

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

THAIS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR
FUNGOS ISOLADOS DA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS**

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2020

THAIS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FUNGOS
ISOLADOS DA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS**

**Evaluation of cellulolytic enzyme production by fungi isolated from the
Campos Gerais region**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Sabrina Ávila Rodrigues.

PONTA GROSSA

2020



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



THAIS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FUNGOS ISOLADOS
DA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 25 de Setembro de 2020

Prof.a Juliana Vitoria Messias Bittencourt, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Eduardo Bittencourt Sydney, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Sabrina Avila Rodrigues, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Vania Aparecida Vicente, Doutorado - Universidade Federal Do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/09/2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus Pais, Afonso e Edna, e meu irmão, Thiago, pelo amor, exemplo, apoio e incentivo que me deram sempre.

Agradeço ao meu noivo, Matheus, por toda a força que me deu, pelo conhecimento compartilhado, por todo amor, carinho e respeito.

Gostaria também de agradecer a todos meus colegas de mestrado pelo companheirismo, amizade e ajuda incondicional.

A minha orientadora, Prof.^a Juliana Bittencourt, pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Um agradecimento a minha coorientadora, Prof.^a Sabrina Ávila Rodrigues por toda orientação, ajuda e ensinamentos.

Ao Prof. Eduardo Bittencourt Sydney, por toda a atenção, ensinamentos e auxílio concedidos na etapa do Biorreator.

À UTFPR, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse projeto.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

RESUMO

OLIVEIRA, Thais. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas por fungos isolados da região dos Campos Gerais**. 2020. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

As enzimas são catalisadores naturais de alto interesse biotecnológico. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de micro-organismos, sendo as de origem microbianas as mais utilizadas. Existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais e os fungos filamentosos estão entre as principais fontes microbianas produtoras destas enzimas. Neste trabalho foi avaliado o potencial enzimático de fungos isolados do solo da região de Ponta Grossa – PR, utilizando farelo de trigo como substrato. Para isso, realizou-se 3 etapas: seleção dos fungos, fermentações em frascos agitados e fermentação em biorreator. A seleção dos isolados foi realizado inoculando os fungos em placas de Petri contendo meio ágar suplementado com carboximetilcelulose (CMC) incubadas por 4 dias à 32°C. Após o período de incubação, as placas foram reveladas utilizando o corante Vermelho do Congo 0,1% (p/v), para a verificação do halo de degradação enzimática. Em seguida foram determinados os índices enzimáticos (I.E). Com essa etapa foi possível selecionar 3 fungos com os melhores índices enzimáticos para a etapa de fermentação submersa sob agitação. A fermentação submersa foi realizada a 32 °C, pH 5,4 e agitação de 150 rpm. Os fungos foram avaliados quanto a produção de celulasas. O isolado CMIB-174 apresentou uma maior atividade enzimática tanto para CMCCase (0,032 UI/mL) quanto a FPase (0,060 UI/mL). Portanto, o isolado CMIB-174 foi escolhida para o teste em biorreator. Pode-se observar que o ensaio em biorreator favoreceu as atividades de CMCCase e FPase com um aumento significativo de 433% e 146%, respectivamente. Porém, todas as linhagens utilizadas no presente trabalho, apresentaram baixas atividades enzimáticas quando comparadas a outros resultados obtidos na literatura.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Enzimas. Celulasas. Farelo de trigo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thais. **Evaluation of cellulolytic enzyme production by fungi isolated from the Campos Gerais region.** 2020. 70p. Dissertation (Master Degree in Biotechnology- Federal Technology University - Paraná. Ponta Grossa, 2020.

Enzymes are natural catalysts of high biotechnological interest. These biocatalysts can be extracted from animal, vegetable and microorganism tissues, with microbial origin being the most used. There is a worldwide increase in the consumption of industrial enzymes and filamentous fungi are among the main microbial sources producing these enzymes. In this work, the enzymatic potential of fungi isolated from the soil of the region of Ponta Grossa - PR was evaluated, using wheat bran as a substrate. For this, 3 stages were carried out: fungi screening, fermentation in agitated flasks and fermentation in a bioreactor. The screening was carried out by inoculating the fungi in Petri dishes containing agar medium and supplemented with carboxymethylcellulose (CMC) incubated for 4 days at 32°C. After the incubation period, the petri dishes were developed using the Congo Red 0.1% (w/v) dye, to verify the enzyme halo. Then the enzyme indexes (I.E) were determined. With this step, it was possible to select 3 fungi with the best enzyme indexes for the submerged fermentation step in agitated flasks. Submerged fermentation was carried out at 32 °C, pH 5.4 and stirring at 150 rpm. Fungi were evaluated for cellulose production. The CMIB-174 strain showed a higher enzymatic activity for both CMCase (0.032 IU/mL) and FPase (0.060 IU/mL). Therefore, the CMIB-174 strain was chosen for the bioreactor test. It can be observed that the bioreactor assay favored the activities of CMCase and FPase with a significant increase of 433% and 146%, respectively. However, all strains used in the present study showed low enzymatic activities when compared to other results obtained in the literature.

Keywords: Filamentous fungi. Enzymes. Cellulases. Wheat bran.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Grão de Trigo.....	19
Figura 2. Estrutura geral da parede celular vegetal.....	21
Figura 3. Representação estrutural da celulose.....	22
Figura 4. Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas.....	22
Figura 5. Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.....	23
Figura 6. Esquema de preparo do inóculo e Fermentação submersa.....	41
Figura 7. Atividade de endoglucanases (CMCase) obtidos nos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.....	53
Figura 8. Atividade de celulases totais (FPase) obtidos nos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo por 120h, 32°C e 150 rpm. ...	53
Figura 9. Açúcares Redutores (g/L) obtidos nos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.	55
Figura 10. Acompanhamento do pH dos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.	56
Figura 11. Teor de sólidos solúveis dos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.	57
Figura 12. Cinética da produção de endoglucanases (CMCase) e celulases totais (FPase) para o isolado CMIB-174, em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph 5,4±0,2. (Barras representam o desvio padrão).....	58
Figura 13. Turbidez obtida para isolado CMIB-174 no decorrer da fermentação em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph 5,4±0,2.....	60
Figura 14. Crescimento Fúngico através da produção de CO ₂ para o isolado CMIB-174 no decorrer da fermentação em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph 5,4±0,2.	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1. Etapas do desenvolvimento do estudo.....	34
Fotografia 1. Biorreator Tecnal (Modelo BIO-TEC-PRO) utilizado para a fermentação.	42
Fotografia 2. Observação do halo da colônia crescida em placa de Petri e corada com vermelho congo, após 4 dias de incubação.	48
Quadro 1. Aplicações industriais da celulase.....	29
Quadro 2. Identificação das linhagens adquiridas junto à Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo médio (100 g de alimento) de compostos em farelo de trigo. ...	20
Tabela 2. Comparação das variações de parâmetros em fermentações submersas.	31
Tabela 3. Composição do meio de cultivo para a seleção dos fungos produtores de celulases.	35
Tabela 4. Adaptação meio nutriente de Mandels e Weber (1969).	39
Tabela 5. Composição química percentual determinada para o farelo de trigo.	47
Tabela 6. Resultados de índice enzimático (I.E.) de todos os isolados incubados em meios sólidos suplementado com CMC por 4 dias a 22 °C.....	49
Tabela 6. Resultados de índice enzimático (I.E.) de todos os isolados incubados em meios sólidos suplementado com CMC por 4 dias a 22 °C.....	50
Tabela 7. Fungos cultivados em fermentação submersa por 120h, 32°C e 150 rpm e valores das atividades enzimáticas.	51
Tabela 7. Isolados cultivados em fermentação submersa por 120h, 32°C e 150 rpm e valores das atividades enzimáticas.	52
Tabela 8. Atividade enzimática atingidas pelo isolado CMIB-174 no decorrer da fermentação em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph 5,4±0,2.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABITRIGO	Associação Brasileira Indústria Trigo
AR	Acúcares Redutores
BG	β -glicosidases
CBH	Celobiohidrolase
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EnG	Endoglucanases
ExG	Exoglucanases
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FES	Fermentação em estado sólido
FSm	Fermentação submersa
FT	Farelo de trigo
GH	Glucana-glucono-hidrolase
GP	Grau de polimerização
I.E	Índice enzimático
TC	Teor de cinzas totais
TE	Teor de extrativos
TU	Teor de umidade
UI	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	17
3.2 FARELO DE TRIGO	18
3.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL	20
3.3.1 Celulose	22
3.3.2 Hemicelulose	23
3.3.3 Lignina	24
3.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS	25
3.4.1 Endoglucanases	27
3.4.2 Exoglucanases	27
3.4.3 β -glicosidases	28
3.4.4 Aplicações biotecnológicas das celulases	28
3.5 PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	30
3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 LINHAGENS, CULTIVO E MANUTENÇÃO	34
4.2 SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE TRIGO	36
4.3.1 Umidade	37
4.3.2 Cinzas	37
4.3.3 Teor de extrativos	38
4.4 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	39
4.5 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	39
4.5.1 Determinação da Concentração de Esporos da Suspensão e Preparo do Pré-cultivo 40	
4.5.2 Preparo do Pré-cultivo (Inóculo)	40
4.7 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR	42
4.7.1 Cinética de Crescimento Fúngico Através da Produção de CO ₂	43
4.8 ANÁLISES FERMENTAÇÕES	43

4.8.1 Sólidos Solúveis	43
4.8.2 Turbidez	43
4.8.3 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	44
4.8.4 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores (AR)	44
4.8.5 Determinação da Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)	45
4.8.6 Determinação da Atividade em Papel Filtro (FPase).....	45
4.8.7 Atividade Enzimática	46
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE TRIGO	47
5.2 SELEÇÃO DE FUNGOS	48
5.3.1 pH e Sólidos Solúveis.....	55
5.4 Biorreator.....	57
5.4.2 Turbidez	59
5.4.1 Cinética de Crescimento Fúngico Através da Produção de CO ₂	60
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são de interesse devido sua origem natural, alta especificidade e sua vasta aplicabilidade (AMORIM, 2017). A cada dia presenciamos mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores, dentre as quais se destacam enzimas na área de alimentos, saúde humana e animal e bens como papel e indústria têxtil (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de micro-organismos. As enzimas de origem microbiana são mais utilizadas por várias razões como, por exemplo: produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas e o fato de o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante (SAID; PIETRO, 2002).

A busca de micro-organismos que possam produzir essas enzimas é constante e várias técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para utilização nesse processo. Talvez a maior dificuldade da indústria seja encontrar enzimas que possam suportar algumas condições industriais como variação de temperatura e pH (MONTEIRO; SILVA, 2009). Nesse contexto, existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais e os fungos filamentosos estão entre as principais fontes microbianas produtoras destas enzimas.

Os fungos são um dos grupos de organismos mais diversos e numerosos no planeta. Eles ocupam todos os habitats possíveis e sua diversidade é estimada em mais de 5.1 milhões de espécies. No entanto, um número muito inferior é atualmente conhecido e menos ainda são aqueles utilizados para fins industriais (SPERANDIO, 2018).

Relatam-se diversas produções enzimáticas através de processos biotecnológicos de fungos filamentosos em meios contendo resíduos da agroindústria, como por exemplo: utilização da casca de soja para produção de xilanase, mananase, carboximetilcelulase e β -glicosidase (PEREIRA, 2016); bagaço de cana-de-açúcar para produção de enzimas lignolíticas (ANTUNES, 2015); produção de celulases utilizando capim elefante (PELENZ, 2018); xilanases utilizando farelo de trigo (AMORIM, 2017). Atualmente o farelo de trigo é usado principalmente como alimento

para animais, sendo pequenas quantidades vendidas para fins alimentícios humano. Considerando a grande quantidade de farelo acumulada e o baixo valor comercial para fins de alimentação animal, a indústria de moagem visa encontrar novas aplicações tecnológicas para o farelo de trigo (PRÜCKLER et al., 2014). Sendo assim, a busca por enzimas de origem fúngicas produzidas através de cultivo a partir de resíduos de trigo, por exemplo, se torna interessante do ponto de vista de aplicabilidade industrial, econômica e ambiental.

Baseando-se nesse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial enzimático de fungos isolados da região de Ponta Grossa – PR utilizando a biomassa do farelo de trigo como fonte de carbono.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial enzimático para a produção de CMCase e FPase de fungos isolados da região de Ponta Grossa – PR utilizando o farelo de trigo como substrato.

2.2 Objetivos específicos

1. Seleção de fungos com melhores índices enzimáticos, cultivados em meio contendo CMC como única fonte de carbono;
2. Realizar cultivos submersos usando o farelo de trigo como substrato, avaliar e quantificar teores de açúcares redutores, a atividade enzimática de endoglucanase (CMCase) e celulases totais (FPase) produzidas através de fermentação submersa.
3. Selecionar o fungo com melhor perfil para produção de enzimas celulolíticas.
4. Avaliar a produção de enzimas em biorreator.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

As matérias-primas lignocelulósicas são consideradas as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, principalmente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. O Brasil, por apresentar uma economia fortemente ligada à agricultura, gera grandes quantidades de resíduos da agroindústria, e especial atenção vem sendo dada para o reaproveitamento desses subprodutos, contribuindo para a minimização de problemas ambientais e energéticos (DOS SANTOS et al., 2018)

Os resíduos agroindustriais são constituídos por três principais frações poliméricas, celulose, hemicelulose e lignina, em uma estrutura cristalina vegetal altamente estável que deve ser rompida mediante pré-tratamentos para disponibilizar a fração sacarídica (celulose e hemicelulose) na forma de açúcares fermentescíveis. A composição química de resíduos lignocelulósicos é interessante ao ponto de vista biotecnológico, pois geralmente esses resíduos são compostos de 20 % a 60 % de celulose, 20 % a 30 % de hemicelulose e 15 % a 30 % de lignina (MENEZES, 2018).

As fontes lignocelulósicas são consideradas uma opção promissora quando o objetivo é o uso de matérias-primas de baixo custo. Além disso, devido à sua estrutura específica, além do conhecido processo de produção de bioetanol a partir de carboidratos, a biomassa lignocelulósica pode ser empregada para obter um amplo espectro de produtos químicos (TOMÁS-PEJÓ et al., 2017).

Na literatura encontra-se um leque de aplicações destas biomassas renováveis na produção de bioetanol, ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e outros. No Brasil tem-se dado atenção para a produção de biocombustíveis. Isso ocorre principalmente, devido ao grande volume da biomassa derivada de cana-de-açúcar. Ademais, no Brasil há subprodutos da moagem do grão de trigo, resíduos do milho, do arroz, do café, algodão, feijão e outros, que, como mencionado, podem ser utilizados como substratos para produção de enzimas e outros produtos da fermentação (AMORIM, 2017).

A fragmentação da biomassa lignocelulósica tem sido, nas últimas décadas, fonte de muitos estudos, visando o aproveitamento das suas frações de celulose, lignina e hemicelulose (SILVA, 2017). Tornando-se cada vez mais uma alternativa promissora, devido à sua grande quantidade de material passível à fermentação (RABELO et al., 2014).

