



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

SIMONE LOPES DO RÊGO DE OLIVEIRA

**Otimização da produção de celulases de *Melanoporia* sp. por fermentação
submersa**

FORTALEZA

2014

SIMONE LOPES DO RÊGO DE OLIVEIRA

**Otimização da produção de celulasas de *Melanoporia* sp. por fermentação
submersa**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues.

Co-orientadora: Dr^a Célia Maria A. Galvão.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia – BPGE

O51o Oliveira, Simone Lopes do Rêgo de.

Otimização da produção de celulases de *Melanoporia sp.* por fermentação submersa / Simone Lopes do Rêgo de Oliveira. – 2014.

111 f. : il. color. , enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

Coorientação: Profa. Dra. Célia Maria A. Galvão.

1. Engenharia Química. 2. Enzimas. 3. Resíduos. I. Título.

CDD 660

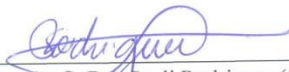
SIMONE LOPES DO RÊGO DE OLIVEIRA

**Otimização da produção de celulases de *Melanoporia* sp. por
fermentação submersa**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 19/12/2014.

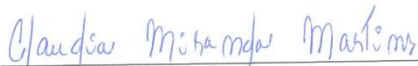
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Sueli Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr^ª. Maria Cristiane Rabelo
Embrapa Agroindústria Tropical – (EMBRAPA)



Prof^ª. Dr^ª. Claudia Miranda Martins
Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr^ª. Nair do Amaral Sampaio Neta
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof^ª. Dr^ª. Maria Valderey Rocha Ponte
Universidade Federal do Ceará – UFC

À Deus, presente em todos os momentos em minha vida, pois serviram para o meu crescimento espiritual; minha mãe, meu esposo e meus filhos por serem impulsionadores nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à DEUS, por ser a luz da minha vida, o meu sustento, minha força, meu escudo, minha fortaleza, minha rocha inabalável, o meu refúgio e ter me dado sabedoria guiando sempre os meus passos.

Ao meu amado esposo Luiz Henrique fonte de incentivo, amor, companheirismo e paciência, obrigada por ter acreditado em mim, ter vivido comigo cada momento de alegria, tristeza, ansiedade e dificuldade. Toda minha gratidão por me fazer acreditar que tudo daria certo e por ser incondicionalmente meu maior incentivador. Obrigada porque você, iluminado por Deus, nunca me deixou desistir.

À minha amada mãe Zenilda que foi o início de tudo, que é meu porto seguro e exemplo de força e honestidade, todo meu amor.

Aos meus filhos Luiz Henrique Filho e Paulo Henrique, que me fazem a cada dia viver a alegria de ser uma mãe muito abençoada por Deus.

Professora Dra. Sueli Rodrigues muito obrigada pela oportunidade de conhecê-la, por sua orientação, competência, sabedoria, confiança e apoio constante em todos os momentos na execução deste trabalho. Obrigada porque sempre nos momentos difíceis me aconselhou e entendeu meus desafios pessoais.

À Sonaly, minha secretária, que muitas vezes teve que trabalhar horas extras para cuidar dos meus filhos e eu poder escrever esta tese, a você toda minha gratidão.

Às profas. Dras. Claudia e Valderez e Dras. Maria Cristiane e Nair por tão gentilmente aceitarem participar da banca de defesa desta Tese.

À Thatyane Vidal pelas valiosas sugestões, amizade, constante presença nas alegrias, tristezas, incertezas e por sua fundamental ajuda na realização desse trabalho.

À Ana Raquel, pela valiosa ajuda com seu conhecimento em química e por sempre me fortalecer espiritualmente quando eu mais precisava.

À Dayana Pinto, bolsista de iniciação científica, um presente que Deus me deu ao longo deste Doutorado. Obrigada Senhor, porque sem a ajuda da Day, seria muito difícil.

Às amigas, Tatiane Maciel e Soraya Sancho, pela amizade, incentivo, paciência e ajuda incondicional na execução deste projeto, todo meu amor e admiração.

Aos meus formadores comunitários, João Carlos e Deusenir, e à minha formadora pessoal, Socorro Almeida. Sem a oração de vocês e a dispensa concedida seria muito difícil a concretização deste trabalho no prazo determinado. Obrigada Espírito Santo por iluminar meus pais espirituais.

Às amigas do labiotec Mariana Santiago, Cláudia Patrícia, Imilena, Niédila, Rosane, Diva, Tati Nunes, Carol e Livia pela sincera amizade, companheirismo, carinho e ótima convivência.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto da EMBRAPA – Agroindústria Tropical pela doação do pó da casca de coco verde utilizado neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro concedido durante o período de doutorado. A FUNCAP e a CAPES pelo apoio financeiro através do PRONEX.

À UFC, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e ao Labiotec pela estrutura necessária à realização deste trabalho.

“Não ajunteis para vós tesouros na terra; onde a traça e a ferrugem os consomem, e onde os ladrões minam e roubam. Mas ajuntai para vós tesouros no céu, onde nem a traça nem a ferrugem os consomem, e onde os ladrões não minam e nem roubam. Porque onde estiver o teu tesouro, aí estará também o teu coração.”

Mateus 6 (19-21)

RESUMO

Celulases são um complexo enzimático constituído por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas com diversas aplicações biotecnológicas. No entanto, o elevado custo de produção dessas enzimas é o principal obstáculo para sua aplicação industrial. Estima-se que cerca de 40% do custo total de produção de celulases esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo. Nesse contexto, é de fundamental importância o desenvolvimento de processos para a produção de enzimas do complexo celulolítico que se mostrem técnico e economicamente viáveis. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de celulases produzidas por *Melanoporia* sp. utilizando o pó da casca de coco como substrato em fermentação submersa. A influência dos parâmetros pH e temperatura na determinação da atividade da enzima foi avaliada através de planejamento experimental univariado. Em seguida, a composição do meio de cultura foi otimizada através dos planejamentos experimentais Placket-Burman e Composto Central. A fermentação em condições otimizadas foi posteriormente conduzida em fermentador para avaliar a influência do controle de pH e oxigênio na produção da enzima. A estabilidade da enzima foi avaliada por 6 e 8 meses nas temperaturas de 4 °C e -20 °C, respectivamente. A capacidade das enzimas em hidrolisar o pó da casca do coco foi avaliada nas temperaturas de 65 °C e 80 °C utilizando o extrato enzimático bruto produzido por *Melanoporia* sp. A atividade da enzima foi determinada através da quantificação de açúcares redutores pelo método de DNS. O pH e a temperatura de determinação da atividade enzimática foram pH 5,5 e 80 °C, respectivamente. A composição do meio de cultura que proporcionou o maior rendimento de produção da enzima foi: 5 g/L de casca de coco; 15 g/L de lactose; 3% de *tween* 80; 1 g/L de KH_2PO_4 e 0,05 g/L de FeSO_4 ; pH 6,5 a 30 °C em 72 horas. Para a produção da enzima em fermentador, o meio de cultura utilizando substrato não deslignificado, com controle do pH em 6,5, sem aeração proporcionou um aumento de 90% na atividade da enzima, comparado à fermentação em shaker. Nessas condições, a máxima produção da enzima foi obtida após 24 horas de fermentação. O extrato enzimático bruto produzido por *Melanoporia* sp. exibiu capacidade de hidrolisar celulose presente na casca de coco com eficiência, apresentando potencial industrial para a degradação de resíduos lignocelulósicos. Diferentemente da maior parte das celulases produzidas por espécies de *Trichoderma*, micro-organismo reportado como bom produtor de enzimas celulolíticas, o micro-organismo utilizado neste trabalho é capaz de produzir celulases de forma eficiente, sem necessidade de pré-tratamento do substrato. Outra característica diferencial desta enzima é sua elevada estabilidade nas temperaturas de -20 °C e 4 °C no caldo bruto.

Palavras-chave: Enzimas; Bioprocessos e Resíduos lignocelulósicos

ABSTRACT

Cellulases are enzyme complex composed of endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases with several biotechnological applications. However, their production cost is a major obstacle for its industrial application. About 40% of the total cellulase production cost is related to the culture medium used for the microorganism growth. In this context, efficient processes for cellulolytic enzyme production are of technical and economical interest. Thus, the present study aimed to optimize the production of cellulases by *Melanoporia* sp. using coconut shell powder as substrate in submerged fermentation. The influence of pH and temperature on the enzyme activity was evaluated by univariate experimental design. Then, the composition of the culture medium was sequentially optimized through Placket-Burman followed by Central Composite experimental designs. The fermentation under optimized conditions was subsequently conducted in bioreactor to evaluate the influence of pH control and aeration on enzyme production. The stability of the enzyme was evaluated for 6 and 8 months at 4 °C and -20 °C, respectively. The ability of the enzyme to hydrolyze coconut shell powder was evaluated at 65 °C and 80 °C using the crude enzyme extract produced by *Melanoporia* sp. The enzyme activity was determined by the quantification of reducing sugars using DNS method at pH 5.5 and 80 °C (optimum conditions). The composition of the culture medium which provided the highest enzyme yield was: 5 g/L of coconut shell; 15 g/L lactose; 3% tween 80; 1 g/L of KH_2PO_4 and 0.05 g/L FeSO_4 ; pH 6.5 at 30 °C for 72 hours. For batch enzyme production, the culture medium using non-delignified substrate, with pH controlled at 6.5, without aeration resulted in an increase of 90% in enzyme activity compared to the fermentation in a rotatory shaker. Under these conditions, the maximal enzyme production was obtained after 24 hours of fermentation. The crude enzyme extract produced by *Melanoporia* sp. was able to hydrolyze cellulose (coconut shell powder) efficiently, presenting industrial potential for the degradation of lignocellulosic residues. Unlike most of the cellulases produced by *Trichoderma* species, the strain reported as one of the best producers, the microorganism was capable of producing cellulases efficiently without the need of substrate pretreatment. Another feature of this enzyme complex is its high stability in the crude broth at -20 °C e 4 °C.

