



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANE CRISTINA MENDES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* PARA
POTENCIAL PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS
EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR**

MARIANE CRISTINA MENDES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* PARA
POTENCIAL PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS
EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mendes, Mariane Cristina.

Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. para a Potencial Produção de Enzimas Celulolíticas em Bagaço de Cana de Açúcar / Mariane Cristina Mendes. - Londrina, 2019.
102 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Rezende.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Resíduos agroindustriais - Tese. 2. Enzimas Celulolíticas - Tese. 3. *Trichoderma* spp. - Tese. I. Rezende, Profa. Dra. Maria Inês. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

MARIANE CRISTINA MENDES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* PARA POTENCIAL
PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS EM BAGAÇO DE CANA
DE AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 28 de março de 2019.

Dedico este trabalho a minha mãe, Cleonice, e ao meu irmão, Everson, por nunca medirem esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e por sempre me apoiarem em momentos e decisões difíceis.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa e apoio a pesquisa.

A UEL por possibilitar a realização de um sonho com tanta excelência.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês Rezende pela receptividade que teve em me acolher no seu laboratório para ensinar o caminho da pesquisa. Em todos os momentos de convívio lhe sobraram paciência e dedicação.

A todos os Professores do Departamento de Bioquímica por me ensinarem o quão grandioso o estudo pode ser para a sociedade e um bem que não pode ser retirado de quem uma vez o teve.

A Profa. Dra. Mara Lúcia Ribeiro por toda paciência, dedicação e carinho durante a pesquisa. Seu jeito sereno de dar aula é um exemplo a seguir.

A Profa. Dra. Daniele Sartori sempre disposta e atenciosa quando houveram dúvidas. Sua ajuda foi de extrema importância nessa pesquisa. Obrigada por todas as contribuições.

A Profa. Dra. Fabiana Guillen pelos esclarecimentos prestados durante o desenvolvimento de alguns experimentos e valiosas sugestões.

A Profa. Dra. Cristiane Vizioli que forneceu tempo disponível e muita ajuda durante os experimentos. A convivência te tornou uma grande amiga a mim.

Ao técnico de laboratório Nelson Rodriguez que com sua experiência ajudou em diversas etapas dessa pesquisa.

A minhas amigas, Beatriz, Eloisi e Victória por tornarem as dificuldades mais leves. As histórias que compartilhamos valem mais que mil publicações.

A meus pais, Cleonice e Sebastião, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me ajudarem a torna-los realidade.

A memória da minha irmã Cristiane que sempre esteve presente no meu coração pelas lições que deixou.

Ao meu irmão Everson pelo apoio em momentos difíceis, pois apesar da distância você sempre se fez presente.

Aos meus sobrinhos João Eduardo e Pedro Miguel por serem o melhor presente que eu já ganhei na vida

“Continue a nadar, continue a nadar...”

Dory, Procurando o Nemo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Geração de resíduos agroindustriais ao longo dos anos no Brasil..... 18
- Figura 2** - Estrutura química e arranjo dos principais polímeros constituintes da parede vegetal 19
- Figura 3** - Organização da estrutura química da celulose. As linhas tracejadas são as ligações de hidrogênio intra cadeia e as linhas com pontos são as ligações de hidrogênio inter cadeia20
- Figura 4** - Esquema da xilana formada por unidades de xilose com ramificações de ácido glururônico, L-arabinofuranose e grupo acetil.....21
- Figura 5** - Atuação das celulasas na camada superficial de celulose. Resíduos de glicose em vermelho representam a região cristalina da celulose e os resíduos em preto representam a região amorfa. CBHI e CBHII são exocelulasas.....22
- Figura 6** - Atuação das enzimas xilanolíticas na cadeia principal da hemicelulose, a xilana. (A): Clivagem das xilanases nas ligações do tipo β -1,4 na xilana. (B): Hidrólise de xilo-oligossacarídeos pela β -xilosidase.....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Utilização da fermentação em estado sólido sob diversos substratos para a obtenção de produtos de interesse industrial32
- Tabela 2** – Enzimas produzidas por diferentes espécies de *Trichoderma* sob fermentação em estado sólido36
- Tabela 3** – Relação dos solos de plantio do isolamento de diferentes cultivares nas cidades de Londrina-PR e Bandeirantes-PR.....37

MENDES, Mariane Cristina. **Seleção de cepas *Trichoderma spp.* para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em bagaço de cana.** 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar, gerando cerca de 147 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano. Esse resíduo é importante para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que apresentam diversas aplicações industriais; como na produção de biocombustíveis. O presente estudo avaliou a produção de xilanases, celulasas e β -glicosidases por 12 linhagens de *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR e cultivados em bagaço de cana de açúcar (BC), além de verificar a influência do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima. A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada com BC proveniente de garapeiro local (BCG) e de usina sucroalcooleira (BCU). Os cultivos desenvolvidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 3,5 g de BC umedecido com 25 mL de solução de Vogel. O inóculo das linhagens consistiu de 1 mL de solução de tween 80 a 0,1 % (v/v) contendo 10^8 esporos mL^{-1} , incubados a 28 ± 2 °C por sete dias. Ao material sólido fermentado (MSF) foram adicionados 10 mL de água destilada, para a obtenção do extrato bruto enzimático (EBE), após homogeneização e centrifugação a 9.000 rpm/15 min. No EBE foram determinados: atividade enzimática (xilanases, celulasas e β -glicosidases); açúcares totais, redutores e proteínas totais solúveis residuais; pH (inicial e final) e peso seco para o MSF. A celulase teve sua atividade verificada em relação ao pH e temperatura ótimos. A linhagem *Th9* foi melhor produtor de celulasas em BCU, no 5° dia, a 28 °C sob fermentação em estado sólido, entre os fungos avaliados, atingindo 33 U/g de atividade enzimática. O EBE mostrou celulasas com atividade ótima em pH 5,0 a 50 °C. Os resultados mostraram que os fungos produziram preferencialmente celulasas em BCU, sugerindo a sua potencial aplicação para o aproveitamento deste resíduo tão abundante no Brasil.

Palavras-chave: Bagaço de cana. *Trichoderma*. Celulasas.

MENDES, Mariane Cristina. **Selection of isolates of *Trichoderma spp.* for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes in sugarcane bagasse.** 2019. 95pp. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sugarcane, generating about 147 million tons of sugarcane bagasse per year. This is a process for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes which is a variety of industrial applications; as in the production of biofuels. The present study evaluated the production of xylanases, cellulases and β -glycosidases by 13 *Trichoderma* species isolated in the region of Londrina-PR and grown in sugarcane bagasse (SB) and partially characterized the enzyme obtained. Solid state fermentation (SSF) was performed based on local production: local comercial sugarcane (SBC) and industry sugarcane bagasse (SBI). The 125 mL Erlenmeyer cultiveives containing 3.5 g of SB with 25 mL solution of Vogel solution. *Trichoderma* inoculum consisted of 1 mL of 0.1% (v / v) tween 80 solution containing 108 spores mL⁻¹, incubated at 28 \pm 2 ° C for seven days. Fermented solid material (FSM) was 25 mL of distilled water after enzymatic homogenization (EB), after homogenization and centrifugation at 9,000 rpm / 15 min. In the EB were determined: enzymatic activity (xylanases, cellulases and β -glycosidases); total sugars, reducers and proteins, residual solids; pH (initial and final) and dry weight for Fsm. EB was also precipitated with ammonium sulphate up to 20% saturation (P0-20) and the cellulase enzyme was partially characterized relative to optimum pH and temperature and its thermal stability. *Th9* was the best producer of cellulases in SBU for 5 days at 28 ° C under solid state fermentation among the evaluated fungi. The P0-20 fraction and EB showed cellulases with better performance at pH 5.0 at 50 ° C with low thermal stability, losing activity with 20 minutes in incubation at 50 ° C. The results show that the fungi preferentially produced cellulases in SBU, suggesting their potential application to the use of this residue so abundant in Brazil.

Keywords: Sugarcane bagasse. Filamentous fungi. Cellulases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Materiais Lignocelulósicos no Brasil: Potencial Biotecnológico	16
3.2	Composição Química dos Resíduos Agroindustriais	18
3.2.1	Celulose.....	19
3.2.2	Hemicelulose	20
3.3	Enzimas de Degradação do Material Lignocelulósico	21
3.3.1	Celulases	21
3.3.2	Endoglucanases	23
3.3.3	β -Glicosidase	23
3.3.4	Xilanases	23
3.3.5	Aplicação das Enzimas Microbianas	25
3.4	Utilização da Fermentação em Estado Sólido (FES) para o Aproveitamento dos Resíduos Agroindustriais.....	26
3.4.1	Parâmetros Físico-Químicos que Afetam a Fermentação em Estado Sólido.....	28
3.4.1.1	Umidade	28
3.4.1.2	Temperatura	28
3.4.1.3	pH.....	29
3.4.1.4	Substrato	29
3.4.2	Vantagens da Fermentação em Estado Sólido	30
3.4.3	Aplicação dos Processos de Fermentação em Estado Sólido.....	31
3.5	Gênero <i>Trichoderma</i> : Origem, Características Morfológicas e Potenciais Aplicações.....	33
3.5.1	Enzimas Extracelulares produzidas pelo gênero <i>Trichoderma</i>	34

4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Microrganismos: origem e manutenção.....	37
4.2	Bagaço de Cana de Açúcar: Procedência.....	38
4.3	Fermentação em Estado Sólido (FES).....	38
4.3.1	Preparo do Inóculo.....	38
4.3.2	Condição de Cultivo.....	38
4.3.3	Interrupção do Cultivo.....	38
4.4	Determinação da atividade enzimática.....	39
4.4.1	Atividade da Celulase.....	39
4.4.2	Atividade da β -Glicosidase.....	39
4.4.3	Atividade da Xilanase.....	39
4.5	Outras determinações analíticas.....	40
4.5.1	Determinação de Proteínas Totais.....	40
4.5.2	Determinação de Açúcares Totais.....	40
4.5.3	Determinação de Açúcares Redutores.....	40
4.6.1	Extração de DNA Genômico de Fungos Filamentosos.....	41
4.6.2	Amplificação das Regiões ITS do DNA Ribossomal.....	42
4.6.3	Sequenciamento.....	42
4.7	Determinação do tempo de cultivo, da Temperatura e do pH Ótimos sobre a Atividade da Celulase.....	43
4.7.2	Determinação do pH e da Temperatura Ótimos para a Atividade Enzimática.....	43
4.8	Análise Estatística.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Artigo Científico 1.....	44
5.2	Artigo Científico 2.....	44
6	CONCLUSÃO	82
7	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar para a geração de açúcar e etanol; decorrente a esse fato vem a geração de toneladas de bagaço de cana de açúcar, material que é fonte de energia renovável. Parte desse material é utilizado dentro das indústrias gerando energia, porém, ainda restam quantidades expressivas de bagaço de cana de açúcar que podem ser utilizados em processos fermentativos afim de agregar valor a esse agro-resíduo.

A fermentação em estado sólido (FES) tem como principais características a utilização de resíduos agroindustriais no seu processo e a ausência de água livre. É importante levar em consideração alguns parâmetros físico-químicos nesse processo; o tamanho das partículas do substrato, para garantir aeração adequada. Entra as principais vantagens da sua utilização, está a e recuperação de um produto bastante concentrado. Esse tipo de fermentação é amplamente usado na produção de enzimas com interesse industrial afim de reduzir os custos.

A FES reproduz o habitat de crescimento de diversos microrganismos, onde os fungos filamentosos são os mais relatados nesse processo devido a sua capacidade de tolerar alta pressão osmótica e por não serem patogênicos, porém, somente os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são empregados na indústria.

O gênero *Trichoderma* é saprófita e endofítico sendo encontrado, principalmente, em solos temperados e tropicais. O *Trichoderma reesei* é considerado modelo na produção industrial de celulasas, porém, existem diversos relatos de outras espécies capazes de produzir celulasas tão ou mais ativas quanto essa espécie. Destacando-se a importância de estudos na busca por novas espécies de *Trichoderma*.

As celulasas, β -glicosidases e xilanases são enzimas extracelulares produzidas por fungos filamentosos a fim de sacarificar materiais vegetais propiciando seu desenvolvimento. As celulasas são responsáveis por iniciar a hidrólise do polímero de celulose, atuando em ligações do tipo β -1,4 e liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos, e as β -glicosidases, em sinergia, clivam esses resíduos a glicose. As xilanases tem um modo de atuação bastante semelhante com as enzimas

celulolíticas, porém, são as enzimas xilanolíticas que sacarificam as hemicelulose da parede vegetal.

As enzimas são utilizadas na indústria para a produção de ração animal, clarificação de polpa e sucos, clarificação de papel, acabamento de tecidos, produção de biocombustíveis, entre outras. E as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são as mais empregadas nas aplicações citadas. Assim, avaliar microrganismos produtores das mesmas, estudá-las e melhorar suas atuações nos processos industriais visando alto rendimento de produtos é importante para uma aplicação biotecnológica. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi selecionar microrganismos produtores de celulasas, β -glicosidases e xilanases produzir e caracterizar parcialmente as enzimas celulolíticas produzidas por *Trichoderma* spp. cultivados em bagaço de cana sob fermentação em estado sólido para potencial aplicação industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar entre 12 isolados de *Trichoderma* a maior produtora de celulases em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido e caracterizar parcialmente as celulases produzidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de produção das celulases por 12 isolados de *Trichoderma* em bagaço de cana sob fermentação em estado sólido;
- Identificar os isolados de *Trichoderma* a nível de espécie utilizando a primer ITS como;
- Selecionar entre os isolados aquele capaz de produzir as celulases com maior atividade nas condições avaliadas;
- Determinar o tempo de cultivo ideal para a produção de enzimas celulolíticas, a temperatura e o pH ótimos de atuação da celulase, além da sua estabilidade térmica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS NO BRASIL: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A economia brasileira é baseada, em grande parte, na produção agrícola (GRAMINHA et al., 2008). Em 2010 o agronegócio representou 25 % dos produtos em circulação no mundo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019). A expansão do agronegócio gera uma quantidade expressiva de resíduos que poderiam ser reutilizados ao em vez de desperdiçados (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2000; FERNANDO et al., 2006).

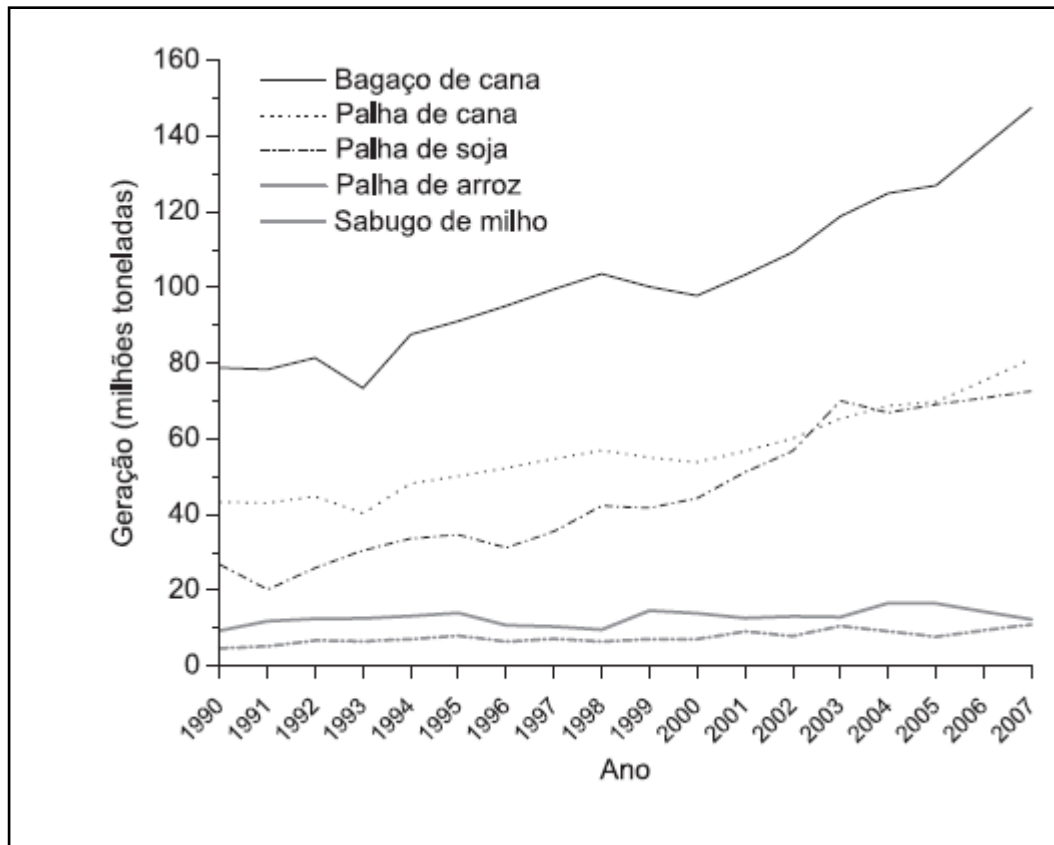
Nos últimos tempos vários bioprocessos estão utilizando os resíduos agroindustriais como substrato em processos fermentativos para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como proteínas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários (SÁNCHEZ, 2009). As principais vantagens de se utilizar esse material como substrato são diminuir o impacto ambiental decorrente do seu acúmulo na natureza e reduzir os custos na produção industrial (DASHTBAN et al., 2009, ALVIRA et al., 2010).

Resíduos como bagaço de mandioca, palha de arroz, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de aveia, farelo de soja, palha de milho, polpa de café e frutas, casca de frutas, espigas de milho, resíduo de cervejaria e resíduos de amido podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos, para serem fontes de matéria orgânica, pois são formados, entre outros compostos, por carboidratos (TAMANINI; HARLEY, 2004; DHANASEKARAN et al., 2011; GARG et al., 2011; FARINAS, 2015). Estes materiais podem ser sacarificados, obtendo-se açúcares fermentescíveis. Além do etanol, outros produtos podem ser obtidos a partir de materiais lignocelulósicos (SAHA, 2003; MAALEJ et al., 2009; KNOB, 2009).

Existem diversas tecnologias que favorecem a produção industrial de enzimas, porém, ainda é um processo com valor elevado. A utilização de substrato específicos, como carboximetilcelulose (CMC) e *p*-nitrofenol-glicosídeo (*p*-NPG), induzem a produção de celulasas e β -glicosidases, respectivamente (COELHO et al., 2001; TAMANINI; HARLEY, 2004). Porém, esses substratos são utilizados em pequena escala, pois para a produção industrial se tornam economicamente inviáveis, assim, os materiais vegetais são uma alternativa de baixo custo (MURUGAN et al., 2011; NUNES et al., 2013; MATOS, 2014).

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar. Para a produção de açúcar e etanol 722 milhões de toneladas de cana de açúcar foram colhidas em 2010, e em 2013 esse valor atingiu 768 milhões de toneladas (IBGE, 2012). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana de açúcar estimada entre os anos de 2018 e 2019 ficou em 635,51 milhões de toneladas representando um aumento de 0,4 % em relação a safra de 2017/18 (NOVA CANA, 2019). Atualmente o país é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo (MAPA, 2019).

Decorrente da produção de cana de açúcar vem a geração de milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar, cerca de 30 % do total produzido é convertido em bagaço de cana de açúcar, quantidades superiores a 200 milhões de toneladas por ano (NOVA CANA, 2017). Parte do bagaço de cana é utilizado na própria indústria para a co-geração de energia, porém, ainda restam quantidades expressivas desse resíduo agroindustrial que podem ser utilizados em processos fermentativos para a geração de novos produtos de alto valor agregado. O Brasil é considerado o país de maior produção desse resíduo agroindustrial (SILVA, GOMES, ALSINA, 2007). A Figura 1 mostra que até 2007 a produção do bagaço de cana de açúcar só vinha aumentando, com produção aproximada a 140 milhões de toneladas, dados da safra 2015/16 mostram que 166,40 milhões de toneladas desse material foi produzido no país, metade dessa produção foi no estado de São Paulo, e assim como a produção da cana de açúcar é crescente o seu resíduo, bagaço de cana de açúcar, acompanha (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2017).

Figura 1 - Geração de resíduos agroindustriais ao longo dos anos no Brasil

Fonte: Castro e Pereira (2010).

A indústria sucroalcooleira está em desenvolvimento, recebendo investimento e aumentando sua produção acarretando na geração do bagaço de cana. Assim, estudos que visem destinar esse resíduo recebem atenção, pois sua utilização reduz os custos dos processos industriais (SILVA et al., 2007; DHANASEKARAN et al., 2011).

