

Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição

Thalita Peixoto Basso⁽¹⁾, Cláudio Rosa Gallo⁽¹⁾ e Luiz Carlos Basso⁽¹⁾

⁽¹⁾Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: tpbasso@esalq.usp.br, crgallo@esalq.usp.br, lucbasso@esalq.usp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar isolados de fungos a partir de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição e avaliar a sua atividade celulolítica em bagaço de cana. Cinco isolados foram avaliados, tendo-se como referências os fungos *Trichoderma reesei* QM9414 e *T. reesei* RUT C30. A atividade celulolítica foi estimada pela capacidade hidrolítica do extrato enzimático dos fungos cultivados em bagaço de cana sobre os substratos papel de filtro (atividade celulolítica total) e carboximetilcelulose sódica (atividade da endoglucanase). Os isolados foram identificados pela análise molecular da região 26S rDNA. Os gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Acremonium/Penicillium* e *Trichoderma* foram identificados. Embora *T. reesei* QM9414 tenha apresentado a mais alta atividade celulolítica total, alguns isolados também apresentaram alta atividade de endoglucanase. A biodiversidade, em nichos como bagaço de cana-de-açúcar, pode fornecer linhagens de fungos celulolíticos com grande potencial biotecnológico.

Termos para indexação: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, celulase, endoglucanase.

Cellulolytic activity of isolated fungi from sugarcane bagasse and decayed wood

Abstract – The objective of this work was to identify fungi isolates from sugarcane bagasse and decayed wood, and to evaluate their cellulolytic activity on sugarcane bagasse. Five isolates were evaluated, as compared to *Trichoderma reesei* QM9414 and *T. reesei* RUT C30. The cellulolytic activity was estimated through the hydrolytic capacity of the enzymatic extract of fungi grown on sugarcane bagasse over filter paper (total cellulolytic activity) and sodium carboxymethyl cellulose (endoglucanase activity). The isolates were identified by molecular analysis of 26S rDNA region. *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Acremonium/Penicillium* and *Trichoderma* genera were identified. Although *T. reesei* QM9414 showed the highest total cellulolytic activity, some isolates showed higher endoglucanase activities. Biodiversity found in habitats such as sugarcane bagasse can provide strains of cellulolytic fungi with great biotechnological potential.

Index terms: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*, cellulase, endoglucanase.

Introdução

A biomassa lignocelulósica é abundante, apresenta baixo custo e tem sido vista como uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis (Galbe & Zacchi, 2002; Gomez et al., 2008). Contudo, os resíduos lignocelulósicos agrícolas apresentam composição físico-química complexa, que oferece resistência ao ataque químico ou bioquímico e dificulta sua conversão, mediante a hidrólise, em materiais com alto valor agregado (Champagne, 2008).

A lignocelulose é composta por três constituintes principais: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é formada por cadeias lineares de D-glicose com ligações β -(1 \rightarrow 4), cujas cadeias, fortemente alinhadas e ligadas

entre si, formam uma fita altamente ordenada, cristalina, relativamente inacessível ao ataque enzimático. Como resultado, a celulose é muito resistente, muito estável e de difícil degradação. A hemicelulose forma uma cadeia altamente ramificada de xilose e arabinose, contém também glicose, manose e galactose, e é mais facilmente hidrolisável (Taiz & Zeiger, 2004).

O processo de hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de um complexo celulolítico, normalmente de fungos, formado por endoglucanases, exoglucanases e β -D-glicosidases; porém, este processo apresenta alto custo e baixa produtividade (Zhang et al., 2006). Apesar disso, uma grande variedade de microrganismos tem sido usada para

cultivo em bagaço de cana, com o objetivo de produção de celulases. Os fungos filamentosos, especialmente Basidiomycetes, são os mais utilizados para a produção dessas enzimas (Pandey et al., 2000). Entre esses fungos, *Trichoderma reesei* é reconhecido pela produção de diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (Béguin, 1990).