Keywords: Enzymes; Bioprocess and Lignocellulosic residues.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Celulases	16
2.2 Resíduos lignocelulósicos	17
2.2.1 <i>Casca de coco verde</i>	19
2.3 Fungos celulolíticos	20
2.3.1 <i>Melanoporia</i> sp	21
2.3.2 <i>Mucor circinelloides</i>	22
2.4 Indutores da produção de celulases	24
2.5 Influência do pH e temperatura sobre a atividade enzimática	25
2.6 Hidrólise enzimática	26
2.7 Custo de produção de celulases	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Substratos para a fermentação	32
3.2 Micro-organismos	33
3.3 Preparo do inóculo	33
3.4 Meio de cultura e ensaio para a produção da enzima	34
3.5 Determinação da atividade total de celulase	34
3.6 Determinação do pH e temperatura ótima de atividade enzimática da celulase produzida por <i>Melanoporia</i> sp	35
3.7 Otimização da composição do meio de cultura para produção de celulases	35
3.7.1 <i>Efeito e concentração de sais minerais</i>	35
3.7.2 <i>Efeito da fonte de nitrogênio e tween 80</i>	37
3.7.3 <i>Otimização da concentração de pó da casca de coco, lactose e tween 80</i>	37
3.8 Otimização do pH inicial de produção de celulases	38
3.9 Experimentos realizados em biorreator	38
3.9.1 <i>Preparo e composição do meio de cultivo</i>	39
3.9.2 <i>Influência do controle de pH durante a fermentação</i>	40
3.9.3 <i>Influência da injeção de O₂ durante a fermentação</i>	40
3.10 Pré-tratamento da casca de coco	40

3.11 Determinação das atividades de enzimas presentes no extrato bruto.....	40
3.11.1 Atividade de celulases – <i>Fpase</i>	41
3.11.2 Atividade de xilanase.....	41
3.11.3 Atividade de carboximetilcelulase (<i>CMCase</i>).....	42
3.11.4 Atividade de celobiase.....	42
3.11.5 Atividade de ligninase.....	42
3.12 Avaliação da influência da temperatura e pH na estabilidade da enzima celulase	43
3.13 Influência da temperatura de estabilidade durante a estocagem.....	44
3.14 Concentração e caracterização das celulases produzidas por <i>Melanoporia</i> sp. .	45
3.14.1 Precipitação com sulfato de amônio e polietilenoglicol-PEG.....	45
3.14.2 Concentração em sistema de ultrafiltração (<i>Amicon</i>).....	45
3.14.3 Concentração em rotaevaporador.....	46
3.14.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>).....	46
3.15 Hidrólise enzimática da casca de coco.....	46
3.16 Quantificação dos produtos de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência (<i>CLAE</i>).....	48
3.16.1 Preparação das amostras para análise de carboidrato no <i>CLAE</i>	48
3.16.2 Determinação da concentração de açúcares por <i>CLAE</i>	48
3.17 Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Seleção do substrato e da linhagem fúngica melhor produtora de celulases.....	50
4.2 Caracterização da casca de coco.....	50
4.3 Otimização da temperatura e pH de determinação da atividade enzimática.....	51
4.4 Otimização da composição do meio de cultura para produção de celulases.....	54
4.4.1 Efeito e concentração de sais minerais.....	54
4.4.2 Efeito da fonte de nitrogênio e tween 80.....	59
4.4.3 Efeito da concentração da casca de coco, lactose e tween 80 na produção de celulase.....	61
4.5 Otimização do pH do meio de produção enzimática.....	69
4.6 Resumo da otimização dos parâmetros estudados para a enzima celulase de <i>Melanoporia</i> sp. realizada em incubadora tipo <i>shaker</i>	71
4.7 Experimentos realizados em biorreator.....	72
4.7.1 Determinação do tempo de fermentação.....	72

4.7.2 <i>Influência da injeção de O₂ durante o processo fermentativo na produção da enzima</i>	74
4.7.3 <i>Influência do controle do pH durante o processo fermentativo na produção da enzima</i>	75
4.8 Efeito da deslignificação sobre a produção de celulasas.....	76
4.9 Determinação das atividades enzimáticas de xilanase, CMCase e celobiase.....	77
4.10 Estabilidade enzimática em diferentes condições de pH e temperatura.....	78
4.11 Estabilidade de celulasas em função da estocagem em baixas temperaturas.....	84
4.12 Determinação do perfil de proteínas presentes no extrato enzimático de <i>Melanoporia</i> sp. através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	86
4.13 Hidrólise enzimática da casca de coco.....	89
4.14 Análise dos produtos de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE.....	93
5. Estimativa dos custos no processo de produção de celulasas por <i>Melanoporia</i> sp.	95
6. CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

Celulases são um complexo enzimático constituído por endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) ou exoglucanases e β -glicosidases (RODRIGUES, 2013; NARRA *et al.*, 2014). Essas enzimas podem ser utilizadas em diversos processos industriais como na preparação do malte da cerveja, em processos de extração de sucos vegetais, pigmentos, alcalóides, amido e no processo de produção de papel. Além disso, as celulases são indispensáveis na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (ANNAMALAI *et al.*, 2014; IRSHAD *et al.*, 2013; MUTHUKRISHNAN, 2007).

As celulases são produzidas por um amplo espectro de bactérias e fungos, porém a produção de celulases por fungos é mais amplamente disseminada na natureza e consequentemente, mais estudada por pesquisadores. Dentre os fungos celulolíticos destacam-se as espécies *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (IQ BAL *et al.*, 2013).

Segundo Delabona *et al.* (2012) a produção enzimática através de processo fermentativo depende de fatores como a linhagem microbiana utilizada, o substrato indutor, composição do meio de produção enzimática (fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais); condições de cultivo (pH e temperatura do bioprocesso) e a complexidade da estrutura da celulose (SRIDEVI *et al.*, 2009).

O elevado custo de produção da enzima ainda é o principal obstáculo para sua larga aplicação industrial. Estima-se que cerca de 40% do custo envolvido na produção de celulases esteja relacionada ao meio de cultura utilizado para a produção de enzima pelo micro-organismo (JOO; CHANG, 2006; CUNHA *et al.*, 2012). Vários estudos têm proposto a utilização de resíduos agroindustriais como substrato indutor para a produção de enzimas como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para a destinação desses recursos e produção de enzimas em larga escala (AGOSTINHO *et al.*, 2014).

Dessa forma, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a produção de celulases produzidas por *Melanoporia* sp. utilizando o pó da casca de coco como substrato em fermentação submersa, bem como avaliar a viabilidade do processo de hidrólise da casca de coco, utilizando-se o extrato enzimático sintetizado por *Melanoporia* sp. Com a finalidade de atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram traçados: pré-tratamento e caracterização da casca de coco; otimização da produção da enzima celulase por fermentação submersa; otimização da

atividade enzimática de celulasas; avaliação da estabilidade da enzima produzida por *Melanoporia* sp.; avaliação preliminar da eficiência de hidrólise utilizando a enzima produzida pela linhagem na casca de coco; caracterização e quantificação dos produtos da hidrólise enzimática; comparação dos resultados obtidos com enzimas comerciais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Celulases

Celulases são um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases, exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases e 1,4- β -D-glucosidases (WYMAN *et al.*, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2014).

As endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucano-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4) atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -1,4. A atividade catalítica pode ser medida através da diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média de celulose ou derivados de celulose. As celobio-hidrolases (exo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.91) atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando D-celobiose, que podem ser detectadas pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

As β -D-glucosidases ou β -D-glucoside gluco-hidrolases (EC 3.2.1.21) catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-glucose a partir de celobiose e celodextrinas solúveis, hidrolisando celobiose à glicose. A atividade catalítica pode ser medida através da análise dos produtos por CLAE ou mesmo por espectrofotometria (OGEDA; PETRI, 2010).

As celulases microbianas para a sacarificação de lignocelulose têm sido estudadas (PAVÓN-OROZCO *et al.*, 2012; SINGHANIA *et al.*, 2014; NARRA *et al.*, 2014; WAGHMARE *et al.*, 2014). No entanto, o custo da produção da enzima tem sido um obstáculo para sua aplicação em processos de hidrólise enzimática (CARDONA *et al.*, 2010). Esse problema poderia ser mitigado através do desenvolvimento de novos bioprocessos menos onerosos na produção de enzimas celulolíticas (SINGHVI *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2012).

As enzimas celulolíticas são aplicadas na produção de ração animal, sendo comercializadas como componentes indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose. Na área energética, essas enzimas vêm sendo empregadas em plantas piloto para obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação para a produção de biocombustíveis (ANNAMALAI *et al.*, 2014; KUBICEK *et al.*, 1993).

Diante do exposto, a conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e outros produtos químicos pode ser alcançada utilizando um sistema multienzimático composto predominantemente de celulasas e que atuam em sinergia (DELABONA *et al.*, 2013). Ao contrário da maioria das enzimas, a celulase é um complexo enzimático que trabalha sinergicamente para atacar a celulose nativa (DESWAL *et al.*, 2011), sendo considerada uma importante glicosilhidrolase envolvida na degradação da biomassa celulósica abundante na natureza (SONI *et al.*, 2010). Dada a habilidade em decompor esse tipo de biomassa em glicose, a qual poderá ser convertida em produtos de alto valor agregado e energia, as celulasas tem se tornado um dos sistemas enzimáticos multicomponentes mais investigados.

Entretanto, mesmo a tecnologia enzimática sendo um dos campos mais promissores, dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (ROVEDA *et al.*, 2010), o maior empecilho para uma aplicação mais ampla de enzimas no processo de conversão de biomassa é o seu custo elevado (DELABONA *et al.*, 2013). Deste modo, a redução no custo de produção de celulasas, pelo uso de resíduos lignocelulósicos (agroindustriais) abundantemente disponíveis, para o cultivo de micro-organismos produtores destas enzimas, oferece uma alternativa para minimizar este problema.

2.2 Resíduos lignocelulósicos

As atividades agroindustriais geram todos os dias grandes quantidades de resíduos que muitas vezes são dispostos diretamente no meio ambiente. Os resíduos produzidos pelas agroindústrias, são, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, e representam uma fonte abundante e renovável de carboidratos com potencial aplicação em bioprocessos para a obtenção de produtos de interesse comercial (TAMANINI; HAULY, 2004). Os resíduos lignocelulósicos são assim conhecidos por apresentarem em sua composição lignina e celulose como componentes majoritários (CHRISOSTOMO, 2011).

A biomassa lignocelulósica é formada por cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas) unidas entre si por ligações de hidrogênio (KINNARINEN *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2010; SINGH; BISHNOI, 2012). A celulose é o polímero natural mais abundante no mundo, responsável por quase 50% da biomassa (WANG *et al.*, 2012).