3.2 FARELO DE TRIGO

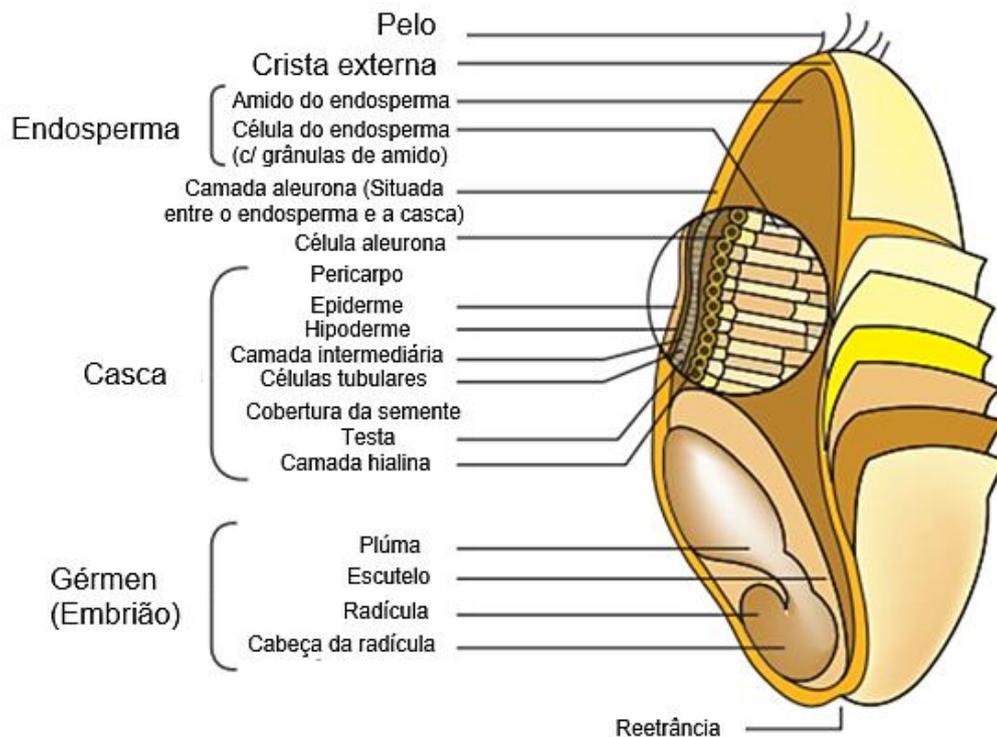
O trigo (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticale* sp) é uma gramínea originária do “Crescente Fértil”, uma zona geográfica que compreende desde a porção africana (Norte do rio Nilo) até a porção asiática (atuais Iraque e Kwait) do Médio Oriente (AGEITEC, 2008). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), o trigo é o segundo alimento mais consumido no mundo. Só em 2017, foram consumidas mais de 740 milhões de toneladas (ABITRIGO, 2017).

Do ponto de vista tecnológico, o grão de trigo pode ser dividido em três partes distintas: o endosperma (83%), farelo (14%) e gérmen (3%). Cada parte compreende dois ou mais tecidos anatomicamente diferentes (Figura 1). O endosperma inclui o endosperma amiláceo e a camada de aleurona, o farelo consiste de pelo menos seis tecidos diferentes e o germe geralmente inclui o escutelo e o embrião (BUSHUK, 1986). O pericarpo corresponde à casca (farelo), ou seja, a camada mais externa protetora do grão sendo composto pela epiderme, hipoderme, camadas intermediárias, células tubulares, testa e camada hialina. O pericarpo é rico em polissacarídeos não amido (fibras) e minerais (cinzas) e é nessa região que as fibras do trigo estão concentradas. O endosperma corresponde a uma matriz proteica com elevado teor de amido (componentes de reserva) e o gérmen é a parte embrionária da planta, onde consta a maior concentração de lipídios e compostos ligados à germinação do grão de trigo (SCHEUER et al., 2011). O gérmen também possui alto conteúdo de proteínas, açúcares redutores e cinzas (GERMANI et al., 1993).

Os constituintes não se distribuem uniformemente pelo grão. O pericarpo é rico em pentosanas, celulose e cinzas. A aleurona é uma camada rica em cinzas (fósforo,

fitato), proteínas, lipídios, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina e ácido pantotênico, além de tocoferol) e enzimas (GERMANI et al., 1993).

Figura 1. Estrutura do Grão de Trigo.



Fonte: Adaptado de Brandão; Lira (2018).

O principal produto oriundo do processamento do trigo é a sua farinha que é produzida pela moagem dos grãos. Já o principal subproduto é o farelo, gerado a uma taxa de 250kg/ton. O farelo de trigo apresenta em média 41,5 g de fibras por 100 gramas de grão(LAMMERS, 2018).

A composição química do farelo de trigo é complexa, mas contém, essencialmente, celulose e pentosanas, polímeros à base de xilose e arabinose, que são fortemente ligados a proteínas. O farelo de trigo é constituído pelas camadas mais externas do grão, como o pericarpo, as camadas superficiais da aleurona e a testa (LAMMERS, 2018). A composição do farelo de trigo compreende, aproximadamente, 12% de água, entre 13 a 18% de proteína, 3,5% de gordura e 56% de carboidratos (APPRICH, et al., 2014). Alguns estudos sugerem que o farelo de trigo contém aproximadamente entre 30% a 40% de hemicelulose, 15% a 35% de celulose e 5% a 25% de lignina, dependendo das condições de cultivo e variedade (CANTERO et al.,

2015). A Tabela 1 lista alguns dos compostos encontrados em trigo integral e farelo de trigo.

Tabela 1. Conteúdo médio (100 g de alimento) de compostos em farelo de trigo.

Compostos	Farelo de Trigo
Fibras (AOAC)	44,6
Lignina	5,6
Oligossacarídeos	3,7
Ácido fítico	4,2
Minerais	3,39
Vitaminas	0,0398
Ácidos fenólicos	1,07

Fonte: Adaptado de Stevenson et al., (2012) .

Os compostos fenólicos e seu polímero lignina são encontrados em diferentes concentrações dentro do farelo. Além disso, os termos fibra alimentar solúvel e insolúvel definem várias estruturas químicas heterogêneas de acordo com sua resistência à hidrólise por enzimas digestivas humanas. Dados da literatura frequentemente mostram variação no conteúdo de compostos bioativos nos tecidos de grãos de trigo, o que pode ser devido a diferentes métodos analíticos, tecnologias de moagem ou devido a cultivar e ao local de cultivo. (PRÜCKLER et al., 2014).

O teor relativamente elevado de proteínas (até 18%), bem como a pequena quantidade de lignina, são os principais diferenciadores do farelo para a outras biomassas lignocelulósicas (APPRICH et al., 2014), pois a lignina é de difícil solubilização e potencial geradora de inibidores para o crescimento microbiano (PANDEY et al., 2011).

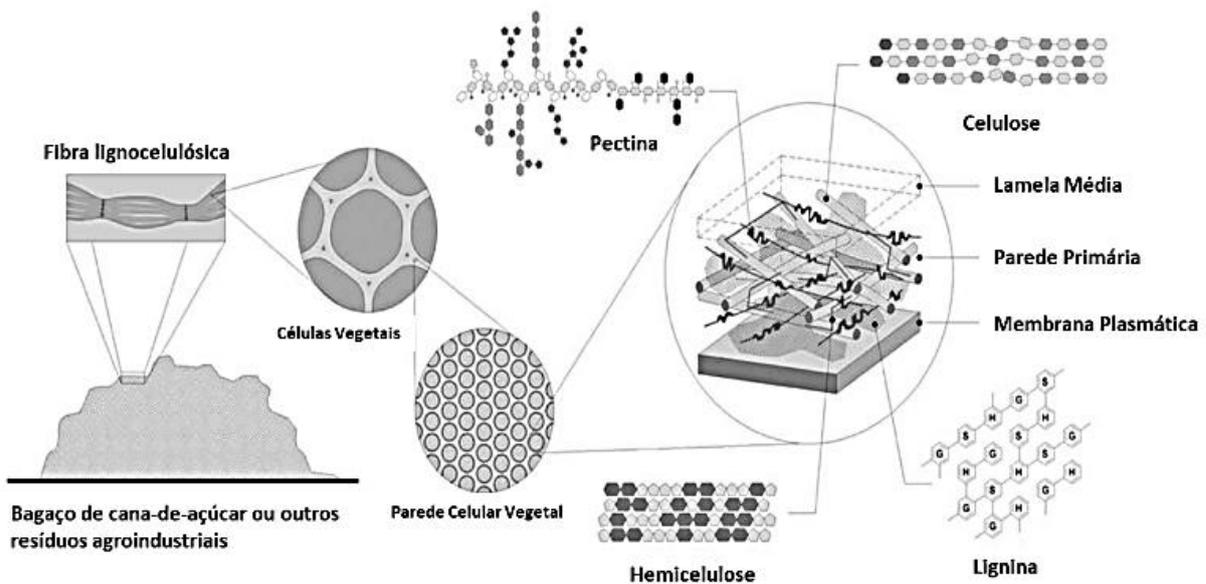
3.3 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular constitui 50% do peso da biomassa vegetal e é provavelmente um dos componentes mais característicos do reino *Plantae*, sendo uma estrutura chave para a classificação botânica, biológica, evolução e inclusive para as aplicações biotecnológicas da matéria vegetal (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010). As indústrias têxtil, madeireira, do papel e mais recentemente a indústria de biorrefinarias lignocelulósicas dependem fortemente da composição e características das paredes celulares das plantas utilizadas em seus processos (SPERANDIO, 2018).

Os materiais lignocelulósicos são formados basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes. Essas frações dominantes são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais. O tamanho e a forma da parede celular, assim como a composição química dos materiais lignocelulósicos varia de espécie para espécie. De maneira geral, a celulose está presente em maior quantidade, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A parede celular é constituída de várias camadas, sendo subdivididas em parede primária e secundária, como podemos observar na Figura 2. São formadas por diversos polissacarídeos e unidos através de ligações covalentes e não covalentes (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Figura 2. Estrutura geral da parede celular vegetal.



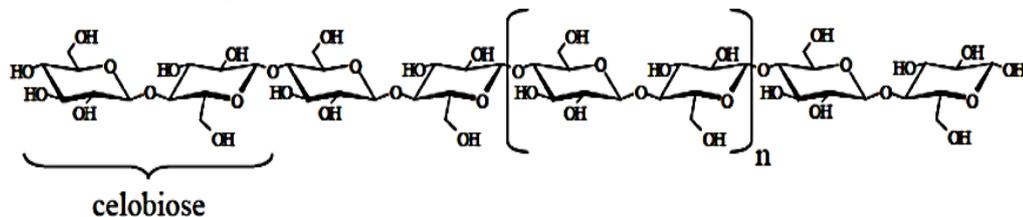
Fonte: Sperandio (2018).

A parede celular primária é formada por microfibrilas de celulose e é continuamente depositada durante o crescimento da mesma. Mais internamente existe a parede celular secundária composta principalmente de celulose e lignina. Esta, por sua vez, pode ser dividida em três camadas, que são classificadas de acordo com as orientações das microfibrilas de celulose. A partir do crescimento da parede, ou seja, da divisão celular, as células recém-formadas permanecem unidas pela lamela média, que por sua vez, é constituída principalmente por lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

3.3.1 Celulose

Dentre os componentes da parede celular, a celulose é o mais abundante, correspondendo de 40 a 45% do peso seco das plantas. Encontra-se envolvida em uma matriz de hemicelulose (30-35%) e lignina (20-23%) (PEREIRA, 2016). Esse homo polissacarídeo, de ocorrência natural, é composto por cadeias com grau de polimerização de 4.000 a 15.000 unidades de glicose, cada unidade une a outra por ligações glicosídicas do tipo β (1-4) e cada par dessa hexose é definida como celobiose (Figura 3), unidade conformacional mínima da celulose e, a glicose a unidade fundamental da cadeia homo polimérica (HARGREAVES, 2008).

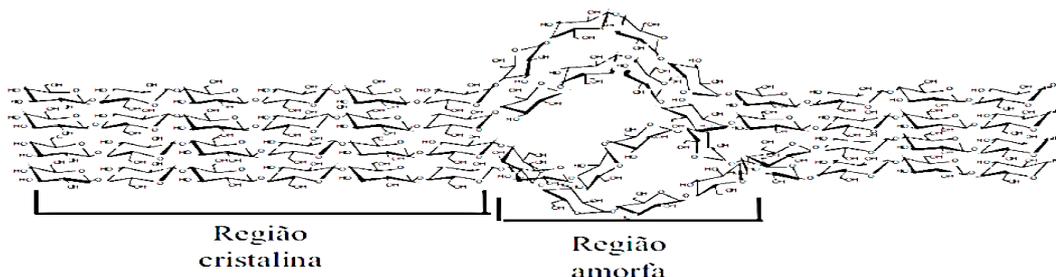
Figura 3. Representação estrutural da celulose.



Fonte: Hargreaves (2008).

A resistência do substrato a hidrólise será definida pelo grau despolimerização e pelo índice de cristalinidade entre cada fibra de celulose, estabilizada por inúmeras pontes de hidrogênio, intra e extramolecular (HARGREAVES, 2008). Através de interações não covalentes, acontece uma agregação das cadeias lineares, formando estruturas cristalinas, chamadas microfibrilas. As microfibrilas apresentam região cristalina, onde as fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade e região amorfa, onde as fibras estão mais distantes entre si, apresentando-se menos compactas (SANTOS, 2014).

Figura 4. Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas.



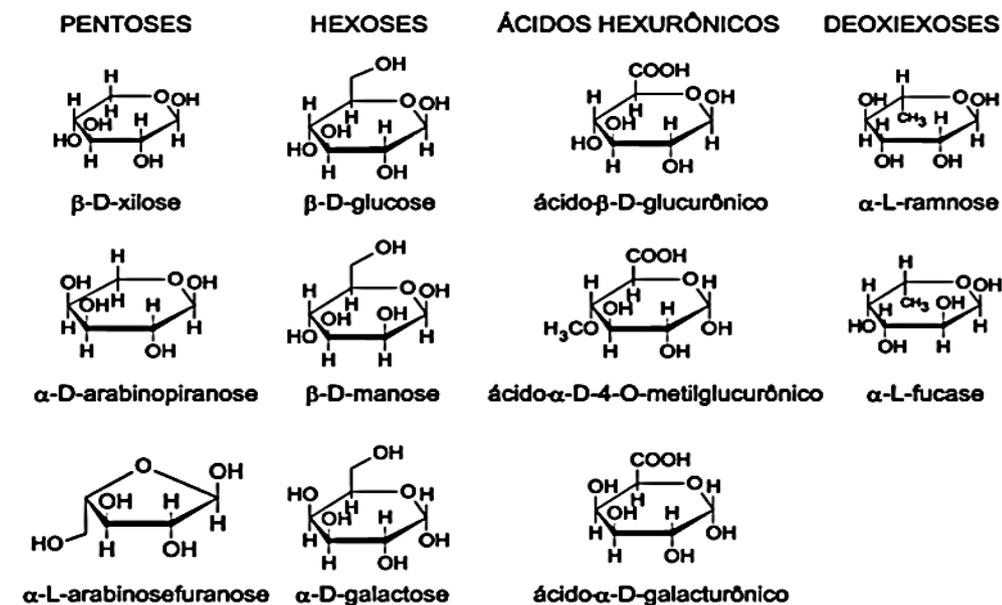
Fonte: Farinas (2011).

Na estrutura cristalina, os átomos são altamente ordenados e o empacotamento das cadeias impede a penetração de água e enzimas no interior da microfibrila. A celulose cristalina confere rigidez à parede celular vegetal, dificultando sua degradação por micro-organismos. Nas regiões não cristalinas (amorfos) a água e enzimas têm maior acesso, sendo mais facilmente hidrolisada que a forma cristalina, e primeiramente atacada e degradada. Além de regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e micro poros que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas, como a água e enzimas (SANTOS, 2014).

3.3.2 Hemicelulose

É um polissacarídeo ramificado formado pela combinação de vários açúcares como pentoses, hexoses, ácidos e oxi-hexoses. Também chamada de poliose, de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero, são classificadas como xilanas, glucomananas e galactanas (DIETRICH & WEGENER, 1989). A estrutura da hemicelulose é linear, semelhante à da celulose, porém, diferentemente desta, a hemicelulose apresenta grande variedade de açúcares nas ramificações (Figura 5), o que impede a formação de grandes regiões cristalinas (JOVANOVIC et al., 2009).