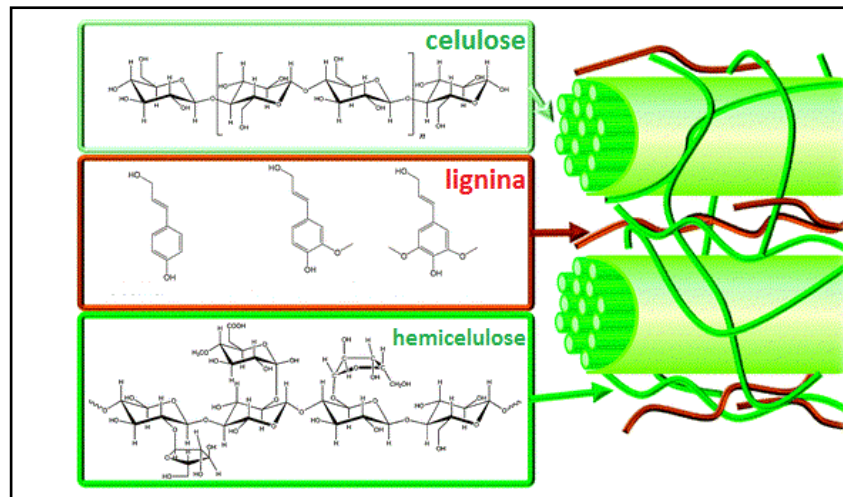
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Em média, os resíduos agroindustriais são formados por celulose (50 %), hemicelulose (25 %) e lignina (25 %). Esses conferem força e flexibilidade a parede celular vegetal através do modo como se dispõe (Figura 2) (CHIACCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006). A porcentagem desses constituintes varia dependendo da espécie vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O bagaço de cana-de-açúcar é composto por 39,7 a 49 % de carbono, 40 a 46 % de oxigênio, 5,5 a 7,4 % de hidrogênio e cerca de 0,3 % de nitrogênio e cinzas

(SILVA et al., 2007). Ou seja, esse material é fonte de carbono e nutrientes e, portanto, também pode ser utilizado em processos fermentativos. Esse resíduo também tem sido utilizado em aplicações como forragem e ração animal (COSTA; BOCCHI, 2012).

Figura 2 - Estrutura química e arranjo dos principais polímeros constituintes da parede vegetal

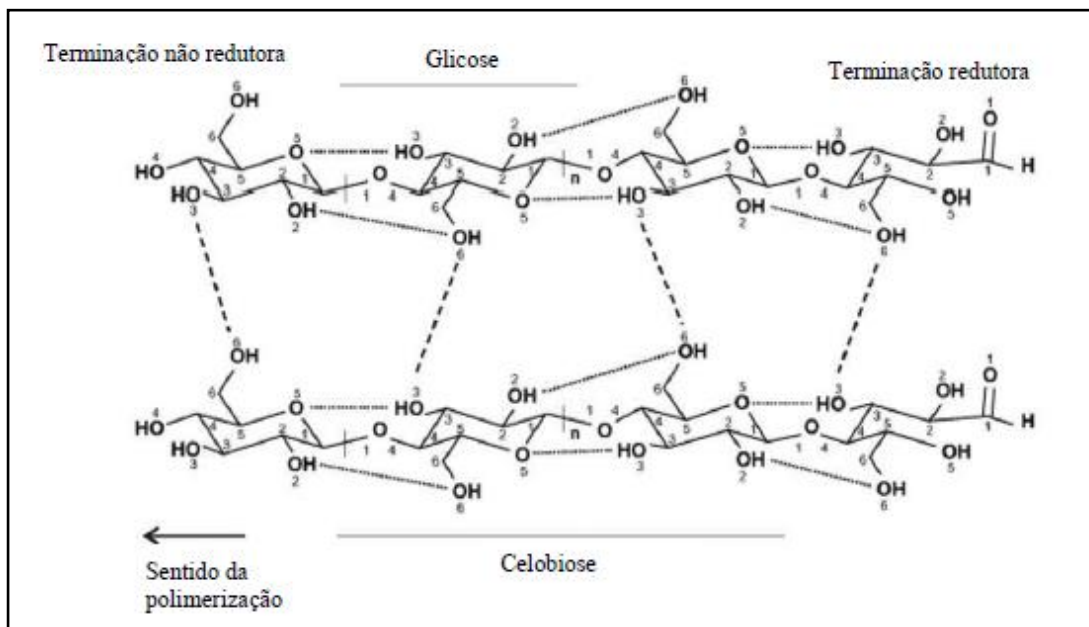


Fonte: Alonso, Wettstein e Dumesic (2012).

3.2.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo formado por unidades de D-glicopiranosose, unidos por ligações glicosídicas β -1,4. Cada resíduo de glicose tem ângulo de 180° em relação ao próximo resíduo, essa subunidade repetitiva do polímero é chamada de celobiose. O carbono anomérico livre na extremidade da cadeia de celulose forma a extremidade redutora, a ausência do carbono anomérico forma a extremidade não redutora (SANDGREN et al., 2005). A interligação, por ligações de hidrogênio inter e intra moleculares entre os grupos hidroxilas, de cadeias de celulose formam as microfibrilas. As interações bem organizadas são chamadas de estrutura cristalina, conferindo resistência ao tecido vegetal, e as regiões que apresentam alguma desordem constitui a estrutura amorfa, sendo estruturas menos rígidas e conseqüentemente mais suscetível a hidrólise enzimática (Figura 3) (LAUREANO-PEREZ et al., 2005; LENGOWSKI et al., 2013).

Figura 3 - Organização da estrutura química da celulose. As linhas tracejadas são as ligações de hidrogênio intra cadeia e as linhas com pontos são as ligações de hidrogênio inter cadeia



Fonte: Festuccibuselli, Otoni e Joshi (2007).

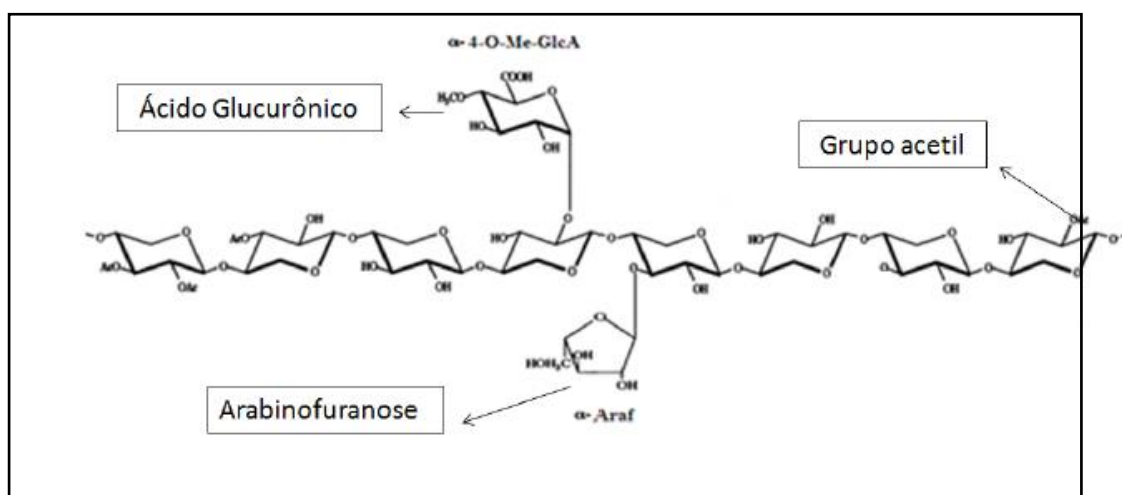
3.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses estão intercaladas com as microfibrilas de celulose, conferindo razoável flexibilidade à parede celular vegetal (LIEPMAN et al., 2010). Seus açúcares são ligados por meio de ligações glicosídicas β -1,4, constituindo a cadeia principal, de onde partem ramificações laterais (BUCKERIDGE, 2010). Geralmente, 2 a 6 açúcares de diferentes resíduos de carboidratos formam esse heteropolissacarídeo, como: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-raminose, ácido D-galacturônico e ácido D-glicurônico (JANES, 1969). De acordo com os principais açúcares presentes as hemicelulose são classificadas em glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (THOMPSON 1983; BASTAWDE et al., 1992).

A xilana é a principal estrutura formadora da hemicelulose, apresentando uma estrutura linear que consiste de resíduos de xilose, podendo, ainda, apresentar resíduos substituintes como L-arabinofuranosil, acetil, glucuronosil e 4-O-metilglucuronosil (Figura 4) (KULKARNI et al., 1999; KNOB et al., 2014). Também estão presentes na xilana os ácidos ferúlico e p-cumárico ligados aos resíduos de L-

arabinofuranose (KULKARNI et al., 1999). A proteção da célula vegetal contra a degradação microbiana se deve à resistência conferida por essa estrutura. Por esse motivo, os micro-organismos apresentam diferentes enzimas com funções específicas para a degradação desse polissacarídeo (KHENG e IBRAHIM, 2005).

Figura 4. Esquema da xilana formada por unidades de xilose com ramificações de ácido glucurônico, L-arabinofuranose e grupo acetil



Fonte: Collins et al. (2005).

3.3 ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

3.3.1 Celulases

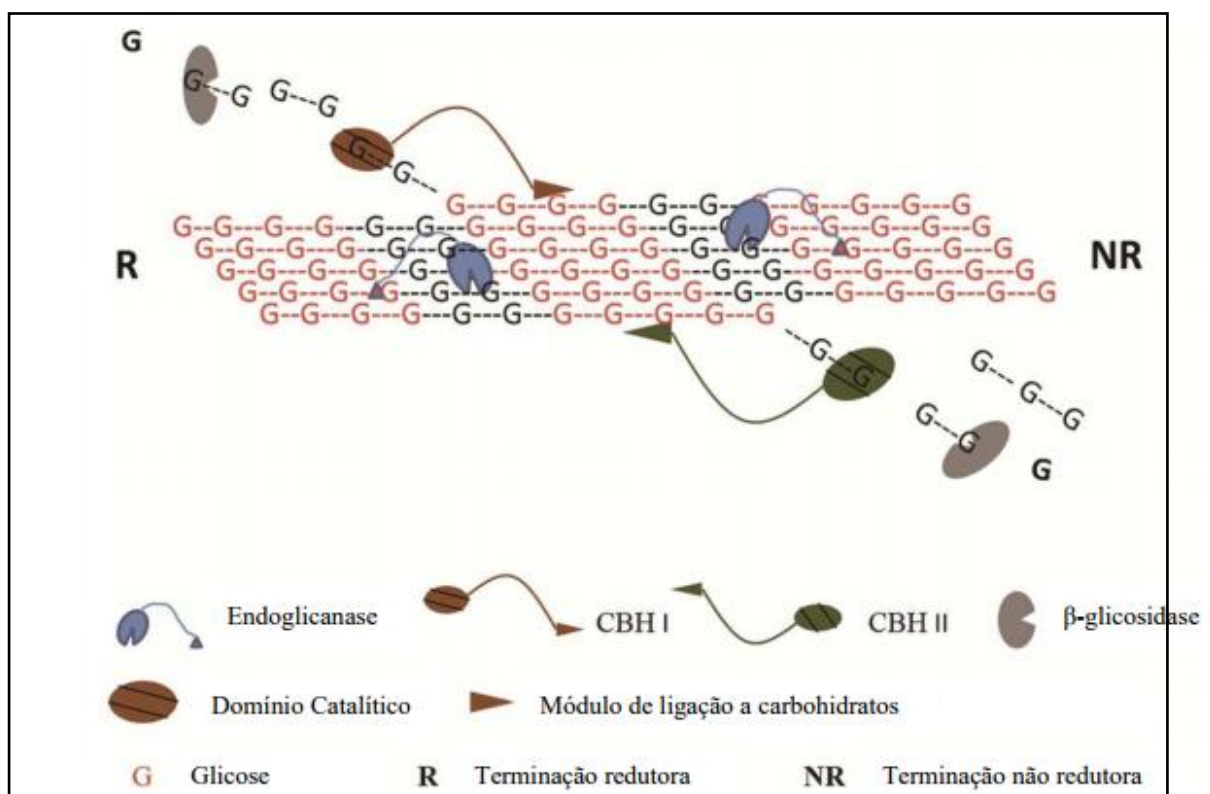
As celulases são um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam sobre a celulose e liberam resíduos de glicose. São classificadas em três grupos de acordo com o local que clivam no substrato. As englucanases (EC 3.2.1.4) iniciam a hidrólise da celulose, clivando ligações internas da fibra do tipo β-1,4, sua atividade pode ser mensurada dosando a quantidade de açúcares redutores. As exoglucanases (EC 3.2.1.9.1) ou celobiosehidrolases (CBH) quebram ligações externas da fibra de celulose e apresentam classificações diferentes conforme a extremidade que hidrolisam, as CBH do tipo I atuam em terminais redutores e as CBH do tipo II hidrolisam terminais não redutores, além disso, existem também as glucano hidrolases capazes de liberar glicose direto da celulose (CASTRO; PEREIRA, 2010).

As β -glicosidasas (EC 3.2.1.21) hidrolisam ligações β -glicosídicas de di e oligossacarídeos, liberados pelas endoglucanases, em glicose. Essas enzimas atuam sinergicamente como mostra o esquema da Figura 5 (BATHIA et al., 2002).

A ação sinérgica dessas enzimas pode ocorrer entre endoglucanase-exoglucanase, onde as endoglucanases liberam oligossacarídeos com terminais redutores e não redutores e as CBHI e CBHII atuam sobre eles, respectivamente. Também acontece sobre endoglucanase- β -glicosidase e exoglucanase- β -glicosidase, as endo e exoglucanases liberam oligossacarídeos de diversos tamanhos que são substratos para a β -glicosidase (NUNES, et al., 2013).

As celulases produzidas por fungos filamentosos têm sua atuação ótima em pH ácido, em torno de 3,6-5,0 e temperatura em torno de 50 °C, porém, esses valores podem variar dependendo do substrato utilizado e do microrganismo (FERREIRA et al., 2011).

Figura 5 - Atuação das celulases na camada superficial de celulose. Resíduos de glicose em vermelho representam a região cristalina da celulose e os resíduos em preto representam a região amorfa. CBHI e CBHII são exocelulases



Fonte: Kumar e Murthy (2013).

3.3.2 Endoglucanases

As endoglucanases são responsáveis pelo início da hidrólise e pela rápida solubilização do polímero de celulose, pois hidrolisam as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, formando, assim, novos terminais redutores e não redutores (LYND et al., 2002, CASTRO; PEREIRA, 2010). As regiões da cadeia que não apresentam ligações de hidrogênio intermoleculares fortes, ou seja, as regiões amorfas, são mais facilmente atacadas, o que expõe as ligações glicosídicas internas da cadeia de celulose (ELISAHVILI, 1993).

3.3.3 β -Glicosidase

A β -glicosidase hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA, 2010). Assim, a β -glicosidase atua de forma sinérgica com a celulase, endoglucanase e exoglucanase na degradação de diferentes tamanhos de oligossacarídeos. A β -glicosidase é responsável pela degradação final da celulose, liberando glicose (MATEO; JIMÉNEZ, 2000; GRIMALDI, et al., 2005).

3.3.4 Xilanases

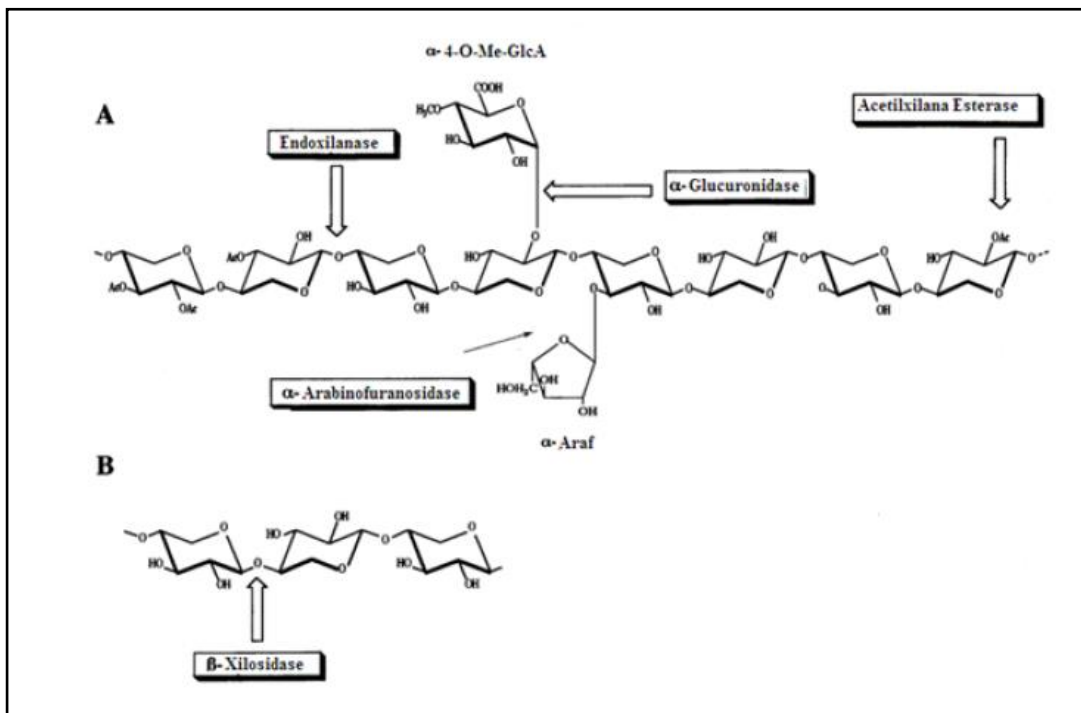
A completa e eficiente hidrólise do complexo polímero de xilana depende principalmente de duas classes de enzimas, as endo β -1,4 xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam as ligações β -1,4 dentro da cadeia de xilana, produzindo xilo-oligossacarídeos e as β xilosidases (EC 3.2.1.37), que hidrolisam a xilobiose e outros xilo-oligossacarídeos em xilose, sendo essas os maiores grupos de enzimas hidrolíticas (BASTAWDE, 1992).

As endoxilanases são consideradas específicas quando hidrolisam somente as ligações β -1,4 na cadeia principal da xilana, e chamadas de não específicas quando hidrolisam ligações glicosídicas cruzadas do tipo β -1,4 de outros polímeros adjacentes, por exemplo, a parte cristalina da celulose. As endoxilanases não ramificadoras atuam sobre a cadeia central da xilana, enquanto que as ramificadoras quebram as ramificações de arabinofuranose (COUGHLAN, 1992).

Outras enzimas como a β -glucuronosidase (EC 3.2.1.139), β -arabidosidase (EC 3.2.1.55) e acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72) atuam em ligações de grupos específicos. A β -glucuronosidase hidrolisa as ligações glicosídicas do tipo α -1,2 entre a xilose e o ácido glucurônico. A β -arabidosidase hidrolisa grupos terminais não redutores. E as esterases quebram ligações de xilose com o ácido acético e as ligações entre resíduos (SAHA, 2003; SHAO et al., 2011; KNOB et al., 2014). Assim, o objetivo final é a atuação cooperativa dessas enzimas em converter a xilana a unidades de xilose (Figura 6) (LAXMI et al., 2008).

Grande parte das xilanases fúngicas atuam em pH ótimo em torno de 4,5-6,0 e a temperatura ótima varia entre 50 e 70 °C (MEDEIROS; HANADA; FERREIRA FILHO, 2003).

Figura 6 – Atuação das enzimas xilanolíticas na cadeia principal da hemicelulose, a xilana. (A): Clivagem das xilanases nas ligações do tipo β -1,4 na xilana. (B): Hidrólise de xilo-oligossacarídeos pela β -xilosidase



Fonte: Collins et al. (2005).

3.3.5 Aplicação das Enzimas Microbianas

De todas as enzimas produzidas comercialmente, 75 % compreendem o grupo das hidrolases, sendo as mais importantes as celulases, hemicelulases, amilases e proteases (BHAT et al., 2000).

As celulases são importantes para a indústria têxtil uma vez que, são capazes de degradar as fibras de superfície do tecido, deixando os mais lisos e macios, proporcionando, com isso, melhor acabamento. O processo de envelhecimento do jeans que era feito com pedra-pomes, devido a capacidade de remoção parcial do corante índigo pelas celulases, essas enzimas passaram a ser empregadas nesse método, oferecendo vantagens como evitar o desgaste do equipamento e do tecido, além de aumentar a qualidade do produto diminuindo a necessidade de abrasão (LOPES, 2011).

As celulases também são úteis na produção de sucos, graças a capacidade de degradar a rede de celulose, essas enzimas ajudam a liberar o líquido das células vegetais, facilitando a extração de sucos e a maceração de frutas para a produção de néctares (MARTINS et al., 2008).

A indústria de ração animal também se beneficia com as celulases, pois elas aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal. Na indústria de polpa e papel auxiliam no branqueamento e alisamento do papel. Atualmente, o foco de estudos para essas enzimas está na produção de etanol, utilizando microrganismos que sejam capazes de crescer em resíduos agroindustriais (LIMA et al., 2005; MATEO; JIMÉNEZ, 2000; GRIMALDI, et al., 2005; CASTRO; PEREIRA, 2010).

Os processos de vinificação se beneficiam com as β -glicosidases, pois elas auxiliam na extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva. Essas enzimas também são capazes de melhorar o aroma e o sabor do vinho através da degradação de compostos fenólicos que atribuem sabor desagradável a bebida (MARTINS et al., 2008).