A hidrólise da celulose resulta em glicose. Numa hidrólise parcial da celulose há a formação de celobiose, que pode atuar como inibidor da enzima celulase, responsável pela quebra do material celulósico em glicose (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram que a hidrólise da celulose em glicose, em meio aquoso, catalisado pelas celulases, possui uma taxa de rendimento muito baixa, principalmente devido à estrutura altamente cristalina da celulose, que dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos, além de adsorver fisicamente sobre ligninas, restringindo sua hidrólise. Deste modo, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática (OGEDA; PETRI, 2010).

Normalmente, hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode alcançar até 90%. Atualmente, há uma grande quantidade de processos de pré-tratamento disponíveis, sejam físicos, químicos ou biológicos. Essa etapa tem sido vista como a de maior custo dentro do processo de conversão de biomassa (SEABRA, 2008).

As operações físicas de pré-tratamento são baseadas na redução do tamanho da partícula através de moagem, aumentando a performance da enzima pelo aumento da área superficial e, em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose (AGUIAR, 2010). Enquanto que os processos químicos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulases.

Dentro desse contexto, o pré-tratamento alcalino provoca alterações estruturais no interior do resíduo lignocelulósico, como por exemplo, a depleção da barreira de lignina, diminui o grau de polimerização e cristalinidade da celulose e solvatação da hemicelulose (IBRAHIM *et al.*, 2011; SILLS; GOSSETT, 2011; ANWAR *et al.*, 2014).

Diversos pesquisadores têm investigado a utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato em processos fermentativos para produção de enzimas como por exemplo, a utilização de farelo de trigo (ROOPESH *et al.* 2006; GOMATHI *et al.* 2012), farelo de arroz (NG *et al.* 2010), bagaço de cana (CUNHA *et al.* 2012; KARP *et al.* 2012), palha de arroz (SHARMA e ARORA, 2011), palha de cana, sabugo de milho e folhas secas (KUMAR *et al.* 2013) e a casca do coco verde (OLIVEIRA, 2010).

2.2.1 Casca de coco verde

A casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) é um resíduo lignocelulósico encontrado em larga escala na região Nordeste. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a produção anual de coco no Brasil em 2013 foi de 2,8 milhões de toneladas (FAO, 2014).

A casca de coco é constituída por uma fração de fibras e outra fração denominada pó, que se apresenta agregada às fibras. O pó da casca de coco é o material residual do processamento da casca de coco verde. A composição química da casca de coco varia conforme a fonte, a época do ano e a quantidade de chuvas. Cerca de 80% a 85% do peso bruto do coco verde é considerado lixo (MACHADO *et al.*, 2009). O pó e a fibra da casca de coco verde representam 15% e 7,5%, respectivamente, sobre a matéria-prima (ROSA, 2013).

A casca do coco verde contém grande quantidade de celulose (31,5-37,4%), hemicelulose (30%) e lignina (37,2-43,9%) (CORRADINI *et al.*, 2009), não havendo necessidade de complementações nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano, pois ainda possui teores de potássio, cálcio e nitrogênio (ROSA *et al.*, 2001). De acordo com pesquisas realizadas por Oliveira (2010), foi possível produzir enzimas, mediante processo de fermentação semi-sólida, utilizando pó da casca de coco verde como substrato.

Como o mercado mundial da tecnologia enzimática movimenta bilhões de dólares, pode-se justificar o interesse em produzir enzimas a partir de subprodutos da agricultura, como as cascas de coco, já que envolve tecnologia de baixo custo energético, com um menor impacto ambiental. Cabe salientar que o Brasil ainda adquire enzimas de outros países, podendo utilizar esse resíduo para o desenvolvimento nacional de uma indústria enzimática.

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco (*Cocos nucifera* L.) com uma produção aproximada de 2,8 milhões de toneladas e responsável por mais de 80% da produção, dentre os países da América do Sul (FAO, 2014) e o grande volume de resíduos gerados da industrialização do fruto, implica em graves problemas ambientais. Roopan *et al.* (2013) ressaltam que qualquer tipo de produção agrícola produz quantidades consideráveis de subprodutos, de modo que torna-se imperativo a busca de alternativas para sua utilização em decorrência do teor de celulose, hemicelulose e lignina presentes nos resíduos lignocelulósicos.

Nesta esfera, os micro-organismos apresentam considerável interesse biológico no uso de resíduos lignocelulósicos como fonte indutora na produção de enzimas, devido as suas biomoléculas constituírem modelos interessantes para a aplicação em bioprocessos e por serem uma ferramenta poderosa para o avanço na área de biotecnologia, principalmente devido a sua grande diversidade genética, o que lhes permitem desenvolver funções com grande interesse industrial, como é o caso dos fungos celulolíticos (PELCZAR *et al.*, 1996; TONELOTTO, 2012).

2.3 Fungos celulolíticos

Há uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulasas, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (RUEGGER e TORNISIELO, 2004). Estes micro-organismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, termofílicos ou mesofílicos, fungos ou bactérias.

Devido ao fato de culturas de fungos apresentarem alta produção de diversas enzimas e pela facilidade de crescimento em ambientes aeróbios, inclusive em substratos lignocelulósicos, a maioria das pesquisas voltadas para a produção comercial de celulasas é focada em culturas destes micro-organismos (SUN e CHENG, 2002). Deste modo, as enzimas do complexo celulásico, responsáveis pela degradação de materiais lignocelulósicos são produzidas principalmente por micro-organismos como fungos filamentosos. No caso dos fungos ligninolíticos, o micélio secreta enzimas especiais que atuam sobre as substâncias, ocorrendo liquefação (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; FASANELLA, 2009).

As espécies de fungos mais estudadas que produzem celulasas são *Trichoderma reesei* (WYMAN, 1996), *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens* (LYND *et al.* 2002), *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* e *Aspergillus niger* (WANG; XIA, 2011). Esses fungos excretam uma celulase de alta atividade no meio de cultura (LO *et al.*, 2010).

O fungo filamentoso *T. reesei*, por exemplo, é um dos organismos produtores de enzimas celulolíticas mais amplamente investigados (ZHONG *et al.*, 2012). Entretanto, outros tipos de fungos também merecem atenção na produção de tais enzimas, como os pertencentes a espécie *Mucor circinelloides* e ao gênero *Melanoporia*, ambos utilizados neste trabalho.

Mucor circinelloides é um fungo filamentoso que pertence à família dos Zigomicetos. Sua bioquímica especial, morfologia e características fisiológicas, estabeleceram um interesse de longa data em pesquisa aplicada e teórica (ÁCS, 2003). Também estão disponíveis na literatura relatos de sua utilização na síntese de ácidos graxos (IMMELMAN *et al.*, 1998), carotenóides (FRASER *et al.*, 1996; ANJOS *et al.*, 2010), na produção de enzimas como celulasas (endoglucanase, celobiohidrolase, e β -glucosidase), conforme descrito por Saha (2004), dentre outros. Além disto, seu emprego na forma liofilizada foi estudada como agente imuno estimulante para peixes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004), e mais recentemente, devido ao apelo ambiental, na produção de óleos de alto valor agregado e ração animal a partir de subprodutos, como vinhaça de etanol de milho (MITRA *et al.*, 2012).

Ao contrário de *M. circinelloides*, o fungo filamentoso do gênero *Melanoporia* foi reportado na literatura principalmente como causador de “podridão” em madeira (KIM *et al.*, 2003); também em virtude da questão ambiental, alguns autores relataram sua utilização na remediação de solos poluídos (DURRANT, 1996) e na produção de enzimas (ZHENGUANG; MINGHAO, 2011) utilizadas em biorremediação (SIGOILLOT *et al.*, 2004), evidenciando escassez de estudos acerca deste micro-organismo, inclusive em relação a processos biotecnológicos.

Em estudos anteriores, linhagens de *Mucor circinelloides* CCT 7735 e *Melanoporia* sp. CCT 7736 foram isoladas da casca do coco verde e os resultados revelaram potencial capacidade de produção de enzimas celulolíticas, devido ao fato de utilizarem a celulose contida na casca do coco, como única fonte de carbono, para seu crescimento (OLIVEIRA, 2010). Deste modo, além de representar economia na elaboração de enzimas industrialmente importantes, tal estudo proporcionou uma importante contribuição ambiental, pela utilização de um subproduto largamente produzido e descartado na natureza.

2.3.1 *Melanoporia* sp.

O gênero *Melanoporia*, descoberto em 1907 por William Alphonso Murrill, pertence à ordem Aphyllophorales. Fungos deste gênero são indiciados como causadores de podridão marrom em madeira (KIM *et al.*, 2003), sendo capazes de degradar celulose e hemicelulose, reduzindo o substrato a pedaços cúbicos amarronzados (RYVARDEN 1991; SAMUELSON *et*

al., 1994). Os Aphyllophorales que causam podridão branca são capazes de remover tanto a lignina quanto a celulose e hemicelulose da madeira, deixando o substrato com aparência esbranquiçada e esponjosa, como é o caso de *Melanoporia nigra* (MACHADO *et al.*, 2005).

Durrant (1996) ressalta a boa produção de enzimas ligninolíticas produzidas por *Melanoporia* na remediação de solos poluídos, a partir da avaliação em meio sólido com bagaço de cana-de-açúcar, o qual tem suscitado pesquisas com estes fungos como adjuntos em sistemas ambientais. Por outro lado, Zhenguang e Minghao (2011) otimizaram a produção de lacase por *Melanoporia castanea*, sendo esta enzima utilizada em diversas aplicações industriais, incluindo biorremediação (SIGOILLOT *et al.*, 2004). Segundo Zhou e Dai (2012), essa mesma linhagem foi encontrada como hospedeiro em árvores como o carvalho (*Quercus mongolica*), confirmando a capacidade deste gênero em degradar a lignina.

Fungos do gênero *Melanoporia* sp. são hospedeiros naturais de árvores de grande porte como castanheiros (*Castanea*) e carvalhos (*Quercus*). *M. castanea* é uma espécie da Ásia Oriental (PARMASTO; KOLLOM, 2000), que apresenta uma forte preferência a substratos de grandes dimensões, principalmente troncos com mais de 50 cm de diâmetro, sendo encontrados também nos ramos destas árvores (HATTORI, 2002; YAMASHITA *et al.*, 2010). *M. nigra* é uma espécie Norte-Americana (PARMASTO; KOLLOM, 2000), com relatos de sua ocorrência na região sudeste do Brasil, em vegetação do tipo cerrado de clima predominante tropical sazonal (FORZZA, 2010).

