU/mg	IU/mL	IU/g
QM9414		0,078	1,173	0,485	0,418	6,270
		0,048	0,719	0,424	0,349	5,239
		0,084	1,267	0,534	0,418	6,264
MAD	Média	0,070	1,053	0,481	0,395	5,924
	Desvpad	0,020	0,293	0,055	0,040	0,594
		0,021	0,313	0,162	0,259	3,879
		0,010	0,155	0,096	0,215	3,228
		0,020	0,300	0,162	0,265	3,973
	Média	0,017	0,256	0,140	0,246	3,693
RUTC30	Desvpad	0,006	0,088	0,038	0,027	0,406
		0,004	0,058	0,033	0,018	0,277
		0,004	0,054	0,029	0,138	2,068
		0,002	0,028	0,016	0,002	0,037
	Média	0,003	0,047	0,026	0,051	0,769
	Desvpad	0,001	0,016	0,009	0,076	1,136
TPB		0,003	0,052	0,026	0,214	3,207
		0,009	0,135	0,072	0,208	3,122
		0,010	0,146	0,078	0,189	2,834
	Média	0,007	0,111	0,059	0,204	3,054
	Desvpad	0,003	0,051	0,028	0,013	0,195
		0,017	0,251	0,130	0,236	3,540
F2		0,019	0,292	0,138	0,253	3,800
		0,023	0,340	0,195	0,253	3,792
	Média	0,020	0,294	0,155	0,247	3,711
	Desvpad	0,003	0,045	0,035	0,010	0,148
		0,026	0,395	0,177	0,269	4,031
		0,028	0,425	0,216	0,249	3,736
F4		0,025	0,381	0,189	0,278	4,169
	Média	0,027	0,401	0,194	0,265	3,979
	Desvpad	0,001	0,022	0,020	0,015	0,221
		0,033	0,499	0,245	0,348	5,227
		0,047	0,699	0,331	0,348	5,224
		0,052	0,778	0,357	0,348	5,223
G3	Média	0,044	0,659	0,311	0,348	5,225
	Desvpad	0,010	0,144	0,059	0,000	0,002

Anexo F - Atividade do extrato enzimático obtido do cultivo dos fungos QM9414, MAD, RUTC30, TPB, F2, F4, G3, S1, S2, S3 e S6 em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente, durante 10 dias a 28°C

(continuação)

Fungo	FP			CMC		
	IU/mL	IU/g	IU/mg	IU/mL	IU/g	IU/mg
S1		0,002	0,025	0,013	0,092	1,387
		0,003	0,040	0,022	0,091	1,369
		0,004	0,066	0,037	0,079	1,180
	Média	0,003	0,044	0,024	0,087	1,312
	Desvpad	0,001	0,021	0,012	0,008	0,114
S2		0,021	0,314	0,212	0,264	3,958
		0,033	0,500	0,263	0,282	4,224
		0,045	0,675	0,338	0,287	4,298
	Média	0,033	0,496	0,271	0,277	4,160
	Desvpad	0,012	0,181	0,063	0,012	0,179
S3		0,001	0,014	0,008	0,030	0,447
		0,002	0,026	0,014	0,032	0,481
		0,001	0,019	0,011	0,019	0,292
	Média	0,001	0,020	0,011	0,027	0,407
	Desvpad	0,000	0,006	0,003	0,007	0,101
S6		0,009	0,139	0,061	0,195	2,929
		0,008	0,125	0,053	0,189	2,830
		0,013	0,199	0,075	0,224	3,360
	Média	0,010	0,154	0,063	0,203	3,040
	Desvpad	0,003	0,039	0,011	0,019	0,282