Figura 5. Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.



Fonte: Huebra (2016).

A parede celular da hemicelulose está intimamente relacionada com a celulose, revestindo as microfibrilas e dificultando a ação das celulases, além de ser covalentemente ligada à lignina, sendo importante na conexão entre celulose e lignina (COLLINS et al., 2005). No geral, as hemiceluloses apresentam um baixo grau de polimerização (média de 100 - 200) e a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses depende do tipo de parede celular e da espécie analisada (ROWEL et al., 2005).

A classificação das hemiceluloses é dada pelo principal resíduo de açúcar presente na sua estrutura polimérica, e variam em: D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses) e D-xilose e L-arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses, onde são unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e ocasionalmente ligações glicosídicas β -1,3. Esses açúcares apresentam menor massa molecular que a celulose e são polímeros ramificados. De acordo com o tipo de monossacarídeo predominante na sua principal cadeia as hemiceluloses são denominadas de xilana, manana, galactana e arabinanas (PEREIRA, 2016).

3.3.3 Lignina

A lignina é um polímero aromático complexo, diferente da celulose e da hemicelulose que formam cadeia, o mecanismo de polimerização da lignina resulta em uma rede tridimensional de compostos aromáticos que envolvem os outros componentes da parede celular, defendendo contra a ação de enzimas produzidas por micro-organismos patogênicos e saprófitos. A remoção da lignina representa um passo fundamental para reciclagem de carbono no ecossistema terrestre, bem como a utilização industrial da biomassa. O polímero de lignina é altamente resistente à degradação química e biológica devido a sua estrutura molecular, onde formam uma rede tridimensional complexa devido a uma variedade de ligações incluindo ester, éter e carbono-carbono (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009).

À medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de lignina tende a ser maior (RAVEN, 2001). Mesmo presente em menores quantidades em relação aos outros componentes, a lignina atribui limitação suficiente para retardar ou evitar

completamente, a ação enzimática, dificultando a hidrólise do material lignocelulósico (CASTRO; PEREIRA JR., 2010). O polímero de lignina é altamente resistente à degradação química e biológica devido a sua estrutura molecular complexa e essas características aumentam ainda a limitação no processo de conversão da biomassa (PEREIRA, 2016).

Um dos principais contribuintes para a recalcitrância da parede celular vegetal é a presença de lignina e de complexos lignina-carboidratos. Pelo menos 5 razões principais fazem da lignina (e seus complexos) uma substância resistente à degradação microbiana: (1) a lignina é insolúvel, (2) grande demais para atravessar a parede celular dos micro-organismos, (3) é heterogênea demais para ser degradada de forma específica por enzimas, (4) seus produtos de degradação são tóxicos e também recalcitrantes, (5) a taxa C:N na lignina é tão alta que pouquíssimos organismos conseguem subsistir na mesma (SPERANDIO, 2018).

3.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria de origem proteica que catalisam a maioria das reações em organismos vivos. Talvez as enzimas sejam as moléculas biológicas usadas há mais tempo pelo homem, mesmo que de forma inconsciente, na produção de pães e vinho, na antiguidade (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Com a exceção de poucos RNA catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. Muitas necessitam de coenzimas ou cofatores não proteicos para exercerem a atividade catalítica. As enzimas têm um poder catalítico extraordinário, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos têm esse conjunto de propriedades (NELSON; COX, 2014).

Os reagentes que participam das reações catalisadas pelas enzimas são denominados de substratos. Efetivamente, quando se compara a conversão de um substrato em produto catalisado por enzima e outro por um catalisador químico, observa-se uma rápida conversão com o uso das enzimas. Além disso, as enzimas

não alteram o equilíbrio químico das reações e aceleram uma reação reversível em ambos os sentidos (GAMA; AIRES-BARROS; CABRAL, 2003). Como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas quantidades e podem ser recuperadas dependendo das condições de tratamento utilizados. A biotecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e possibilitam menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis (GALINDO, 2016).

Entretanto, o desenvolvimento de processos alternativos e mais eficientes para a produção de enzimas é um desafio que precisa ser superado, visto que o alto custo desse insumo pode ser um fator limitante no processo de produção. Nesse sentido, a produção de enzimas utilizando materiais lignocelulósicos como fonte de carbono para o cultivo de micro-organismos tem sido considerada uma estratégia potencial para reduzir os custos na produção das enzimas celulolíticas (FLORENCIO; BANDIO; FARINAS, 2017).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas. Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (FLORENCIO, 2011; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). As enzimas do complexo celulásico atuam em conjunto e apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. Tal efeito é conhecido como sinergia. Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis com grau de polimerização até 6 (GALINDO, 2016).

3.4.1 Endoglucanases

A endoglucanase (EnG) ou endo- β -1,4-glucanase, é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente). A EnG é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (FLORENCIO, 2011; SANTOS, 2014).

3.4.2 Exoglucanases

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH, cujo nome sistemático é 1,4- β -D glucana-glucano-hidrolase, é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). As exoglucanases atuam de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias da celulose, podendo liberar tanto glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolases) como produtos principais. Atuam nas extremidades da molécula de celulose em sua região cristalina, liberando unidades de celobiose, aumentando a taxa de hidrólise por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases. As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Elas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outra enzima do complexo celulolítico, a β -glicosidade (PEREIRA, 2016).

Para avaliação da exoglucanase, a celulose cristalina vem sendo usada por possuir baixas concentrações de fibra amorfa, tornando-se menos acessível às endoglucanases, por possuir baixo grau de polimerização (HARGREAVES, 2008).

3.4.3 β -glicosidases

As β -1,4-glicosidases, conhecidas também como celobiasas, finalizam a despolimerização da celulose por hidrolizarem celobiose e oligossacarídeos solúveis liberando glicose. Dessa forma, além de aumentarem o rendimento total da formação de glicose, também contribuem para a taxa global do processo consumindo a celobiose, que é um inibidor de endoglucanase e exoglucanase (PEREIRA, 2016).

As β -glucosidases hidrolisam celobioses solúveis para liberação de glicose, essas enzimas podem hidrolizar cadeias de até seis anidroglicosos, mas a taxa de atividade reduz-se drasticamente com o aumento do grau de polimerização. Tomando-se vantagem do fato de que a celobiose não é hidrolisada por endoglucanase ou exoglucanase, esse substrato é utilizado para quantificação da atividade de β -glucosidase, quantificando a glicose liberada no ensaio (HARGREAVES, 2008).

3.4.4 Aplicações biotecnológicas das celulasas

Desde a década passada, a celulase é a terceira enzima mais utilizada na indústria em vários processos, atrás apenas das proteases e amilases, e é a segunda maior enzima industrial em volume de dólar, cuja demanda está aumentando por aplicações industriais, como indústria de detergentes, têxtil, de processamento de papel, de ração animal, de suco de frutas, alimentos e bebidas, biocombustíveis (GAETE; TEODORO; MARTINAZO, 2020).

A produção de celulasas em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulasas também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a

clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Na indústria têxtil, em processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos de algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Podem ser aplicadas em formulações de detergentes domésticos e industriais, preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos, produtos estimuladores de ensilagem e no tratamento de lixo orgânico e de águas residuais (SANTOS, 2014). O Quadro 1 apresenta um resumo das aplicações biotecnológicas das celulasas na indústria.

Quadro 1. Aplicações industriais da celulase.

Indústria	Função	Aplicação
Alimentos	Hidrólise de componentes da parede celular.	Extração de suco de frutas; Alteração das propriedades sensoriais de frutas, legumes, azeite e sopas; Redução da deterioração dos alimentos; Extração de pigmentos aplicáveis como corantes naturais de alimentos; Estabilidade e clarificação de vinhos.
Ração Animal	Hidrólise parciais dos materiais lignocelulósicos.	Melhoria na qualidade nutricional da alimentação animal; Melhoria na digestibilidade do alimento; Ganho de peso em frangos de corte; Diminuição da colonização de bactérias patogênicas do intestino grosso.
Têxtil	Atua no tecido de algodão e rompimento das pequenas extremidades da fibra do tecido de algodão.	Aplicadas na lavagem do jeans e de outros tecidos para obtenção de aspecto envelhecido; Produção de tecidos de alta qualidade.
Farmacêutica/ Cosmética	Digestão da fibra de celulose.	Preparação de digestina; Hidrólise rápida da celulase; auxiliar digestão/carboidrase.
Biocombustíveis	Conversão de material celulósico em glicose e em outros açúcares fermentescíveis.	Produtos de fermentação como o etanol.

Fonte: Adaptado de Gaete; Teodoro; Martinazo, (2020).

De acordo com o Relatório de Pesquisa de Mercado Global Cellulase (CAS 9012-54-8) publicado em 2018, a Ásia é o maior consumidor de celulase, com uma

participação de mercado de receita de cerca de 32,84% em 2016. Além disso, os dados relatados mostraram 29,71% da demanda do mercado de celulase em rações animais, 26,37% em alimentos e bebidas, e 13,77% na indústria têxtil em 2016. Este mesmo relatório prevê que as aplicações de celulases chegarão a 2.300 milhões de dólares até o final de 2025, a uma taxa composta de crescimento anual de 5,5% durante o período 2018–2025. Esses dados sugerem que a aplicação de celulases nas indústrias está aumentando drasticamente a cada ano. Novozymes e DuPont, da Dinamarca, são os principais produtores de enzimas celulase, fornecendo essas enzimas ao mercado global para aplicações industriais (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

O mercado global deve crescer de US\$ 16 bilhões, em 2018, para US\$ 24,8 bilhões, em 2023, com uma taxa de crescimento anual de 9,2% no período. O mercado mundial de enzimas para biocombustíveis foi avaliado em US\$ 623 milhões em 2014. Em 2020, esse valor de mercado deve chegar a quase US\$ 1 bilhão, com taxas de crescimento anuais de 10,4%(EMBRAPA, 2020).

Estima-se que, somente em 2019, quase 30 mil toneladas de enzimas ou preparações enzimáticas tenham sido importadas pelo Brasil, contra 9,3 mil toneladas exportadas. Vários mercados poderão ser beneficiados, em especial as empresas produtoras de enzimas e a agroindústria sucroalcooleira energética, que faz a conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis, eletricidade, calor e compostos químicos derivados (EMBRAPA, 2020).

3.5 PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Atualmente são usados dois métodos de cultivo convencionais para produção de enzimas celulolíticas: a fermentação em estado sólido (FES), caracterizada pela ausência de água livre, e a fermentação submersa (FSm), que ocorre em meio líquido. Cada um desses processos apresenta vantagens e desvantagens associadas a condições ambientais e operacionais, sendo que a FSm é utilizada na maioria dos processos industriais para produção de enzimas microbianas (FLORENCIO; BANDIO; FARINAS, 2017).

As fermentações submersas (FSm) incluem processos microbianos em que a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido, onde os sólidos

ficam dissolvidos ou submersos (SILVA, 2017). O meio essencial consiste de água contendo nutrientes dissolvidos, sendo que a água pode constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material. Na FSm, o caldo de fermentação pode ser considerado como uma mistura perfeita, na qual os micro-organismos são inoculados diretamente em meio nutriente líquido. Quando se faz uso de fungos filamentosos para a produção de enzimas celulolíticas por esse método de cultivo, pode ser feita tanto a inoculação de esporos quanto de micélios desenvolvidos em uma etapa de pré-cultivo. Além disso, esse tipo de cultivo pode contribuir para uma melhor absorção de nutrientes pelo micro-organismo e facilitar a recuperação de metabólitos. A maioria das celulasas comerciais são produzidas por fungos filamentosos, principalmente *A. niger* e *T. reesei* cultivados em FSm (FLORENCIO; BANDIO; FARINAS, 2017).

Para cada forma de cultivo avaliada tem sido investigada a influência de diferentes parâmetros, tais como pH e temperatura, tipo de reator, tipo de meio nutriente, cultivo de cultura mistas, umidade ideal para cada micro-organismo (FLORENCIO; BANDIO; FARINAS, 2017). Tais influências estão apresentadas na Tabela 2, na qual podemos observar as variações do tempo de cultivo, pH, temperatura e agitação em diferentes estudos.

Tabela 2. Comparação das variações de parâmetros em fermentações submersas.

Enzima	Tempo de cultivo (h)	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Referência
Celulasas	96	5,5	45	0	Darwesh et al., 2020
Xilanases	72	5,0	32	200	Amorim, 2017
Xilanases, mananases, carboximetilcelulasas, β -glicosidase	168	7,0	28	120	Antunes, 2015
Celulasas	72	6,0	30	150	Hargreaves, 2008
Hidrolases	72	5,0	29	200	Codima, 2019
Celulasas	168	5,5	28	150	Bortolazzo, 2011
CMCase, celulase total e xilanase	240	7,0	28	120	Silva, 2018
Lipases	72	7,0	37	150	Pinheiro, 2006
Celulasas	60	5,0	30	150	Cripwell et al., 2015
Celulasas	72	4,5	28	200	Singhania et al., 2014
CMCase, FPAse e β -glicosidase), hemicelulasas (xilanases e mananases) e pectinases.	168	5,0	28	120	Sperandio, 2018

Fonte: Autoria própria.

Muitas pesquisas demonstraram que o pH tem efeito na produção de celulasas e hemicelulasas. Os estudos apontam que a produção de xilanases é favorecida em

valores de pH mais altos, enquanto a produção de celulase se favorece em valores de pH mais baixos, e o pH ideal para endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase também é diferente (ZHANG; BUNTERNGSOOK; LI, 2019). Outras diferenças demonstradas na tabela 2 foram as variações nas temperaturas. Essas diferenças nos valores de temperatura ótima permitem selecionar o micro-organismo que produz as celulases que mais adequam-se ao processo em que serão utilizadas (SANTOS, 2017).

Comparados com os processos em superfície, os processos submersos oferecem várias vantagens como: facilidade na manipulação, maiores volume de meio, a massa de micro-organismo fica totalmente submersa no meio de maneira uniforme, a absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são executados com mais eficiência, o que acarreta menor tempo de fermentação e, conseqüentemente, maior produtividade (MONTEIRO; SILVA, 2009). Portanto, o uso de enzimas microbianas torna os processos enzimáticos bastante versáteis (SANTOS, 2017).

3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos fazem parte de um grupo bastante diversificado e numeroso de micro-organismos, podendo ser facilmente encontrados na natureza, em solos, vegetais e até mesmo em animais. Fazem parte do reino *Fungi* e são seres que compartilham das seguintes características: serem eucarióticos, portadores de esporos e heterotróficos (ou seja, que se alimentam da absorção dos nutrientes) (SCHEFFER, 2018). Os fungos são considerados mais eficientes na degradação da biomassa lignocelulósica. Tendo como exemplo, os fungos da podridão branca, fungos de podridão parda e fungos de podridão mole. Os dois primeiros são basidiomicetos e os fungos de podridão mole são classificados no grupo ascomiceto (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019).

Dentre os diferentes tipos de fungos, os filamentosos são os que apresentam maior relevância biotecnológica uma vez que estão presentes em vários ecossistemas, possuem crescimento bastante rápido e precisam de meios de cultura relativamente simples para sua produção em condições facilmente controladas. O conhecimento da microbiota em que estes micro-organismos estão inseridos é de fundamental importância pois assim é possível inferir quais processos metabólicos

ocorrem para que sejam utilizados posteriormente em interações ambientais ou aplicações biotecnológicas (SCHEFFER, 2018).