Fungos necessitam de baixa umidade (40–60%) para realizar a fermentação de substratos em estado sólido (FES). A seleção do substrato, no entanto, depende de vários fatores relacionados principalmente ao custo e à disponibilidade. Neste sentido, a seleção de resíduos agroindustriais pode ser interessante (Singhania et al., 2009). Latifian et al. (2007) testaram diferentes níveis de umidades (40, 55, 70%) no farelo de arroz e obtiveram os melhores resultados de atividade de celulase do fungo *T. reesei* QM9414 com 70% de umidade.

A FES tem sido utilizada com diferentes resíduos agroindustriais como palha de arroz (Khan et al., 2007), farelo de arroz (Latifian et al., 2007), farelo de trigo (Camassola & Dillon, 2007), bagaço de cana-de-açúcar (Massadeh et al., 2001; Muthuvelayudham & Viruthagiri, 2006). Esse bioprocessamento tem sido apontado como alternativa para mitigar problemas de poluição ambiental (Soccol & Vandenberghe, 2003).

Há uma grande variedade de fungos e substratos utilizados para produção de celulases. Kang et al. (2004) estudaram a produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus niger* KK2 em palha de arroz e farelo de trigo. Aguiar & Menezes (2000) avaliaram a atividade enzimática de *A. niger* IZ-9 em bagaço de cana-de-açúcar, e Camassola & Dillon (2007) utilizaram *Penicillium echinulatum* em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.

A grande disponibilidade de biomassa lignocelulósica de baixo custo, como a do bagaço de cana-de-açúcar, no Brasil, estimula a busca por

microrganismos mais eficientes no uso desse resíduo. Para a produção de etanol, a hidrólise química apresenta baixo rendimento, em razão da degradação parcial desses resíduos pelo uso de ácido e pela formação de compostos que, além de não serem fermentescíveis, podem inibir a atividade da levedura. Ademais, o uso frequente de ácido causa corrosões nos equipamentos e aumenta os riscos de acidentes pelo seu manuseio (Menezes, 1980). Assim, a hidrólise enzimática tem sido preferida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana e de madeira em decomposição, tendo-se como referências as linhagens *Trichoderma reesei* QM9414 e RUTC30, conhecidas por suas elevadas capacidades hidrolíticas.

Material e Métodos

As amostras de madeira em decomposição foram coletadas no parque da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, e as de bagaço de cana-de-açúcar nas usinas de açúcar Graneli e Furlan, em Piracicaba, SP (Tabela 1). Uma amostra de 5 g foi homogeneizada com 45 mL de água peptonada a 0,1%, e alíquotas foram plaqueadas em meio PDA sólido, com tetraciclina (100 mg L⁻¹), e incubadas a 28°C. Após o crescimento em placas, os isolados foram coletados, tendo-se buscado a diversidade morfológica das colônias, e repicados em PDA. Após crescimento a 28°C por 7 dias, discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro da porção central da colônia, com micélio, foram recortados e armazenados à temperatura ambiente em vidros de cor âmbar com água esterilizada.

Os isolados foram identificados por análise molecular da região 26S rDNA. A reação de PCR para amplificação foi realizada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguida de um ciclo com uma primeira etapa de

Tabela 1. Origem, nomenclatura e identificação dos isolados por análise molecular.

Origem	Nomenclatura	Pares de bases	Melhor concordância Blast	Identidade
Esalq ⁽¹⁾	MAD	470	<i>Trichoderma</i> sp RA 305 (GQ169750)	100%
Usina Furlan	F1	507	<i>Peecilomyces variotti</i> (FJ345354)	98%
Usina Furlan	F2	400	<i>Moniliophthora perniciososa</i> (AY916742)	98%
Usina Furlan	F4	440	<i>Aspergillus fumigatus</i> (HM807348)	93%
Usina Graneli	G3	540	<i>Acremonium cellulolyticus</i> (AB474751)	99%
			<i>Penicillium verruculosum</i> (AF510496)	99%