Os estudos de Lima, (2003) também relatam a importância das β -glicosidases na retirada da molécula de glicose das isoflavonas, aumentando a biodisponibilidade de isoflavonas agliconadas, que são relatadas importante na prevenção da osteoporose. Em conjunto com celulases, pectinases e xilanases as β -glicosidases

são aproveitadas na indústria de alimentos, na produção de bebidas, na indústria de rações (BAUERMEISTER et al., 2010).

A utilização das xilanases no branqueamento de polpas de celulose diminuem a utilização de produtos organoclorados altamente recalcitrantes no ambiente, pois essas enzimas substituem o emprego do cloro e dióxido de cloro que são químicos tóxicos usados na indústria de papel (AHMED; IMDAD; JAMIL, 2012).

Graças a capacidade de conversão do material lignocelulósico, as xilanases são utilizadas na clarificação de sucos e para melhorar a consistência de cervejas (SRIVASTAVA et al., 2014). E após a hidrólise enzimática da xilana a produção de xilo-oligossacarídeos pode ser empregada na produção de prebióticos que evitam a infecção gastrointestinal e a constipação, além de aumentar a absorção de nutrientes (PAI et al., 2013).

As xilanases também são utilizadas para a produção de ração animal. Elas podem aumentar a energia metabolizável e diminuir a viscosidade das rações, favorecendo o ganho de peso de animais (LI et al., 2012).

De modo geral, as enzimas citadas são importantes e empregadas nos setores da indústria têxtil, alimentícia e de rações para animais (BHAT et al., 2000). Outras aplicações também são relatadas como: fermentação de cerveja; extração de café; detergentes; produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos; conservantes de alimentos e agentes antimicrobianos (KAMAL et al., 2004; KATAPODIS et al., 2006; SCHUTER; SCHMOLL, 2010).

3.4 UTILIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) PARA O APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRAIS

Os processos fermentativos são descritos desde 2.600 A.C. quando os egípcios processavam pães de modo parecido com a produção atual. Este é um exemplo de fermentação em estado sólido que vem trazendo benefícios a humanidade, sendo que foi descrita há séculos na fabricação de queijos (países ocidentais) e Koji (países do leste), e atualmente ainda é muito aplicada nas indústrias de alimentos para a fermentação de iogurtes e queijos, farmacêutica na produção de antibióticos, na indústria têxtil para o acabamento de tecidos, na indústria bioquímica

e biotecnológica na produção de enzimas para produção de etanol de segunda geração (AIDOO, 1988; PANDEY, 2003; SOCCOL, VANDERBERGHE, 2003).

Diariamente as indústrias descartam toneladas de diversos resíduos de origem agrícola, porém, esses são fonte de energia renovável e podem ser utilizados como fonte de carbono na fermentação em estado sólido (FES).

A fermentação em estado sólido é a utilização de um material sólido e orgânico, o substrato, que será umidificado e servirá como suporte para o aumento do número de células. A água presente deve assegurar o crescimento e metabolismo das células microbianas sem exceder a capacidade de ligação com a matriz sólida, ou seja, ausência de água livre (DEL BIANCHI, CAPALBO, MORAES, 2001; SUBRAMANIYAM e VIMALA, 2012). A ligação da água com a fase sólida depende da capacidade de absorção do substrato que está sujeito ao tipo de material utilizado (PANDEY, 2003; SOCCOL, et al., 2017).

A fase sólida da FES é fonte de carbono e nitrogênio servindo como nutrientes para o crescimento de microrganismos na ausência de água livre. O tamanho das partículas do substrato é importante para que haja aeração, onde o oxigênio deverá ser capaz de alcançar os espaços entre o meio. Com isso, é um processo trifásico, constituído de sólidos, líquidos e gases (PINTO et al., 2005; PANDEY; THOMAS; LARROCHE, 2013).

Segundo Farinas, (2015) um dos fatores mais importante a ser considerado durante a FES é a escolha do microrganismo e do substrato. Pois o microrganismo deve ser capaz de se aderir e penetrar no substrato com baixa atividade de água e o substrato precisa conter características que ajudem o desenvolvimento do mesmo (WITTMANN; LIAO, 2016).

A FES é capaz de reproduzir o modo de crescimento dos microrganismos na natureza. Esse fator é importante para os altos rendimentos que esse tipo de fermentação demonstra (NIGAM; PANDEY, 2009). Os fungos filamentosos conseguem crescer em condições baixas de umidade e tolerar alta pressão osmótica, se destacando nesse tipo de fermentação, ao contrário das bactérias (FARINAS, 2015).

Entretanto, existem exceções e outros microrganismos, além dos fungos filamentosos, são capazes de crescer em um meio com baixa atividade de água entre

eles estão as espécies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus sp* que apresentam relatos de produção enzimática na FES. Microrganismos resistentes como actinomicetes e *Streptomyces sp.* também podem ser empregados na FES (OROZCO et al., 2008; SINGHANIA et al., 2009).

3.4.1 Parâmetros Físico-Químicos que Afetam a Fermentação em Estado Sólido

3.4.1.1 Umidade

A umidade é um dos fatores mais relevantes na FES, pois a capacidade de absorção do substrato, as necessidades do microrganismo e o tipo do produto final determinam o grau de umidade (PANDEY, 2003; PINTO et al., 2005).

O substrato umedecido deve formar uma película de água e facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio, e ainda, entre as partículas de água é preciso existir canais que difundam gás e dissipem calor. Com isso, alta umidade interfere na troca de gases impedindo a penetração do oxigênio, pois diminui a porosidade do meio aumentando consideravelmente a temperatura, enquanto baixa umidade dificulta o desenvolvimento do microrganismo afetando o produto final, que provavelmente estará em baixas quantidades. Assim, é preciso estudar a quantidade ideal de umidade na capacidade de absorção do substrato utilizado (LIMA et al., 2001; PINTO et al., 2005).

3.4.1.2 Temperatura

O controle da temperatura durante o cultivo da FES é importante para que se consiga obter o máximo do produto que o microrganismo empregado irá produzir, levando em consideração que a melhor temperatura de atuação é variável entre as espécies, dependendo do local que foram isoladas. Microrganismos isolados em regiões frias se desenvolvem melhor que baixas temperaturas, diferentes de microrganismos isolados perto de vulcões, que se adaptaram a sobreviver sob calor intenso (KNOB et al., 2009).

Além disso, o crescimento microbiano é um processo exotérmico e o calor gerado pode ficar retido nas partículas da FES prejudicar a produção final, sabendo

que a temperatura afeta propriedades físicas da membrana celular e também da síntese de enzimas extracelulares. Com isso, faz-se necessário, em alguns casos, a injeção de ar comprimido para o resfriamento do processo (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL, 2001; HASAN, 2002).

3.4.1.3 pH

O pH pode interferir na atividade enzimática dos microrganismos, porém, devido a heterogeneidade e consistência da FES torna-se bastante difícil controlar o pH. Uma alternativa é a utilização de um meio com alto poder tamponante no substrato. Nesse tipo de fermentação é possível informar o pH inicial e final do cultivo (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL, 2001; HASAN, 2002).

3.4.1.4 Substrato

Os substratos utilizados na FES devem ser simples e de baixos custos, geralmente, se empregam farelos e cascas que são dispensados pelas indústrias. Esses materiais podem precisar de algum suplemento, como minerais ou necessitar somente a adição de água.

Em alguns casos os resíduos agroindústrias precisam passar por pré-tratamentos para diminuir a cristalização, porosidade e permeabilidade facilitando a exposição de seus constituintes ao ataque enzimático. Os pré-tratamentos podem ser mecânicos como a moagem ou químicos, utilizando ácidos e/ou bases. A utilização de solvente acarreta num aumento da poluição, tornando um método menos eficiente no que se diz respeito a reutilização de material renovável (SANTOS et al., 2018).

Após escolher o substrato, o tamanho da partícula precisa facilitar o acesso do microrganismo aos nutrientes, partículas pequenas aumentam a área de contato para o crescimento microbiano, porém se aglomeram dificultando a transferência de gases, já partículas grandes favorecem a aeração mas podem limitar o crescimento, sendo importante escolher um tamanho adequado a respiração e crescimento do microrganismo (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL, 2001; HASAN, 2002).

Em relação a concentração de substrato é importante colocar uma quantidade de inóculo adequada, sem que haja produção excessiva de biomassa (SANDHYA et al., 2005).

Em nível industrial, muitas vezes, os processos de autoclavagem e agitação não são necessários tornando a FES mais barata pela baixa exigência de energia, e ainda favorecendo, devido à natureza concentrada dos subprodutos reatores com design simples podem ser utilizados (MIENDA; IDI; UMAR, 2011).

3.4.2 Vantagens da Fermentação em Estado Sólido

A FES apresenta vantagens de baixo risco a contaminação devido à ausência de água livre no sistema; produz pouca quantidade de resíduos; em alguns casos, como na suplementação da alimentação de animais, todo o produto é utilizado; é bastante produtiva pois o produto final é bem concentrado em comparação aos outros métodos de fermentação (CASTRO; PEREIRA, 2010). Devido à alta concentração do produto final necessita de menores quantidades de reação de fermentação, ocupando um espaço menor nos fermentadores. Esse processo também contribui para o aproveitamento de resíduos agroindustriais pois são materiais orgânicos que contém nutrientes para o crescimento de diversos microrganismos, assim diminui os impactos ambientais que o acúmulo desse material causa na natureza, além disso, esses resíduos requerem um pré-tratamento simples, dispensando o uso de solventes tóxicos no meio ambiente, onde ocorre apenas uma umidificação do substrato e/ou a trituração do mesmo para diminuir o tamanho das partículas e facilitar o acesso das fibras ao ataque das enzimas produzidas pelos microrganismos (JÚNIOR, 2014).

Comparando a FES com a fermentação submersa, essa última apresenta vantagens como o crescimento em meio líquido que é de fácil controle do pH, oxigênio dissolvido, temperatura, aeração e concentração de moléculas solúveis durante a fermentação e após o término a recuperação do produto final é mais rápida e fácil (FARINAS, 2015). Entretanto, a FES reproduz o habitat natural da maior parte dos microrganismos (principalmente os fungos) aumentando as chances de adaptação as condições laboratoriais; exige menos energia para esterilizar devido à ausência de água livre, sendo também menos suscetível a contaminação, permite maior produtividade enzimática pois sofre menor inibição por substrato e,

consequentemente, rende maior concentração do produto final; e pela utilização de resíduos agroindustriais como substrato é um método ambientalmente favorável e junto a esse fato ocorre a redução dos custos no processo (SINGHANIA, et al., 2009; MARTINS et al., 2011). Segundo Sukumaran et al., (2010) *T. reesei* produz celulasas com maiores rendimentos em FES em comparação a fermentação submersa, além da diminuição em 10 x no custo da produção.

Apesar das vantagens citadas a maior parte das enzimas comerciais são produzidas sob fermentação submersa pois o controle dos fatores físico-químicos (pH, temperatura e agitação) e a recuperação do produto final é mais fácil, porém, estudos que visem melhorar esses parâmetros na FES favorecem a utilização desse processo que é bastante econômico e atrativo para a produção de enzimas extracelulares com aplicação industrial pela alta produtividade e concentração do produto final, menor geração de efluentes e baixa repressão enzimática (SUKUMARAN et al., 2010).

3.4.3 Aplicação dos Processos de Fermentação em Estado Sólido

Segundo Mitchell et al., 2002 a FES pode ser empregada para a compostagem de resíduos valorizando o produto lignocelulósico; e na aplicação para produções enzimáticas, ácidos orgânicos, etanol e alimentos fermentados, visando lucrar com esse material lignocelulósico.

A Tabela 1 mostra diversas utilizações da fermentação em estado sólido para a obtenção de produtos.

Tabela 1 - Utilização da fermentação em estado sólido sob diversos substratos para a obtenção de produtos de interesse industrial

Microrganismo	Substrato	Composto	Referência
<i>Metarhizium anisoplia</i>	Farelo de trigo	Biopesticida	Breukelen et al. 2011
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Brassica carinata</i>	Alimento proteico	Simon et al., 2017
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Palha de arroz e farinha de soja	Surfactina	Zhu et al., 2013
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de cajá	Endoglucanase	Ferreira et al., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de cacau	Ligninases	Santos et al., 2011
<i>Xanthomonas campestris</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Goma de xantana	Zilioli et al., 2004
<i>Celulosimicrobium</i>	Bagaço de maçã	Xilanases	Walia et al., 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bagaço de maçã	Etanol	Hang; Lee; Woodams, 1982

Fonte: próprio autor.

Além disso, a fermentação em estado sólido é há muito tempo utilizada para a obtenção de queijos dos tipos: Roquefort, por *Penicillium roqueforti* e Camembert, por *Penicillium camembert* e *penicillium caseicolun* (RAIMBAULT; ALAZARD, 1980) e também para o cultivo de cogumelos comestíveis como o *Agaricus bisporus*, conhecido como champignon Paris e o *Lentinus edodes*, chamado de Shii-take, a produção dos mesmos pode ser feita em diversos grãos, como centeio, cevada, arroz, trigo e milho (DELMAS, 1989; SOCCOL, 1992).

Bactérias, leveduras e fungos são utilizadas em diferentes processos de FES, como na compostagem de alimentos. As bactérias são as mais empregadas em processos de compostagem, ensilagem e produção de alimentos, como os iogurtes. As leveduras são relatadas na produção de etanol, ração e alimentos. E os fungos filamentosos são os mais adaptados na FES, devido a sua fisiologia (MIENDA; IDI; UMAR, 2011).

Soccol et al., (2017), avaliaram que as principais aplicações da fermentação em estado sólido nos últimos cinco anos estão na produção de enzimas, alimentos

fermentados e biomoléculas importantes, entre elas os ácidos orgânicos, pigmentos, compostos fenólicos, aromas e biossolventes.

Nas últimas décadas vários estudos têm focado a utilização FES em biorreatores devido à grande quantidade de produto final, a menor repressão do catabolismo e ao baixo custo desse processo (PANDEY; LARROCHE; SOCCOL, 2017).

De acordo com Pessoa et al., (2016), a FES na produção em larga escala apresenta desafios na manutenção da transferência de calor; Suryanarayan et al, (2001) sugerem como solução para esse problema a aeração em biorreatores, porém, ainda são encontrados problemas como ressecamento do substrato, pois a aeração além de remover o calor evapora a água. Soccol et al., (2017) descreveram os tipos de biorreatores utilizados em laboratório e indústrias, que, dentre outros, podem ser estáticos ou agitados, quando o microrganismo necessita de transferência de oxigênio. O design do biorreator deve considerar o meio de crescimento, a morfologia do fungo e a aeração, portanto, a composição e porosidade do meio e a necessidade de aeração vão aumentar a complexidade do biorreator.

3.5 GÊNERO *TRICHODERMA*: ORIGEM, CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES

O gênero *Trichoderma* pertence ao reino Fungi e é composto por ascomicetos que na forma sexual são chamados de *Hypocrea*, a primeira descrição desse gênero foi em 1794. Até 2006 foram relatadas mais 100 espécies filogeneticamente diferentes desse gênero (SCHUTER, A.; SCHMOLL, M, 2010).

Esses microrganismos ocupam diversos habitats, considerados saprófitos no solo e endofíticos em plantas (XIA et al., 2011). Podem ser isolados de solos temperados e tropicais. Para a decomposição do substrato secretam complexos enzimáticos que degradam celulose, hemicelulose, lignina e quitina, além de produzir mais de 100 metabólitos diferentes com propriedades antibióticas que os ajudam na sua colonização do meio ambiente, fornecem proteção contra competidores e auxiliam o desenvolvimento sexual. São utilizados como controladores de patógenos em plantas e auxiliam no aumento do crescimento das mesmas. O gênero também é bastante estudado quanto a produção de enzimas de interesse biotecnológico e

comercializados como biofertilizantes e inoculantes do solo (HOWELL, 2002; HARMAN, et al., 2004; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

A espécie *Trichoderma viride* QM6a foi descoberta nos EUA durante a segunda Guerra Mundial, em 1976, e pela sua eficiência na produção de celulases, motivou estudos mais aprofundados a respeito da aplicação industrial dessas enzimas. Em 1977 essa espécie foi renomeada para *Trichoderma reesei* homenageando Elwyn Reese, pesquisador responsável pelo isolamento e identificação dessa espécie que é considerada, desde então, a mais importante do gênero para fins industriais (SCHUTER, A.; SCHMOLL, M, 2010).

Trichoderma é caracterizado por apresentar crescimento rápido, conídios esverdeados e ramos de conidióforos (SCHUTER, A.; SCHMOLL, M, 2010). A busca por novas espécies capazes de produzir metabólitos para a aplicação na indústria possibilitou a identificação de diversas espécies de *Trichoderma*. São microrganismos abundantes em diferentes ambientes, sendo microrganismos de fácil isolamento e manutenção, além de não serem patogênicos ao homem, tem bastante relatos na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas pela indústria (WONG; SANDDLER, 1992; KAR et al., 2006).

3.5.1 Enzimas Extracelulares produzidas pelo gênero *Trichoderma*

Diferentes microrganismos secretam enzimas extracelulares que são objetos de estudo para a degradação do material lignocelulósico. Pode-se citar entre eles, os gêneros: *Agaricus*, *Aspergillus*, *Clostridium*, *Cellulomas*, *Bacillus*, *Ganoderma*, *Pseudomonas*, *Thermonospora*, *Trichoderma* e *Ruminococcus*. Porém, somente os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são empregados para produção industrial de celulases e hemicelulases, devido a capacidade de crescerem em diversos substratos, produzirem enzimas em grandes quantidades e serem bastante tolerantes a variação de temperatura e pH (KARBOUNE; GERAERT; KERMASH, 2008; MARX et al., 2013; RAGHUWANSHI et al., 2014; SILVA, TERRASAN, CARMONA, 2015; CAVALCANTE et al., 2018).

A Tabela 2 mostra diversas enzimas produzidas pelo gênero *Trichoderma* em diferentes condições de cultivo sob fermentação em estado sólido. As enzimas que são utilizadas em processos industriais, na sua maioria, foram produzidas por

microrganismos, pois esses são de fácil cultivo em laboratório, tornando possível controlar as condições de cultivo e as enzimas são obtidas mais facilmente em relação com as de origem animal e vegetal (SIMÕES, 2006).

Esse fungo também é amplamente empregado na produção de β -1,3-glucanase, pectinase, celulasas e proteases, que são enzimas importante na degradação do material vegetal (SCHUTER; SCHMOLL, 2010).

Para que se consiga obter enzimas para aplicação industrial é necessário a otimização do processo, afim de conseguir as melhores condições para a atuação desta, minimizando desperdícios (SIMÕES, 2006; DHANASEKARAN et al., 2011).

Portanto, avaliar diferentes espécies de *Trichoderma* e as melhores condições de cultivo como, pH, temperatura de incubação, concentração de substrato, umidade e indutores do cultivo auxiliam a resultados mais satisfatórios na produção de celulasas e hemicelulasas (MARRA et al., 2015).

Tabela 2 – Enzimas produzidas por diferentes espécies de *Trichoderma* sob fermentação em estado sólido

Espécies de <i>Trichoderma</i>	Enzima	Resíduo Agroindustrial	pH	Temperatura	Tempo de cultivo (dias)	Atividade Enzimática (U/g)	Referência
<i>Trichoderma harzianum</i>	Endoglucanase; Celulase	Farelo de trigo	6,0	34 °C	4	14,80 3,96	PATHAK; BHARDWAJ; SINGH, 2014
<i>Trichoderma reesei</i> MCG77	Celulase	Farelo de arroz	6,0	25 °C	8	0,33 1,87	LATIFIAN; HAMIDI- ESFAHANI; BARZEGAR, 2007
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414							
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Celulase; β -1,3-glucanase; Xilanase	Farelo de trigo	5,0	30 °C	3	3,85 6,95 5,50	SIVANESAN et al., 2017
<i>Trichoderma reesei</i> Rut C30	Celulase	Farelo de trigo	-	30 °C	8	25,93	FLORENCIO; COURI; FARINAS, 2012.
<i>Trichoderma reesei</i> NCIM 992	Celulase	Farelo de trigo	5,0	30 °C	6	26,30	MAURYA et al., 2012
<i>Trichoderma viride</i> IR05	Xilanase	Bagaço de cana de açúcar	4,5	30 °C	7	72,40	IRFAN; NADEEM; SYED, 2014
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulase	Casca de ervilha	5,0	30 °C	6	28,60	VERMA; BANSAL; KUMAR, 2011
<i>Trichoderma koeningi</i>	Xilanase	Espiga de milho e casca de abacaxi	7,0	37 °C	4	2,87	BANDIKARI; POONDLA; OBULAM, 2014
<i>Trichoderma asperellum</i> RCK2011	Celulase β -glicosidase	Palha de trigo	5,5	30 °C	4	13,2 9,20	RAGHUWANSHI et al., 2014
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Celulase	Farelo de trigo	4,8	30 °C	7	959,53	IDRIS et al., 2017

Fonte: próprio autor

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS: ORIGEM E MANUTENÇÃO

Para este estudo foram utilizados 12 isolados do gênero *Trichoderma* isoladas de diferentes fontes. O *Trichoderma harzianum* Rifai (*ThR*) foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, a partir de peroba (*Aspidosperma sp*) em decomposição. Esta cepa foi classificada no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Recife-PE, e previamente selecionada como xilanolítica quando cultivado em bagaço de cana por Barbosa et al. (1992).