Através da capacidade de secretarem enzimas extracelulares e pela sua particular forma de crescimento, os fungos filamentosos se adaptam ao aproveitamento de uma ampla gama de substratos. Existem polímeros em abundância que podem ser aproveitados como fontes nutricionais, principalmente resíduos de origem vegetal. Os componentes dos materiais lignocelulósicos durante a decomposição fúngica são progressivamente despolimerizados por complexos enzimáticos. As células alargadas de crescimento apical, permitem que os fungos filamentosos colonizem a superfície do substrato e penetrem dentro do mesmo, em busca de nutrientes, facilitando a utilização de resíduos para produção de substâncias de interesse como as enzimas (PEREIRA, 2016).

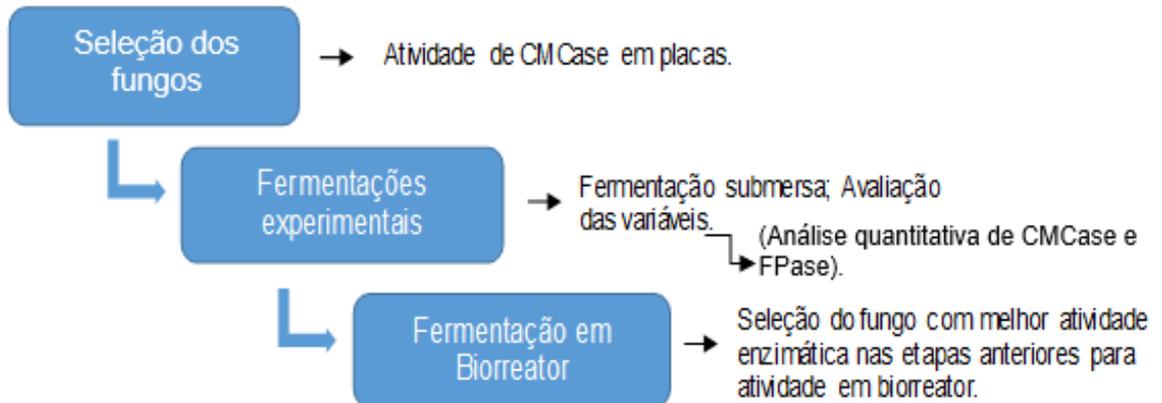
O pré-tratamento biológico pode ser realizado cultivando o micro-organismo diretamente na matéria-prima ou usando os extratos enzimáticos (JAYASEKARA; RATNAYAKE, 2019). Essa eficiência na degradação de substratos contribui para a grande capacidade adaptativa colonizando diferentes ambientes com variações de temperatura e pH, umidade e nutrientes. (PEREIRA, 2016).

Na indústria, aplicações de micro-organismos resultam rendimentos econômicos consideravelmente altos, exemplos clássicos de processos microbiológicos são as fermentações de bebidas alcoólicas, combustíveis, laticínios, ácidos, antibióticos. Entre o grande número de micro-organismos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos são particularmente interessantes, devido à alta produção de enzimas endo e extracelulares de grande potencial industrial (MENEZES, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido em três etapas: seleção dos fungos, fermentações experimentais e fermentação em biorreator, como demonstrado no Fluxograma 1.

Fluxograma 1. Etapas do desenvolvimento do estudo.



Fonte: Autoria própria.

Na etapa de seleção foi realizado um ensaio qualitativo para detectar a atividade enzimática através da formação de um halo de degradação do substrato em meio sólido. Os fungos que apresentaram melhores índices enzimáticos nessa etapa, prosseguiram para as fermentações experimentais.

Nas fermentações experimentais, foram conduzidos ensaios de fermentações submersas, cultivados sob agitação em meio de cultivo líquido suplementado com farelo de trigo. Nessa etapa, foram realizados testes quantitativos, por métodos espectrofotométricos, quantificando a produção das enzimas.

Por último, foi conduzido um ensaio em biorreator com o fungo que apresentou melhor atividade enzimática nas fermentações de bancada.

4.1 LINHAGENS, CULTIVO E MANUTENÇÃO

Os fungos utilizados neste trabalho estão cadastrados no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), sob número A76A0CD. Todas as linhagens foram adquiridas junto à Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico – UTFPR

(Câmpus Ponta Grossa), identificados conforme Quadro 2. Os fungos avaliados foram coletados por Scheffer (2018), no depósito de resíduos de madeira localizado dentro da propriedade da empresa Águia Florestal em Itaiacoca, Paraná, a 42 km do centro de Ponta Grossa, com coordenadas 25°10'06.4"S 49°51'57.3"W. E isolados conforme descrito em Scheffer (2018). Como linhagem de referência, foi usado o *Mucor* sp., também adquirido junto à Coleção da UTFPR. Essa linhagem foi escolhida como controle devido a sua prévia utilização em outro estudo realizado por Rodrigues et al. (2020), no qual demonstrou ter um grande potencial para a produção de celulases.

Quadro 2. Identificação das linhagens adquiridas junto à Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico.

Identificação UTFPR	Número da Coleção	Identificação Molecular
CMIB-166	Não possui	<i>Mucor irregularis</i>
CMIB-167	CMRP4917	Sem identificação
CMIB-169	Não possui	<i>Mucor circinelloides</i>
CMIB-172	CMRP4918	Sem identificação
CMIB-174	CMRP4919	Sem identificação
CMIB-064	CMRP3223	<i>Mucor</i> sp.

Fonte: Autoria própria.

Os isolados foram mantidos em laboratório em meio sólido Agar Sabouraud. Repiques das culturas foram realizados periodicamente, sendo incubadas a 32°C, por sete dias. Após este período, as linhagens foram utilizadas ou armazenadas a 4°C.

4.2 SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES

Nesta etapa, os isolados foram inicialmente avaliados de forma qualitativa por meio de testes em placas de petri, para identificar as espécies fúngicas produtoras das enzimas celulases. O meio base era caracterizado por um meio mineral contendo como fonte de carbono a carboximetilcelulose (CMC), conforme Tabela 3.

Tabela 3. Composição do meio de cultivo para a seleção dos fungos produtores de celulases.

Componentes	Unidade	Concentração
NaNO ₃	g/L	3,0
K ₂ HPO ₄	g/L	1,0
MgSO ₄	g/L	0,5
KCl	g/L	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg/L	10,0
Agar	g/L	20
CMC	g/L	10

Fonte: Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004).

Após o preparo do meio o pH foi corrigido para 5,0, valor recomendado ao se utilizar a carboximetilcelulose como substrato, usando uma solução tampão de acetato de sódio. Uma vez estabilizado o pH, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos (SCHEFFER, 2018). Os esporos foram inoculados em *cup plates* de 6 mm de diâmetro, perfurados na superfície do meio de cultura sólido. Após realizada a inoculação dos esporos nas placas, as mesmas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28°C por 96h. Cada um dos 5 micro-organismos foi inoculado em 4 placas distintas, para verificação do halo enzimático em 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente.

Após o período de incubação, as culturas foram coradas com *Congo Red* a 0,1% (0,1 g de vermelho congo e 100 mL de água destilada) e, em seguida, descoradas com solução de NaCl 0,5 M (NaCl 29,22 g e 1 L de água destilada) para detecção da atividade enzimática, visualizada pelo halo de coloração mais clara, conforme previamente descrito por Carder (1986).

Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com o auxílio de um paquímetro (Western PRO). O índice enzimático (I.E.) pôde ser determinado através da Equação 1 (BEZERRA, 2017):

$$I.E. = \frac{\text{diâmetro do halo de hidrólise (mm)}}{\text{diâmetro da colônia (mm)}} \quad (\text{Eq.1})$$

Os micro-organismos que apresentaram os melhores índices enzimáticos seguiram para os ensaios de fermentação submersa utilizando farelo de trigo como substrato.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE TRIGO

O farelo de trigo (FT) utilizado na FSm foi fornecido por uma indústria localizada no Distrito Industrial da cidade de Ponta Grossa – PR. Para a caracterização do material foram realizadas análises de umidade, cinzas e teor de extrativos. O mesmo foi mantido sob refrigeração a 4°C até o momento de sua utilização.

4.3.1 Umidade

Para a determinação da umidade, foram pesados 2g de FT, em recipientes previamente lavados e secos em estufa. Em seguida, o conjunto material-recipiente foi levado à estufa a 105 ± 2 °C, por três horas. Após a permanência na estufa, o conjunto foi retirado e posto em um dessecador com agente dessecante (sílica gel) para resfriar à temperatura ambiente por 30 minutos. Findo esse tempo, o conjunto foi pesado (MORAIS, ROSA, MARCONCINI; 2010).

A determinação do teor de umidade (TU%), foi calculada de acordo com a equação 2:

$$TU\% = \frac{(MRAU - MRAS) \times 100\%}{MAU} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

MRAU = Massa do conjunto recipiente/amostra úmida;

MRAS = Massa do conjunto recipiente/amostra seca;

MAU = Massa da amostra úmida.

Essa análise foi realizada em quintuplicata.

4.3.2 Cinzas

Para a determinação do teor de resíduo mineral, foram pesados 2g do FT em cadinhos previamente calcinados a 600°C por 30 minutos, e resfriados em dessecador. Em seguida, o conjunto foi levado à mufla por um período de 3 horas a 600 °C. Após esse período, o conjunto foi retirado e posto em um dessecador com agente dessecante (sílica gel) para resfriar à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o conjunto foi pesado (MORAIS, ROSA, MARCONCINI; 2010). Essa análise foi realizada em quintuplicata.

A determinação do teor de cinzas totais (TC%), foi calculada de acordo com a equação 3:

$$TC\% = \frac{MRAC - MR \times 100\%}{MA} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

MR = massa do recipiente;

MA = massa da amostra;

MRAC = massa do conjunto recipiente/amostra calcinada.

4.3.3 Teor de extrativos

Para a determinação dos extrativos, foram pesados 2,5 g do farelo de trigo, os quais foram submetidos a um tratamento em aparelho Soxhlet, utilizando acetona como solvente extrator por um período de 5 horas.

O farelo de trigo foi colocado em um cartucho de papel filtro, previamente seco. Ao final do processo o conjunto foi seco em estufa a 105 ± 2 °C, por 60 minutos. Após esse período, o conjunto foi retirado e posto em um dessecador com agente dessecante (sílica gel) para resfriar à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o conjunto foi pesado (MORAIS, ROSA, MARCONCINI; 2010). Essa análise foi realizada em quintuplicata.

O cálculo da determinação do teor de extrativos (TE%) referente a massa da amostra seca, foram realizados de acordo com a equação 4:

$$TE\% = \frac{MRE - MRRS}{MA} \times 100\% \quad (\text{Eq.4})$$

Onde:

MRE = massa conjunto recipiente/extrativos;

MRRS = massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente;

MA = massa da amostra.

Foi necessário realizar mais um cálculo, a fim de corrigir os valores que deverão constar na tabela de análise centesimal do material original, de acordo com a equação 5:

$$TE\% \text{ corrigido} = \frac{TE\% \times (100 - TU\%)}{100} \quad (\text{Eq.5})$$

Onde:

TE% = teor de extrativos calculado na equação 4.

TU% = teor de umidade calculado na equação 2.

4.4 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

O meio nutriente utilizado para os cultivos foi uma adaptação do meio descrito por Mandels e Weber (1969), conforme demonstrado na Tabela 4. Em Erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 100 mL do meio suplementar descrito acima. Os frascos foram então autoclavados a 121 °C por 20 minutos com a intenção de esterilizar completamente o meio interno.

Tabela 4. Adaptação meio nutriente de Mandels e Weber (1969).

Componentes	Unidade	Concentração
Uréia	g/L	0,3
KH ₂ PO ₄	g/L	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	1,4
CaCl ₂	g/L	0,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	g/L	0,3
Peptona	g/L	0,75
Extrato de levedura	g/L	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	mg/L	5,0
MnSO ₄ .5H ₂ O	mg/L	3,2
ZnSO ₄	mg/L	2,8
CoCl ₂ .6H ₂ O	mg/L	2,0
Glicose	g/L	10,0
Tween 80	ml/L	1,0

Fonte: Mandels e Weber (1969).

4.5 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Os fungos (descrito no item 4.1) foram reativados em placas com meio ágar Sabouraud, incubados por 96h e a 28°C em estufa bacteriológica Eletrolab (Modelo EL101/3RS). Após este período, uma suspensão de esporos foi obtida com adição de cerca de 10 mL da solução salina peptonada e leve raspagem com auxílio de alça estéril.

4.5.1 Determinação da Concentração de Esporos da Suspensão e Preparo do Pré-cultivo

A contagem de esporos foi realizada na câmara de Neubauer Improved nos cinco quadrados medianos (A, B, C, D e E) de lados de 0,2 mm, área de 0,04 mm² e 0,1 mm de profundidade, subdivididos em 16 quadrados.

Para obter a concentração desejada de 10⁷ esporos/ml foi feita a contagem de esporos utilizando a câmara de Neubauer no microscópio óptico. Assim o volume de inóculo foi obtido pela equação 6 (AMORIM, 2017):

$$V_{\text{susp}} \text{ (mL)} = C_{\text{esp.}} \cdot V_{\text{meio}} / (N \cdot \text{FD} / V_{\text{campo}}) \quad (\text{Eq.6})$$

Onde:

C_{esp} = concentração de esporos desejada para o cultivo de 1x10⁷ (esporos/mL);

V_{meio} = volume de meio de cultura desejado (100 mL);

V_{campo} = volume de um campo dos quadrados medianos (4x10⁻⁶ mL);

N = número médio de esporos dos cinco campos dos quadrados medianos de 0,04 mm²;

FD = fator de diluição.

4.5.2 Preparo do Pré-cultivo (Inóculo)

A preparação do inóculo para as FSm foi obtida através da combinação do volume da suspensão de esporos calculado (equação 6), com 100 mL de meio Mandels esterilizado (Tabela 4) em frasco Erlenmeyer de 250 mL. A suspensão resultante foi cultivada a 32°C, 150 rpm sob agitação orbital (SOLAB -Modelo SL-221) durante 50 h, período necessário para a obtenção dos esporos germinados. Após isso, um volume equivalente a 10% (v/v) do cultivo (item 4.5.2) foi inoculado em frascos Erlenmeyers para os ensaios de FSm.