⁽¹⁾Madeira em decomposição.

desnaturação a 94°C por 1 min; uma segunda etapa de 1 min de anelamento a 55°C; e, finalmente a terceira etapa, de extensão, a 72°C durante 1 min. Este ciclo foi repetido por 35 vezes. Ao final da ciclagem, houve uma etapa de extensão final a 72°C durante 7 min. As reações foram conduzidas no termociclador modelo GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os iniciadores específicos NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') e NL1 (5'-GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3') amplificam fragmentos de 600 pares de bases (Kurtzman & Robnett, 1998; Leal Junior et al., 2008). Os produtos da amplificação do gene 26S rDNA foram sequenciados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade de São Paulo. O sequenciamento foi realizado com o protocolo padrão do Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences, Foster City, EUA). O sequenciador utilizado foi o ABI Prisma-3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

As sequências foram analisadas por meio do programa Chromas Lite versão 2.01 (Technelysium, 2005). Os cromatogramas obtidos foram examinados para verificação da qualidade com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (Hall, 1999). A identificação dos fungos (Tabela 1) foi realizada com a ferramenta Blast (National Center for Biotechnology Information-NCBI). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados público GeneBank do NCBI, para a certificação da região amplificada. O alinhamento foi realizado no programa Mega, versão 4 (Tamura et al., 2007).

Os isolados foram avaliados quanto à atividade celulolítica, tendo-se tomado as linhagens de *T. reesei* QM9414 e RUT C30 como referência por suas elevadas capacidades hidrolíticas.

No experimento 1, compararam-se as duas linhagens de *T. reesei*, por serem amplamente utilizadas na literatura. Os fungos foram repicados em tubos inclinados ("slants"), com PDA, e incubados nas mesmas condições anteriores até a esporulação. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de 10 mL de Triton-100 a 0,1%, para obtenção de concentrações de 2×10^7 e 6×10^7 esporos mL⁻¹, para as linhagens RUTC30 e QM9414, respectivamente.

Em frasco Erlenmeyer de 250 mL, foram colocados 2,5 g do bagaço e 25 mL da solução de sais, conforme Mandels & Weber (1969). Após esterilização em autoclave (121°C por 30 min), 1 mL da suspensão de esporos foi adicionada ao frasco Erlenmeyer, para incubação a 28°C. Nos 3º, 6º, 9º, 12º e 15º dias de incubação, 40 mL de tampão citrato 0,05 mol L⁻¹ (pH, 4,8) foram adicionados a cada frasco e submetidos à agitação a 150 rpm, à temperatura ambiente, por 1 hora. A fase líquida foi separada por meio de filtração, com o auxílio de seringa e algodão, para obtenção do extrato enzimático no qual foram estimadas as atividades enzimáticas.

O experimento 2 foi conduzido em condições idênticas, porém, com os isolados F1, F2, F4, G3, MAD (Tabela 1) e *T. reesei* QM9414, cujas suspensões de esporos tiveram concentrações de 3×10^8 , 6×10^7 , 5×10^7 , 3×10^8 , 2×10^7 e 3×10^8 esporos mL⁻¹, respectivamente. Diluições foram realizadas de modo que todos os fungos tivessem a mesma concentração (10^7 esporos mL⁻¹). As amostras foram retiradas apenas aos 10 dias de incubação.

Para determinação da atividade de celulase total (FPase), utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose (1987), tendo-se empregado como substrato o papel de filtro Whatman nº1, cortado em tiras de 1x6 cm e com, aproximadamente, 50 mg. O substrato foi colocado em tubos com capacidade de 25 mL, tendo-se adicionado 1 mL de tampão citrato 0,05 mol L⁻¹ (pH, 4,8) e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 60 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada, pela reação com ácido dinitrosalicílico, conforme Miller (1959).