As outras 10 cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Hiroki Sumida do Departamento de Agronomia – Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) Londrina-PR, sendo que 2 delas já foram identificadas morfológicamente como *Trichoderma asperellum* e as outras 9 ainda sem identificação da espécie, todos os espécimes foram coletados das cidades de Londrina-PR e Bandeirantes-PR. (Tabela 1).

Tabela 3 – Relação dos solos de plantio do isolamento de diferentes cultivares nas cidades de Londrina-PR e Bandeirantes-PR

Nome	Identificação	Origem	Local
<i>ThR</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	peroba	Londrina
<i>Tha1</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	milho	Londrina
<i>Tha2</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	milho	Londrina
<i>Th3</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	milho	Londrina
<i>Th4</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	couve	Londrina
<i>Th5</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	milho	Londrina
<i>Th6</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	milho	Londrina
<i>Th7</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	tomate	Londrina
<i>Th8</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	milho	Londrina
<i>Th9</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	cana	Bandeirantes
<i>Th10</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	cana	Bandeirantes
<i>Th11</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	cana	Bandeirantes

As cepas foram mantidas em ágar inclinado 2 % (m/v), contendo sais de Vogel e xilose 1 % como fonte de carbono. Repiques sucessivos foram feitos a cada 3 meses.

4.2 BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR: PROCEDÊNCIA

O bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) foi obtido de duas fontes. Um lote foi cedido pela Usina Clealco, Penápolis-SP e utilizado como obtido e outro de garapeiro local, Londrina-PR, que foi lavado exaustivamente em água corrente, triturado em pulverizador, e então seco em estufa a 70 °C.

4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Todos os cultivos foram feitos em triplicata experimental.

4.3.1 Preparo do Inóculo

Foram feitos repiques em ágar inclinado 2% (m/v), contendo sais de Vogel e xilose 1 % com 7 dias. No preparo do inóculo foram utilizados 1.10^8 mL⁻¹ UFC suspensos em solução de Tween 80 0,1% em água destilada.

4.3.2 Condição de Cultivo

Foi inoculado 1 mL das suspensões descritas no item 4.3.1 em Erlenmeyers de 125 mL contendo 3,5 g de pulverizado de bagaço de cana e umedecidos com 25 mL de meio mínimo de Vogel. Os cultivos foram mantidos a 28 ± 2 °C por 7 dias.

4.3.3 Interrupção do Cultivo

Para a interrupção foram adicionados aos cultivos 25 mL de água destilada e para a condição 2 acrescentou-se 240 mL de água destilada; centrifugados por 15 minutos a 9.000 g. O material obtido é denominado extrato livre de células (ELC) ou extrato bruto enzimático (EB), o qual foi determinado o pH final dos cultivos, armazenado a -4 °C e a partir deste foram realizadas as determinações analíticas.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Todas as determinações foram feitas em duplicatas experimentais.

4.4.1 Atividade da Celulase

O sistema de incubação consistiu em 0,5 mL de carboximetilcelulose (CMC) 1 % dissolvido em tampão citrato 50 mM pH 5,0 e 0,5 mL de extrato enzimático (PERIYASAMY et al., 2017). O sistema foi mantido a 50 °C por 10 minutos e interrompido pela adição de 500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores liberados foram determinados segundo a técnica descrita por Miller, 1958. Uma unidade de atividade celulásica é definida como a quantidade de enzima que libera µ moles de glicose liberados por minuto por mL do extrato enzimático.

4.4.2 Atividade da β-Glicosidase

A atividade de β-Glicosidase foi dosadaa utilizando 1 mL de para-nitrofenol glicosídeo (p-NPG) 1 Mm dissolvido em tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5,0 e 0,25 mL de extrato bruto enzimático. O sistema foi mantido a 30 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1,25 mL de carbonato de sódio 0,5 M. A atividade de β-glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (p-NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade de β-glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µM de p-NP por minuto, nas condições experimentais.

4.4.3 Atividade da Xilanase

O sistema de incubação consistiu em 100 µL de uma solução de xilana de “Larchwood” 1 %; 50 µL de tampão acetato 50 mM pH 5,0; 325 µL de água destilada e 25 µL de extrato enzimático (BAILEY; BIELY; POUNTANEN, 1992). O ensaio foi mantido à 50 °C por 20 minutos e interrompido pela adição de 0,5 mL do reativo de Somogyi. Os açúcares redutores liberados foram então determinados através da técnica descrita por Somogyi (1945) e Nelson (1944). Uma unidade de atividade

xilanásica é definida como a quantidade de enzima que libera μ moles de xilose liberados por minuto por mL do extrato enzimático.

4.5 OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.5.1 Determinação de Proteínas Totais

A concentração total de proteínas se baseou no método de Lowry, que envolve duas reações químicas. A primeira é chamada de reação de Biureto, a segunda envolve a redução do reagente de Folin-Ciocalteu que causa uma mudança na cor da reação, deixando-a azul. O sistema de reação consistiu da mistura de 0,5 mL de amostra e 2,5 mL de mistura reativa, ficando em repouso por 10 minutos, após, ocorreu a adição de 0,25 mL de Follin-Ciocalteu diluído 3 vezes e mais um repouso de 10 minutos. As leituras no espectrofotômetro ocorreram na faixa de A660 nm.

4.5.2 Determinação de Açúcares Totais

A determinação dos açúcares totais foi feita através do método do fenol sulfúrico, onde o ácido sulfúrico concentrado desidrata pentoses e hexoses convertendo-os em furfural e hidroximetilfurfural respectivamente, os quais reagem com o fenol formando um complexo colorido de coloração alaranjada. O sistema de reação compreende 1 ml de amostra mais 1 ml de fenol, ao qual se adiciona, rapidamente, 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Como a reação é exotérmica, faz-se necessário resfriar a temperatura ambiente antes de fazer a leitura de absorvância (480 nm).

4.5.3 Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram medidos pelo método de Somogy-Nelson. O sistema de análise compreende 1 ml de amostra mais 1 ml do reativo de Somogy, a reação foi fervida por 10 minutos, resfriada e após adicionado 1 ml do reativo de Nelson completando um volume de 12,5 a leitura da absorvância foi feita a 540 nm.

4.6 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *TRICHODERMA*

4.6.1 Extração de DNA Genômico de Fungos Filamentosos

Inicialmente os isolados foram cultivados em meio de cultivo MEA - Malt Extract Agar (Extrato de malte 20 g/L; peptona 1 g/L; glicose 20 g/L e ágar 20 g/L) por 7 dias a 28 °C.

Foi preparada uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios, coletados a partir do cultivo inicial, em 2 mL de Tween 80 %. A suspensão foi vertida em frascos Erlenmeyer 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido de extrato de malte (Extrato de malte 20 g/L; peptona 1 g/L; glicose 20 g/L), incubado a 28 °C, sob agitação constante de 180 rpm por 16 horas. Posteriormente, o micélio formado foi coletado por filtração para extração de DNA.

A extração de DNA genômico foi realizada como descrito por Azevedo et al. (2000). O micélio coletado foi macerado em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 60 mg do macerado foi transferido para microtubos (2 mL) e imediatamente adicionado 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; NaCl 5 M; SDS 10% e água ultrapura). Os componentes foram homogeneizados por inversão dos microtubos e incubados em banho Maria a 65°C durante 20 minutos com homogeneização a cada 5 minutos. Após este período, foi adicionado 800 µL de fenol (Invitrogen®), seguido de homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos.

A fase aquosa (superior) foi transferida para outro microtubo de 2 mL, e em seguida adicionado 800 µL da mistura fenol (Invitrogen®), clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 25:24:1, respectivamente, com posterior homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Novamente a fase aquosa recuperada foi transferida para outro microtubo de 2 mL, e adicionado 800 µL de clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 24:1, respectivamente, com posterior homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. À fase aquosa resultante foi adicionado 1:10 do volume de NaCl 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado seguido de incubação a -20 °C por 60 minutos para a precipitação dos ácidos nucleicos.

Decorrido o período, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* lavado com 300 µL de etanol 70 % seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, repetindo esse processo de purificação por 2 vezes. Após a secagem dos ácidos nucleicos o *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0 e q.s.p. de água destilada) e armazenado a -20 °C.

4.6.2 Amplificação das Regiões ITS do DNA Ribossomal

Para as reações de amplificação foram utilizados os *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTTGCGG3') e ITS2 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990).

As reações foram preparadas com volume final de 25 µL, composto por: 2,5 µL de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2 µL de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 µL de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/µL), 1 µL de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL da amostra de DNA (5 ng/µL) e 17,4 µL de água ultrapura. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura.

As reações foram submetidas a um termociclador MJ Research PTC-100™ Thermal Cycler (MJ Research, Inc), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, 34 ciclos composto por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v). As amostras de DNA foram coradas em solução de brometo de etídeo 10 mg/mL diluídos em tampão super buffer 1x e fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus®).

4.6.3 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados baseados no método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os mesmos pares de *primers* descritos anteriormente para a obtenção dos respectivos fragmentos. As amostras foram sequenciadas em aparelho ABI 3500XL na Universidade Estadual de Londrina do laboratório.

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO, DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS SOBRE A ATIVIDADE DA CELULASE

As variáveis foram analisadas uma de cada vez e em duplicata.

4.7.1 Determinação do Tempo de Cultivo Ideal para a Produção Enzimática

A influência do tempo de cultivo para a produção enzimática foi verificada incubando o *Th9* de acordo com o item 4.3.2 ao total de 10 dias. A cada 24 horas foi realizada a interrupção do cultivo (item 4.3.3) e feita a determinação das atividades enzimáticas.

4.7.2 Determinação do pH e da Temperatura Ótimos para a Atividade Enzimática

Inicialmente foram verificados a influência do pH sob a atividade da celulase. O intervalo de pH foi de 3,0 até 8,0 em intervalo de 1,0 unidades de pH em tampão acetato 50 mL. A temperatura ótima foi definida entre 30 °C até 70 °C com intervalo de 10 °C. A dosagem da atividade de celulase foi feita conforme o item 4.6.1.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando GraphPad Prism Software (versão 5.0). A significância estatística dos dados foi avaliada por teste t-Student para comparar dois parâmetros e para as outras análises foi utilizado one-way-ANOVA com post-hoc teste de Tukey. O nível de 5 % ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

Os dados representam a média \pm desvio padrão da média dos experimentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram redigidos na forma de dois artigos científicos conforme segue.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo submetido a revista Atena Editora, com o doi 10.22533.

ATIVIDADE DE CELULASES, BETA-GLICOSIDASES E XILANASES DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma asperellum* EM BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

O artigo será submetido a revista, Journal of Applied Biology & Biotechnology.

Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. para a Potencial Produção de Enzimas Celulolíticas em Bagaço de Cana de Açúcar

Artigo 1

**ATIVIDADE DE CELULASES, BETA-GLICOSIDASES E XILANASES DE
Trichoderma harzianum E *Trichoderma asperellum* EM BAGAÇO DE CANA DE
AÇÚCAR**

Mariane Cristina Mendes

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

Fabiana Guillen Moreira Gasparin

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

Maria Inês Rezende

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – Paraná

RESUMO: O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar, gerando mais de 600 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano. Esse resíduo pode ser um importante substrato para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que apresentam diversas aplicações industriais, como a produção de biocombustíveis. O presente estudo avaliou a produção de celulases, β -glicosidases e xilanases em espécies de *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR e cultivados em bagaço de cana de açúcar (BC). A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada com BC proveniente de: garapeiro local (BCG) e de usina sucroalcooleira (BCU). Os cultivos desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL contendo 1,4 g de BC umedecido com 10 mL de solução de Vogel. O inóculo de *Trichoderma harzianum* Rifai (*Thh1*) e de *Trichoderma asperellum* (*Tha2* e *Tha3*) consistiu de 400 μ L de solução de tween 80 a 0,1 % (v/v) contendo 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubados a 28 ± 2 °C por sete dias. O *Thh1* foi melhor produtor de celulases 8,38 U/g em BCU e 6,46 U/g em BCG e de xilanases 0,37 U/g entre os fungos avaliados. A espécie *asperellum*, *Ta1* e *Ta2*, também produziu preferencialmente celulases 4,17 U/g à xilanases 0,15 U/g para ambos os substratos. A atividade de β -glicosidases para *Tha2* e *Tha3* foi superior a encontrada para o *Thh1*, 0,21 U/g e 0,13 U/g, respectivamente. Os resultados mostram que os fungos produziram preferencialmente celulases em BCU, sugerindo o potencial de aplicação e aproveitamento deste resíduo tão abundante no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Celulase, xilanase, β -glicosidase, bagaço de cana de açúcar, *Trichoderma*.

ABSTRACT: Brazil is the largest producer of sugar cane, generating about 147 million tons of sugarcane bagasse per year. This residue could be an important for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes that have several industrial applications, as in the production of biofuels. This present study evaluated the

production of cellulases, β -glycosidases and xylanases by *Trichoderma* species isolated in the region of Londrina-PR and grown in sugarcane bagasse (SB). Solid state fermentation (SSF) was performed with SB from local commercial sugarcane (SBC) and industry sugarcane bagasse (SBI). Cultures grown in 50 mL Erlenmeyers containing 1.4 g of BC were moistened with 10 mL of Vogel's solution. The inoculum of *Trichoderma harzianum* Rifai (*Thh1*) and *Trichoderma asperellum* (*Tha2* and *Tha3*) consisted of 400 μ l of 0.1% (v / v) tween 80 solution containing 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubated at 28 ± 2 ° C for seven days. *Thh1* was the best producer of cellulases (with) 8.38 U/g in SBI and 6.46 U/g in SBC and xylanases 0.37 U/g among the evaluated fungi, the species *T. asperellum*, *Tha2* and *Tha3*, also produced cellulases preferentially 4.17 U/g than xylanases 0.15 U/g for both substrates. The activity of β -glycosidases for *Tha2* and *Tha3* was higher when compared with the result found for *Thh1*, 0.21 U/g and 0.13 U/g, respectively. The results show that the fungi preferentially produced cellulases in SBI, suggesting their potential application to the use of this residue so abundant in Brazil.

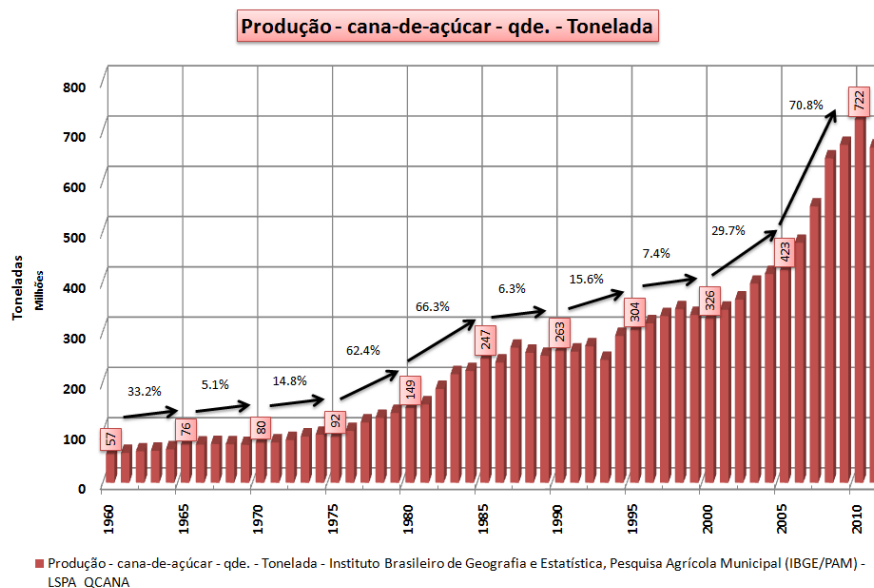
KEYWORDS: Cellulase, xylanase, β -glucosidase, sugarcane bagasse, *Trichoderma*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar para a produção de açúcar e etanol. A produção de açúcar foi mais que triplicada de 1993 até 2001, e atualmente o país é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo (MAPA, 2019). Aproximadamente 722 milhões de toneladas de cana de açúcar foram colhidas em 2010, e em 2013 esse valor atingiu 768 milhões de toneladas, Figura 1, (IBGE, 2012). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana de açúcar estimada entre os anos de 2018 e 2019 ficou em 635,51 milhões de toneladas representando um aumento de 0,4 % em relação à safra de 2017/18 (NOVA CANA, 2019).

Decorrente da produção de cana de açúcar vem a geração de milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar, cerca de 30 % do total produzido é convertido em bagaço de cana de açúcar, quantidades superiores a 200 milhões de toneladas por ano (NOVA CANA, 2017). Parte do bagaço de cana é utilizado na própria indústria para a cogeração de energia, porém, ainda restam quantidades expressivas desse resíduo agroindustrial que podem ser utilizados em processos fermentativos para a geração de novos produtos de alto valor agregado.

Figura 1. Produção de cana de açúcar no Brasil nos últimos 50 anos.



Fonte: IBGE, 2010.

Esse material é fonte de energia renovável sendo composto por 39,7 a 49 % de carbono, 40 a 46 % de oxigênio, 5,5 a 7,4 % de hidrogênio e até 0,3 % de nitrogênio e cinzas, podendo ser utilizado em processos fermentativos como fonte de carbono (SILVA et al., 2007; COSTA; BOCCHI, 2012).

A fermentação em estado sólido (FES) é a utilização de um material sólido e orgânico, o substrato, que será umidificado e servirá como suporte para o aumento do número de células. A água presente deve assegurar o crescimento e metabolismo das células microbianas sem exceder a capacidade de ligação com a matriz sólida, ou seja, ausência de água livre. A ligação da água com a fase sólida depende da capacidade de absorção do substrato que está sujeito ao tipo de material utilizado (SOCCOL, et al., 2017).

A fase sólida da FES é fonte de carbono e nitrogênio servindo como nutrientes para o crescimento de microrganismos na ausência de água livre. O tamanho das partículas do substrato é importante para que haja aeração, onde o oxigênio deverá ser capaz de alcançar os espaços entre o meio. Dessa forma, é um processo trifásico, constituído de sólidos, líquidos e gases (PINTO et al., 2005; PANDEY; THOMAS; LARROCHE, 2013).

A FES é capaz de reproduzir o modo de crescimento dos microrganismos na natureza. Aparentemente, esse fator é muito importante para os altos rendimentos

que esse tipo de fermentação demonstra (NIGAM; PANDEY, 2009). Os fungos conseguem crescer em condições baixas de umidade e tolerar alta pressão osmótica, se destacando nesse tipo de fermentação (FARINAS, 2015).

O gênero *Trichoderma spp.* são bastante relatado por produzir enzimas celulolíticas e xilanolíticas com altas atividades, e muitos estudos tem focado na produção dessas enzimas (SEIBOTH, IVANOVA e SEIBOTH, 2011). Esses microrganismos são de fácil cultivo, com produção de níveis elevados de enzimas e não causam doenças ao homem, assim são empregados em processos industriais (KAR et al., 2006; AZIN, MORAVEJ e ZAREH, 2007).

As celulases, β -glicosidases e xilanases são enzimas que atuam sobre a celulose e hemicelulose, compostos presentes no material vegetal. As celulases são responsáveis pelo início da hidrólise e pela rápida solubilização do polímero de celulose, pois hidrolisam as regiões internas da estrutura da fibra celulósica liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (LYND et al., 2002, CASTRO; PEREIRA, 2010). A β -glicosidase é responsável pela degradação final da celulose, hidrolisando os oligossacarídeos liberados pela celulase em glicose (MATEO; JIMÉNEZ, 2000; GRIMALDI, et al., 2005). A completa e eficiente hidrólise do polímero de xilana depende principalmente de duas classes de enzimas, as endo- β -1,4 xilanases, que hidrolisam as unidades de xilanopirranose da cadeia principal e as β -xilosidases, que hidrolisam a xilobiase e outros xilo-oligossacarídeos resultantes da ação das endoxilanases (SAHA, 2003; SHAO et al., 2011).

De todas as enzimas produzidas comercialmente, 75 % compreendem ao grupo das hidrolases, sendo as mais importantes as celulases, amilases e hemicelulases (BHAT et al., 2000; SRIVASTAVA et al., 2014).

As celulases são importantes para a indústria têxtil uma vez que, são capazes de degradar as fibras de superfície do tecido, deixando os mais lisos e macios, proporcionando, com isso, melhor acabamento. No processo de envelhecimento do jeans utilizava-se pedra-pomes, hoje as celulases fazem a remoção parcial do corante índigo, oferecendo vantagens para o processo, como evitar o desgaste dos equipamentos, do tecido e aumentam a qualidade do produto diminuindo a necessidade de abrasão (LOPES, 2011).