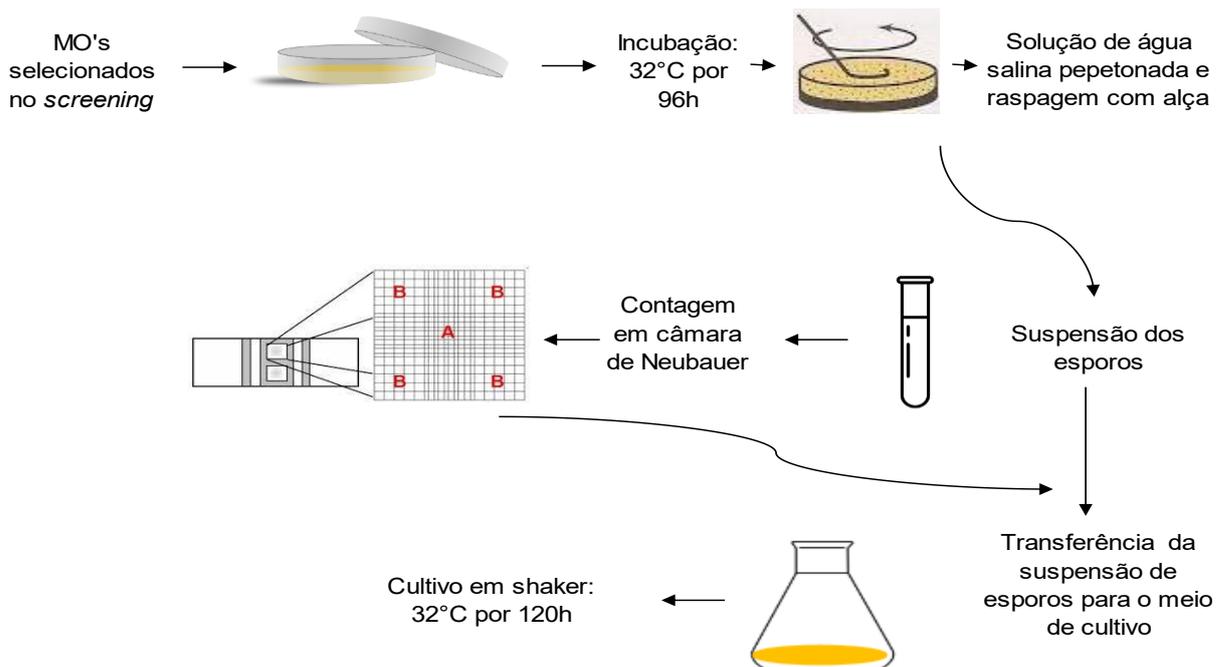
4.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Um total de 10g de farelo de trigo (FT) foi inserido em frasco Erlenmeyer de 250 mL e, este conjunto foi esterilizado em autoclave vertical (Alpha Life Science) a 121 °C/1ATM durante 20 min. Após despressurização da autoclave e resfriamento do frasco, 40 mL de solução tampão citrato de sódio esterilizado (0,05 mol/mL a pH 5,4) foi adicionado ao frasco. Inoculou-se 10 mL da suspensão contendo 1×10^7 dos esporos germinados e 40 mL do meio Mandels esterilizado. A manipulação de todo material estéril ocorreu em câmara de fluxo laminar unidirecional vertical (Veco – Modelo Bioseg 12).

Os cultivos foram realizados em triplicata e ocorreram em shaker orbital com a incubação por 120h, a 32°C e a 150 rpm. Decorrido o tempo de incubação, o fermentado foi centrifugado (Thermo Scientific – Modelo Megafuge 16R) a 10000 rpm por 20 min, a 10°C. O sobrenadante foi armazenado a 4°C e posteriormente utilizado para mensuração das atividades enzimáticas (CMCase, FPase), açúcares redutores, pH, sólidos solúveis e turvação.

Portanto, a figura 6 ilustra de forma resumida as etapas realizadas para o preparo do inóculo e da FSm.

Figura 6. Esquema de preparo do inóculo e Fermentação submersa.



Fonte: Autoria própria.

4.7 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR

A fermentação foi realizada em biorreator da marca Tecnal, Modelo BIO-TEC-PRO (Fotografia 1), em vaso reacional de 2,5 L, contendo uma mistura de 2 L de meio de cultivo composto por: 200 g de farelo de trigo, 1000 mL de Meio Mandels (Tabela 4), 700 mL de solução tampão citrato de sódio esterilizado (0,05 mol/mL a pH 5,4). Antes do ensaio, o biorreator contendo o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 40 minutos.

O processo foi monitorado e controlado nas seguintes condições: temperatura a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, agitação de 200 rpm, aeração de 2,0 vvm, monitoramento do pH $5,4 \pm 2$, com controle de espuma. A concentração de inóculo foi de 1×10^7 de esporos. O tempo de cultivo foi de 120h. Foram retiradas amostras logo após adicionado o inóculo no meio de fermentação e a cada 24 horas subsequentes, para avaliação das atividades enzimáticas, açúcares redutores e turbidez. A variação de pH, CO_2 e DO_2 foi monitorada no próprio reator por meio de eletrodos imersos no meio de cultivo.

Fotografia 1. Biorreator Tecnal (Modelo BIO-TEC-PRO) utilizado para a fermentação.



Fonte: Autoria própria.

4.7.1 Cinética de Crescimento Fúngico Através da Produção de CO₂

A cinética de crescimento do fungo no biorreator foi avaliada por meio da geração de CO₂, uma vez que a concentração deste gás, é uma medida indireta para mensurar a biomassa gerada pelo micro-organismo (FARINAS et al., 2011). Devido a presença do farelo, que é insolúvel ao meio, ficou impossibilitada a medição de crescimento de biomassa por métodos convencionais (contagem e peso seco). Por isso foi utilizada a medição indireta.

4.8 ANÁLISES FERMENTAÇÕES

Nos ensaios de fermentação submersa realizados em frascos sob agitação, foram retiradas alíquotas a cada 24h e realizadas análises de determinação de açúcares redutores, atividade enzimática de CMCase e FPase. Também foram realizados os acompanhamentos de pH, sólidos solúveis e turbidez. Para o ensaio em biorreator foram retiradas alíquotas a cada 24h para a avaliação das atividades enzimáticas CMCase, FPase e determinação de açúcares redutores. Os demais monitoramentos (pH, aeração, temperatura) foram acompanhados no próprio equipamento.

4.8.1 Sólidos Solúveis

Com um refratômetro manual portátil, colocou-se duas gotas do sobrenadante do meio de análise e leu-se o teor de sólidos solúveis em °Brix, e transformou-se em g/L. Essa análise foi realizada em duplicata a cada 24 horas de fermentação.

4.8.2 Turbidez

Quantificou-se a turbidez do meio de fermentação em NTU (Unidade Nefelométrica de Turbidez), utilizando o Turbidímetro PoliControl AP2000 WT. O turbidímetro foi calibrado com os padrões de 0,10 NTU, 20 NTU, 100 NTU e 800 NTU.

Aproximadamente 20 mL de amostra foram colocados na cubeta do equipamento para a realização da leitura. Essa análise foi realizada em triplicata. Nas fermentações de bancada, essa análise foi realizada ao início e final de cada fermentação. E para a atividade em biorreator, o acompanhamento foi realizado a cada 24h.

4.8.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

As medidas do pH foram realizadas em um pHmetro (Tecnal – Modelo TEC-2), calibrado com soluções padrões de 4,0 e 7,0. Em um tubo falcon foram colocados 10 mL de amostra e o eletrodo foi imerso para a leitura. Essa análise foi realizada em triplicata a cada 24 horas de fermentação.

4.8.4 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores (AR)

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959), baseado na capacidade de o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ser reduzido pela glicose a composto nitroamino análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), altamente colorido. Esse composto aromático absorve fortemente a luz, sendo possível, assim, estabelecer uma relação direta entre a medida colorimétrica e a quantidade de açúcares redutores presente (GONÇALVES, 2010).

Para análise, 1,0 mL da amostra foi adicionada a 1,0 mL do reagente DNS em tubo de ensaio. Em seguida, os tubos seguiram para reação em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após esse tempo, foram resfriados em banho de gelo para finalizar a reação. O volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. Após homogeneização, a intensidade da cor foi avaliada em espectrofotômetro (Weblabor – Modelo V-M5), a 540 nm, com auxílio do software UV Basic V1.67.0 no módulo Quantitation. O equipamento foi calibrado com amostra “branco”, na qual foi substituída a amostra por água destilada. A curva padrão foi feita a partir da determinação de glicose nas concentrações de 0,1 a 1,0 g/L. A partir dessa curva obteve-se a equação que relaciona valores de absorbância aos de atividade (Equação 7).

$$Y = 1,417x + 0,036 \quad (R^2 = 0,9997) \quad (\text{Eq.7})$$

O cálculo da concentração de açúcares redutores (AR), em g.L⁻¹ foi realizado de acordo com a Equação 8:

$$AR = \text{abs} \times f \times d \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que:

Abs = média das absorvâncias lidas;

F = fator de concentração;

D= inverso da diluição da amostra.

4.8.5 Determinação da Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)

Para determinar a atividade de CMCase, foi utilizada a metodologia adaptada de Ghose (1987), que representa a dosagem de endoglucanases. Os ensaios reacionais foram conduzidos em microtubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 0,5 mL de extrato enzimático diluído em tampão citrato de sódio 0,5 M, pH 5,0, e 0,5 mL de solução de CMC (2%). Em outro tubo foi adicionado 0,5 mL de solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático comparado ao controle da reação. O branco conteve 0,5 mL CMC a 2% e 0,5 mL de solução tampão. Os tubos foram mantidos a 50 °C durante 30 minutos, e então adicionou-se 0,5 mL de DNS para então levar a banho fervente por 5 min. Logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorvância a 540 nm realizada em espectrofotômetro. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

4.8.6 Determinação da Atividade em Papel Filtro (FPase)

A atividade de FPase ou atividade em papel de filtro, que abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987) a partir da degradação de uma tira de papel de filtro. Em um tudo de ensaio com capacidade mínima de 25 mL, foi inserida uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 de 1x6 cm (cerca de 50 mg), 1 mL de tampão citrato de sódio 0,5 M, pH 5,0 e 0,5 mL do extrato enzimático. Em outro tubo foi adicionando 1 mL da

mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, comparado ao controle da reação. Em um terceiro tubo foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro, este foi comparado ao branco. As amostras foram incubadas em estufa a 50°C por 60 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 3 mL de DNS. Então o tubo foi levado a banho fervente por 5 minutos. Acrescentando 16 mL de água destilada e então homogeneizado, a leitura da intensidade foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Todas as medições foram realizadas em triplicata.

4.8.7 Atividade Enzimática

Após as determinações analíticas anteriores, as concentrações enzimáticas foram calculadas segundo a Equação 9 (GALINDO, 2016):

$$[\text{enzima}] = [\text{AR}] \times V_{\text{mistura}} \times (\text{Treação})^{-1} \quad (\text{Eq.9})$$

Onde:

[AR] = concentração de açúcar produzido ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$);

V = volume da mistura reacional (mL);

Treação = tempo de reação enzimática (min).

Sendo assim, a unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática foi expressa em UI por mL de substrato (UI/mL) (GALINDO,2016).

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de todas as análises realizadas no trabalho foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey utilizando o software Minitab 18, com nível de 95% de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO FARELO DE TRIGO

A composição química do FT depende geralmente do processamento dos grãos e das características do cultivo. As amostras de farelo de trigo foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, cinzas e extrativos. A Tabela 5 exhibe os resultados obtidos no atual estudo.

Tabela 5. Composição química percentual determinada para o farelo de trigo.

Teor	Média	IC de 95% (μ)
Umidade	12,1329 \pm 0,15	(11,9369; 12,3289)
Cinzas	5,3371 \pm 0,03	(5,2891; 5,3850)
Extrativos	2,783 \pm 0,46	(2,038; 3,529)

μ : média de teores corrigidos

Fonte: Autoria própria.

O valor encontrado para umidade (12%) está dentro da faixa reportada pela literatura. Bakker (2017), em seu trabalho encontrou resultados de 12,5% de umidade no farelo de trigo. A umidade do farelo é importante para estabelecer uma base que expresse os resultados das análises por exemplo, em base seca ou em base padrão (como 14% de umidade). O limite máximo permitido de umidade para a farinha de trigo, pela legislação brasileira, é de 15% (EMBRAPA, 2009).

As porcentagens de compostos de diferentes naturezas, agrupadas como cinzas e extrativos (4,3% e 2,7%, respectivamente), encontrados no presente estudo são comparáveis com os valores reportados por Rojas (2012), que obteve um percentual de 5% para cinzas e 4% de extrativos. As cinzas, em amostras vegetais, representam basicamente os minerais presentes na amostra, apesar de também poderem consistir em resíduos de produtos usados durante o preparo da amostra, em materiais metálicos com os quais ela entrou em contato (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010).

Os extrativos são definidos como compostos que podem ser extraídos de materiais lignocelulósicos, tanto por solventes polares quanto por apolares, que não são componentes estruturais da parede celular. Nessa categoria, incluem-se vários compostos de baixa ou de média massa molecular, incluindo uma grande variedade de moléculas, como: alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água);

ácidos ou ésteres graxos; álcoois de cadeia longa; ceras; resinas; esteroides; e compostos fenólicos e glicosídeos (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010).

5.2 SELEÇÃO DE FUNGOS

Os micro-organismos foram recebidos em tubos de *ependorf* e foram reativados em meio Ágar Sabouraud, sendo incubadas a 32°C por sete dias. A primeira etapa de avaliação do potencial celulolítico dos isolados em estudo, consistiu na observação do crescimento dos fungos em meio sólido em placa contendo substrato celulósico, CMC, como única fonte de carbono. Esta avaliação consistiu na observação do crescimento das linhagens e determinação do diâmetro do halo de hidrólise utilizando o corante vermelho congo (FLORENCIO, 2011). A Fotografia 2 mostra a zona mais clara ao redor da colônia do isolado CMIB-174.

Fotografia 2. Observação do halo da colônia crescida em placa de Petri e corada com vermelho congo, após 4 dias de incubação.



Fonte: Autoria própria.

A zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da CMC, foi observada em todas as linhagens. A medida dos diâmetros dos halos de hidrólise observados com o corante vermelho Congo representa uma

informação diretamente relacionada à região de atuação das enzimas celulolíticas, visto que o corante vermelho Congo permanece ligado apenas às regiões onde há ligações β -1,4 glicídicas. A formação do halo em placas de ágar com CMC resulta da clivagem do CMC em fragmentos menores, os quais o corante vermelho Congo não consegue se fixar. Além disso, halos podem resultar da clivagem do CMC em fragmentos suficientemente pequenos para serem lavados das placas durante o processo de coloração (FLORENCIO, 2011).

Procurando-se comparar essas linhagens, foi estabelecido um índice enzimático (I.E) e por meio deste observou-se que algumas colônias com pouco crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004). Tendo como exemplo CMIB-172 que em 24h apresentou um diâmetro da colônia de 5,9mm e diâmetro de halo de 8,9mm, obtendo assim, um I.E de 1,54 aumentando para 1,73 em 48h. O mesmo podemos observar com o isolado CMIB-174 que também apresentou halos menores, obtendo um I.E de 1,50 em 24h de análise.

A tabela 6 apresenta os resultados de índice enzimático obtidos para todas as linhagens, ao longo dos quatro dias em que foram efetuadas as medições dos halos de hidrólise e dos diâmetros das colônias.

Tabela 6. Resultados de índice enzimático (I.E.) de todos os isolados incubados em meios sólidos suplementado com CMC por 4 dias a 22 °C.

(continua)

Fungo	Tempo (h)	Diâmetro halo (mm)	Diâmetro colônia (mm)	I.E
CMIB-166	24	6,7	6,1	1,10
	48	35,7	31,6	1,13
	72	61,1	59,4	1,03
	96	86,8	85,5	1,02
CMIB-167	24	8,8	7,9	1,11
	48	13,8	12,8	1,08
	72	19,3	17,8	1,08
	96	36,4	34,8	1,05
CMIB-169	24	18,3	14,4	1,27
	48	46,3	41,8	1,11
	72	56,3	53,8	1,05
	96	85,6	84,9	1,01

Tabela 7. Resultados de índice enzimático (I.E.) de todos os isolados incubados em meios sólidos suplementado com CMC por 4 dias a 22 °C.

				(conclusão)
Fungo	Tempo (h)	Diâmetro halo (mm)	Diâmetro colônia (mm)	I.E
CMIB-172	24	8,9	5,9	1,51
	48	21,1	12,2	1,73
	72	40,3	26,2	1,54
	96	49,9	41,2	1,21
CMIB-174	24	12,6	8,4	1,50
	48	10,9	9,3	1,17
	72	26,4	23,4	1,13
	96	48,5	45,9	1,06
CMIB-064 (controle)	24	11,3	5,7	1,98
	48	47,5	20,5	2,32
	72	78,9	60,7	1,30
	96	80,6	69,8	1,15

Fonte: Autoria própria.