Para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase), utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose (1987), tendo-se empregado como substrato a carboximetilcelulose sódica a 2%, em tampão citrato 0,05 mol L⁻¹ (pH, 4,8). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos com capacidade de 25 mL, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 30 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada, também pela reação com ácido dinitrosalicílico.

Para ambas as atividades enzimáticas, utilizaram-se controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima) e do substrato (branco da reação), separadamente, dos valores de absorbância obtidos.

Os valores de absorvância (a 540 nm) foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose, mediante reta padrão previamente estabelecida. As quantidades de glicose liberada nas reações enzimáticas ficaram abaixo de 2 mg, no caso da FPase, e os valores de atividade foram estimados segundo recomendação de Ghose (1987). Considerou-se 1 unidade internacional (UI) equivalente a 1 μmol de glicose liberada por min, que corresponde a 0,18 mg de glicose por minuto. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica em relação ao conteúdo de proteínas nos extratos enzimáticos, estimadas segundo Bradford (1976).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, com três repetições. As parcelas principais foram constituídas dos períodos de incubação, e as subparcelas com as linhagens dos fungos, no caso do primeiro ensaio. No segundo experimento, considerou-se o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (fungos) e três repetições. As comparações de médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com uso do programa Estat (1992).

Resultados e Discussão

O crescimento das linhagens de *T. reesei* QM9414 e RUT C30 foi visível quando utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar embebido com a solução de sais minerais, com colonização de toda a superfície do meio já com nove dias, sem diferença para os dois fungos avaliados. No entanto, a atividade enzimática de celulase dos respectivos extratos foi superior para a linhagem QM9414 (Figura 1 A e B). Latifian et al. (2007), ao trabalhar com *T. reesei* QM9414, obtiveram atividade máxima de 1,2 UI g^{-1} após oito dias, a 30°C, com uso de farelo de arroz como substrato. No presente trabalho, observou-se atividade de 2,3 UI g^{-1} no 15º dia, com bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Singhania et al. (2007) ao utilizar *T. reesei* RUT C30 em farelo de trigo, obtiveram atividade de celulase total de 0,17 UI g^{-1} de substrato com 5 dias de cultivo, valor próximo ao encontrado no presente trabalho para o mesmo microrganismo (Figura 1 B).

Khan et al (2007) utilizaram *Trichoderma* spp. e obtiveram atividade celulósica total de 0,10 UI mL^{-1}

de extrato enzimático, com uso de palha de arroz como substrato, com 8 dias de cultivo, valores inferiores aos observados no presente trabalho por *T. reesei* QM9414 (Figura 1 A).

A atividade enzimática de endoglucanase da linhagem QM9414 mostrou-se igualmente superior àquela da linhagem RUT C30 (Figura 1 C e D). Enquanto a atividade de celulase total aumentou durante o período estudado (Figura 1 A e B), a atividade de endoglucanase foi quase constante, no caso da linhagem QM9414. Na Figura 1 C, observa-se maior atividade de CMCase de *T. reesei* RUT C30 no 9º dia, estatisticamente diferente apenas do 3º dia, pois a atividade manteve-se constante do 6º ao 15º dia. A atividade máxima de endoglucanase para *T. reesei* QM9414 foi de 0,5 UI mL^{-1} , no 15º dia.

Ao trabalhar com *Trichoderma* spp, Khan et al (2007) obtiveram atividade de endoglucanase de 0,7 UI mL^{-1} de extrato enzimático, com o uso de palha de arroz como substrato com 8 dias de cultivo, valores pouco superiores aos obtidos no presente trabalho pelas cepas de *T. reesei* (Figura 1 C).

Na Figura 1 D, a atividade máxima de CMCase foi de 3,5 UI g^{-1} para *T. reesei* RUT C30, e de 5,7 UI g^{-1} para *T. reesei* QM9414, no 15º dia.