Graças a capacidade de degradar a rede de celulose, as celulasas ajudam a liberar o líquido das células vegetais, facilitando a extração de sucos e a maceração de frutas para a produção de néctares (MARTINS et al., 2008).

A indústria de ração animal também se beneficia pela ação dessas enzimas, pois aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal. Na indústria de polpa e papel auxiliam no branqueamento e alisamento do papel. Porém, ultimamente, o foco de estudos para essas enzimas está na produção de etanol, utilizando microrganismos que sejam capazes de crescer em resíduos agroindustriais (LIMA et al., 2005; CASTRO; PEREIRA, 2010).

Os processos de vinificação se beneficiam com a aplicação das beta-glicosidases, pois auxiliam na extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva. Essas hidrolases também são capazes de melhorar o aroma e o sabor do vinho (MARTINS et al., 2008). Além disso, apresentam ação antioxidante pela liberação de oligossacarídeos e glicoconjugados na hidrólise enzimática de celulose (MATEO; JIMÉNEZ, 2000; GRIMALDI, et al., 2005).

Os estudos de Lima, (2003) também relatam a importância das β -glicosidases na retirada da molécula de glicose das isoflavonas, aumentando a biodisponibilidade de isoflavonas agliconadas, que são relatadas importante na prevenção da osteoporose (BAUERMEISTER et al., 2010).

A utilização das xilanases no branqueamento de polpas de celulose diminuem a utilização de produtos organoclorados altamente recalcitrantes no ambiente, pois essas enzimas substituem o emprego do cloro e dióxido de cloro que são químicos tóxicos usados na indústria de papel (AHMED; IMDAD; JAMIL, 2012).

Graças a capacidade de conversão do material lignocelulósico, as xilanases são utilizadas na clarificação de sucos, para melhorar a consistência de cervejas. E após a hidrólise enzimática da xilana a produção de xilo-oligossacarídeos que podem ser empregados na produção de prebióticos. Esses evitam infecções e a constipação intestinais, além de favorecer a absorção de nutrientes (PAI et al., 2013).

As xilanases também são utilizadas para a produção de ração animal. Elas podem aumentar a energia metabolizável e diminuir a viscosidade das rações, favorecendo o ganho de peso de animais (LI et al., 2012).

De modo geral, as enzimas citadas são importantes e empregadas nos setores da indústria têxtil, alimentícia e de rações para animais (BHAT et al., 2000). Outras aplicações também são relatadas como: fermentação de cerveja; extração de café; detergentes; produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos; conservantes de alimentos e agentes antimicrobianos (KATAPODIS et al., 2006; SCHUTER; SCHMOLL, 2010).

O presente estudo avaliou a potencial produção de celulases, xilanases e β -glicosidases por espécies de *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR e cultivados em bagaço de cana (BC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas três linhagens de *Trichoderma* isoladas de diferentes solos de cultivo. *Trichoderma harzianum* Rifai (*Thh1*) foi isolado de peroba em decomposição na Universidade Estadual de Londrina, e as outras duas de *Trichoderma asperellum* (*Tha1* e *Tha2*) que foram isoladas de cultivo de milho na região de Londrina-PR.

Os microrganismos foram mantidos em ágar inclinado 2 % (m/v), contendo sais de Vogel e xilose 1 % como fonte de carbono. Repiques sucessivos foram feitos a cada 3 meses.

O bagaço de cana de açúcar (BC) foi obtido de duas fontes. Um lote foi cedido pela Usina Clealco, Penápolis-SP (BCU) e utilizado como obtido e outro de garapeiro local, Londrina-PR, (BCG) este foi lavado exaustivamente em água corrente, triturado em pulverizador, e então seco em estufa a 70 °C.

Os cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL contendo 1,4 g de BC umedecido com 10 mL de solução de Vogel. O inóculo consistiu de 400 μ L de solução de tween 80 a 0,1 % (v/v) contendo 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubados a 28 ± 2 °C por 7 dias. Também foram realizados cultivos controle, nas mesmas condições mencionadas, porém, ausentes de microrganismo. Ao material sólido fermentado (MSF) foram adicionados 10 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 9.000 rpm/15 min, o sobrenadante foi o extrato bruto enzimático (EBE), e o MSF foi seco em estufa a 70 °C por 24 horas para determinação do peso seco.

No EBE foram determinados: atividade enzimática (xilanases, celulases e β -glicosidases), açúcares totais, redutores e proteínas totais solúveis residuais e pH (inicial e final).

O sistema de incubação para determinação da atividade celulásica consistiu de 1 % de carboximetilcelulose (CMC) dissolvida em tampão citrato 50 mM pH 5,0 (PERIYASAMY et al., 2017). O sistema foi mantido a 50 °C por 10 minutos e interrompido pela adição do ácido dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores liberados foram determinados segundo a técnica descrita por Miller, 1958. Uma unidade de atividade celulásica é definida como a quantidade de enzima que libera μ moles de glicose por minuto por mL do extrato enzimático.

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando p-nitrofenol glicosídeo (p-NPG) 1 Mm dissolvido em tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5,0. O sistema foi mantido a 30 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de carbonato de sódio 0,5 M. A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade de beta-glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ M p-NP min⁻¹, nas condições experimentais.

O sistema de incubação para a atividade da xilanase consistiu de 1 % de xilana de "Larchwood" e tampão acetato 50 mM pH 5,0 (BAILEY; BIELY; POUNTANEN, 1992). O ensaio foi mantido à 50 °C por 20 minutos e interrompido pela adição do reativo de Somogyi. Os açúcares redutores liberados foram então determinados através da técnica descrita por Somogyi (1945) e Nelson (1944). Uma unidade de atividade xilanásica é definida como a quantidade de enzima que libera μ moles de xilose por minuto por ml do extrato enzimático.

A determinação de proteínas totais foi pelo método de Lowry. As leituras no espectrofotômetro ocorreram na faixa de 660 nm. Os açúcares totais foram feitos através do método do fenol sulfúrico. As leituras aconteceram na absorvância de 480 nm. E os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogy-Nelson. A leitura da absorvância foi feita a 540 nm.

A análise estatística foi feita utilizando GraphPad Prism Software (versão 5.0). A significância estatística dos dados foi avaliada por one-way-ANOVA com post-hoc teste de Tukey. O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH final dos meios de cultivo ficou em torno de 7, um valor considerado neutro, diferente dos cultivos controle que não continham microrganismo e resultaram em pH 5. De acordo com Prakasham et al., (2006) o pH do meio de crescimento influencia a transferência de componentes por meio da membrana plasmática e também a atividade enzimática, afetando com isso o desenvolvimento, crescimento e formação de produtos. Valores de pH muito ácido ou básicos afetam a estrutura tridimensional das enzimas metabólicas produzidas pelos microrganismos diminuindo ou cessando seu crescimento.

Em relação ao material sólido fermentado (MSF), o cultivo controle teve um MSF de 1,2 g permanecendo próximo a quantidade de bagaço de cana inicial ao cultivo, 1,4 g, sendo que a diferença de 0,2 g representa a umidade presente no substrato. As cepas mostraram diminuição do peso seco, valores próximos ou menores que 1 g, em relação ao valor inicial, sugerindo a sacarificação do material vegetal.

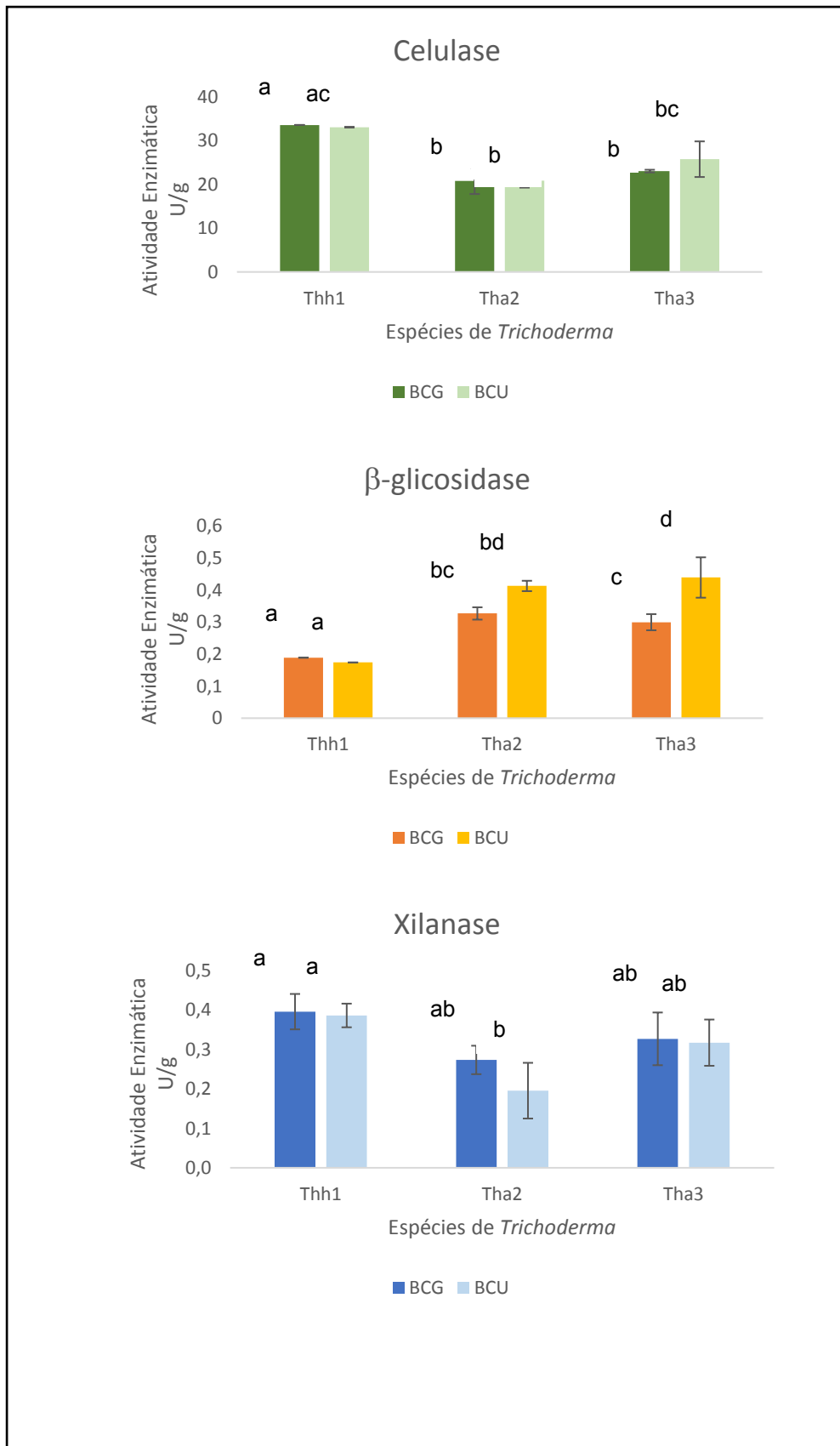
Os resultados presentes na Figura 2 mostraram que as três linhagens foram capazes de crescer nos dois substratos avaliados e conseqüentemente produzir as hidrolases. O *Thh1* foi o melhor produtor de celulases 33,6 U/g em BCU e 33,08 U/g em BCG. *Tha3* produziu 25,77 U/g em BCU, e *Tha2* produziu as menores atividades de celulase entre os analisados 20,83 U/g em ambos os substratos, BCG e BCU. *Tha2* e *Tha3* foram capazes de produzir β -glicosidases mais ativas em BCU em relação a *Thh1*, 0,41 U/g; 0,44 U/g e 0,17 U/g, respectivamente. *Thh1* também foi o que produziu as maiores atividades de xilanase entre os estudados 0,4 U/g em ambos os substratos, BCG e BCU, *Tha2* em BCU foi o menor produtor de xilanases, 0,2 U/g. A Figura 2 apresenta a produção da celulase, β -glicosidase e xilanase pelos isolados de *Trichoderma*. As atividades representam a média \pm desvio padrão da média dos experimentos. Valores com letras iguais não apresentam diferença significativa enquanto valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0.05$).

Na pesquisa de Delabona et al., (2012) *T. harzianum* isolado da floresta amazônica e cultivado em bagaço de cana também foi capaz de produzir as enzimas celulase, xilanase e β -glicosidase nas seguintes quantidades, 121 U/g; 8000 U/g e 1730 U/g, produzindo preferencialmente xilanases, o mesmo foi relatado quando essa espécie foi cultivada em palha de arroz, 111,31 U/g de celulase, 433,75 U/g de

xilanase e 173,71 U/g de β -glicosidase (RAHNAMA et al., 2013). Porém, os resultados encontrados foram contrários a esse estudo, onde a enzima que apresentou mais atividade foi a celulase, sugerindo que de acordo com a origem do substrato, as condições de cultivo e origem do isolado utilizado a atividade enzimática é diferente.

Nos estudos de Nava-Cruz et al., (2016) *T. asperellum* cultivado em fibras de *Agave atrovirens*, obteve na produção de celulases 12,86 U/g, no presente trabalho a mesma espécie foi capaz de produzir celulases mais ativas, 25,86 U/g (*Tha3*, BCU). Apesar do fungo produzir β -glicosidase quando cultivado em bagaço de cana, 0,37 U/g, os níveis de atividade não foram satisfatórios em relação ao cultivo de *T. asperellum* em *Agave atrovirens*, 3144,4 U/g.

Figura 2. Atividade de celulase, β -glicosidase e xilanase pelos *T. harzianum* (*Thh1*), *T. asperellum* (*Tha2*) e *Trichoderma harzianum* (*Tha3*) cultivados em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido



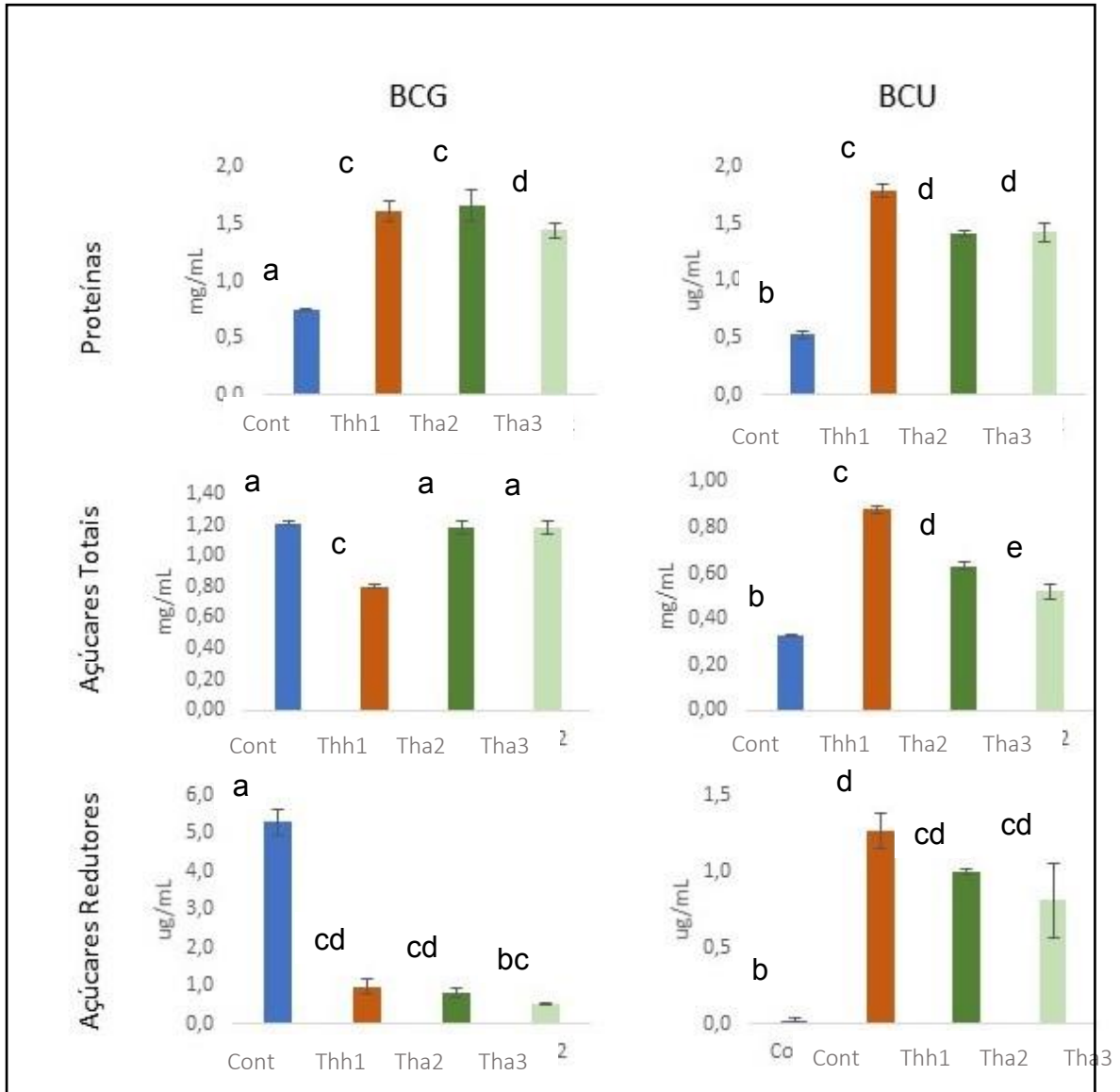
A Figura 3 apresenta a comparação das concentrações de proteínas, açúcares totais e açúcares redutores solúveis residuais determinadas no extrato bruto dos cultivos em BCG e BCU. É possível observar que nos dois substratos avaliados, BCG

e BCU, as proteínas totais solúveis aumentaram mais de 2 vezes em relação ao controle, indicando a produção de proteínas extracelulares pelos fungos, e entre elas, as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Os açúcares totais presentes no controle do BCG estavam em maiores níveis em comparação ao BCU, 1,21 mg/mL e 0,33 mg/mL, respectivamente mostrando a diferença da composição dos substratos de origens diferentes. Levando em consideração que o BCU já passou por diversos processamentos na Usina para a produção de açúcar e etanol e seus açúcares foram utilizados, porém, esse fato não afetou no desenvolvimento das cepas durante o cultivo, indicando que os fungos são capazes de sacarificar as fibras de celulose e hemicelulose para o seu desenvolvimento.

Em relação aos açúcares redutores, o controle de BCG também apresenta quantidades maiores de açúcares redutores que o controle de BCU, 5,5 mg/mL e 0,02 mg/mL, porém, os fungos cultivados em BCU produziram maiores quantidade de açúcares redutores em comparação ao cultivo em BCG, quase 2 vezes mais. Assim, em BCU os microrganismos necessitam secretar enzimas extracelulares capazes de hidrolisar o material vegetal afim de liberar açúcares para o seu desenvolvimento, diferente de quando são cultivados em BCG, um material rico em açúcares, onde utilizam os açúcares solúveis do meio para o seu crescimento. As cepas *Tha2* e *Tha3* ambas no BCG se aproximaram da quantidade de açúcares redutores produzidos pelo controle BCG, com 1,18 mg/mL e a cepa *Tha3* BCU foi a com menor produção, 0,53 mg/mL, esse fato indica que os fungos consomem os açúcares disponíveis no meio, utilizam para o seu crescimento e posteriormente produzem enzimas extracelulares para hidrolisar o material vegetal.

Figura 3. Comparação das concentrações de proteínas totais, açúcares totais e açúcares redutores residuais determinadas no extrato bruto enzimático dos cultivos de *Trichoderma harzianum* (Thh1), *Trichoderma asperellum* (Tha2) e *Thichoderma asperellum* (Tha3) cultivados em bagaço de cana de açúcar, BCG e BCU, por 7 dias a 28 ± 2 °C sob fermentação em estado sólido.



BCG: bagaço de cana de açúcar proveniente do garapeiro; BCU: bagaço de cana de açúcar obtido da usina; Cont: controle; Thh1: *Trichoderma harzianum*; Tha2 e Tha3: *Trichoderma asperellum*.

4. CONCLUSÃO

No material sólido fermentado foi observado uma redução da sua massa quando os microrganismos foram cultivados, indicando sua sacarificação pelos mesmos. Esse tipo de análise não apresenta relatos na literatura até o momento.

Trichoderma harzianum e os dois *Trichoderma asperellum* isolados de peroba e de solos de cultivo de milho, respectivamente, foram capazes de produzir as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em bagaço de cana proveniente de duas fontes: de indústria sucroalcooleira (BCU) e de garapeiro (BCG) sob fermentação em estado sólido.

As celulasas foram as enzimas mais ativas produzidas pelos fungos filamentosos em ambos os substratos, BCG e BCU sob fermentação em estado sólido. *Tha3* em BCU foi o maior produtor de β -glicosidase entre os estudados. *Thh1* produziu preferencialmente xilanases em comparação a *Tha2* e *Tha3*.

BCG e BCU apresentaram quantidades semelhantes de proteínas e todos os isolados foram capazes de produzir concentrações maiores de proteína em relação ao controle, indicando a produção de enzimas extracelulares por esses fungos.