A maior atividade de celulase foi observada na linhagem controle (CMIB-064), identificada como *Mucor* sp. O gênero *Mucor* pertence à ordem Mucorales e é um grupo de fungos filamentosos encontrado principalmente no solo, plantas e frutas em decomposição (HERMET et al., 2012). Na literatura, *Mucor* sp. foi avaliada quanto à atividade enzimática e foi descrita por Rodrigues et al. (2020) como uma boa produtora de celulases, a qual apresentou o maior IE (7,17) e o ápice da taxa de crescimento em aproximadamente 36 h.

Na literatura existem abordagens diferentes para classificação de micro-organismos como bons produtores de celulases de acordo com o seu índice enzimático (I.E.) (SCHEFFER, 2018). Andrade (2015), realizando isolamento de fungos filamentosos a partir do solo para aplicação em resíduos de café, propõem que para classificar as cepas como potenciais para aplicação biotecnológica, estas devem apresentar um I.E. com valores superiores a 1,2. No presente trabalho foi considerado um valor de I.E. maior ou igual a 1,2 para a classificação das melhores cepas quanto à produção de enzimas celulolíticas.

Avaliando esses resultados, pode-se concluir que mesmo apresentando menor crescimento das colônias, o que indica uma produção baixa de biomassa, essas cepas possuem um elevado potencial de produção de enzimas celulolíticas. Partindo do

pressuposto que o complexo enzimático celulolítico é composto por um consórcio de enzimas que atuam de forma sinérgica para a degradação da celulose, é de grande relevância realizar estudos acerca de quais enzimas estão presentes em cada complexo produzido afim de avaliar o potencial de aplicação de maneira mais específica (SCHEFFER, 2018).

Diante dos resultados obtidos, selecionou-se para a etapa de fermentação submersa em frascos agitados, os isolados CMIB-169, CMIB-172 e CMIB-174. Uma vez que, apresentaram os maiores índices enzimáticos para carboximetilcelulase nas primeiras 24h e 48h.

5.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

As três diferentes linhagens foram empregadas em cultivos em frascos agitados, utilizando FT, a fim de investigar a produção de duas enzimas diferentes (CMCase e FPase). Essas enzimas foram escolhidas com base em suas importantes aplicações em diferentes tipos de indústrias, como alimentos, ração, têxtil, celulose, papel e, mais recentemente, na indústria de etanol de segunda geração (BUFFO, 2020).

A atividade de endoglucanase (CMCase) e celulases totais (FPase) foi detectada em todos os 3 isolados na fermentação submersa por 120 horas a 32°C. Na tabela 7 estão expressos os resultados das atividades enzimáticas e açúcares redutores.

Tabela 8. Fungos cultivados em fermentação submersa por 120h, 32°C e 150 rpm e valores das atividades enzimáticas.

(continua)

Fungo	Tempo ferm (h)	AR (g/L)	CMCase (U/mL)	Fpase (U/mL)
CMIB -169	24	0,017 + 0,007b	0,005 + 0,008b	0,013 + 0,010a
CMIB -169	48	0,017 + 0,013b	0,006 + 0,019b	0,017 + 0,004a
CMIB -169	72	0,019 + 0,010b	0,008 + 0,017b	0,019 + 0,008a
CMIB -169	96	0,023 + 0,026b	0,009 + 0,010b	0,021 + 0,006a
CMIB -169	120	0,023 + 0,029b	0,016 + 0,010a	0,023 + 0,008a
CMIB-172	24	0,029 + 0,009a	0,012 + 0,09a	0,016 + 0,006a

Tabela 9. Isolados cultivados em fermentação submersa por 120h, 32°C e 150 rpm e valores das atividades enzimáticas.

(conclusão)

Isolados	Tempo ferm (h)	AR (g/L)	CMCase (U/mL)	Fpase (U/mL)
CMIB-172	48	0,030 + 0,012a	0,018 + 0,006a	0,025 + 0,008a
CMIB-172	72	0,030 + 0,017a	0,022 + 0,005a	0,038 + 0,016a
CMIB-172	96	0,032 + 0,004a	0,026 + 0,007a	0,032 + 0,033a
CMIB-172	120	0,032 + 0,015a	0,027 + 0,004a	0,053 + 0,008a
CMIB-174	24	0,032 + 0,013a	0,016 + 0,020a	0,012 + 0,037a
CMIB-174	48	0,032 + 0,012a	0,018 + 0,009a	0,026 + 0,020a
CMIB-174	72	0,032 + 0,011a	0,020 + 0,031a	0,038 + 0,003a
CMIB-174	96	0,032 + 0,011a	0,021 + 0,005a	0,052 + 0,006a
CMIB-174	120	0,032 + 0,006a	0,032 + 0,007a	0,060 + 0,058a

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

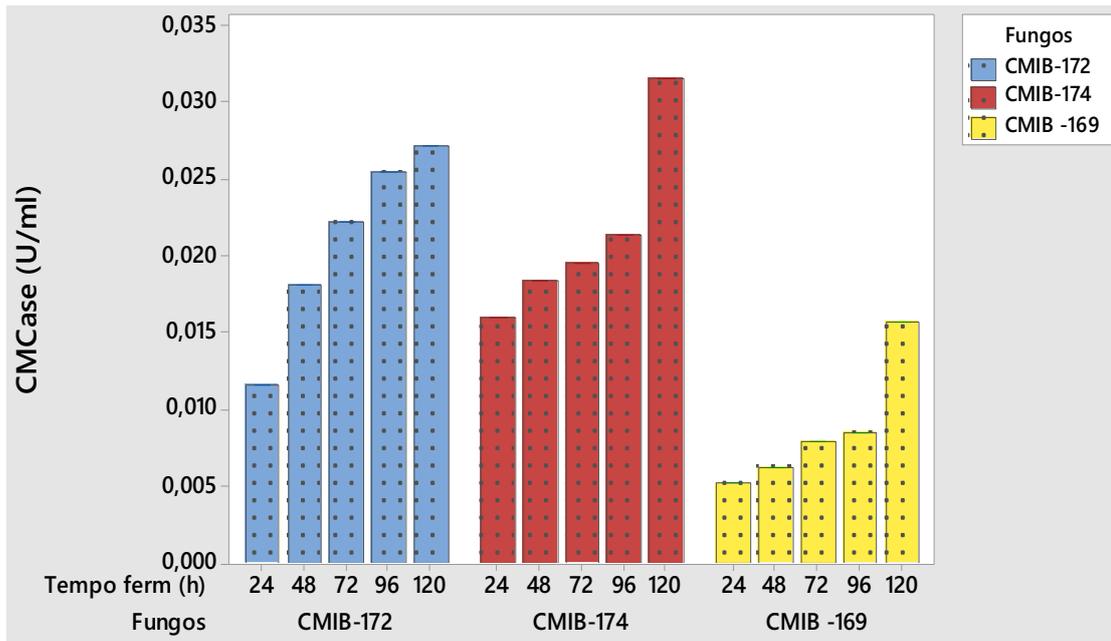
Fonte: Autoria própria.

Com os dados apresentados na Tabela 7 foi possível obter um gráfico da atividade enzimática das celulasas em função do tempo para os fungos. As Figuras 7 e 8 mostram os gráficos das atividades enzimáticas após 24, 48, 72, 96 e 120 h de cultivo das diferentes linhagens.

Dentre as linhagens testadas, CMIB-169 foi a que apresentou a menor atividade enzimática, tanto para CMCase (0,016 UI/mL) e FPase (0,021 UI/mL), tendo o pico de maior atividade em 120h de fermentação. Dessa forma, os melhores resultados de CMCase foram observados em 120h de fermentação, nas linhagens CMIB-174 (0,032 UI/mL) e CMIB-172 (0,027 UI/mL). O mesmo comportamento foi também observado em outros estudos. Li *et al.* (2017) observaram um pico de produção de endoglucanase por *T. reesei* em 120h de cultivo. Porém, todas as linhagens, utilizadas no presente trabalho, apresentaram baixas atividades desta enzima quando comparado com os resultados apresentados por Pereira (2016), o qual relatou uma atividade de carboximetilcelulase de 1,3 UI/mL para os fungos isolados do Cerrado, em 7 dias de FSm a 28°C. Buffo (2020) também relatou uma maior atividade de CMCase (~900 UI/L) em seu trabalho utilizando cepas de *Aspergillus Niger*.

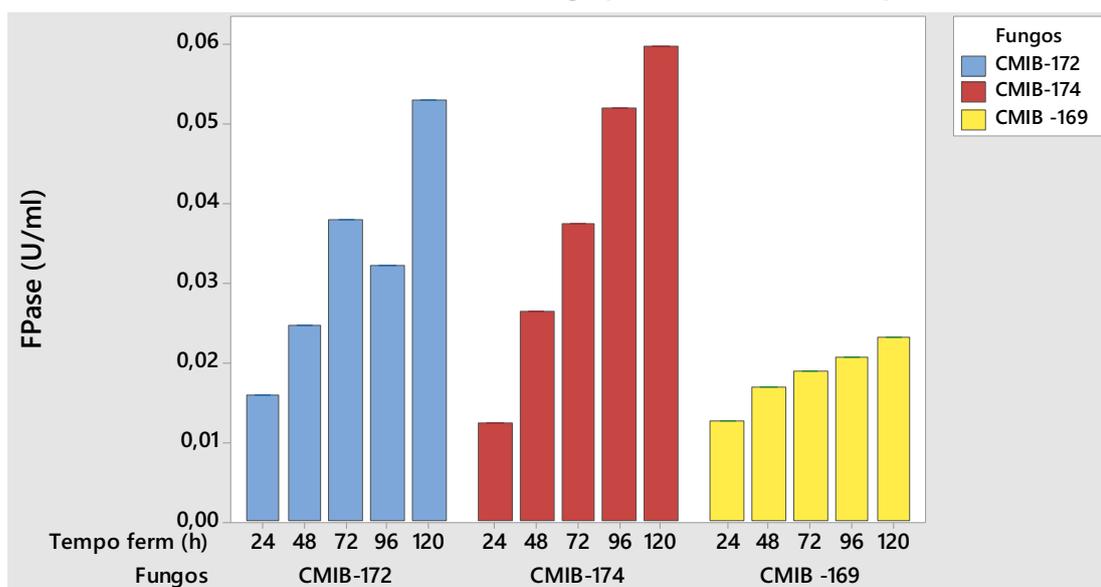
Uma possível explicação para a menor produção de CMCase é a agitação utilizada (150rpm). Como em frascos agitados a transferência de oxigênio é limitada, isso pode ter contribuído para diminuir a produção dessa enzima. O fato da quantidade de oxigênio dissolvido possivelmente afeta a produção de endoglucanase indica que essa enzima é mais dependente desse nutriente para sua produção (BUFFO, 2020).

Figura 7. Atividade de endoglucanases (CMCase) obtidos nos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Atividade de celulases totais (FPase) obtidos nos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo por 120h, 32°C e 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

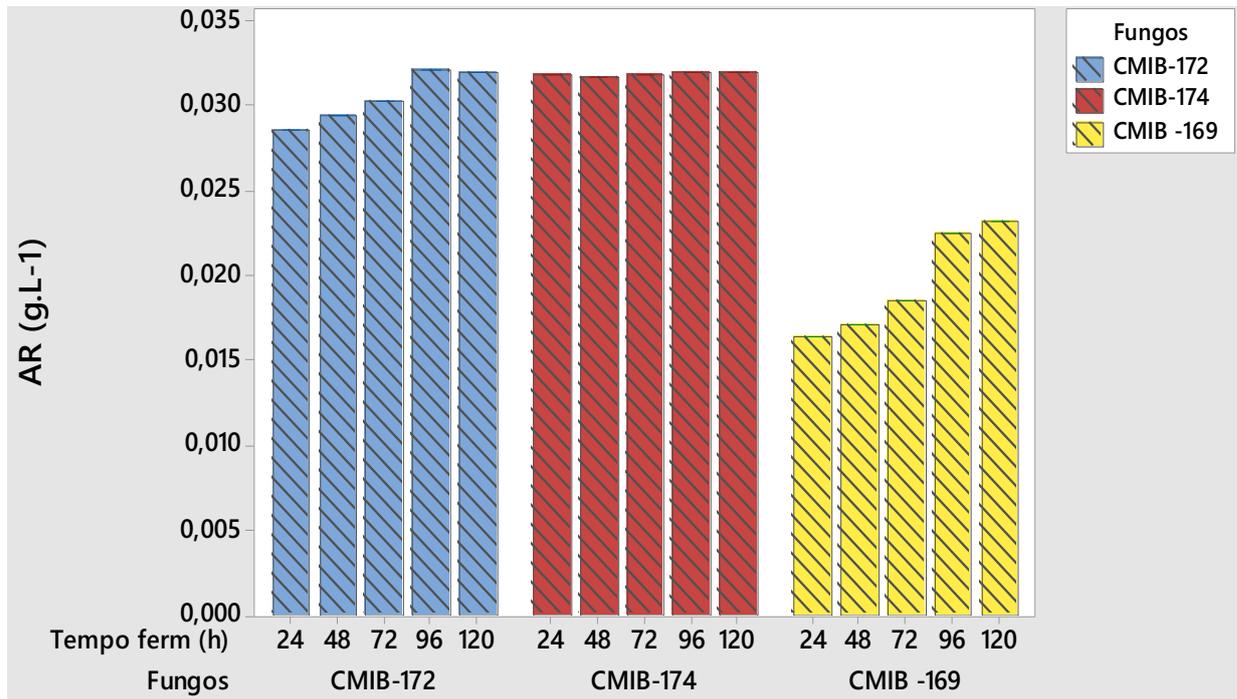
Para essa etapa da seleção utilizou-se como parâmetro a produção de celulases totais utilizando papel filtro. Em geral, os papéis de filtro utilizados em laboratório são produzidos a partir de polpa de celulose refinada e/ou lineares de algodão; possuem quantidade elevada de α -celulose (α -celulose > 95%) sendo essa a porção insolúvel da celulose e teores de cinzas extremamente baixos (em geral os valores são menores de 0,1%) (INFORSATO; PORTO, 2016).

Quanto a atividade de FPase, o isolado CMIB-174 também se destacou em relação às demais, apresentando uma produção de 0,060 UI/mL em 120h de fermentação. O isolado CMIB-172 teve um leve aumento da produção enzimática em 72h (0,038 UI/mL), seguido de um declínio em 96h (0,032 UI/mL) e tendo sua máxima produção em 120h (0,053 UI/ml). Em contrapartida, o isolado CMIB-169 apresentou valores consideravelmente inferiores às demais.

Inforsato e Porto (2016), encontraram valores maiores de celulases totais utilizando linhagens *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp. cultivados em meio de cultura semi-sólido de farelo de trigo. Em 120h de fermentação observaram uma produção de 0,31 UI/mL para o *Aspergillus* sp. e 0,67 UI/mL para o *Rhizopus* sp. Codima (2019) teve o ponto máximo de concentração de FPase nas amostragens de 76h e 96h de cultivo, com a concentração de $0,73 \pm 0,05$ FPU/ml. Uma unidade de FPU/mL é calculada como sendo a razão de 0,37 e a concentração da enzima necessária para liberar 0,2 mg de glicose (CODIMA, 2019).

No contexto de crescimento populacional e atividade enzimática estão os mecanismos de atuação das enzimas e o processo de *feedback*. Após determinado tempo de atuação da enzima no substrato, ocorreu uma elevação da concentração de um determinado produto formado, nesse caso os açúcares redutores. A concentração elevada de açúcares pode levar à inibição da atividade enzimática, total ou parcial, até que o equilíbrio produto/substrato seja atingido. Alguns exemplos de enzimas do complexo celulolítico que sofrem inibição pelo produto são a 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase, que hidrolisa terminais não redutores e oligossacarídeos em celobiose, a β -glicosídeo gluco-hidrolase que promove a hidrólise de oligossacarídeos e celobiose em glicose (INFORSATO; PORTO, 2016). A figura 9 expressa os resultados de AR após 24, 48, 72, 96 e 120 h de cultivo das diferentes linhagens.