Camassola & Dillon (2007) obtiveram atividade de endoglucanase de 20 UI g^{-1} , em bagaço de cana-de-açúcar tratado com NaOH, com o uso de *Penicillium echinulatum* e cinco dias de cultivo.

A atividade específica da CMCase, em relação à celulase total, apresentou queda nas duas linhagens de *T. reesei*, a partir do 3º dia, com diferença estatística entre as cepas ao longo do cultivo (Figura 1 E), o que indica que, nos primeiros dias de cultivo, a fração proteica é mais rica em enzimas celulolíticas totais.

A atividade específica em relação à endoglucanase apresentou queda ao longo dos 15 dias, tanto para *T. reesei* QM9414 quanto para *T. reesei* RUT C30, porém não diferiu entre as linhagens. Como a atividade de endoglucanase se manteve constante, com base na massa de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 1 D), a queda observada na atividade específica em relação à proteína presente (Figura 1 F) pode ser consequência de maior liberação de proteínas sem atividade celulolítica no meio de crescimento, ao longo das amostragens.

Uma vez constatada a superioridade da linhagem QM9414 sobre a RUT C30, quanto à atividade celulolítica no cultivo em bagaço de cana-de-açúcar,

ela foi utilizada como referência na avaliação dos isolados no experimento 2. Embora todos os isolados tenham tido boa capacidade de colonização do bagaço, a atividade celulolítica total mostrou-se inferior à exibida pela linhagem referência (Figura 2 A e B). Após 10 dias de fermentação, a atividade alcançada por *T. reesei* QM9414 foi de 0,16 UI mL⁻¹ de extrato, enquanto atividades de 0,06 UI mL⁻¹ foram

observadas com a linhagem F4 (*Aspergillus fumigatus*) e 0,05 UI mL⁻¹ com o isolado MAD (*Trichoderma* sp. RA 305). Khan et al. (2007) obtiveram atividade de celulase total de 0,10 UI mL⁻¹ para *Trichoderma* spp., após oito dias de cultivo em palha de arroz, valores superiores aos observados no presente trabalho para *Paecilomyces variotti* (F1), *A. fumigatus* (F4), *Acremonium cellulolyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma* sp. RA 305 (MAD).