Fungos deste gênero possuem a capacidade de degradar substratos lignocelulósicos, pela produção de enzimas ligninolíticas (CAPELARI e ZADRAZIL, 1997; ZHOU e DAI, 2012), de modo que podem ser utilizados na degradação da lignina presente na casca do coco.

2.3.2 *Mucor circinelloides*

Mucor circinelloides é um fungo filamentoso não patogênico, dimórfico, ou seja, sofre variações morfológicas de acordo com as condições nutricionais e temperatura de incubação (LUBBEHUSEN *et al.*, 2003).

Com relação à produção de enzimas, existem alguns estudos sobre o potencial desta linhagem na produção de quitosanase (STRUSZCZYK *et al.*, 2006), lipase (STRUSZCZYK *et al.*, 2009), β -glucosidase e carboximetilcelulase-CMCase (BAFFI *et al.*, 2012).

No que se refere às condições de cultivo de *M. circinelloides*, a faixa de pH variando de 5 a 7 é reportada como a melhor para o crescimento do micro-organismo e temperatura de incubação na faixa de 25 °C a 30 °C. Este fungo foi relatado na literatura por possuir a capacidade de assimilar diferentes tipos de fontes de carbono, como xilose, glicerol e arabinose e utilizar diretamente os polissacarídeos, como amido e celulose para seu crescimento (XIA *et al.*, 2011). Este fato reforça a ideia de utilizá-lo para a produção de celulasas a partir de substratos lignocelulósicos, como palha e bagaço da cana-de-açúcar, além da casca de coco verde, como fontes de carbono.

M. circinelloides é conhecido por produzir enzimas celulolíticas extracelulares (BOTHA *et al.*, 1997), que podem auxiliar na degradação de polissacarídeos insolúveis contidos em amostras de linhaça (MITRA *et al.*, 2012). Além disso, *Mucor* sp. também foi reportado como um micro-organismo que tem a capacidade de secretar celulasas (TAKÓ *et al.*, 2010).

Segundo Takano e Hoshino (2012), *M. circinelloides* tem atraído atenção porque possui uma alta capacidade para a produção de etanol de hexose e pentose e secreção de enzimas do complexo celulásico como endo- β -glucanase, celobiohidrolase, β -glucosidase, xilanase e β -xilosidase, que são capazes de converter vários materiais celulósicos e hemicelulósicos a glicose e xilose, sendo, portanto, selecionado como um bom produtor de etanol a partir materiais lignocelulósicos.

Como resultado desse trabalho foi verificado que *M. circinelloides* NBRC 5398, utilizando como fontes de carbono glicose, xilose e palha de arroz, apresentou alta atividade de endo- β -glucanase (EBG) e β -glucosidase (BG) com resultados iguais a 2,46 U/L e 2,94 U/L, respectivamente, quando comparado com outras linhagens da mesma espécie (TAKANO; HOSHINO, 2012). Vale salientar que os mesmos autores utilizaram uma cocultura de *M. circinelloides* NBRC 4572 e NBRC 5398, constatando que a linhagem 4572 pode fermentar eficientemente glicose e xilose, enquanto a linhagem 5398 pode secretar altas quantidades de EBG e BG, portanto, com uso de cocultura, ou seja, de duas linhagens de alto desempenho pode-se utilizar o potencial de cada uma em particular e obter ao mesmo tempo enzimas e etanol a partir de palha de arroz utilizando fungos de alta performance.

2.4 Indutores da produção de celulases

De acordo com Morikawa *et al.* (1995) o modelo amplamente aceito para a indução de celulase é que a suplementação com celulose extracelular que atua como um sinal que é reconhecido pelas celulases conidiais constitutivas basais, presentes nos fungos filamentosos, que então agem sobre a celulose e catalisam a hidrólise dos celooligossacarídeos.

No entanto, é possível que várias substâncias possam atuar como indutores para bioprodução de celulases. Para explorar a natureza do indutor natural, vários pesquisadores avaliaram o potencial de moléculas diferentes, como a lactose (SUN *et al.*, 2010), soforose (SILVA, 2008), celobiose, celulose e galactose para indução da produção de celulases por fungos (HECK *et al.*, 2005).

Em virtude do efeito positivo da lactose, na produção de enzimas hidrolíticas, especialmente as celulases, este dissacarídeo (que consiste de porções de D-glicose e D-galactose) tem sido amplamente utilizado (SUN *et al.*, 2010). No entanto, a síntese de celulases não pode ser induzida por galactose e/ou glicose.

Estudos realizados por Ilmen *et al.* (1997) verificaram que a glicose atuou como repressora da síntese de celulase por *T. reesei*. Morikawa *et al.* (1995) descreveram o papel da lactose como um indutor para a indução da produção de celulases por *T. reesei* PC-3e7 na presença de outros açúcares, como a galactose, soforose e celobiose. Os autores concluíram que a lactose pode agir como um indutor, se consumida no micélio de *T. reesei* e os outros açúcares podem, supostamente, induzir a produção de lactose permease. Estudos realizados por Portnoy *et al.* (2011) verificaram que a lactose induziu a expressão do gene de *T. reesei* para a produção de celulases, sendo utilizada como uma fonte de carbono indutora.

Surfactantes como o *tween* podem efetivamente melhorar a produção da enzima celulase a partir de resíduos lignocelulósicos. Várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo, dentre eles: a) os surfactantes alteram a estrutura do substrato, disponibilizando mais a celulose ao ataque enzimático e b) aumentam a estabilidade enzimática, reduzindo a desnaturação (YANG *et al.*, 2011). Wang e Xia (2011) suplementaram o meio para a produção de celulases com 0,02% de *tween* 80 e 2% de lactose, utilizando *T. reesei* e obtiveram resultados promissores na atividade enzimática total.

A Tabela 1 apresenta a influência de diferentes fontes indutoras na produção de celulasas por fungos filamentosos.

Tabela 1 - Influência de diferentes indutores na produção de celulasas durante fermentação submersa por fungos filamentosos

Micro-organismo	Fonte de carbono	Atividade enzimática (FPU/mL)	Referências
<i>P. citrinum</i>	FT	1,72	Dutta <i>et al.</i> (2008)
<i>A. cellulolyticus</i>	Celulose (jornal)	1,05	Park <i>et al.</i> (2011)
<i>P. janthinellum</i> NCIM 1171	FT + avicel (1%)	1,21	Singhvi <i>et al.</i> (2011)
<i>T. reesei</i> Rut C-30	Palha de arroz	1,07	Hideno <i>et al.</i> (2011)
<i>T. harzianum</i> P49P11	BC + lactose	0,35	Delabona <i>et al.</i> (2012)
<i>T. harzianum</i> P49P11	BCD + lactose	0,48	Delabona <i>et al.</i> (2012)
<i>A. sydowii</i>	Carboximetilcelulose	1,33	Matkar <i>et al.</i> (2013)
<i>P. janthinellum</i>	Palha de trigo 'pt'	3,10	Singhanian <i>et al.</i> (2014)
<i>P. chrysosporium</i> NCIM 1106	Casca de sorgo	0,12	Waghmare <i>et al.</i> (2014)
<i>P. chrysosporium</i> NCIM 1106	Gramma em pó	0,07	Waghmare <i>et al.</i> (2014)

BC: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado; BCD: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e deslignificado; FT: farelo de trigo; pt: pré-tratada

2.5 Influência do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

A atividade enzimática pode ser afetada por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura proteica, notadamente o pH e temperatura. A influência do pH sobre a catálise enzimática depende do número e tipo de grupos ionizáveis que a enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária, enquanto a influência da temperatura envolve a energia cinética das moléculas componentes do sistema, de modo que temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (BORZANI *et al.*, 2001).

Oliveira (2010) analisou condições de atividade enzimática de celulasas de *Melanoporia* sp. CCT 7736 a partir de substrato lignocelulósico (casca de coco) e encontrou valores ótimos de pH e temperatura de 6,5 e 60 °C, respectivamente. O comportamento da enzima foi interessante uma vez que as celulasas obtidas do *T. polysporum* e *A. niger* NRRL 2001 apresentaram atividade ótima na faixa de pH 5,5 e temperatura em torno de 40 °C (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Ainda de acordo com Oliveira (2010), o mesmo comparou os resultados obtidos com o fungo *Melanoporia* sp. e linhagens de *Trichoderma* e *Aspergillus*. Os resultados afirmaram que a atividade enzimática do fungo *Melanoporia* sp. foi superior, pois apresentou valor de $1,26 \pm 0,09$ UI/gds no extrato bruto, quando comparado com *T. polysporum*,

T. viride e *A. niger*, com valores de atividade de 0,47 UI/gds, 0,64 UI/gds e 0,31 UI/gds, respectivamente.

Esse resultado pode ser considerado muito promissor, uma vez que, a atividade dessas enzimas foi obtida em pH próximo da neutralidade favorecendo o processo industrial pois, além de evitar a corrosão nas tubulações, os efluentes provenientes das indústrias não precisam de onerosos tratamentos de correção de pH. Vale ressaltar também que a grande maioria das celulasas reportadas na literatura atuam em condições de pH ácido na faixa de 4,8-5,5 (AHAMED e VERMETTE, 2009; AZZAZ *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2014).

2.6 Hidrólise enzimática

As celulasas são enzimas fundamentais na bioconversão de substratos celulósicos. Atualmente, a produção de celulasas é a etapa que confere maior custo, aproximadamente 40%, do valor total de produção de etanol proveniente de biomassa lignocelulósica (CHANDRA *et al.*, 2010). Dentro desse contexto, a hidrólise enzimática é uma etapa fundamental na conversão de resíduos lignocelulósicos, pois as tecnologias para a produção de celulasas e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são processos em contínuo desenvolvimento, e chave para o aumento da produtividade e economicidade da rota enzimática (ZÚNIGA, 2010).

O processo de hidrólise enzimática envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas que apresentam um alto custo associado a uma baixa produção (ZHANG *et al.*, 2006; SCHEUFELE *et al.*, 2012). Diversas pesquisas tem sido realizadas na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, na purificação e caracterização dos extratos enzimáticos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes ou pelo melhoramento genético de espécies de micro-organismos (KANG *et al.*, 2004; CASTRO e PEREIRA Jr, 2010).

A grande maioria das celulasas comerciais são produzidas pelos fungos filamentosos *T. reesei* ou *A. niger* por fermentação submersa. Isto se dá porque os fungos possuem maior interesse comercial devido à capacidade de níveis de secreção protéica e a possibilidade de suas

enzimas atuarem naturalmente de maneira bastante efetiva na hidrólise da biomassa lignocelulósica (CHUNDAWAT *et al.*, 2011).