Figura 9. Açúcares Redutores (g/L) obtidos nos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

Para as linhagens CMIB-169 e CMIB-172 observou-se um aumento na concentração de açúcares redutores. A máxima liberação de açúcares ocorreu em tempos de 96 e 120 h. O isolado CMIB-174 se manteve constante na liberação dos açúcares desde as 24h de cultivo. Isso pode ter ocorrido devido a suplementação de glicose adicionada ao meio de cultivo.

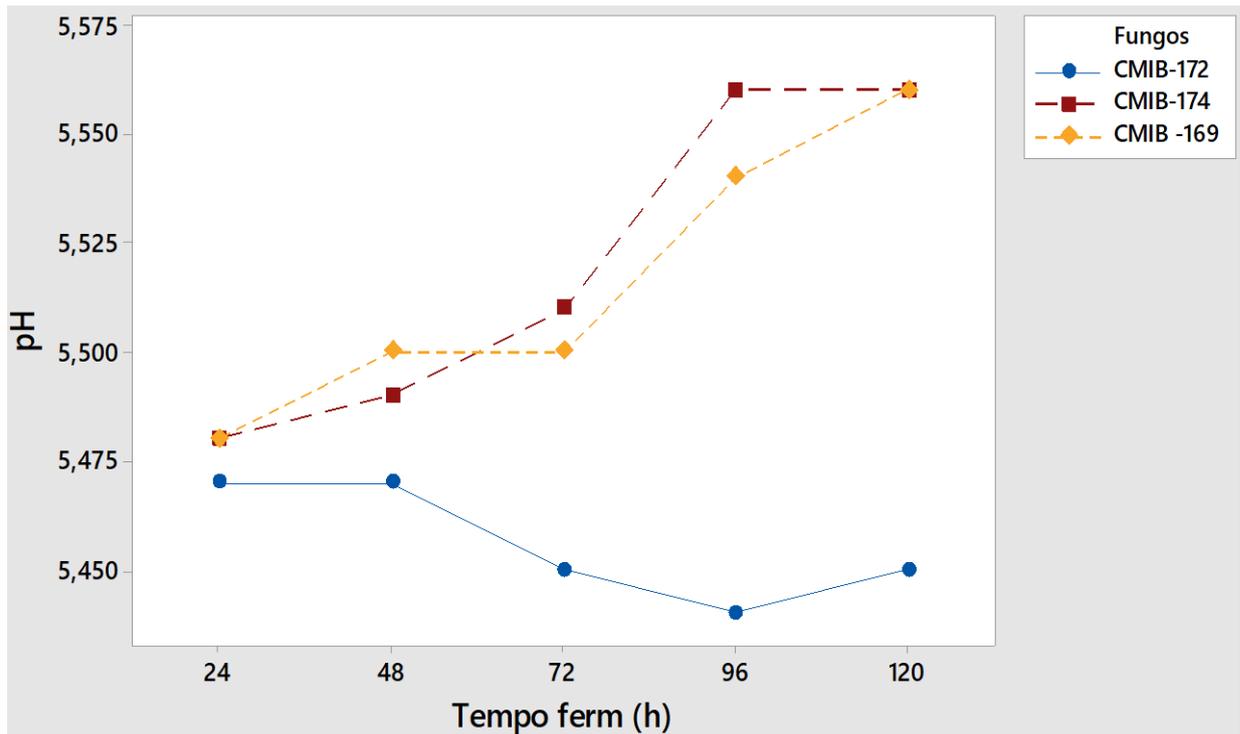
Além da glicose, a suplementação da fonte de nitrogênio no meio nutriente para FSm é importante para produção enzimática. Amorim (2017) apontou a deficiência de nitrogênio do farelo de trigo na produção de celulasas por *A. niger* em fermentação em estado sólido a 50% de umidade quando comparado a outras fontes de carbono como o farelo de soja (AMORIM, 2017).

5.3.1 pH e Sólidos Solúveis

Sabe-se que uns dos principais fatores que afetam a atividade enzimática são a temperatura e o pH (AMORIM, 2017). O pH pode influenciar no transporte de componentes na membrana das células e assim, induzir mudanças morfológicas nos micro-organismos e interferir na estabilidade enzimática. O tempo de fermentação está diretamente relacionado com o esgotamento nutricional no meio, implicando na

redução do crescimento microbiano, inviabilizando a conversão da biomassa em produtos e, conseqüentemente, reduzindo a produção de enzimas (DOS SANTOS et al., 2018). A figura 10 expressa o acompanhamento do pH durante as 120h de cultivo.

Figura 10. Acompanhamento do pH dos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.

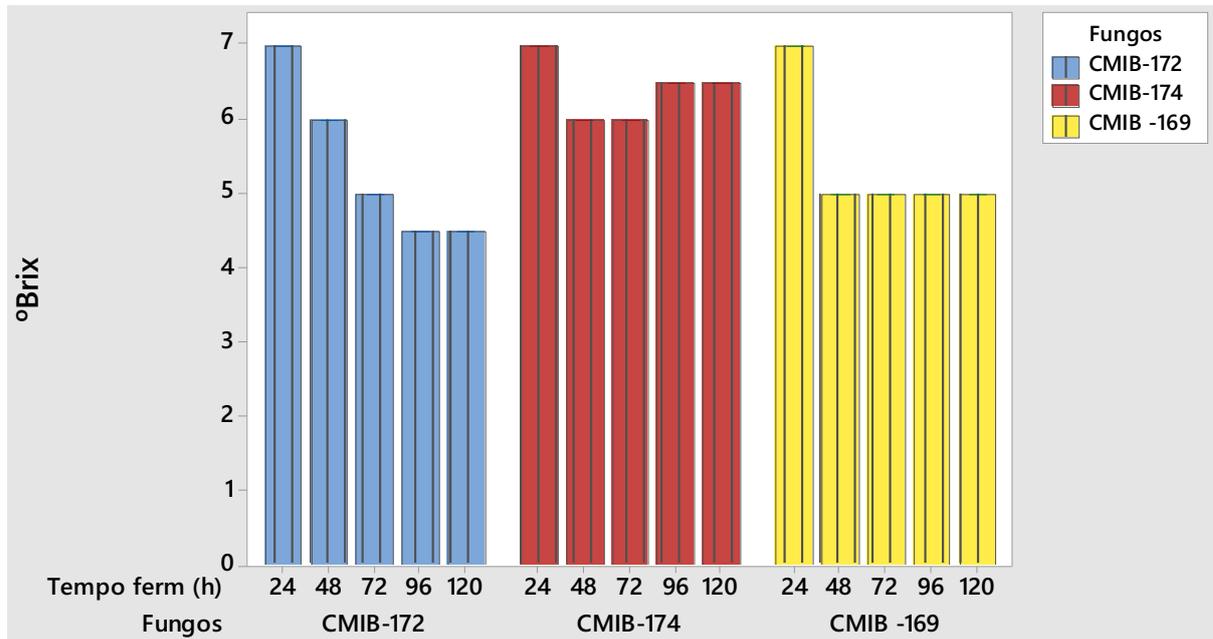


Fonte: Autoria própria.

Através dos resultados obtidos percebe-se que houve uma maior variação no pH em 72h de cultivo, sendo o isolado CMIB-172 a que apresentou uma maior queda em relação às demais, apresentando um pH de 5,45 em 72h e caindo para 5,39 em 96h. Porém, devido a utilização do meio tamponado nota-se que a variação do pH não foi significativa durante todo o processo. Segundo Bonassa et al. (2013) a viabilidade celular é influenciada pelo pH, afetando o tempo de fermentação e não a concentração final do produto.

Assim, a Figura 11 demonstra as curvas de consumo de substrato para a fermentação com as diferentes linhagens durante as 120h de cultivo.

Figura 11. Teor de sólidos solúveis dos diferentes isolados através de fermentação submersa em meio de farelo de trigo, por 120h, 32°C e 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

Nas primeiras 24h de cultivo percebeu-se que o teor de sólidos solúveis se manteve constante para todas as linhagens. Uma explicação para os valores mais altos nas primeiras 24h se deve a suplementação de glicose adicionada ao meio. Porém, comparando as linhagens percebeu-se que somente CMIB-174 expressou um aumento nos valores de sólidos solúveis a partir de 96h de cultivo.

5.4 Biorreator

Devido às melhores repostas, principalmente frente à FPase, o isolado CMIB-174 foi selecionado para avaliação da produção enzimática em biorreator, agitado mecanicamente a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e pH $5,4 \pm 0,2$. Como observado anteriormente nos ensaios de otimização em frascos, mesmo com a utilização do meio tamponado houve uma pequena variação do pH durante o processo, sendo assim na atividade em biorreator foi ativado o controle automático da dosagem de ácido e base do sistema.

Na tabela 8 estão apresentados os resultados de atividade enzimática obtidos na fermentação em biorreator. Com base nos dados apresentados, pode-se observar que o ensaio em biorreator favoreceu as atividades de CMCase e FPase com um aumento significativo de 433% e 146%, respectivamente.

Tabela 10. Atividade enzimática atingidas pelo isolado CMIB-174 no decorrer da fermentação em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph 5,4±0,2.

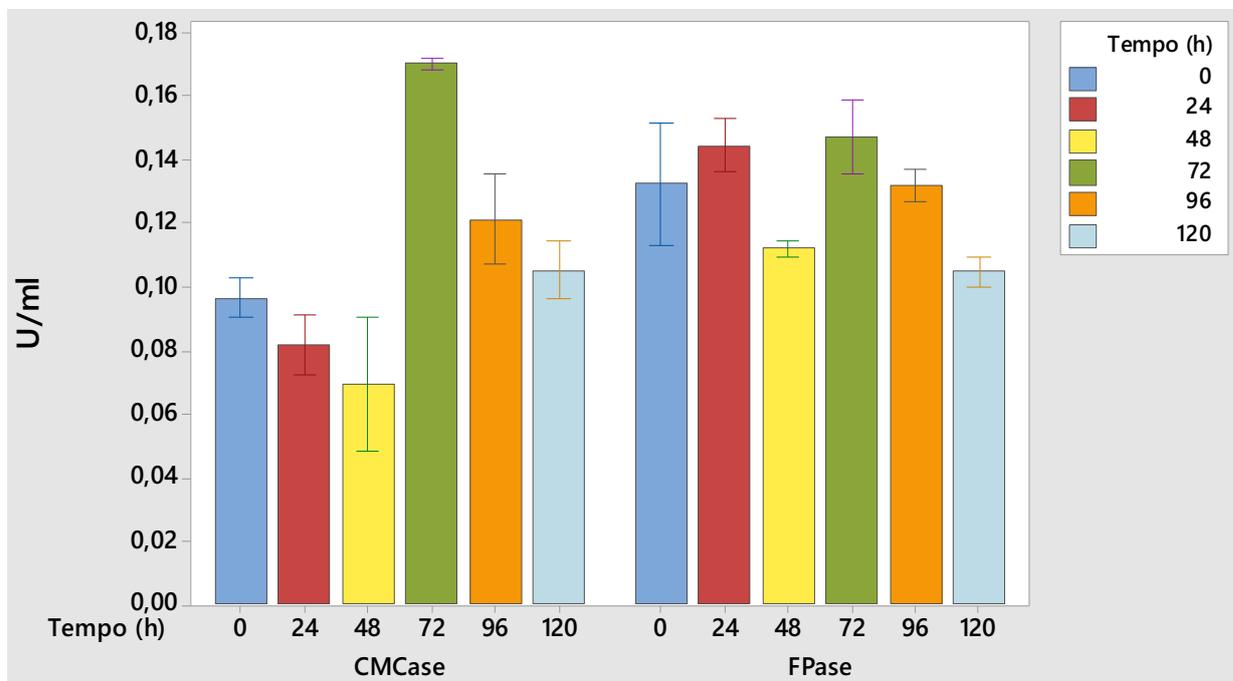
Tempo (h)	AR (g/L)	CMCase (U/mL)	FPase (U/mL)
0	0,0343 ±0,0001a	0,0966 ±0,0007c	0,1327 ±0,0011b
24	0,0334 ±0,0009ab	0,0818 ±0,0056d	0,1446 ±0,0034a
48	0,0331 ±0,0002b	0,0695 ±0,0037d	0,1121 ±0,0021c
72	0,0336 ±0,0003ab	0,1705 ±0,0025a	0,1473 ±0,0078a
96	0,0329 ±0,0002b	0,1216 ±0,0039b	0,1322 ±0,0046b
120	0,0333 ±0,0004ab	0,1055 ±0,0085c	0,1048 ±0,0018c

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: Autoria própria.

Avaliando a cinética das atividades enzimáticas (Figura 12) observou-se que, diferentemente dos ensaios em frascos, a máxima produção de atividade enzimática ocorreu em 72h de cultivo, assim como a maior taxa de produção de enzimas endoglucanásicas, representadas pela atividade CMCásica.

Figura 12. Cinética da produção de endoglucanases (CMCase) e celulases totais (FPase) para o isolado CMIB-174, em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph 5,4±0,2. (Barras representam



o desvio padrão).

Fonte: Autoria própria.

Existe uma dificuldade em comparar as atividades enzimáticas obtidas com os dados da literatura, devido aos diferentes tipos de biorreatores utilizados, os

substratos utilizados, sua solubilização, diferentes maneiras de expressar a atividade enzimática, e a diferença entre os equipamentos utilizados pelos laboratórios, entre outros fatores (FLORENCIO, 2011). Considerando esses fatores, os valores das atividades enzimáticas CMC_{Case} e FPase, foram comparados a alguns estudos que apresentaram condições aproximadas para a realização da FSm.

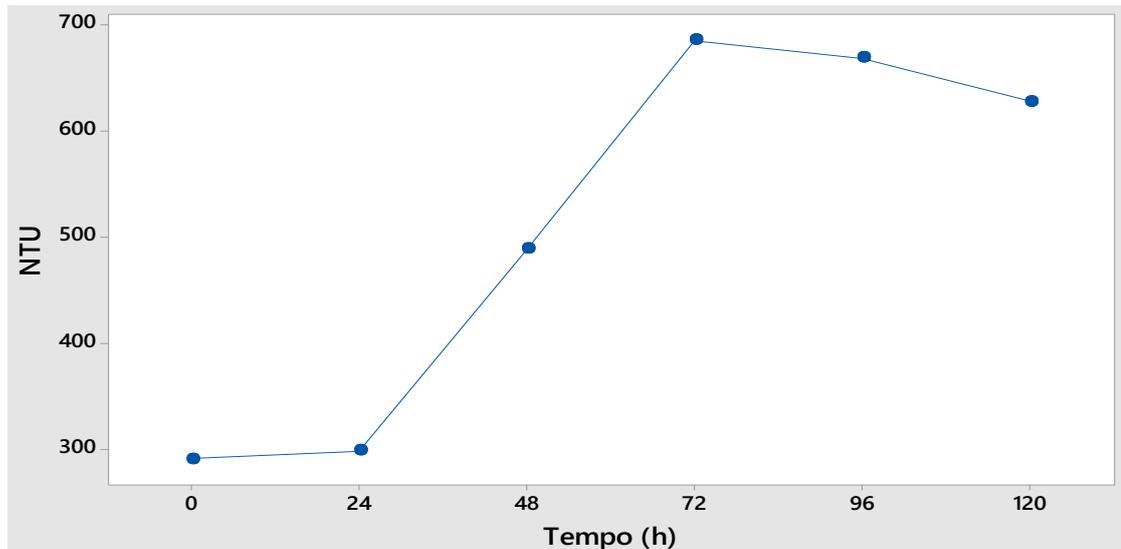
Comparando com os resultados encontrados na literatura, o isolado expressou baixas atividades enzimáticas. Silva et al. (2018), em sua pesquisa em um biorreator de tanque agitado, encontrou uma atividade de FPase de $1,25 \pm 0,14$ U/mL utilizando *T. reesei* para produção de enzimas celulolíticas, tendo como resíduo de casca de laranja. Ahamed e Vermette (2008), também utilizando cepas de *T. reesei*, encontraram uma atividade CMC_{Case} de 4,2 U/mL porém utilizando um biorreator de tanque agitado de 7 L. Em outro estudo, Xue et al. (2020), utilizando um biorreator *gas lift*, relatou que atividade das celulases foi superior a 6,28 U/mL.