Em relação aos açúcares totais e açúcares redutores totais residuais o cultivo controle de BCG apresentou maior concentração em relação ao cultivo controle de BCU, pois esse último passou por processamentos na indústria para a obtenção do caldo de cana e produção de açúcar e etanol, diferentemente do BCG que foi apenas espremido para a venda do caldo de cana. Dessa forma, BCG apresentava açúcares solúveis disponíveis para serem utilizados pelos *Trichoderma* durante seu desenvolvimento, não precisando produzir maiores concentrações de enzimas extracelulares para sacarificar o material vegetal como quando cultivado em BCU, que apresentou maior concentração de açúcares totais e redutores produzidos nos cultivos pelos microrganismos.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, S.; IMDAD, S. S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, n.3, 2012.

AZIN, M.; MORAVEJ, R.; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 801-805, 2007.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. International testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GEISE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. b-1,3-glucanases fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, 2010.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18: 355-83, 2000.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2019). Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-levantamento-safra-2018-19-cana-de-acucar-210818>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

COSTA, W. L. S.; BOCCHI, M. L.M. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n.1, 2012.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresouce Technology**, v.107, p. 517-521, 2012.

FARINAS, C. S. **A Parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na suadegradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. A survey of glucosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 233-244, 2005.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. A survey of glucosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 233-244, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2010_v37_br.pdf>. Acesso 10 janeiro 2019.

KAR, S.; MANDAL, A.; DAS MOHAPATRA, K. P.; MONDAL, C. K.; PATI, R. B. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 462-464, 2006.

KATAPODIS, P., NERINCKX, W., CLAEYSSSENS, M., CHISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular xylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2402–2409, 2006.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, e201209017, 2012.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LOPES, C. S. D. Análise ambiental da fase de acabamento do jeans. **Interfacehs Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 6, n. 3, p. 87-102, 2011.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Cana de

açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N. Degradabilidade de volumosos utilizando enzimas fibrolíticas. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 435-442, 2008.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpene in grape juices and wine. **Journal of chromatography a**, v. 881, p. 557-567, 2000.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpene in grape juices and wine. **Journal of chromatography a**, v. 881, p. 557-567, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Anai Chem.**, p. 426-428, 1958.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Anai Chem.**, p. 426-428, 1958.

NAVA-CRUZ, N. Y.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR-GONZALÉZ, M. A.; NUNCIO, A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*. **3 Biotech**, v. 6, p. 115, 2016.

NIGAM, P.; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization. **Springer Science, Netherlands**, p. 466, 2009.

PAI, K. C.; CHEN, W. J.; ZENG, Y. F.; TUNG, C. L.; LIU, R. J. **Cloning of the bifunctional xylanolytic enzyme gene from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* S20**. Department of Life Science, National Taiwan Normal University, 2013.

PANDEY, A.; THOMAS, L.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, n. 81, p. 146-161, 2013.

PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBI, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D.; SIVANESSAN, S. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation. **Arab J Sci Eng**, v. 42, p. 53-63, 2017.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólida: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa**, p. 2-5, 2005.

PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SHARMA, P. N. Gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation, **Bioresource Technology**, v. 97, 1449-1460, 2006.

RAHNAMA, N.; MAMAT, S.; SHAH, U. K. M.; LING, F. H.; RAHMAN, N. A. A.; ARRIF, A. B. Effect of Alkali Pretreatment of Rice Straw on Cellulase and Xylanase Production by Local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under Solid State Fermentation. **BioResources** v. 8, n. 2, 2013.

SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C. e SEIBOTH, C. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, v. 13, p. 310-340, 2011.

SCHUTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Application Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

SHAO, W.; XUE, Y.; WU, A.; KATAEVA, I.; PEI, J.; WU, H.; WIEGEL, J. Characterization of a novel β -Xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 719-726, 2011.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 3, n. 1, p. 27-32, 2007.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71, 2017.

Artigo 2

Identificação de Espécies de *Trichoderma* e Avaliação do Potencial Celulolítico em Bagaço de Cana de Açúcar sob Fermentação em Estado Sólido

Mariane Cristina Mendes, Cristiane Vizioli Ghizoni, Daniele Sartori, Maria Inês Rezende

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

1. Resumo

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar, gerando cerca de 147 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano. Esse resíduo é importante para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que apresentam diversas aplicações industriais; como na produção de biocombustíveis. O presente estudo avaliou a produção de xilanases, celulasas e β -glicosidases por espécies de *Trichoderma* isolados na região de Londrina-PR e cultivados em bagaço de cana (BC). A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada com BC. Os cultivos desenvolvidos em Erlenmeyers de 240 mL contendo 3,5 g de BC umedecido com 25 mL de solução de Vogel. O inóculo de *Trichoderma harzianum* Rifai (*ThR*) e de *Trichoderma asperellum* (*Ta1* e *Ta2*) consistiu de 1000 μ L de solução de tween 80 a 0,1 % (v/v) contendo 1.10^8 UFC mL⁻¹, incubados a 28 ± 2 °C por sete dias. Ao material sólido fermentado foram adicionados 25 mL de água destilada, para a obtenção do extrato bruto enzimático (EBE), após homogeneização e centrifugação a 9.000 rpm/15 min. No EBE foram determinados: atividade enzimática (celulasas e β -glicosidases). O isolado Th9 foi capaz de produzir as celulasas mais ativas nas condições estudadas, 18 U/g, e o Th6 foi o melhor produtor de β -glicosidases nas mesmas condições, 1,1 U/g. O meio de Vogel é o mais adequado para umidificar o substrato na produção de enzimas extracelulares, e o melhor tempo de cultivo, dentro de 10 dias, para a produção das celulasas é o quinto e das β -glicosidases a partir do sexto dia. As celulasas apresentam melhor atuação em pH 5,0 a temperatura de 50 °C. Os resultados mostram o potencial desses microrganismos para a produção de enzimas celulolíticas empregando-se o bagaço de cana de açúcar como substrato, um resíduo tão abundante no Brasil.

2. Introdução

A economia brasileira é baseada, em grande parte, na produção agrícola [1]. Em 2010 o agronegócio representou 25 % dos produtos em circulação no mundo [2]. A expansão do

agronegócio gera uma quantidade expressiva de resíduos que poderiam ser reutilizados ao em vez de desperdiçados [3].

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar. Para a produção de açúcar e etanol 722 milhões de toneladas de cana de açúcar foram colhidas em 2010, e em 2013 esse valor atingiu 768 milhões de toneladas [4]. Decorrente da produção de cana de açúcar vem a geração de milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar, cerca de 30 % do total produzido é convertido em bagaço de cana de açúcar, quantidades superiores a 200 milhões de toneladas por ano [5].

Nos últimos tempos vários bioprocessos estão utilizando os resíduos agroindustriais como substrato em processos fermentativos para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como proteínas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários [6]. As principais vantagens de se utilizar esse material como substrato são diminuir o impacto ambiental decorrente do seu acúmulo na natureza e reduzir os custos na produção industrial [7,8].

O bagaço de cana-de-açúcar é composto por 39,7 a 49 % de carbono, 40 a 46 % de oxigênio, 5,5 a 7,4 % de hidrogênio e cerca de 0,3 % de nitrogênio e cinzas [9]. Ou seja, esse material é fonte de carbono e nutrientes e, portanto, também pode ser utilizado em processos fermentativos.

A fermentação em estado sólido é a utilização de um material sólido e orgânico, o substrato, que será umidificado e servirá como suporte para o aumento do número de células. A água presente deve assegurar o crescimento e metabolismo das células microbianas sem exceder a capacidade de ligação com a matriz sólida, ou seja, ausência de água livre [10,11]. Segundo Farinas, (2011) um dos fatores mais importante a ser considerado durante a FES é a escolha do microrganismo e do substrato. Pois o microrganismo deve ser capaz de se aderir e penetrar no substrato com baixa atividade de água e o substrato precisa conter características que ajudem o desenvolvimento do mesmo [12,13].

O gênero *Trichoderma* é caracterizado por apresentar crescimento rápido e conídios esverdeados [14]. A busca por novas espécies capazes de produzir metabólitos para a aplicação na indústria possibilitou a identificação de diversas espécies de *Trichoderma*, além disso, são microrganismos abundantes em diferentes ambientes, fáceis de isolar e manter, tornando os processos de menor custo.

Soccol et al., (2017), avaliaram que as principais aplicações da fermentação em estado sólido nos últimos cinco anos estão na produção de enzimas, alimentos fermentados e biomoléculas importantes, entre elas os ácidos orgânicos, pigmentos, compostos fenólicos, aromas e biosolventes [15].

As celulasas são responsáveis pelo início da hidrólise e pela rápida solubilização do polímero de celulose, pois hidrolisam as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, formando, assim, novos terminais redutores e não redutores [16,17]. As β -glicosidasas hidrolisam a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Assim, as β -glicosidasas atuam de forma sinérgica com as celulasas na degradação de diferentes tamanhos de oligossacarídeos. As β -glicosidasas são responsáveis pela degradação final da celulose, liberando glicose [18,19].

As celulasas e β -glicosidasas são importantes e empregadas nos setores da indústria têxtil, alimentícia e de rações para animais [20]. Outras aplicações também são relatadas como: fermentação de cerveja; extração de café; detergentes; produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos; conservantes de alimentos, agentes antimicrobianos e muitos estudos tem dado atenção a produção de etanol de segunda geração [14,21,22].

3. Material e Métodos

3.1 Microrganismos: origem e manutenção

Para este estudo foram utilizados 12 isolados do gênero *Trichoderma* de diferentes fontes. O *Trichoderma harzianum* Rifai (*ThR*) foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, a partir de peroba (*Aspidosperma sp*) em decomposição. Esta cepa foi classificada no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Recife-PE, e previamente selecionada como xilanolítica quando cultivado em bagaço de cana por Barbosa et al. (1992).

As outras 12 cepas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ciro Hideki Sumida do Departamento de Agronomia – Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) Londrina-PR, sendo que 2 delas já foram identificadas como *Trichoderma asperellum* (*Tha1* e *Tha2*) e as outras 9 foram identificadas no presente trabalho, todos os espécimes foram coletados das cidades de Londrina-PR e Bandeirantes-PR (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação das espécies dos isolados de *Trichoderma* e dos solos de plantio do isolamento de diferentes cultivares nas cidades de Londrina-PR e Bandeirantes-PR.

Nome	Identificação	Origem	Local
<i>ThR</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	peroba	Londrina
<i>Tha1</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	milho	Londrina
<i>Tha2</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	milho	Londrina
<i>Th3</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	milho	Londrina
<i>Th4</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	couve	Londrina
<i>Th5</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	milho	Londrina
<i>Th6</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	milho	Londrina
<i>Th7</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	milho	Londrina
<i>Th8</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	tomate	Londrina
<i>Th9</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	milho	Londrina
<i>Th10</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	cana	Bandeirantes
<i>Th11</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	cana	Bandeirantes
<i>Th12</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	cana	Bandeirantes

3.2 Extração de DNA genômico de fungos filamentosos

Inicialmente os isolados foram cultivados em meio de cultivo PDA - Potato Dextrose Agar por 7 dias a 28 °C.

Foi preparada uma suspensão de aproximadamente 10^7 conídios, coletados a partir do cultivo inicial, em 2 mL de Tween 80 %. A suspensão foi vertida em frascos Erlenmeyer 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido de extrato de PDA, incubado a 28 °C, sob agitação constante de 180 rpm por 16 horas. Posteriormente, o micélio formado foi coletado por filtração para extração de DNA.

A extração de DNA genômico foi realizada como descrito por Azevedo et al. (2000). O micélio coletado foi macerado em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 60 mg do macerado foi transferido para microtubos (2 mL) e imediatamente adicionado 800 µL de tampão de extração (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; NaCl 5 M; SDS 10% e água ultrapura). Os componentes foram homogeneizados por inversão dos microtubos e incubados em banho Maria a 65°C durante 20 minutos com homogeneização a cada 5 minutos. Após este período, foi adicionado 800 µL de fenol (Invitrogen®), seguido de homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos.

A fase aquosa (superior) foi transferida para outro microtubo de 2 mL, e em seguida adicionado 800 µL da mistura fenol (Invitrogen®), clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 25:24:1, respectivamente, com posterior homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Novamente a fase aquosa recuperada foi transferida para outro microtubo de 2 mL, e adicionado 800 µL de clorofórmio (Merck®) e álcool isoamílico (Vetec®), na proporção 24:1, respectivamente, com posterior homogeneização por inversão do tubo e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. À fase aquosa resultante foi adicionado 1:10 do volume de NaCl 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado seguido de incubação a -20 °C por 60 minutos para a precipitação dos ácidos nucleicos.

Decorrido o período, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o *pellet* lavado com 300 µL de etanol 70 % seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, repetindo esse processo de purificação por 2 vezes. Após a secagem dos ácidos nucleicos o *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0

e q.s.p. de água destilada) e armazenado a -20 °C.

3.3 Amplificação das regiões ITS do DNA ribossomal

Para as reações de amplificação foram utilizados os *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTTGCGG3') e ITS2 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al. 1990).

As reações foram preparadas com volume final de 25 µL, composto por: 2,5 µL de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2 µL de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 µL de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/µL), 1 µL de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL da amostra de DNA (5 ng/µL) e 17,4 µL de água ultrapura. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura.

As reações foram submetidas a um termociclador MJ Research PTC-100™ Thermal Cycler (MJ Research, Inc), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, 34 ciclos composto por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, pareamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v). As amostras de DNA foram coradas em solução de brometo de etídeo 10 mg/mL diluídos em tampão super buffer 1x e fotografados utilizando transiluminador UV e Sistema de Imagem Digital LPIX (Loccus®).

3.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados baseados no método de Sanger et al. (1977), utilizando-se os mesmos pares de *primers* descritos anteriormente para a obtenção dos respectivos fragmentos. As amostras foram sequenciadas em aparelho ABI 3500XL na universidade Estadual de Londrina.

3.5 Bagaço de Cana de Açúcar: cultivo

O bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) foi cedido pela Usina Clealco, Penápolis-SP. O inóculo foi preparado utilizando 1.10^8 UFC mL⁻¹ suspensos em solução de Tween 80 0,1% em água destilada. O cultivo desenvolveu-se em Erlenmeyers de 125 mL contendo 3,5 g de pulverizado de bagaço de cana e umedecidos com 25 mL de meio mínimo de Vogel, mantidos a 28 ± 2 °C por 7 dias. A interrupção do cultivo ocorreu com a adição de 25 mL de água destilada; centrifugados por 15 minutos a 9.000 g.

3.6 Atividade da Celulase

O sistema de incubação consistiu em 0,5 mL de carboximetilcelulose (CMC) 1 % dissolvido em tampão citrato 50 mM pH 5,0 e 0,5 mL de extrato enzimático (PERIYASAMY et al., 2017). O sistema foi mantido a 50 °C por 10 minutos e interrompido pela adição de 500 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores liberados foram determinados segundo a técnica descrita por Miller, 1958. Uma unidade de atividade celulásica é definida como a quantidade de enzima que libera µ moles de glicose liberados por minuto por mL do extrato enzimático.

3.7 Atividade da β -Glicosidase

A atividade de β -Glicosidase foi dosadaa utilizando 1 mL de para-nitrofenol glicosídeo (ρ -NPG) 1 Mm dissolvido em tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5,0 e 0,25 mL de extrato bruto enzimático. O sistema foi mantido a 30 °C por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1,25 mL de carbonato de sódio 0,5 M. A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ -NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade de β -glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ M de ρ -NP por minuto, nas condições experimentais.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando GraphPad Prism Software (versão 5.0). A significância estatística dos dados foi avaliada por teste t-Student para comparar dois parâmetros e para as outras análises foi utilizado one-way-ANOVA com post-hoc teste de Tukey. O nível de 5% ($p < 0.05$) foi adotado como critério de significância.

Os dados representam a média \pm desvio padrão da média dos experimentos.

4 Resultados e Discussão

4.1 Identificação das Espécies do Gênero *Trichoderma*

A identificação das espécies ocorreu através da amplificação das regiões ITS do DNA ribossomal e posterior sequenciamento baseado no método de Sanger et al., (1977). A Tabela 1 mostra as 13 espécies do gênero *Trichoderma*. Os 9 isolados, *Th3* até *Th11*, tiveram suas espécies analisadas no programa Blast com 100 % de homologia.

Tabela 1 – Relação das espécies dos isolados de *Trichoderma* e dos solos de plantio do isolamento de diferentes cultivares nas cidades de Londrina-PR e Bandeirantes-PR.

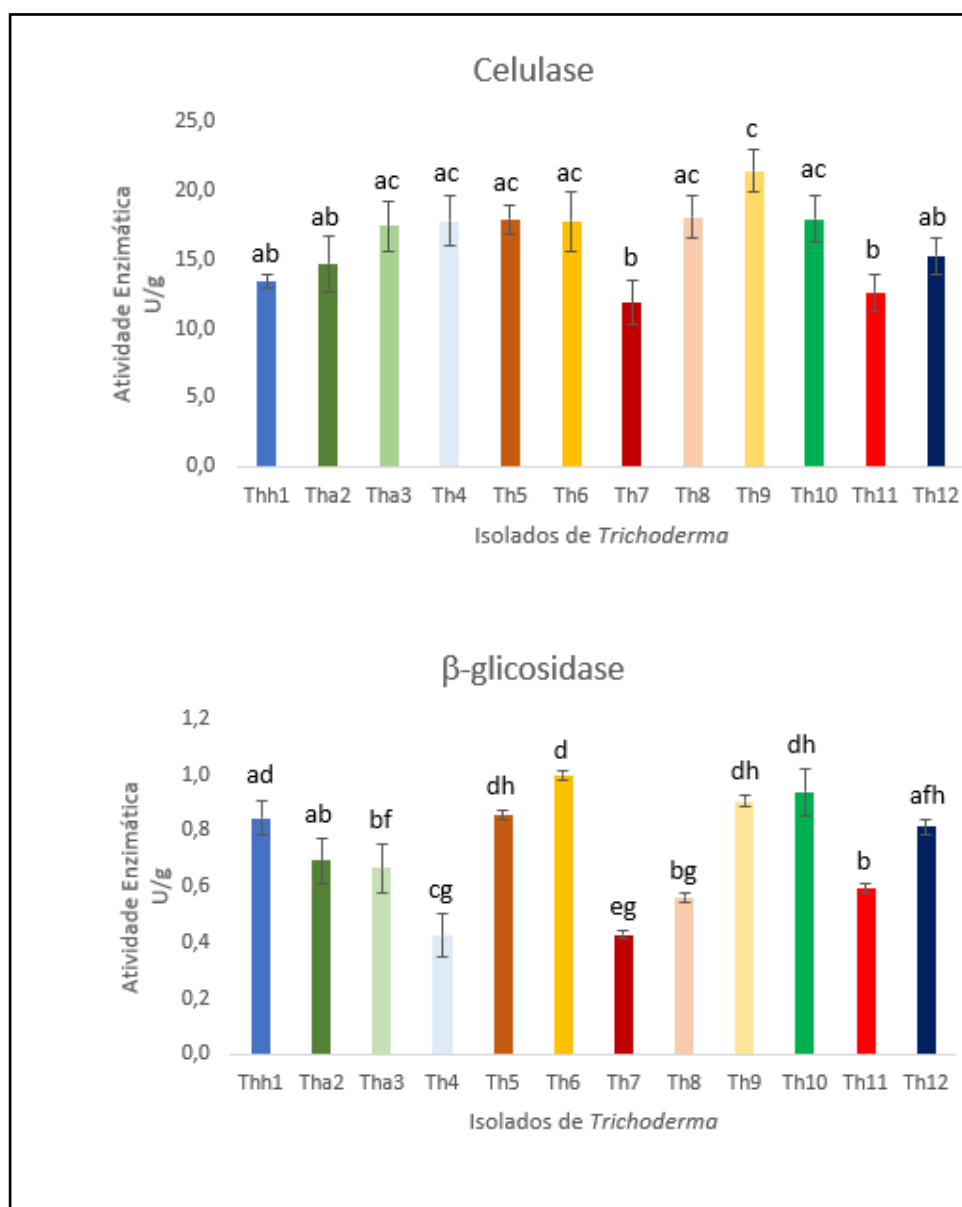
Nome	Identificação	Origem	Local
Th3	<i>Trichoderma asperellum</i>	milho	Londrina
Th4	<i>Trichoderma asperellum</i>	couve	Londrina
Th5	<i>Trichoderma harzianum</i>	milho	Londrina
Th6	<i>Trichoderma sp.</i>	milho	Londrina
Th7	<i>Trichoderma harzianum</i>	milho	Londrina
Th8	<i>Trichoderma yunnanense</i>	tomate	Londrina
Th9	<i>Trichoderma citroviridae</i>	milho	Londrina
Th10	<i>Trichoderma harzianum</i>	cana	Bandeirantes
Th11	<i>Trichoderma harzianum</i>	cana	Bandeirantes
Th12	<i>Trichoderma harzianum</i>	cana	Bandeirantes

Foram encontradas espécies nos solos de cultivar: de milho *T. citroviridae*, *T. harzianum* e *T. asperellum*; de couve *T. asperellum*; de cana o *T. harzianum*, de tomate foi encontrado o *T. yunnanense*.