Por serem amplamente conhecidos, os fungos da espécie *Trichoderma* e seus mutantes vêm sendo os mais estudados e empregados na produção comercial de celulasas, principalmente por terem sido os primeiros fungos isolados desde a década de 1950 e por produzirem altas concentrações do complexo enzimático hidrolítico (HOWARD *et al.*, 2003). No entanto, a quantidade de β -glicosidase contida no complexo é relativamente baixa e insuficiente para a completa sacarificação da celulose, resultando em inibição enzimática pela presença de celobiose, uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação (GARCÍA-KIRCHNER *et al.*, 2005), havendo portanto a necessidade de suplementação com a enzima β -glicosidase (REIS *et al.*, 2013).

A β -glicosidase atua hidrolisando ligações glicosídicas β -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose. A presença de β -glicosidase nos coquetéis enzimáticos é importante para evitar que o acúmulo de celobiose resulte em inibição das exo e endo-glucanases (SINGHANIA *et al.*, 2011; SAIBI e GARGOURI, 2011).

O desempenho da produção destas enzimas é intensamente influenciado por diversos fatores incluindo a natureza do substrato celulósico, o pH do meio, a disponibilidade de nutrientes, suplementação com indutores, temperatura do processo, entre outros parâmetros de controle (SINGHANIA *et al.*, 2010).

No entanto, os custos e os baixos teores de produção de celulasas são os principais fatores a serem superados para a aplicação industrial do processo, por isso, reduzir os custos de produção por meio da otimização desses parâmetros é o principal objetivo para o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica (LATIFIAN *et al.*, 2007; CASPETA *et al.*, 2014).

Dessa forma, a maior perspectiva de aplicação de celulasas é a hidrólise da biomassa celulósica para a produção de etanol renovável, cuja escala de produção ainda não atingiu a escala comercial devido, entre outros fatores, aos elevados custos dessas enzimas.

2.7 Custo de produção de celulasas

As enzimas, por serem catalisadores biológicos, ativam reações nas células de organismos vivos. Elas podem acelerar os processos de produção, geralmente a um custo menor

do que os produtos químicos. Em 2000, o Departamento de Energia dos EUA financiou um projeto intensivo para a conversão enzimática de etanol celulósico. Na época, o custo de aplicação de enzima para matérias-primas celulósicas era muito caro, pensaram até que não fosse possível chegar a uma viabilidade comercial (NOVOZYMES, 2014).

Apesar da abundância de matérias-primas, os substratos podem ser difíceis de serem hidrolisados em componentes ou produtos de alto valor agregado. Devido a isso, os custos elevados dessas enzimas têm sido historicamente um dos maiores desafios para um processo de etanol celulósico viável comercialmente.

Existem desafios técnicos e econômicos na busca de produção de enzimas celulasas, mas esse tipo de produção é muito complexa. Portanto, é fundamental se concentrar na otimização de processos, equilibrando os custos.

No entanto, para obter reduções de custos verdadeiramente significativas, é necessária uma abordagem mais holística. Envolvendo todos os aspectos do processo de produção de etanol celulósico como: transporte de matéria-prima, pré-tratamento dos resíduos e as despesas de capital e operacionais devem ser examinadas e melhoradas. A necessidade de enzimas com mais eficiência em bioprocessos levou a um esforço sem precedentes para a pesquisa (NOVOZYMES, 2014).

Segundo Comyns (2012), uma pesquisa prevê mercado de enzimas industriais em US\$ 6 bilhões em 2016. O mercado mundial de enzimas industriais foi avaliado em US\$ 3,1 bilhões em 2009 e atingiu cerca de US\$ 3,6 bilhões em 2010, enquanto que em 2011 foi cerca de US\$ 3,9 bilhões. O mesmo autor ainda diz que as enzimas do campo alimentício compõem o maior segmento da indústria de enzimas industriais, com faturamento de cerca de US\$ 1,2 bilhões em 2010, chegando a US\$ 1,3 bilhões de dólares em 2011 e estima-se que em 2016 seja de US\$ 2,1 bilhões.

Tendo em vista que não foram encontrados na literatura relatos da utilização em processos fermentativos de linhagens de *Melanoporia* sp. na produção de celulasas, até o presente momento, este estudo visa estabelecer as condições otimizadas para a produção de enzimas celulasas por essa linhagem, via fermentação submersa, a partir do resíduo agroindustrial constituído da casca do coco como fonte de carbono.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A produção da enzima celulase de *Melanoporia* sp. foi inicialmente otimizada em agitador orbital (*shaker*), e em seguida, foi feito um aumento de escala em biorreator. As Figuras 1 e 2 apresentam um fluxograma descritivo das análises experimentais realizadas neste estudo.

Figura 1 - Fluxograma descritivo da análise experimental realizada em *shaker*.

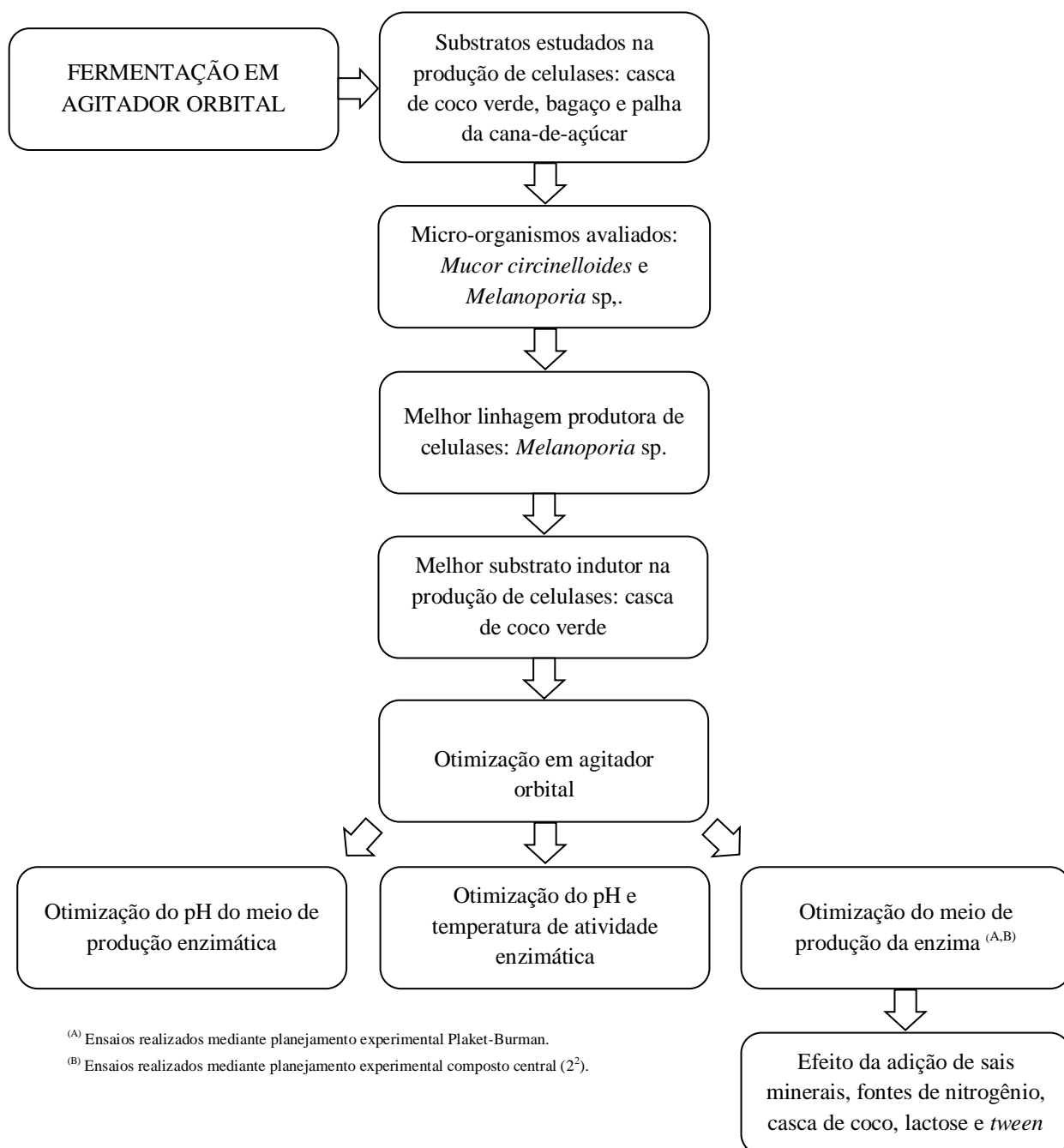
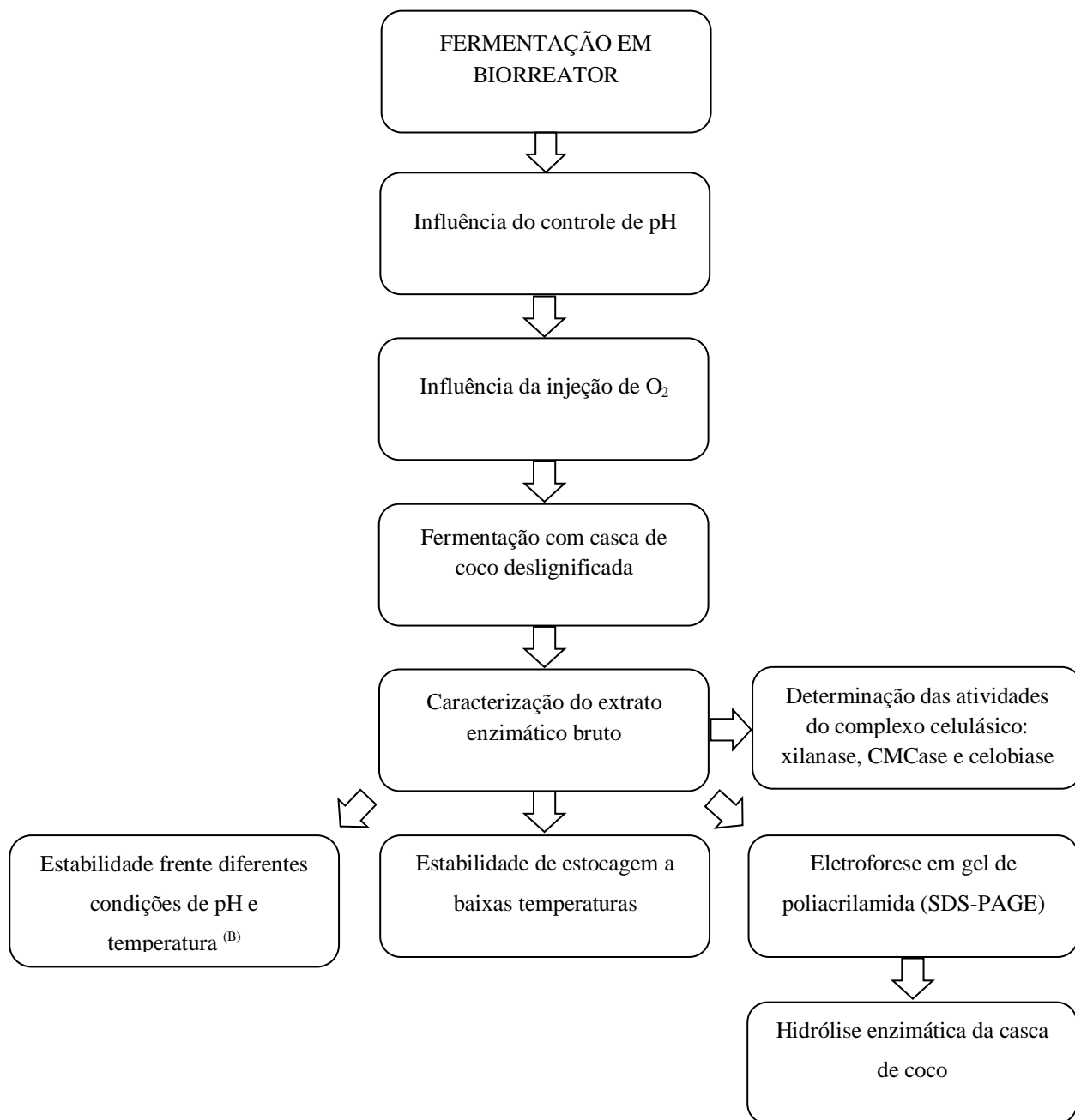