Com base nos resultados finais de fermentação em biorreator, conclui-se que os ensaios favoreceram o aumento da atividade CMC_{Cásica} e FP_{ásica}, mas quando comparado a outros estudos observa-se uma baixa atividade enzimática. Para esses resultados, a melhor homogeneização do meio e a aeração mais eficiente no processo podem ter colaborado para esse avanço.

5.4.2 Turbidez

A turbidez é a propriedade de um líquido, que pode ser definido como o grau de dificuldade em que um feixe luminoso atravessa o mesmo, levando-o a uma aparência cada vez mais turva. Suas principais causas são partículas insolúveis em suspensão, materiais orgânicos, fragmentos celulares e micro-organismos (MATSUO; STEFFEN, 2018). Na figura 13 foi possível obter um gráfico da turbidez em função do tempo, onde observou-se um aumento de 130% da turbidez em 72h de cultivo, coincidindo com o aumento das produções enzimáticas.

Figura 13. Turbidez obtida para isolado CMIB-174 no decorrer da fermentação em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph $5,4\pm 0,2$.

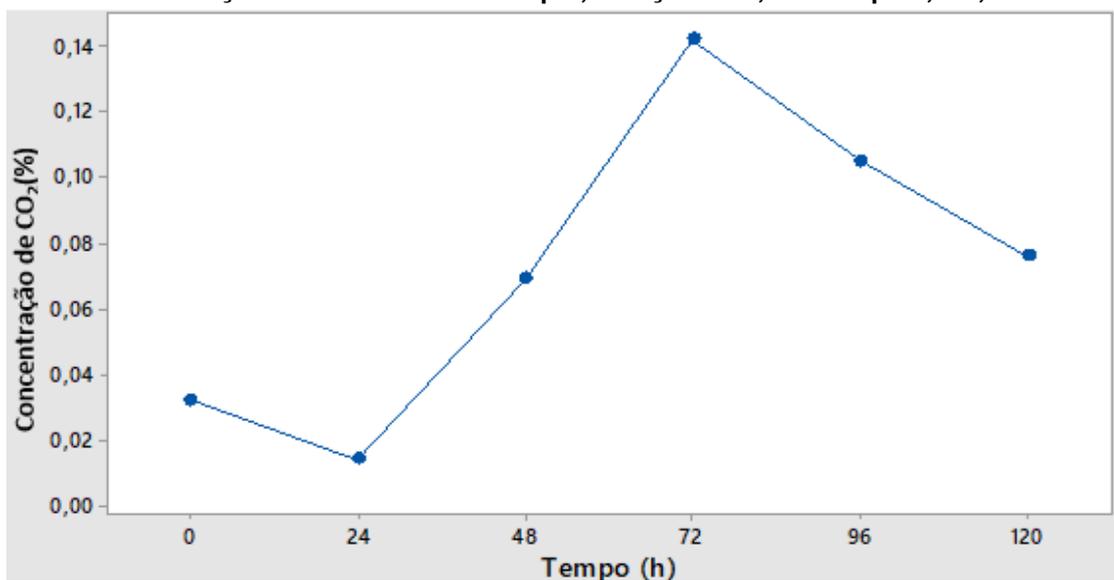


Fonte: Autoria própria.

5.4.1 Cinética de Crescimento Fúngico Através da Produção de CO₂

Para entender melhor o desenvolvimento do micro-organismo foi monitorado a concentração de CO₂, pois, como mencionado anteriormente, a geração de CO₂ é uma medida indireta para mensurar a biomassa microbiana (CUNHA, 2020). A figura 14 expressa a cinética do crescimento do fungo.

Figura 14. Crescimento Fúngico através da produção de CO₂ para o isolado CMIB-174 no decorrer da fermentação em biorreator a 200 rpm, aeração de 2,0 vvm e ph $5,4\pm 0,2$.



Fonte: Autoria própria.

É possível observar que as concentrações de CO_2 tiveram um aumento em 48h de cultivo, tendo sua máxima em 72h. A similaridade do aumento das concentrações de CO_2 e turbidez nos mesmos tempos da fermentação indicam o crescimento microbiano.

6 CONCLUSÃO

Baseando-se nos dados apresentados no capítulo anterior, foi possível concluir que os isolados fúngicos utilizados no presente trabalho apresentaram uma capacidade de produção de enzimas celulolíticas quando testados em meio sólido suplementado com CMC. Porém, nessa etapa os dados não foram conclusivos devido à suscetibilidade a variáveis intrínsecas ao método.

Todas as amostras testadas foram capazes de produzir celulasas em farelo de trigo como substrato em fermentação submersa. Também foi possível observar que o ensaio realizado em biorreator favoreceu as atividades de CMCase e FPase com um aumento significativo de 433% e 146%, respectivamente. Indicando que a aeração mais eficiente teve impacto no processo. Porém, os valores obtidos de CMCases e FPases foram relativamente baixos quando comparados a outros trabalhos encontrados na literatura.

Frente ao apresentado, este estudo contribui para a descrição do potencial biotecnológico dos isolados fúngicos presentes na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico – UTFPR (Câmpus Ponta Grossa).

Para trabalhos futuros, sugere-se a utilização de outras fontes lignocelulósicas como fonte de carbono, otimizando as variáveis da fermentação (pH, temperatura e agitação) e testar *blends* com os micro-organismos a fim de investigar uma melhor produção enzimática. A identificação taxonômica das linhagens também se faz de extrema importância para uma melhor exploração dos micro-organismos e aplicação biotecnológica dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ABITRIGO. **História do Trigo**. 2017. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/conhecimento-trigo.php>>. Acesso em: 10 de nov. 2019.
- AGEITEC. **Agencia Embrapa de Informação tecnológica - Tecnologia de Alimentos**. 2008. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000gjrlnwqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html>. Acesso em: 10 de nov 2019.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**. v. 40, n.3, p. 399-407, 2008.
- AMORIM, C. C. **Xilanases por cultivo submerso de *Aspergillus niger***. 2017. 137f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.
- ANDRADE, M. C. **Bioprospecção de fungos filamentosos, perfil enzimático e utilização em resíduos do processamento de café**. 2015. 131 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- ANTUNES, J. R. D. Q. **Bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de enzimas lignolíticas fúngicas**. 2015. 73f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.
- APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BOHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S. Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products. **LWT - Food Science and Technology**, v.56, p. 222-231, 2014.
- BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. 141f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- BONASSA, G. et al. Análise da influência do pH e da temperatura no processo de fermentação de caldo de cana. In: ENCONTRO PARANAENSE DE ENGENHARIA E CIÊNCIA, 3., 2013, Toledo. **Anais [...]**. Toledo: UNIOESTE, 2013. p. 181-185.
- BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise**

enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BUFFO, M. M. **Influência da morfologia e do cisalhamento na produção de enzimas elulolíticas por *Aspergillus niger*.** 2020. 167f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

BUSHUK, W. Wheat: chemistry and uses. **Cereal Foods World**, v. 31, n. 3, p. 218-226, 1986.

CANTERO, D. A.; MARTÍNEZ, C.; BERMEJO, M.D.; COCERO, M.J. Simultaneous and Selective Recovery of Cellulose and Hemicellulose Fractions from Wheat Bran by Supercritical Water Hydrolysis. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 610–618, 2015.

CARDER, J. H. Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. **Analytical Biochemistry**, v. 153, n. 1, p. 75–79, 1986.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CODIMA, C. A. **Mapeamento metabólico de *Trichoderma harzianum* P49P11 em fermentação submersa visando aumento de produção de glicosil hidrolases.** 2019. 94f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

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

CRIPWELL, R.; FAVARO, L.; ROSE, S. H.; BASAGLIA, M.; CAGNIN, L.; CASELLA, S.; ZYL, W. Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. **Applied Energy**, v. 160, p. 610–617, 2015.

CUNHA, L. P. **Produção de esporos do fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 utilizando biorreator de leito empacotado.** 2020. 112f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2020.

DARWESH, O. M.; EL-MARAGHY, S. H.; ABDEL-RAHMAN, H. M.; ZAGHLOUL, R. A. Improvement of paper wastes conversion to bioethanol using novel cellulose degrading fungal isolate. **Fuel**, v. 262, p. 116518, 2020.

DIETRICH, F.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Plant cell walls: The skeleton of the plant world. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 5, p. 357–381, 2010.

DOS SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr, A. C. R.; ASSIS, F.G.V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 04, n. 02, p. 181–188, 2018.

EMBRAPA. **Descrição dos métodos usados para avaliar a qualidade de trigo**. 2009. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do112_5.htm>. Acesso em: 10 jul. 2020.

EMBRAPA. **Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana**. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana?p_auth=cvTiyg1p>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FARINAS, C.S., VITCOSQUE, G.L., FONSECA, R.F., NETO, V.B., COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186–1192, 2011

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

FLORENCIO, C. **Micro-organismos Produtores de Celulases : Seleção de Isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, 2011 .

FLORENCIO, C.; BANDIO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, 2020.

GALINDO, H. M. **Produção e caracterização de exoglucanases e endoglucanases de *Mucorales* utilizando fermentação sólida**. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,

2016.

GAMA, M.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. **Engenharia Enzimática**. Edição: Lidel, abril de 2003 · ISBN: 9789727572724.

GERMANI, R.; BENASSI, V. T.; CARVALHO, J. L. V.; TORREZAN, B.; CAMPOS, J. E.; MAZZARI, M. R. **Curso para laboratoristas da indústria moageira do trigo**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1993.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GONÇALVES, C.; JASSO, R. M. R.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, p. 2046-2048, 2010.

HARGREAVES, P. I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta Amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

HERMET, A. et al., 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. **Fungal Biology**, 116(6): 692–705. doi: 10.1016/j.funbio.2012.04.002.

HUEBRA, L. DA S. **Avaliação da utilização da casca de café para a produção de um derivado celulósico**. 2016. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2016.

INFORSATO, J. F.; PORTO, A. L. M. Atividade enzimática de celulases pelo método DNS de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 6, p. 444–465, 2016.

JAYASEKARA, S.; RATNAYAKE, R. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. Cellulose. **IntechOpen**. n. April, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84531.

JOVANOVIĆ, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, v. 16, p. 687-697, 2009.

LAMMERS, T. C. G. L. **Efeito do processamento químico e térmico do farelo de trigo na lubrificação de polissacarídeos benéficos para a saúde humana.** 2018. 101f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência d Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

LI, Y.; ZHANG, X.; XIONG, L.; MEHMOOD, M. A.; ZHAO, Z.; BAI, F. On-site cellulase production and efficient saccharification of corn stover employing cbh2 overexpressing *Trichoderma reesei* with novel induction system. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 643-649, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.084>.

MATSUO, N. Y.; STEFFEN, R. D. A. **Efeito do processo fermentativo na cinética e qualidade de hidromel.** 2018. 35f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

MENEZES, B. D. S. **Produção de xilooligossacarídeos a partir de resíduos lignocelulósicos e fungos filamentosos.** 2018. 121f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MESQUITA, T. J. B. **Controle de biorreator com base em modelo de fluxos metabólicos: sintonia das condições de microaeração para a maximização da produção de etanol por *S. cerevisiae*.** 2017. 137f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

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

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista de Processos Químicos**, v.3, n.5, p. 9–23, 2009.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. DE F.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. **Embrapa Algodão**, v. 236, n. 1, p. 54, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298p. il. color.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, C. S.; DUSSAP, C-G; GNANSOUNOU, E. **Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes.** 1st ed. Oxford: Elsevier, 2011.

PEREIRA, C. B. **Avliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do Cerrado, Costa Marinha Brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato.** 2016. 116f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PINHEIRO, T. L. . F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como micro-organismo.** 2006. 120f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HOLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1 : Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 211–221, 2014.

RABELO, S.C.; ANDRADE, R.R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349-357, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª edição. Editora Guanabara Hoogan, Rio de Janeiro, 2001.

RODRIGUES, J. H.; BONFIM, C.C.O.; SCHEFFER, M.; NASCIMENTO, M.M.F.; BITTENCOURT, J. V. M.; SILVA, M. Isolation and Characterization of Filamentous Fungi Capable of Producing Cellulases from Native Soil in Brazil. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 10, p. 78-85, 2020. DOI: 10.36632/mejas/2020.10.1.11.

ROJAS, M. J. **Produção de Etanol e Hidrolisado Protéico da Casca de Soja.** 2012. 95f. Dissertação (Mestrado) Programa Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

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

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

RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, A.T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n.2, p. 164–177, 2009.

SANTOS, F. R. S. **Celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófila isoladas do cerrado sul-mato-grossense**. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado) - Programa Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SANTOS, D. D. E. A. **Produção de celulases por fungos de ambiente marinho e terrestre para uso na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *Serratia marcescens* a partir de glicose e glicerol**. 2017. 190f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos Ed., 2002. 121 p.

SCHEFFER, M. **Isolamento de fungos produtores de enzimas lignocelulósicas em depósito de resíduos de madeira de *Pinus* sp.** 2018. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2018.

SCHEUER, P.M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M.Z.; et al. Trigo: Características E Utilização Na Panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Brasil, v. 13, n. 2, p. 211–222, 2011.

SILVA, A. S. V. S. **Identificação e potencial degradativo de fungos lignocelulolíticos associados às podridões branca e parda**. 2018. 85f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SILVA, D.F.; HERGESEL, L.M.; CAMPIONI, T.S.; CARVALHO, A.F.A.; OLIVA-NETO, P. Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases. **Process Biochemistry**. v. 67, p. 29-37, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.008>.

SILVA, F. L. DA. **Produção de enzimas lignocelulolíticas e de bioetanol a partir de resíduos da palha de carnaúba (*Copernicia prunifera*) pré-tratados**. 2017. 157f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

SINGHANIA, R. R.; SAINI, J. K.; SAINI, R.; ADSUL, M.; MATHUR, A.; GUPTA, R.; TULI, D. K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 490–495, 2014.

SPERANDIO, G. B. **Estudos dos perfis enzimáticos de *Trichoderma reesei* RutC30 e 9414 em co-culturas com fungos do gênero *Aspergillus* e *Phanerochaete***. 2018. 83f.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

STEVENSON, L.; PHILLIPS, F.; O'SULLIVAN, K., WALTON, J. Wheat bran : its composition and benefits to health , a European perspective. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 1001–1013, 2012.

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

TOMÁS-PEJÓ, E.; FERMOSO, J.; HERRADOR, E.; HERNANDO, H., JIMÉNEZ, S.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ, C.; SERRANO, D. P. Valorization of steam-exploded wheat straw through a biorefinery approach: Bioethanol and bio-oil co-production. **Fuel**, v. 199, p. 403–412, 2017.

XUE, D.; YAOA, D.; SUKUMARANB, R. K.; YOU, X.; WEIA, Z.; GONGA, C. Tandem integration of aerobic fungal cellulase production, lignocellulose substrate saccharification and anaerobic ethanol fermentation by a modified gas lift bioreactor. **Bioresource Technology**. v.302, 122902, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122902

ZHANG, F.; BUNTERNGSOOK, B.; LI, J. Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production. **Advances in Bioenergy**, v. 4, p. 79-119, 2019.