4.1 Seleção do Isolado de *Trichoderma sp.* Produtor de Celulases em Bagaço de Cana de Açúcar sob Fermentação em Estado Sólido

Foram cultivadas 13 isolados de *Trichoderma sp.* (Tabela 3) em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido e posteriormente feita a determinação das atividades de celulase e β -glicosidase a fim de verificar o isolado que seria capaz de produzir os maiores níveis de atividade enzimática entre os estudados. A Figura 1 mostra a produção de celulases e β -glicosidases entre os isolados avaliados.

Figura 1 – Produção de celulase e β -glicosidase por isolados de *Trichoderma* cultivados em bagaço de cana açúcar sob fermentação em estado sólido.



Todos os isolados de *Trichoderma* foram capazes de produzir celulases e β -glicosidases, sendo que o *Th9* foi capaz de produzir os maiores níveis de celulases nas condições avaliadas, 18,0 U/g, e *Th6* produziu as β -glicosidases a mais ativas dentre os isolados, 1,1 U/g.

O gênero *Trichoderma* é relatado como um bom produtor de enzimas celulolíticas e algumas espécies são capazes de excretar enzimas específicas de forma mais eficiente que outras espécies desse gênero. Como é o caso do *T. reesei* que é considerado referência na

produção em larga escala de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, porém, *T. asperellum* S4F8 é capaz de produzir xilanases e β -glicosidases mais ativas, 4 e 23 vezes, respectivamente, em comparação ao *T. reesei*, sob as mesmas condições de cultivo; fermentação em estado sólido no bagaço de cana-de-açúcar e temperatura de 30 °C [23].

Os estudos de Irfan, Nadeem e Syed (2014) mostraram que as cepas de *Trichoderma virens*, *T. harzianum* e *Trichoderma asperelloides* cultivados em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido se desenvolvem de forma satisfatória nesse tipo de fermentação e são capazes de produzir as enzimas celulasas e β -glicosidases. Dentre essas linhagens a maior produção foi da enzima celulase, 23 U/g, pelo *T. asperelloides*, e o *T. virens* mostrou 4 U/g na atividade de β -glicosidase. Assim como no presente estudo a enzima produzida em maiores quantidades também foi a celulase pelo *T. citroviridae* [24].

Esses resultados ressaltam a importância de investigar diferentes espécies dentro de um gênero para a obtenção de enzimas extracelulares, pois o Brasil importa a maior parte das enzimas que utiliza, porém apresenta potencial para a produção das mesmas pela abundância de matéria orgânica que produz que pode ser utilizada como substrato diminuindo os custos [25].

Os estudos de Rocha et al., (2016) demonstraram que entre o coquetel enzimático produzido por *T. harzianum* cultivado em bagaço de cana de açúcar cerca de 67 % das enzimas produzidas são da família das glicosil hidrolases, outras enzimas presentes são as mono-oxigenases, esterases e lipases, todas em níveis de 1 % e o restante do secretoma com função desconhecida. No presente trabalho as celulasas representaram 60 % do total de enzimas analisados e 20 % foram β -glicosidases [26].

4.3 Avaliação da Solução Umedecedora e do Tempo de Cultivo para atividade das celulases produzidas por *Th9* Isolado de Cultivo de Milho

Devido a maior produção de celulases, entre os analisados nas condições estabelecidas, a seleção do tempo de cultivo foi feita cultivando o *T. citroviridae* (*Th9*) em bagaço de cana sob fermentação em estado sólido. A interrupção do cultivo ocorreu desde o 1º dia até o 10º dia, com intervalo de 24 horas. Os cultivos foram umidificados de duas formas: com a adição de apenas água e a adição de meio Vogel. A Figura 2 mostra a atividade da celulase e β -glicosidase nos cultivos utilizando as diferentes soluções umedecedoras por 10 dias.

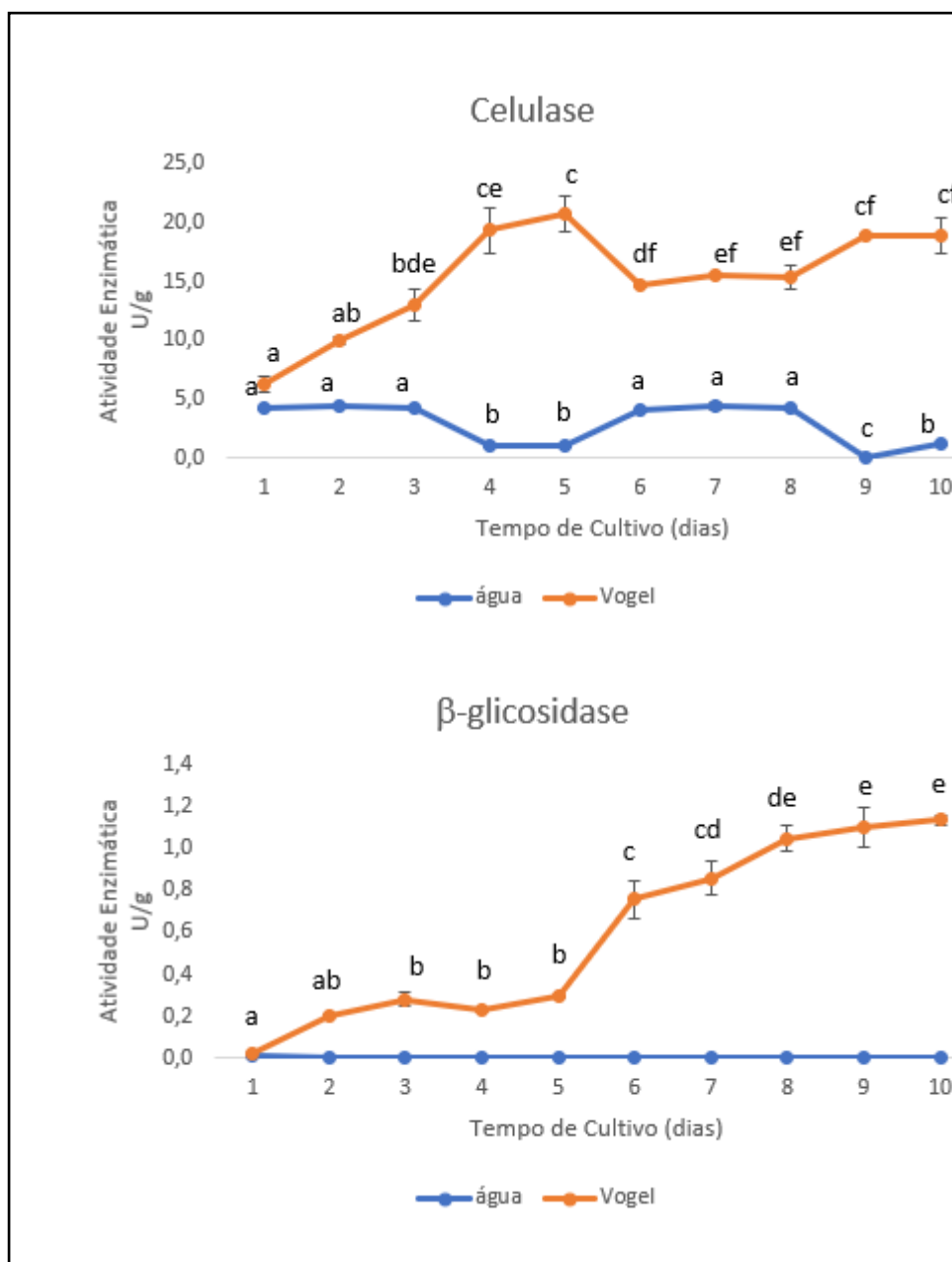
A atividade enzimática para as duas enzimas, celulase e β -glicosidase, foi maior quando os isolados foram cultivados na presença do meio de Vogel. Esse meio contém minerais essenciais para a nutrição das células e sais que são utilizados como cofatores enzimáticos, apesar desse fato, ainda houve produção de celulases no substrato umidificado com água, diferente da β -glicosidase que não apresentou atividade quando os microrganismos foram cultivados somente com água [27].

A Figura 14 indica que entre os dias 4 e 5 foram obtidas as maiores atividades de celulase, 19,3 U/g e 20,8 U/g, respectivamente, e entre os dias 9 e 10 a melhor atividade de β -glicosidase, 1,1 U/g e 1,2 U/g. No 5º dia foi observado a maior alta atividade de celulase e a partir do 6º dia ocorre um aumento crescente na atividade da β -glicosidase, esse fato pode ser justificado pelos resíduos liberados pelas celulases, oligossacarídeos e celobiose, serem substrato para a atuação da β -glicosidase.

As celulases podem ser enzimas indutivas que dependem das condições nutricionais para sua síntese sendo favorecidas pelas condições de cultivo como pH, temperatura e tempo de cultivo [27]. O peso molecular alto da celulose impede sua entrada na célula e

consequentemente não induz a síntese de enzimas celulolíticas. São resíduos de glicose e celobiose que irão acionar os genes para a produção das celulasas, pois tem baixo peso molecular e conseguem entrar nas células fúngicas [28]. Esse fato explica o motivo dos fungos precisarem de um período de tempo para produzirem altos níveis de celulase, assim ocorre a expressão dos genes necessários para a síntese e então, sua liberação. O declínio na produção após o sexto dia pode estar relacionado com o consumo de algum componente essencial ou então a ação de inibidores [29]. Similarmente ao presente estudo uma linhagem de *T. harzianum* apresentou a maior produção de celulasas após o 4 dia de incubação, porém em pH 6,0 e temperatura de 34 °C [30].

Figura 2 - Produção de celulases pelo *Th9* ao longo do tempo de cultivo de 10 dias em bagaço de cana da usina sob fermentação em estado sólido.



A celulase foi a enzima que apresentou maior atividade nas condições avaliadas, 5^o dia em substrato umidificado com meio de Vogel, 21,4 U/g. Assim, a determinação do pH e temperatura ótimo de atuação foram feitos para a atividade da celulase.

4.4 Influências do pH e da Temperatura na Atividade das Celulases Produzidas por *Th9* no Extrato Bruto

Afim de verificar a temperatura e o pH para a melhor atuação das celulases produzidas por *T. citroviridae* (*Th9*) em bagaço de cana sob fermentação em estado sólido, o extrato bruto foi incubado em temperaturas de 30 °C a 80 °C com intervalo de 10 °C, e posteriormente, em valores de pH de 3 a 8 com intervalo de 1 unidade de pH.

O efeito da temperatura sobre a atividade da celulase está representado na Figura 3 onde a maior atividade enzimática foi a temperatura de 50 °C mostrando um perfil mesófilo do fungo analisado. Porém, os resultados encontrados foram contrários ao que se relata na literatura para as celulases produzidas por *T. viride* [31] (GOYAL et al., 2008), *T. reesei* [32] (MAURYA et al., 2012) e *T. harzianum* [33] (RUBEENA et al., 2013) que evidenciaram os melhores resultados da atuação de celulase entre 25 e 30 °C. Segundo Knob et al., (2013) a temperatura ótima de atuação para a atividade enzimática varia de acordo com o microrganismo que a produz [34].

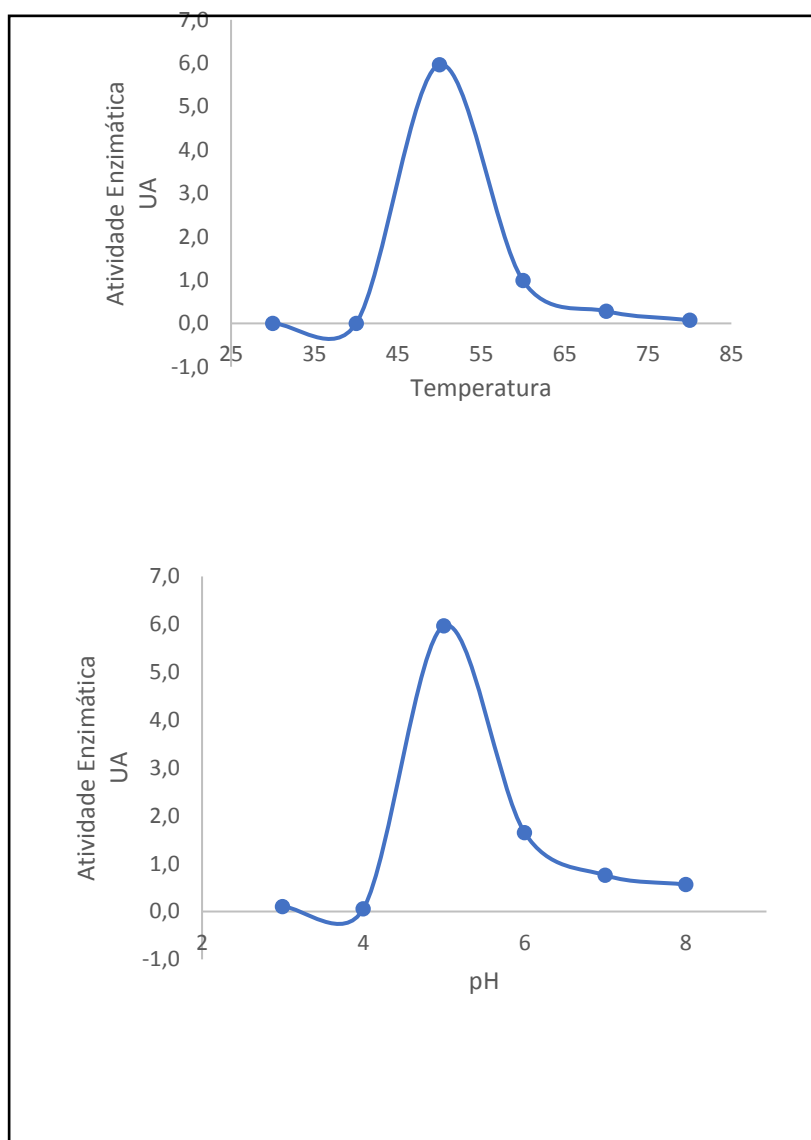
A temperatura influencia na cinética da reação enzimática de modo que aumentos na temperatura levam a aumentos na velocidade de reação, por elevar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Entretanto, altas temperaturas promovem a desnaturação da enzima, perdendo a atividade da enzima e a estabilização da reação enzimática [35].

A caracterização do pH se deu em temperatura ótima pré-estabelecida de 50 °C. A melhor atuação das celulases produzidas se deu em pH 5 e o mesmo foi encontrado nos estudos de Maurya et al., (2012) [32] e Rubeena et al., (2013) [33], onde a melhor atuação das celulases de *T. reesei* e *T. harzianum* foram em pH 4 e 5, respectivamente.

Habitualmente fungos filamentosos produzem enzimas celulolíticas que atuam sobre valores de pH levemente ácidos. Neste estudo sugere-se que valores de pH mais ácidos

promovem uma alteração no estado iônico dos resíduos de aminoácidos da enzima, resultando em uma conformação tridimensional mais eficaz em promover a hidrólise da celulose [36,37].

Figura 3 - Influência da temperatura e do pH sobre a atividade de celulases produzidas pelo *Th9* cultivo em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido.



5 Conclusão

Todos os isolados de *Trichoderma* foram capazes de produzir as enzimas celulolíticas, sendo o *T. citroviridae* (*Th9*) o melhor produtor de celulases, nas condições avaliadas, 5 dias de cultivo utilizando como solução umedecedora para o bagaço de cana de açúcar o meio de

Vogel sob fermentação em estado sólido. A β -glicosidase foi produzida em maiores níveis a partir do 6º dia. Todos os isolados também foram capazes de produzir celulasas quando o substrato foi umidificado apenas com água, diferente da produção da β -glicosidase, que não ocorreu nessas condições.

A atividade das celulasas foi verificada em relação aos parâmetros pH e temperatura, sendo o pH ótimo 5,0 e a temperatura 50 °C.

A espécie *T. citroviridae* apresenta potencial para a produção de celulasas, sendo uma espécie diferente das relatadas na literatura. Esse estudo contribuiu com a identificação de isolados celulolíticos e com a identificação molecular de suas linhagens. Futuros estudos de otimização da produção de celulasas poderão ser desenvolvidos.

Referências

1. Graminha E. N.; Gonçalves, A. Z. L.; Pirota, R. D. P. B.; Balsalobre, M. A. A.; da Silva, R.; Gomes, E. Enzyme production by solid- state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 2008; 144: 001–022.
2. Ministério da Agricultura [Internet]. Brasília: Agricultura, Pecuária e Abastecimento [citado em 9 de fevereiro de 2019]. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/>.
3. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. [Internet]. Cultivo da batata-doce [publicado em 10 de janeiro de 2014, citado em 9 de fevereiro de 2019]. Disponível em http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_batata_doce.htm/.
4. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Produção Agrícola Municipal [publicado em 14 de junho de 2015, citado em 9 de fevereiro de 2019]. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2010_v37_br.pdf.
5. Nova Cana [Internet]. Levantamento da Safra de Cana de Açúcar [publicado 21 de Agosto de 2017, citado em 9 de fevereiro de 2019]. Disponível em <http://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-levantamento-safra-2018-19-cana-de-acucar-210818/>.

5. Sánchez, O. J.; Cardona, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2008; 99(13): 5270-5295.
6. Dashtban, M.; Scharaft, H.; Wensheng, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 2009; 5: 578-595.
7. Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 4851-4861.
8. Silva, V. L. M. M.; Gomes, W. C.; Alsina, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista eletrônica de materiais e processos*. 2007; 3(1): 27-32.
9. Del Bianchi, V. L.; Capalbo, D. M. F.; Moraes, I. O. Fermentação em Estado Sólido. In: *Biotecnologia Industrial*. Coord. Schmidell, W. et al. 2001; 2: 247-276.
10. Subramaniyam, R.; Vimala, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*. 2012; 3(3): 480-486.
11. Witmann, C.; Liao, J. *Industrial Biotechnology: products and processes*. 2016.
12. Farinas, C. S. *A Parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação*. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.
13. Schuter, A.; Schmoll, M. *Biology and Biotechnology of Trichoderma*. *Application Microbiology and Biotechnology*. 2010; 87: 787-799.
14. Soccol, C. R.; Costa, E. S. F.; Letti, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017; 1: 52-71.
15. Lynd, I.R., Weimer, P. J., Zyl, W. H., Pretorius, I.S. *Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2002; 66: 506-577.
16. Castro, A. M.; Pereira Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 2010; 33(1): 181-188.
17. Mateo, J. J.; Jiménez, M. Monoterpene in grape juices and wine. *Journal of chromatography a*. 2000; 881: 557-567.
18. Grimaldi, A.; Bartowsky, E.; Jiranek, V. A survey of glucosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International journal of food microbiology*. 2005; 105: 233-244.

19. Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000; 18: 355-83.
20. Kamal, K. B., Balakrishnan, H., Rele, M.V. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Epub ahead of print, 2004.
21. Katapodis, P., Nerinckx, W., Claeysens, M., Chistakopoulos, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular xylanase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Process Biochemistry*. 2006; 41: 2402–2409, 2006.
22. Marx, I. J.; Wyk, N. V.; Smit, S.; Jacobson, D.; Viljoem-Bloom, M.; Volschenk, H. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagace. *Biotechnology for Biofuels*. 2013; 6: 2-13.
23. Irfan, M.; Nadeem, M.; Dyed, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *Journal of radiation research and applied sciences*. 2014; 317-326.
24. Orlandelli, R. C.; Specian, V.; Felber, A. C.; Pamphile, J. A. Enzimas de Interesse Industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*. 2012; 7(3): 97-109.
25. Rocha, V. A. L.; Maeda, R. N.; Pereira Jr., N.; Kern, M.; Elias, L.; Simister, R.; Steele-King, C.; Gómez, I. D.; Mcqueen-Mason, S. J. Characterization of the Cellulolytic Secretome of *Trichoderma harzianum* During Growth on Sugar Cane Bagasse and Analysis of the Activity Boosting Effects of Swollenin. *Biotechnology Progress*. 2016; 32(2).
26. Gupta, U.; Kar, R. Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009; 52(6): 1363-1371.
28. Beg, Q.; Kapoor, M.; Mahajan, I.; Hoondal, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 56(3): 326-338.
29. Berovic, M.; Ostroversnik, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal Biotechnology*. 1997; 53: 47-53.
30. Pathak, P.; Bhardwaj, N. K.; Singh, A. K. Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2014; 172: 3776-3797.
31. Goyal, M.; Kalra, K. L.; Sareen, V. K.; Soni, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Braz J Microbiology*. 2008; 39: 535–541.