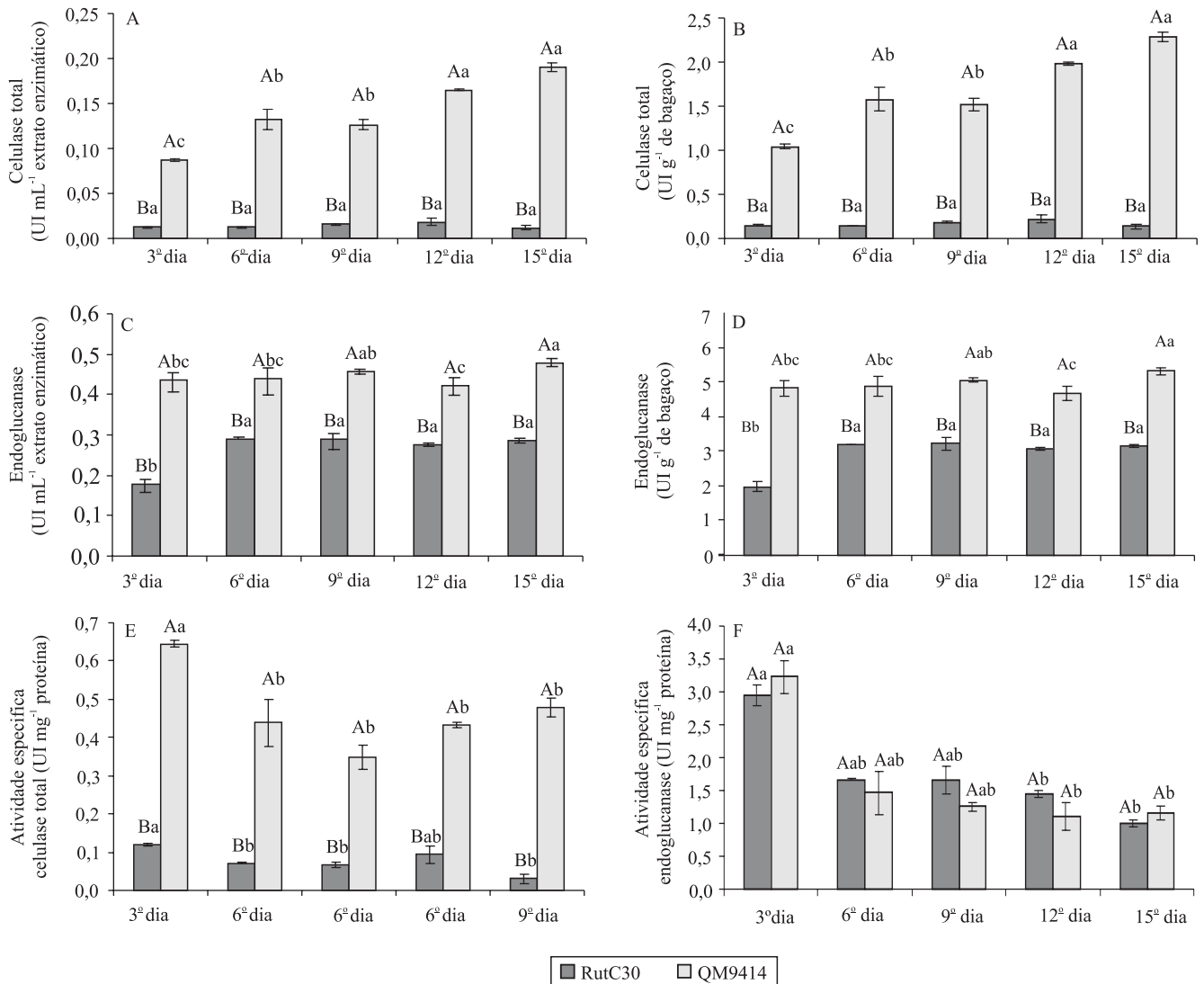


Figura 1. Atividade enzimática da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) e atividade específica dessas enzimas, para as linhagens de *Trichoderma reesei* RUT C30 e QM9414, no transcorrer de 15 dias de crescimento a 28°C. (A), atividade da FPase expressa em UI mL⁻¹ de extrato enzimático; (B), atividade da FPase expressa em UI g⁻¹ de bagaço; (C), atividade de CMCase expressa em UI mL⁻¹ de extrato enzimático; (D), atividade da CMCase expressa em UI g⁻¹ de bagaço; (E), atividade específica da FPase (UI mg⁻¹ de proteína) em substrato papel de filtro; e (F), atividade específica da CMCase em carboximetilcelulose como substrato. Médias±desvio-padrão seguidas de letras iguais, maiúsculas em um mesmo dia e minúsculas em uma mesma linhagem, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Aguiar & Menezes (2000), ao utilizar *Aspergillus niger* IZ-9 aos sete dias de incubação em bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram valores de atividade de celulase total de 0,05 UI mL⁻¹, valor próximo aos observados com os isolados deste trabalho (Figura 2 A).

Trichoderma reesei QM9414 também apresentou o maior valor de atividade de celulase total em

relação à massa de substrato: 4 UI g⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar. Os demais isolados apresentaram atividade enzimática inferior à do fungo referência (Figura 2 B). Comparativamente, Latifian et al. (2007) obtiveram atividade de celulase total de 1 UI g⁻¹ de farelo de arroz, ao utilizar *T. reesei* QM9414, enquanto Camassola & Dillon (2007) relataram atividade de