Figura 2 - Fluxograma descritivo da análise experimental realizada em biorreator.



^(B) Ensaios realizados mediante planejamento experimental composto central (2²).

3.1 Substratos para a fermentação

Inicialmente foram utilizados pó da casca de coco verde, bagaço e palha da cana-de-açúcar como substratos para a fermentação. A Figura 3 apresenta os três resíduos celulósicos utilizados como substratos para a produção de celulases.



Figura 3 - Pó da casca do coco (A), bagaço de cana-de-açúcar (B) e palha de cana-de-açúcar (C) utilizados nos processos fermentativos.

O resíduo da casca do coco foi obtido após beneficiamento da casca conforme descrito por Rodrigues, Pinto e Fernandes (2008). As cascas do coco verde foram cortadas em pedaços, lavadas com água fria para remoção de sujidades e secas ao sol por 4 dias. O material foi então desintegrado em um moinho de facas industrial projetado pela Embrapa-Agroindústria Tropical. Após a desintegração, o material foi submetido à secagem ao sol até que a umidade final atingisse 4%. As fibras remanescentes foram separadas da casca através de uma peneira de nylon de abertura de 1,5 mm, visando um ajuste granulométrico, de modo a se obter partículas com diâmetros inferiores a 1,5 mm, proporcionando um meio mais homogêneo para o crescimento dos micro-organismos. O pó da casca de coco foi armazenado em temperatura ambiente até o momento do uso.

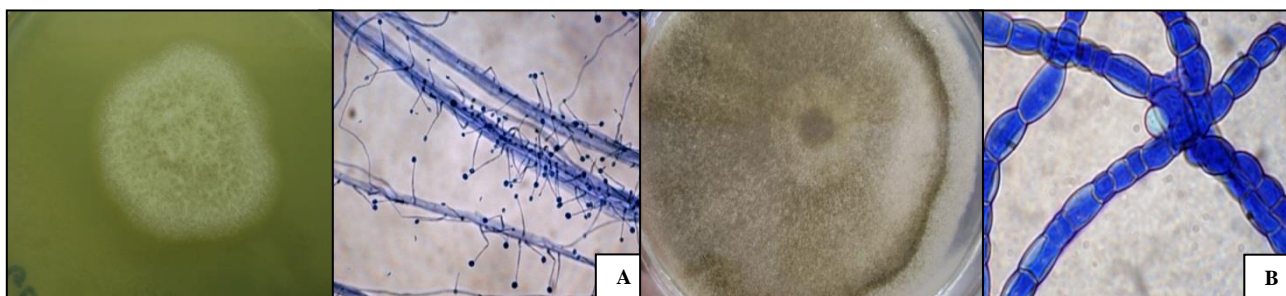
O pó da casca do coco pré-tratado e não tratado foi caracterizado quanto a sua composição química. Foram determinados os percentuais em massa das frações lignocelulósicas (celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extraíveis), segundo as metodologias descritas por Moraes; Rosa e Marconcini (2010).

O bagaço da cana-de-açúcar foi obtido no comércio local de Fortaleza e a palha da cana-de-açúcar foi doada pelo Centro de Tecnologia Canaveira-CTC, localizado em Piracicaba, São Paulo. Ambos os resíduos foram cortados em pedaços pequenos e armazenados a 4 °C até o

momento de uso. O resíduo que melhor induziu a produção de celulases foi utilizado para os ensaios posteriores de otimização da atividade e produção da enzima.

3.2 Micro-organismos

As linhagens utilizadas neste estudo foram os fungos filamentosos *Melanoporia* sp. CCT 7736 e *Mucor circinelloides* CCT 7737, (Figura 4) as mesmas foram isoladas a partir de uma amostra de casca de coco com visível contaminação fúngica (OLIVEIRA, 2010). A identificação molecular foi realizada no Laboratório do Centro Pluridisciplinar Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA). As linhagens foram depositadas na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas-SP).



Fonte: Oliveira (2010)

Figura 4 - Imagens macroscópicas e microscópicas de *Melanoporia* sp. (A) e *Mucor circinelloides* (B).

3.3 Preparo do inóculo

As linhagens foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio ágar batata-dextrose (BDA), sendo incubadas por dez dias em estufa incubadora tipo BOD (*Biochemistry Oxygen Demand*) a 30 °C. A preparação do inóculo ocorreu através da adição de 20 mL de uma solução estéril de *tween* 80 a 2% (v/v) à placa contendo os esporos e transferência destes para a solução, com o auxílio de alça de Drigalski. A concentração de esporos presentes nesta suspensão foi quantificada em câmara de *Neubauer*, sendo requerida uma concentração igual a 1×10^6 esporos/mL para inoculação no meio de produção de celulases (NCUBE *et al.*, 2012).

A linhagem que apresentou a maior atividade de celulases foi utilizada para otimização da produção da enzima.

3.4 Meio de cultura e ensaio para a produção da enzima

Para a produção enzimática foi empregado o meio de cultura de Mandels e Weber (1969) como pré-inóculo. O meio foi constituído de 10 g/L de $C_6H_{12}O_6$; 2 g/L de KH_2PO_4 ; 1,4 g/L de $(NH_4)_2SO_4$; 0,3 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,005 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,0016 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,0014 g/L de $ZnSO_4 \cdot H_2O$; 0,0037 g/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ e 0,4 g/L de $CaCl_2$. O meio de pré-inóculo foi acondicionado em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio e autoclavado a 121°C por 15 minutos. A composição do meio de cultura, para a produção de celulases, foi a mesma correspondente ao meio do pré-inóculo, sendo suplementado com 7,5 g/L de lactose e 15 g/L do substrato indutor (neste caso pó da casca de coco, palha ou bagaço de cana-de-açúcar).

O ensaio para a produção de celulases seguiu a metodologia de Domingues *et al.* (2000). Foram inoculados 50 μ L de uma suspensão de esporos contendo (1×10^6) esporos/mL ao meio de pré-inóculo contendo um volume de 50 mL, sendo incubado por 48 horas sob agitação em agitador orbital a 30 °C e 200 rpm. O meio para produção de celulases (volume de 50 mL) foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo ativado (KADAM e KEUTZER, 1995). A fermentação foi conduzida por um período de 72 horas a 30 °C em agitador orbital a 150 rpm, sendo o extrato enzimático obtido após filtração em papel de filtro.

3.5 Determinação da atividade total de celulase

A atividade celulolítica total das enzimas foi avaliada pela capacidade hidrolítica da celulose presente no papel de filtro *Whatman* n°1 (GHOSE, 1987). Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 200 mM com pH e temperatura variados de acordo com o ensaio univariado. Foram adicionados 250 μ L do extrato enzimático a 500 μ L da solução tampão acetato de sódio no tubo (25 mL) contendo tiras de papel de filtro *Whatman* n° 1 no tamanho 1×6 cm. A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura do ensaio univariado. A reação foi interrompida pela adição do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A atividade enzimática foi quantificada através da reação de hidrólise da celulose, que libera açúcar redutor (AR), de acordo com o método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio (BINOD *et al.*, 2007).

3.6 Determinação do pH e temperatura ótima de atividade enzimática da celulase

Foram realizados dois ensaios univariados com o intuito de se estabelecer as condições mais adequadas de pH e temperatura para a determinação da atividade enzimática de celulases. Para avaliar a influência do pH, a temperatura foi mantida constante em 60 °C, tendo o pH variado em 5,5, 6,5 e 7,5. O valor de pH que resultou na maior atividade enzimática foi utilizado nos ensaios de temperatura, tendo esta variado em 40 °C, 60 °C e 80 °C. As determinações das atividades enzimáticas foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.

3.7 Otimização da composição do meio de cultura para produção de celulases

3.7.1 Efeito e concentração de sais minerais

Para a determinação da composição do meio de produção da enzima, um planejamento do tipo Plackett-Burman, com 19 ensaios e 3 pontos centrais, foi utilizado para identificar os sais mais significativos (PLACKETT e BURMAN, 1946) na produção de celulases (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial Plackett-Burman para seleção de sais minerais do meio de produção de celulases por *Melanoporia* sp.