32. Maurya, P.; Singh, D.; Pratap, D.; Maurya, J. P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Journal of environmental biology*. 2012; 33: 5-8.
33. Rubeena, M.; Neethu, K.; Sajith, S.; Sreedevi, S.; Priji, P.; Unni, K. N.; Sarath Josh, M. K.; Jisha, V. N.; Pradeep, S.; Benjamin, S. Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013; 4: 214-221.
34. Knob, a.; Beitel, S. M.; Fortkamp, D.; Terrasan, C. R. F.; Almeida, A. F. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. *BioMed Research International*. 2013; 1: 1-18.
35. Kurozawa, I. E.; Park, K. J.; Hubinger, M. D. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis of chicken meat. *Food Science and Technology*. 2009; 29: 577-566.
36. Knob, A. Complexo xilanolítico de *Penicillium sclerotiorum*: produção, purificação e caracterização de xilanases e de beta-xilosidades. 2009. 184f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, 2009.
37. Luo, H.; Yang, J.; Li, J.; Shi, P.; Huang, H.; Bai, Y.; Fan, Y.; Yao, B. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 86: 1829–1839.

6 CONCLUSÃO

Os isolados estudados apresentaram atividade de celulase, β -glicosidase e xilanase, respectivamente, quando cultivados em bagaço de cana de açúcar sob fermentação em estado sólido sendo as celulases as enzimas mais ativas. Além da atividade enzimática na avaliação do material sólido fermentado (bagaço de cana de açúcar) foi determinada a redução do peso seco em relação ao controle, indicando que a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas levou a sacarificação parcial deste material o que pode contribuir para a diminuição do impacto ambiental causado por esse resíduo agroindustrial.

O processo de sacarificação foi confirmado pela determinação dos açúcares totais e açúcares redutores residuais solúveis obtidos dos extratos dos cultivos em estado sólido com o bagaço de cana de açúcar proveniente da indústria sucroalcooleira (BCU).

A identificação molecular confirmou o gênero e definiu as espécies de alguns dos isolados dos solos coletados na região norte do Paraná. As espécies encontradas no solo de cultivo de milho foram identificadas como *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. citroviridae*; de cultivo de cana de açúcar a espécie *T. harzianum*; de cultivo de couve *T. asperellum* e de cultivo de tomate o *T. yunannense*.

O *T. citroviridae* (*Th9*) isolado de solo coletado de cultivo de milho foi o melhor produtor de celulases (5 dias de cultivo) e também produtor de β -glicosidase (a partir do 6º dia de cultivo), em bagaço de cana de açúcar umedecido com o meio de Vogel embora a atividade celulásica tenha sido também encontrada nos extratos obtidos dos cultivos em bagaço de cana umedecido apenas com água.

A espécie *T. citroviridae* apresentou melhor potencial para a produção de celulases nas condições avaliadas, sendo uma espécie diferente das comumente relatadas na literatura para produção dessas hidrolases, estudos para a otimização das condições de cultivo contribuirão para o aumento da produção de celulases e o maior aproveitamento desses resíduo agroindustrial.

7 REFERÊNCIAS

ACESSORIA DE COMUNICAÇÃO E IMPRENSA DA FAAC. **Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo**. 2017. Disponível em: <<http://www.acifaaunesp.com>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Café no Brasil**. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 13 nov. 2018.
AHMED, S.; IMDAD, S. S.; JAMIL, A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.15, n.3, 2012.

ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, S. J.; DUMESIC, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, v.41, p.8075-8098, 2012.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. International testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270, 1992.

BANDIKARI, R.; POONDLA, V.; OBULAM, V. S. R. Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koeningi* isolate: effect of pretreated agro-residues. **Biotech**, v. 4, p. 655-664, 2014.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 353-368, 1992.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GEISE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. b-1,3-glucanases fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, 2010.

BEG, Q.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.

BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18: 355-83, 2000.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial b-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.

BREUKELLEN, G.; VAN KEULEN, H. M.; MERTERS, I.; AUSEMS, M.; CAMPBELL, M.; RESNICOW, K.; BRUG, J.; VRIES, H. Tailored print communication and telephone motivational interviewing are equally successful in improving multiple

lifestyle behaviors in a randomized controlled trial. **Ann Beahay Med**, n.41, v. 1, 2011.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, p. 365-380, 2010.

BUTHELEZI, S. P.; OLANIRAN, A. O.; PILLAY, B. Sawdust and digestive bran as cheap alternate substrates for xylanase production. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.7, p.742-752, 2011.

CARVALHO, F. A.; GÓES, L. M. S.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, E. G. P.; RODRIGUES, L. B.; PIROVANI, C. P.; COSTA, A. M. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. **Food chemistry**, v. 221, p. 1499-1506, 2017.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de Resíduos Agroindustriais e do Beneficiamento de Produtos Agrícolas. **Informações Econômicas**, v. 22, n. 12, p. 32-46, 1992.

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

CAVALCANTE, P. A. W.; COELHO, D. F.; SILVA, C. F.; ABUD, A. K. S.; SOUZA, R. R. Utilização de Resíduos Lignocelulósicos na Produção de Celulases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, p. 1-9, 2018.

CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim de Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.1, p.3-23, 2005.
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2019). Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-levantamento-safra-2018-19-cana-de-acucar-210818>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

COSTA, W. L. S.; BOCCHI, M. L.M. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n.1, 2012.

COUGHLAN, M.P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: Xylans and xylanases. **Progress in Biotechnology**, p. 111-139, 1992.

DASHTBAN, M.; SCHARAFT, H.; WENSHENG, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 578-595, 2009.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresouce Technology**, v.107, p. 517-521, 2012.

DELMAS, J. Les Champignons et Leur Culture. Flammarion, **La maison Rustique**, Paris, 1989.

DHANASEKARAN, D.; LAWANYA, S.; SAHA, S.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.8, p.26-32, 2011.

DOMINGUES, J. M.; CARNEIRO, G. E.; BRAND, D.; RICARDO, W. Fermentação em estado sólido de *Aspergillus parasiticus* e produção de aflotoxinas. Universidade Federal do Paraná, **Ciências Farmaceuticas**, p. 210-170, 2015.

ELISASHVILI, V.L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biotechnology and Microbiology**, New York, v. 29, p. 257-266, 1993.

ELLILA, S.; FONSECA, L.; UCHIMA, C.; COTA, J.; GOLDMAN, G. H.; SALOHEIMO, M.; SACON, V.; SIIKA-AHO, M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology Biofuels**, p. 10-30, 2017.

EL-NAGAR, N. E.; HAROUN, S. A.; OWAIS, E. A.; SHEIER, A. A. Identification of new ly isolated Talarom yces Pinophilus and statical optimization of b-glucosidase production under solid state fermentation. **Preparative biochemistry and biotechnology**, p. 1-38, 2014.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 1727-1737, 2006.

FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVERES, I. M. C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo de cajá. **Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba**, v. 9, n. 2, p. 207-213, 2011.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants Brazilian. **Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme research**, p. 1-7, 2012.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GARG, G.; MAHAJAN, R.; KAUR, A.; SHARMA, J. Xylanase production using agro-residue in solid-state fermentation from *Bacillus pumilus* ASH for biodelignification of wheat straw pulp. **Biodegradation**, v. 22, p. 1143–1154, 2011.

GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SAREEN, V. K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Braz J Microbiology**, 39, p. 535–541, 2008.

GRAMINHA E. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid- state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.1–22, 2008.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. A survey of glucosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 233-244, 2005.

GUPTA, U.; KAR, R. Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1363-1371, 2009.

HANG, Y. D.; LEE, C. Y.; WOODAMS, E. E. A solid state fermentation system for production of ethanol from apple pomace. **Food Science**, v. 47, n. 6, p. 1851-1852, 1982.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature review, microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HASAN, S. D. M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monóceras* obtidas por fermentação em estado sólido**. Campinas: faculdade de engenharia química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

HOWELL, C. R. cotton seedling pre emergence damping off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.92, p.177-180, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2010**. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2010_v37_br.pdf>. Acesso 10 janeiro 2019.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S.; SUKUMARAN, S. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource technology**, v. 242, p. 265-271, 2017.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Geração de Bioenergia de Biomassa de Cana-de-Açúcar nas Usinas Signatárias ao Protocolo Agroambiental Paulista, Safra 2015/2016. Análises e Indicadores do Agronegócio, v.12, n. 4, 2017.

IQBAL, H. M. N.; AHMED, I.; ZIA, M. A.; IRFAN, M. Purification and Characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 149-156, 2011.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* IR05 in solid-state fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 317-326, 2014.

JAMAL, P.; SAHEED, O. K.; ALAM, Z. Bio-valorization potential of banana peels (*Musa sapientum*): an overview. **Asian Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.1-14, 2012.

JAMPALA, P.; TADIKAMALLA, S.; PREETHI, M.; ANUJAM, S. R.; UPPULURI, K. B. Concurrent production of cellulase and xylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method. **Biotechnology**, p. 7-14, 2017.

JANES, R. L. The chemistry of wood and fibres. **The pulping of wood**, 1969.

KAMAL, K.B., BALAKRISHNAN, H., RELE, M.V. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Epub ahead of print, 2004.

KAPOOR, M.; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agro-industrial wastes: Technical challenges and commercialization potential. **Agro-Industrial wastes as feedstock for enzyme production**, p. 61-83, 2016.

KAR, S.; MANDAL, A.; DAS MOHAPATRA, K. P.; MONDAL, C. K.; PATI, R. B. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 462-464, 2006.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P. A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *penicillium funiculosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008.

KATAPODIS, P., NERINCKX, W., CLAEYSSENS, M., CHISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular xylanase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2402–2409, 2006.

KHENG, P. P.; IBRAHIM, C. O. Xylanase production via solid-state fermentation. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 332, 2005.

KNOB, A. Complexo xilanolítico de *Penicillium sclerotiorum*: produção, purificação e caracterização de xilanases e de beta-xilosidades. 2009. 184f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, 2009.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. **BioMed Research International**, v. 1, p. 1-8, 2013.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S. C.; ALMEIDA, J. M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, n. 3, p. 5738-5773, 2014.

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

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis of chicken meat. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 577-566, 2009.

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

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry**, v. 124, n. 1-3, p. 1081-1099, 2005.

LAXMI, S. G.; SATISH, T.; CHAGANTI, R. S.; BRAHMAIAH, P.; HYMAVATHI, M.; PRAKASHAM, R. S. Palm fiber as novel substrate for enhanced xylanase production by isolated *Aspergillus* sp. RSP-6. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 447-455, 2008.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, e201209017, 2012.

LIEPMAN, H. A.; WIGHTMAN, R.; GESHI, N.; TURNER, S. R.; SCHELLER, H. V. *Arabidopsis* – A powerful model system for plant cell wall research. **The Plant Journal**, v. 61, p. 1107–1121, 2010.

LIESHOUT, J. V. et al. Hydrolase and glycosynthase activity of endo-1,3--glucanase from the thermophile *Pyrococcus furiosus*. **Archaea**, v. 1, p. 285-292, 2004.

LIMA, A. F. **Produção e caracterização de b-glicosidade vegetal e microbinana e sua aplicação para a conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas**. Faculdade de engenharia de alimentos, tese, 2003.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial**, v. 3, 2001.

LOPES, C. S. D. Análise ambiental da fase de acabamento do jeans. **Interfacehs Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 6, n. 3, p. 87-102, 2011.

LUO, H.; YANG, J.; LI, J.; SHI, P.; HUANG, H.; BAI, Y.; FAN, Y.; YAO, B. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, p. 1829–1839, 2010.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose. Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAALEJ, I., BELHAJ, I., AND BELGHITH, H. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: Purification and characterization. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 200-212, 2009.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; DUNLAP, V. P.; CLARK, P. D. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed. 1160p. 12.Ed, 2010.

MANNERS, D. J. et al. Some properties of a fungal -D-glucanase preparation. **Carbohydrate Research**, v. 49, p. 383-388, 1976.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). Secretaria de Produção e Agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e Agroenergia. Cana de açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural Technology**, Thailand, v. 1, n. 1, p. 67-80, jun. 2005.

MARRA, I. F.; SILVA, T. B.; SCHEUFELE, F. B.; GEBERT, D. G. C.; LANGARO, C.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M. Efeito do pH, umidade e indutores sobre a produção de celulases por *Trichoderma* sp em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 2, p. 125-131, 2015.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N. Degradabilidade de volumosos utilizando enzimas fibrolíticas. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 435-442, 2008.

MARTINS, S., MUSSATTO, S. I., MARTÍNEZ-AVILA, G., MONTANEZ-SAENZ, J., AGUILAR, C. N., & TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MARX, I. J.; WYK, N. V.; SMIT, S.; JACOBSON, D.; VILJOEM-BLOOM, M.; VOLSCHENK, H. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperrelum* S4F8

and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagace. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 2-13, 2013.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpene in grape juices and wine. **Journal of chromatography a**, v. 881, p. 557-567, 2000.

MATOS, A. T. **Tratamento e Aproveitamento Agrícola de Resíduos Sólidos**. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2014.

MAURYA, P.; SINGH, D.; PRATAP, D.; MAURYA, J. P. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of environmental biology**, v. 33, p. 5-8, 2012.

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

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications – an overview. **Research in biotechnology**, n. 2, v. 6, p. 21-26, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugar. **Anai Chem.**, p. 426-428, 1958.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio exterior – MDIC; Secretaria de Inovação – SI; Fundação Bio-Rio; **Diagnóstico De Referência Sobre Serviços De Escalonamento De Biotecnologias No Brasil**, 2012. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1350494454.pdf> Acesso em: 12 de fevereiro 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). ORGANIZAÇÃO NÃO GOVERNAMENTAL BANCO DE ALIMENTOS. Disponível em: http://www.bancodealimentos.org.br/porque/dados_fome.htm. **Agricultura Sustentável**. Brasília: MMA, p. 57, 2000.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Bioreactor design and operation for solid state fermentation. In: Curso de fermentação semi-sólida na obtenção de bioprodutos **EMBRAPA**, 2002.

MONISHA, R.; UMA, M. V.; MURTHY, V. K. Partial purification and characterization of *Bacillus pumilus* xylanase from soil source. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 5, no. II, p. 137- 148, 2009.

MURUGAN, S.; ARNOLD, D.; PONGIYA, U. D.; NARAYANAN P. M. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State Fermentation, **Enzyme Research**, 2011.

NAVA-CRUZ, N. Y.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR-GONZALÉZ, M. A.; NUNCIO, A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*. **3 Biotech**, v. 6, p. 115, 2016.

NEETHU, C. S.; MUJEEB-RAHIMAN, K. M.; ROSMINE, E.; SARAMMA, A. V.; MOHAMED-ATHA, A. A. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 703–709, 2015.

NGIKOH, B.; KARIM, N. A. A.; JAHIM, J.; BAKAN, F. D. A.; MURAD, A. M. A. Characterisation of cellulases and xylanase from *Trichoderma virens* UKM1 and its potential in oil palm empty fruit bunch (OPEFB) saccharification. **Journal of Physical Science**, v. 28, n. 1, p. 171-184, 2017.

NIGAM, P.; PANDEY, A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*. **Springer Science, Netherlands**, p. 466, 2009.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, A. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista liberato**, v. 14, n. 22, 2013.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de Interesse Industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PAI, K. C.; CHEN, W. J.; ZENG, Y. F.; TUNG, C. L.; LIU, R. J. **Cloning of the bifunctional xylanolytic enzyme gene from the ruminal fungus *Neocallmastix patriciarum* S20**. Department of Life Science, National Taiwan Normal University, 2013.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical engineering journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. **Currents developments in biotechnology and bioengineering: currents advances in solid-state fermentation**. Elsevier, p. 478, 2017.

PANDEY, A.; THOMAS, L.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, n. 81, p. 146-161, 2013.

PATHAK, P.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, A. K. Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 3776-3797, 2014.

PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBI, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D.; SIVANESSAN, S. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation. **Arab J Sci Eng**, v. 42, p. 53-63, 2017.

PESSOA, D. R.; FINKLER, A. T. J.; MACHADO, A. V. L.; LUZ, L. F. L.; MITCHELL, D. A. Fluid dynamics simulation of a pilot-scale fermentation bioreactor. *Chemical engineering transactions*, v. 46, p. 49-54, 2016.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólida: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa**, p. 2-5, 2005.

Comunicado Técnico 102, EMBRAPA, ISSN 1679-6535, Fortaleza CE, 2005.
PITSON, S. et al. Production and regulation of α -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* species. **Mycology Research**, v. 95, p. 352-356, 1991.

PRAKASHAM, R. S.; SUBBA RAO, C. H.; SHARMA, P. N. Gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation, **Bioresource Technology**, v. 97, 1449-1460, 2006.

PRASAD, N. K. **Enzyme Technology: Pacemaker of Biotechnology**. PHI Learning Pvt. Ltd., 2011.

RAHNAMA, N.; MAMAT, S.; SHAH, U. K. M.; LING, F. H.; RAHMAN, N. A. A.; ARIFF, A. B. Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and xylanase production by local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under solid state fermentation. **Bioresoucers**, n. 8, v. 2, p. 2881-2896, 2013.

RAHNAMA, N.; MAMAT, S.; SHAH, U. K. M.; LING, F. H.; RAHMAN, N. A. A.; ARRIF, A. B. Effect of Alkali Pretreatment of Rice Straw on Cellulase and Xylanase Production by Local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under Solid State Fermentation. **BioResources** v. 8, n. 2, 2013.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid State Fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.9, p. 199-209, 1980.

ROCHA, V. A. L.; MAEDA, R. N.; PEREIRA JR., N.; KERN, M.; ELIAS, L.; SIMISTER, R.; STEELE-KING, C.; GÓMEZ, L. D.; McQUEEN-MASON, S. J. Characterization of the Cellulolytic Secretome of *Trichoderma harzianum* During Growth on Sugar Cane Bagasse and Analysis of the Activity Boosting Effects of Swollenin. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, 2016.

RUBEENA, M.; NEETHU, K.; SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; PRIJI, P.; UNNI, K. N.; SARATH JOSH, M.K.; JISHA, V.N.; PRADEEP, S.; BENJAMIN, S. Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 214-221, 2013.

SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALES, M. R. Produção de enzimas do complexo celulolítico e da xilanase por *Aspergillus* sp. utilizando o bagaço de cana de açúcar como substrato. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 2289-2291, 2010.

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

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Science Technology**, v. 1, p. 45-70, 2005.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

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. 4, n. 2, 2018.

SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): obtenção de ligninases. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011.

SASHASIVAM, S.; SACITHA, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. Production, purification and characterization of mid-redox potencial laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 736-732, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI. **Biotechnologia industrial**, v. 2, 2001.

SCHUTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Application Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

SHAO, W.; XUE, Y.; WU, A.; KATAEVA, I.; PEI, J.; WU, H.; WIEGEL, J. Characterization of a novel β -Xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 719–726, 2011.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotchnology**, v. 18, p. 307-313, 2015.

SILVA, L. C. A.; HORONATO, T. L.; FRANCO, T. T.; RODRIGUES, S. Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. Under solid-state fermentation. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1564-1572, 2012.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista eletrônica de materiais e processos**, v. 3, n. 1, p. 27-32, 2007.

SIMÕES, G. L. M. **Produção de xilanases por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga**. Tese de Mestrado, Unesp, Rio Claro, São Paulo – Brasil, 2006.

SIMON, J. J.; WOOTON, S. A.; JOHNSON, T. J.; KARKI, B.; ZAHLER, J. D.; BALDWIN, B. L.; BERHOW, M.; CROAT, J. R.; GIBBONS, W. R. Solid state fermentation of Carinata (*Brassica carinata*) meal using various fungal strain to produce a protein-rich product for feed application. **Journal of Microbial e Biochemical Technology**, p. 9-2, 2017.

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

SIVANESAN, S.; PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBIZ, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation. **Research article biological sciences**, v. 42, p. 53-63, 2017.

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

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71, 2017.

SOCCOL, C.R.; CABRERO, M.A.; ROUSSOS, S. ; RAIMBAULT, M. Selection of *Rhizopus* for Growing on Raw Cassava, **VI International Symposium on Microbial Ecology**, Barcelona, 6-11 Septiembre, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed: 2009, 819p.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

THOMPSON, N.S. Hemicellulose as a biomass resource. In: Wood and Agricultural Residues; research on use for feed, fuels and chemicals. **Academic Press**, p. 101-119, 1983.

TORTORA, J. G.; FUNKE, R. B.; CASE, L. C. **Microbiologia**. 10° ed. Porto Alegre: Artmed: 2012, 964p.

VERMA, N.; BANSAL, M. C.; KUMAR, V. Pea peel waste: a lignocellulosic waste and its utility in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation. **Bioresources**, n. 6, v. 2, p. 1505-1519, 2011.

WALIA, A.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 187-198, 2013.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of Cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresouce Biotechnology**, v. 96, p. 491-499, 2005.

WITMANN, C.; LIAO, J. Industrial Biotechnology: products and processes. V. I, 2016.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York, USA: 315–322, 1990.

WONG, K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **critical reviews in biotechnology** v.12, n. 5-6, p. 413-435, 1992.

XIA, X.; LIE, T. K.; QIAN, X.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. **Microbial Ecology**, v.61, p.619–625, 2011.

ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEIN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ- 173 in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 96-102, 2013.

ZILIOLI, P.C.; WOICIECHOWSKI, A.L. ; PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. Xanthan Gum Production by Solid-State Fermentation using Cassava Bagasse as Carbon Source. In: **Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries**, v. 1, p. 52, 2004.