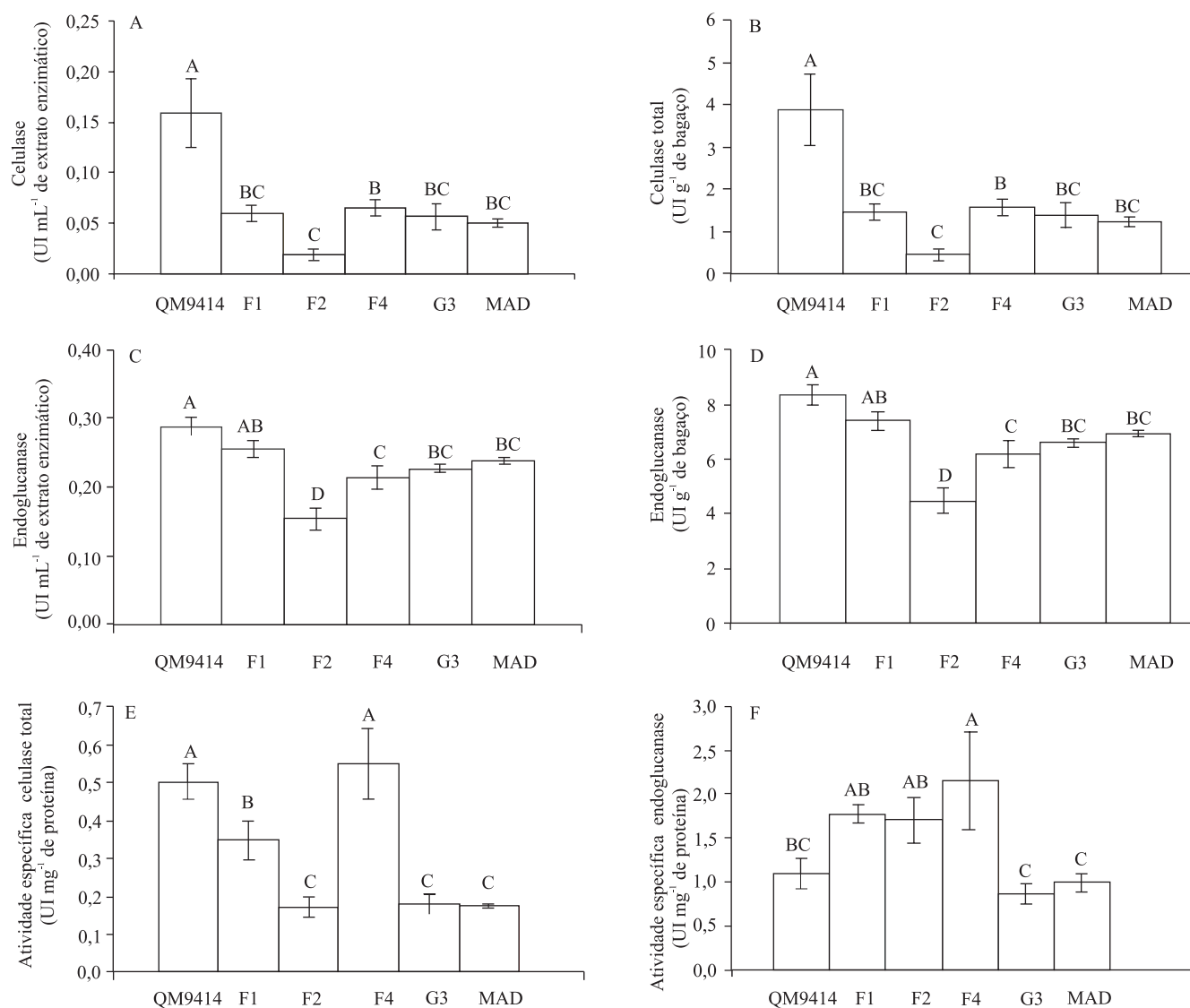


Figura 2. Atividade enzimática da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) e atividade específica dessas enzimas, quanto às linhagens de *Trichoderma reesei* QM9414 e dos isolados *Peecilomyces variotti* (F1), *Moniliophthora perniciosa* (F2), *Aspergillus fumigatus* (F4), *Acremonium cellulolyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma* sp. RA 305 (MAD), no transcórter de 10 dias de crescimento a 28°C. (A), atividade da FPase expressa em UI mL⁻¹ de extrato enzimático; (B), atividade da FPase expressa em UI g⁻¹ de bagaço; (C), atividade de CMCase expressa em UI mL⁻¹ de extrato enzimático; (D), atividade da CMCase expressa em UI g⁻¹ de bagaço; (E), atividade específica da FPase (UI mg⁻¹ de proteína) em substrato papel de filtro; e (F), atividade específica da CMCase em carboximetilcelulose como substrato. Médias±desvio-padrão seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

celulase total de 1 UI g⁻¹ de bagaço pré-tratado, ao utilizar *Penicillium echinulatum*, com cinco dias de fermentação, valores inferiores aos dos isolados *Paecilomyces variotti* (F1), *Aspergillus fumigatus* (F4), *Acremonium cellulolyticus*/*Penicillium verruculosum* (G3) e *Trichoderma* sp. RA 305 (MAD) em bagaço sem tratamento. Kang et al. (2004), ao utilizar o mutante *Aspergillus niger* KK2, com dois dias de incubação, obtiveram valores de atividade de celulase total de 5 UI g⁻¹ de palha de arroz, próximos aos alcançados com *T. reesei* QM9414 no presente trabalho (4 UI g⁻¹).

O isolado *Paecilomyces variotti* (F1) não diferiu estatisticamente da cepa QM9414 (Figura 2 C e D) quanto à atividade de endoglucanase. Os isolados F1, G3 e MAD tiveram, respectivamente, valores de 7,4, 6,6 e 6,9 UI g⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar in natura, para endoglucanase (Figura 2 D).

Entre os fungos testados, o *Aspergillus fumigatus* (F4) não diferiu estatisticamente de *T. reesei* QM9414 em relação à atividade específica de celulase total (Figura 2 E). Quanto à atividade específica de endoglucanase, esse isolado teve o maior valor, o que indica maior concentração dessa proteína enzimática na fração proteica do extrato (Figura 2 F).

Conclusões

1. As linhagens *Trichoderma reesei* QM9414 e RUT C30 apresentam grandes diferenças em suas atividades celulolíticas.

2. A linhagem *T. reesei* QM9414 tem maior atividade de celulase total e endoglucanase, em comparação à linhagem *T. reesei* RUT C30, e as enzimas são excretadas nos três primeiros dias de incubação.