Ensaio	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	FeSO ₄	CoCl ₂	MnSO ₄	ZnSO ₄	NaCl	NaNO ₃	CuSO ₄
1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
3	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
5	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
6	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
7	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
8	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
9	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
10	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
11	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
12	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
13	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
14	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
15	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*Pontos centrais, onde 0 (zero) significa que a fonte de sal não foi adicionada ao meio de cultivo e 1, que a fonte de sal foi adicionada ao meio de cultivo, na concentração de 0,1 g/L.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e a média da atividade foi considerada a variável resposta. Baseado nos resultados obtidos nesse planejamento, aplicou-se um delineamento composto central rotacional com 11 ensaios e 3 pontos centrais, fixando o valor da temperatura em 30 °C, variando-se a concentração dos sais (KH₂PO₄ e FeSO₄ de 0,005 g/L a 1 g/L), os quais apresentaram efeito significativo na produção da enzima e foram analisados através da metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). Tal delineamento teve como objetivo estimar as interações simultâneas entre estes fatores dentro das suas faixas de variação, e determinar o nível de cada fator que maximizaria a atividade enzimática.ⁱ

ⁱ O objetivo da aplicação dos chamados “fatoriais fracionários”, bem como dos planejamentos Plackett-Burman, é de seleção das variáveis significativas no processo testado. A partir dos resultados obtidos nessa etapa de triagem, variáveis são definidas, e ensaios mais complexos, como os planejamentos rotacionais, são conduzidos com objetivo de modelar as respostas em função desse número menor de variáveis significativas. Uma vez obtido um modelo bem ajustado, técnicas de otimização podem ser finalmente aplicadas (WANG *et al.*, 2012), considerando-se um número “n” de respostas de interesse, com o objetivo de identificar quais seriam as condições mais favoráveis de combinação entre essas variáveis para se alcançar o melhor resultado final.

3.7.2 Efeito da fonte de nitrogênio e tween 80

Na composição do meio de produção da enzima, um planejamento do tipo Plackett-Burman, com 15 ensaios e 3 pontos centrais, foi utilizado para selecionar as fontes de nitrogênio e *tween* mais significativas na produção de celulases (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial Plackett-Burman para seleção de fontes de nitrogênio e *tween* para compor o meio de produção de celulases por *Melanoporia* sp.

Ensaio	Ext. levedura	Ext. carne	Uréia	Sulf. amônio	Peptona	Nitrato de sódio	<i>Tween</i>
1	1	0	1	0	0	0	1
2	1	1	0	1	0	0	0
3	0	1	1	0	1	0	0
4	1	0	1	1	0	1	0
5	1	1	0	1	1	0	1
6	1	1	1	0	1	1	0
7	0	1	1	1	0	1	1
8	0	0	1	1	1	0	1
9	0	0	0	1	1	1	0
10	1	0	0	0	1	1	1
11	0	1	0	0	0	1	1
12	0	0	0	0	0	0	0
13*	1	1	1	1	1	1	1
14*	1	1	1	1	1	1	1
15*	1	1	1	1	1	1	1

*Pontos centrais, onde 0 (zero) significa que a fonte de nitrogênio não foi adicionada ao meio de cultivo e 1, que a fonte de nitrogênio foi adicionada ao meio de cultivo. A cada Erlenmeyer foi adicionado, no máximo, 3% (m/m) de fonte de nitrogênio, em relação à massa do meio de cultivo.

3.7.3 Otimização da concentração de pó da casca de coco, lactose e tween 80

Aplicou-se um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional 2^3 com 17 ensaios e 3 pontos centrais, fixando o valor da temperatura em 30 °C, variando-se a concentração de *tween* em 1,0%, 2,0% e 3,0%, e de casca de coco e lactose em 5 g/L, 10 g/L e 15 g/L. Tal delineamento teve como objetivo estimar as interações simultâneas entre estes fatores dentro das suas faixas de variação, e determinar o nível de cada fator que maximiza a atividade enzimática.

3.8 Otimização do pH inicial de produção de celulases

Realizou-se um ensaio univariado para a determinação do melhor pH de produção da enzima celulase. O pH inicial foi variado na faixa de 3,5 a 7,5 e a temperatura de incubação foi mantida em 30 °C em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas. As determinações das atividades enzimáticas foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.5. Esta etapa finalizou o processo de otimização em *shaker* e com o intuito de ampliar a escala, as próximas etapas foram realizadas em biorreator.

3.9 Experimentos realizados em biorreator

Após a otimização em incubadora tipo *shaker* de alguns parâmetros do processo fermentativo como: pH e temperatura de atividade enzimática; pH de produção da enzima; composição do meio de cultura, o micro-organismo *Melanoporia* sp. CCT 7736, o qual apresentou a melhor produção de celulases nos ensaios anteriores foi submetido aos testes em biorreator para maximizar a produção da enzima. O processo fermentativo foi realizado em fermentador TECNAL (Figura 5), modelo TECBIO com capacidade para 1,5 L a temperatura de 30 °C sob agitação de 250 rpm por processo batelada simples (REIS *et al.*, 2013).

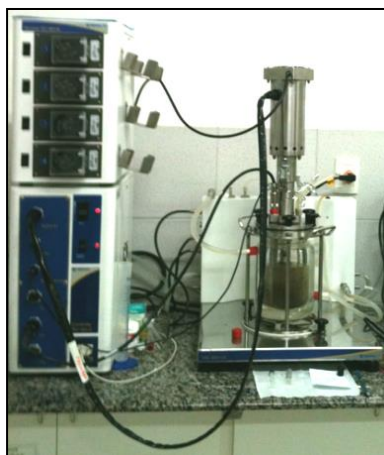


Figura 5 - Biorreator de bancada utilizado no processo fermentativo.

Para o meio de cultura do processo fermentativo foram utilizadas as condições otimizadas nos ensaios anteriores realizados em *shaker*. Antes da inoculação no fermentador os parâmetros de temperatura, pH e agitação foram ajustados automaticamente para 30 °C, 6,5, e 250 rpm respectivamente, durante 30 minutos para estabilização do sistema.

3.9.1 Preparo e composição do meio de cultivo

Para a produção da enzima em biorreator utilizou-se o meio de cultura de Mandels e Weber (1969) como pré-inóculo. Este foi constituído de 10 g/L de $C_6H_{12}O_6$; 2 g/L de KH_2PO_4 ; 1,4 g/L de $(NH_4)_2SO_4$; 0,3 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,005 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,0016 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,0014 g/L de $ZnSO_4 \cdot H_2O$; 0,0037 g/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ e 0,4 g/L de $CaCl_2$. O meio de pré-inóculo foi acondicionado em frascos Erlenmeyer contendo um volume de 200 mL, autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Foram inoculados 200 µL de uma suspensão de esporos contendo 1×10^6 esporos/mL no meio de pré-inóculo, sendo incubado por 48 horas sob agitação em *shaker* (200 rpm) a 30 °C. Vale ressaltar que o inóculo foi ativado em *shaker* e a produção da enzima foi realizada em fermentador, como descrito no item 3.9.

A composição do meio de cultura (volume de 700 mL), para a produção de celulasas, foi composta por: 1 g/L de KH_2PO_4 ; 0,05 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 3% de *tween*; 15 g/L de lactose e 5 g/L de pó da casca de coco, como substrato indutor. O meio para produção de celulasas foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo ativado (KADAM e KEUTZER, 1995). O ensaio para a produção de celulasas seguiu a metodologia de Domingues *et al.* (2000). Com o sistema estável, o fermentador foi inoculado assepticamente com 700 mL do meio de fermentação e em seguida adicionou-se 10% de volume do inóculo ativado por 48 horas. As fermentações foram conduzidas em batelada simples durante 72 horas, 30 °C e 250 rpm, sendo as amostras retiradas a cada 6 horas para análise do melhor tempo de produção e atividade de celulasas e consumo de açúcares redutores.

3.9.2 Influência do controle de pH durante a fermentação

Para avaliar a influência do controle do pH durante o processo fermentativo foram realizadas fermentações com e sem o controle de pH, de acordo com os valores obtidos nos ensaios realizados em *shaker* para verificar quais as melhores condições de máxima produção enzimática. O pH do meio durante a fermentação foi controlado a $6,5 \pm 0,05$ por adição automática de HCl 2M ou NaOH 2M.

3.9.3 Influência da injeção de O_2 durante a fermentação

Outro parâmetro de suma importância em um processo fermentativo é a presença ou ausência de O_2 , pois este influencia diretamente no metabolismo do micro-organismo. Diante disto, foi realizada fermentação com e sem injeção de O_2 . A concentração de O_2 dissolvido foi mantida em torno de 20% no reator (AHAMED e VERMETTE, 2009).

3.10 Pré-tratamento da casca de coco

No processo de deslignificação (pré-tratamento) do pó da casca de coco utilizou-se uma concentração de substrato (matéria-prima lignificada) de 10% (m/v), cuja solução reagente foi NaOH 4% (m/v). Esta mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos. Em seguida, o resíduo foi lavado em água corrente até que a água de lavagem atingisse pH próximo da neutralidade (7,0). O pó da casca de coco deslignificado foi levado à estufa de secagem à temperatura de 50 °C por 3 horas (SEGUENKA, 2009).

3.11 Determinação das atividades de enzimas presentes no extrato bruto

O extrato enzimático após filtração, em papel de filtro *Whatman*, foi submetido às atividades de celulasas, xilanase, carboximetilcelulase, celobiase e ligninase para avaliar o potencial de *Melanoporia* sp. em produzir essas enzima.

3.11.1 Atividade de celulases – Fpase

A atividade celulolítica total das enzimas foi avaliada pela capacidade hidrolítica de papel de filtro *Whatman* n°1 (GHOSE, 1987). Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 200 mM em pH 5,5. Foram adicionados 250 µL do extrato enzimático a 500 µL da solução tampão no tubo (25 mL) contendo tiras de papel de filtro *Whatman* n° 1 no tamanho 1×6 cm. A mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura de 80 °C e a reação foi interrompida pela adição do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A concentração dos açúcares redutores foi quantificada de acordo com o método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio (BINOD *et al.*, 2007).

3.11.2 Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada conforme metodologia de Biely (1997). Foram adicionados 125 µL do extrato enzimático a 125 µL da solução de atividade constituída de uma solução tampão acetato de sódio com pH ajustado a 5,5 contendo 1% (m/v) de xilana de carvalho (Fluka) como substrato. A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura de 80 °C. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente DNS.

Segundo esse método os AR liberados durante a hidrólise do substrato reduzem o DNS, gerando complexos de coloração marrom-alaranjada, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria a 540 nm. A construção de uma curva-padrão com glicose permite associar a absorbância à concentração dos produtos da reação de hidrólise (RIBEIRO, 1997). Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio (BINOD *et al.*, 2007).