3. Os isolados *Paecilomyces variotti*, *Aspergillus fumigatus*, *Acremonium cellulolyticus*/*Penicillium verruculosum* e *Trichoderma*, também são bons produtores de enzimas celulolíticas, embora menos eficientes que *T. reesei* QM9414.

4. Substratos naturais e industriais, como a madeira em decomposição ou o bagaço de cana-de-açúcar, permitem o isolamento e seleção de linhagens com grande potencial de utilização biotecnológica.

Referências

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ₉ usando fermentação submersa

sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.18, p.57-70, 2000.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.

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

CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2196-2204, 2007.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, v.27, p.51-57, 2008.

ESTAT. **Sistema de análise de variância estatística**. Versão 2.0. Jaboticabal: UNESP, 1992.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.618-628, 2002.

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

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

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

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

KHAN, M.H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.42, p.381-386, 2007.

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

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.

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

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

- MASSADEH, M.I.; YUSOFF, W.M.W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1771-1774, 2001.
- MENEZES, T.J.B. de. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 233p.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.1873-1881, 2006.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.
- 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.
- SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Improved cellulose production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.142, p.60-70, 2007.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.
- TECHNELYSIUM. **ChromasPro**. 2005. Available at: <www.technelysium.com.au>. Accessed on: 09 Dec. 2010.
- ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-481, 2006.

Recebido em 5 de julho de 2010 e aprovado em 4 de outubro de 2010