3.11.3 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

Para a atividade de CMCase foram adicionados 125 μL do extrato enzimático a 125 μL da solução de atividade constituída de uma solução tampão acetato de sódio com pH ajustado a 5,5 contendo 1% (m/v) de carboximetilcelulose (Sigma) como substrato. A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura de 80 °C. A reação foi interrompida pela adição de 250 μL do reagente (DNS). A concentração dos açúcares redutores foi determinada de acordo com o método do DNS.

3.11.4 Atividade de celobiase

Para a atividade de celobiase foram adicionados 125 μL do extrato enzimático a 125 μL da solução de atividade constituída de uma solução tampão com pH ajustado a 5,5, contendo 1% (m/v) de celbiose (Fluka) como substrato. A mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura de 80 °C. A reação foi interrompida pela adição de 250 μL do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). A concentração dos açúcares redutores foi determinada de acordo com o método do DNS.

3.11.5 Atividade de ligninase

A atividade de lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) nas amostras filtradas, foram determinadas como descrito a seguir. A atividade de Lac foi determinada pelo método modificado de Slomczynsky, Nakas e Tanenbaum (1995) com 50 μL de 2,6 dimetoxifenol (2 mM) em 150 μL de tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e 5 μL de extrato bruto. A oxidação do 2,6 dimetoxifenol foi acompanhada a 30 °C a 477nm ($\epsilon_{477} = 14600\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada pelo método modificado de Tien e Kirk (1984), através da oxidação do álcool veratrílico a veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenzaldeído). A mistura reacional foi composta por 250 μL de solução de álcool veratrílico, composto por álcool veratrílico 8,0 mM em tampão de tartarato de sódio (0,1 M, pH

3,0), 200 μL de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e volume variável de extrato bruto, conforme a atividade enzimática. A reação foi acompanhada a 37 °C a 310 nm (ϵ 310=9300 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

A atividade de MnP foi determinada pelo método modificado de Wariishi, Valli e Gold (1992) com 0,2 mL de MnSO_4 (0,1 mM) em 1,4 mL de tampão malonato de sódio (50 mM, pH 4,5), 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 75 μM e 10 μL de extrato bruto. A formação do complexo de Mn (III)-malonato foi acompanhada a 30 °C, por 1 min, a 270 nm (ϵ 270=11590 $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), a leitura foi feita em cubeta de quartzo. Todas as atividades enzimáticas foram expressas em Unidade Internacional (UI), definida pela quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto.

3.12 Avaliação da influência da temperatura e pH na estabilidade da enzima celulase

Com a finalidade de verificar as melhores condições de pH e temperatura de estabilidade de celulasas, um delineamento composto central rotacionado - DCCR (2^2) com 11 ensaios e 3 pontos centrais (RODRIGUES; IEMMA, 2005) foi conduzido. Para analisar a estabilidade enzimática, incubou-se o extrato bruto juntamente com as respectivas soluções-tampão (no pH e temperatura do planejamento experimental) durante 24 h e 48 h, e posteriormente determinou-se a atividade enzimática em cada ponto do ensaio, comparando este resultado com aquele obtido sem a exposição prévia da enzima aos diferentes pH's e temperaturas. Os resultados foram expressos em termos de atividade enzimática residual (%), conforme a Eq. 1:

$$A_r = \frac{At_f}{At_0} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

A_r = atividade enzimática residual (%)

At_f = atividade enzimática final (FPU/mL)

At_0 = atividade enzimática inicial (FPU/mL)

3.13 Influência da temperatura de estabilidade durante a estocagem

Os ensaios de estabilidade da enzima frente à temperatura de estocagem foram realizados armazenando-se alíquotas do extrato bruto a temperaturas de -20 e 4 °C. A cada 30 dias realizou-se a determinação da atividade da enzima estocada durante o período de 240 dias. Para a análise da estabilidade foi determinada a atividade da enzima, nas condições referidas no item 3.11.1, ao longo do tempo. Os resultados foram analisados em termos de atividade enzimática residual (%).

A estabilidade térmica foi estudada através do tempo de meia-vida da enzima ($t_{1/2}$) nas condições estudadas, ou seja, tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade enzimática inicial, expresso em unidade de tempo, e calculado a partir da Eq. 2, a qual obedece uma cinética de ordem zero:

$$Ar = Ar_0 - kt \quad (2)$$

Sendo:

Ar = atividade relativa (%)

Ar_0 = atividade relativa inicial (%)

k = constante de desativação (meses)

t = tempo

Sendo o ($t_{1/2}$) representado pela Eq. 3:

$$t_2^1 = \ln_2^1 \div 2 \quad (3)$$

3.14 Concentração e caracterização das celulases produzidas por *Melanoporia* sp.

3.14.1 Precipitação com sulfato de amônio e polietilenoglicol-PEG

As enzimas foram precipitadas pelo processo de precipitação por salificação (*salting-out*). O sulfato de amônio é preferido para a precipitação de enzimas, indicado por Nelson e Cox, (2011) e utilizado por SOUZA (1996), em consequência de sua solubilidade acentuada em água, que lhe permite produzir forças iônicas muito elevadas e precipitar proteínas.

Esta etapa foi realizada com o intuito de concentrar a enzima presente no extrato bruto. Foram realizadas precipitações com sulfato de amônio e polietilenoglicol-PEG. No primeiro caso, o extrato enzimático bruto (caldo fermentado) foi submetido à saturação de 0-20%, 20-40% e 40-60% com sulfato de amônio. O precipitado coletado após centrifugação (9000 g/ 15 min/ 4°C) foi dialisado em membrana de celulose Sigma-Aldrich (EUA) inicialmente por 6 horas utilizando água destilada e, em seguida, contra solução de tampão fosfato de sódio 20 mM e pH 7,0 durante 12 h a 4 °C (LIMA, 2010).

No caso da precipitação com PEG, o extrato enzimático bruto foi misturado, na proporção 1:1, com o PEG. Foram testados o PEG 1500 e 4000. A mistura extrato-PEG foi submetida à centrifugação (8000 rpm/10 min/4 °C) e o precipitado obtido, ressuspensão em tampão fosfato de sódio (RABELO, 2012).

3.14.2 Concentração em sistema de ultrafiltração (Amicon)

Nesta etapa de concentração utilizou-se dispositivos de filtração centrífuga Amicon® com membrana da Millipore Ultra-4 (corte de 10 kDa) que permite a ultrafiltração rápida. Para a análise 4 mL de extrato enzimático bruto foram centrifugados a 8000 rpm por 20 minutos a temperatura de 4 °C. O soluto concentrado foi recuperado por pipetagem no fundo do recipiente com varrimento lateral para garantir a recuperação total do extrato. As amostras foram armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

3.14.3 Concentração em rotaevaporador

Outro método de concentração da enzima utilizado foi por rotaevaporador sob vácuo. Inicialmente 600 mL de extrato enzimático foram filtrados em papel de filtro e em seguida centrifugados a 8000 rpm por 20 minutos a temperatura de 4 °C. As amostras foram rotaevaporadas a 60 °C e 50 rpm e armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

É importante ressaltar que, o método de concentração que obteve o melhor valor em atividade específica foi utilizado para as análises de hidrólise enzimática da casca de coco. A atividade específica foi calculada por meio da razão entre os valores de atividade enzimática (FPU/mL) e proteína (mg/mL).

3.14.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Com o objetivo de determinar o perfil protéico dos extratos enzimáticos produzidos por *Melanoporia* sp., as amostras nos tempos 0, 18, 24 e 72 horas de fermentação foram analisadas nas corridas de eletroforese em gel de poliacrilamida na condição redutora desnaturante (SDS-PAGE) utilizando géis a 12% (v/v) e na voltagem e amperagem de 150 V e 50 mA, respectivamente (LAEMMLI; FAVRE, 1973). A quantidade de proteína carregada em cada poço foi de 2,1 µg. Para a revelação dos géis foram utilizados os métodos com reagente de nitrato prata, conforme metodologia descrita por Morrysey (1981). Como marcador de massa molecular foi utilizado o Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen, U.S.A) no qual estão presentes padrões de proteínas na faixa de 10 a 220 kDa.

3.15 Hidrólise enzimática da casca de coco

Este ensaio foi realizado com a finalidade de avaliar a capacidade das celulases produzidas por *Melanoporia* sp. na hidrólise da biomassa indutora da enzima. Para tanto, 2% (m/v) de casca de coco *in natura* e deslignificada foram utilizadas. O volume de reação da

hidrólise foi de 100 mL composto por tampão acetato de sódio 200 mM pH 5,5, extrato enzimático (20 FPU/g substrato), azida sódica 0,2% m/v e H₂O q.s.p..

O sistema de hidrólise consistiu basicamente em um reator de vidro de 250 mL encamisado com controle de temperatura e agitação mecânica. A montagem experimental pode ser observada na Figura 6.



Fonte: o autor

Figura 6 - Reator encamisado utilizado na hidrólise da casca de coco com enzimas produzidas por *Melanoporia* sp.

A hidrólise foi realizada durante 120 h, e a cada 24 h, alíquotas eram retiradas e aquecidas a 100 °C por 5 minutos, para desativar as enzimas presentes no hidrolisado (WAGHMARE *et al.*, 2014) e então foram quantificados os açúcares redutores, pelo método de DNS (MILLER, 1959). Os produtos de hidrólise nos tempos de 24 h e 48 h foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE e em comparação com esses resultados foi realizada hidrólise da casca de coco com celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 da sigma[®]. As curvas de hidrólise foram montadas a partir da concentração de açúcares redutores formados durante a hidrólise.

3.16 Quantificação dos produtos de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.16.1 Preparação das amostras para análise de carboidrato no CLAE

Foram coletados 1,0 mL de amostras resultantes da hidrólise do extrato enzimático e centrifugadas a 6.000 rpm por 15 minutos, a 25 °C. Os sobrenadantes foram previamente filtrados em membrana de éster de celulose de 0,45 µm (FMS, CA-USA) e injetados no sistema de cromatografia. As injeções foram em duplicata e o analito confirmado pelo tempo de retenção do padrão.

3.16.2 Determinação da concentração de açúcares por CLAE

O analito foi quantificado usando o método de padrão externo. A concentração de carboidratos (celobiose, glicose, arabinose e xilose) 0,5 g/L a 10 g/L, foram medidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês HPLC) e identificados pelo tempo de retenção dos respectivos padrões (Sigma-Aldrich), injetados nas mesmas condições cromatográficas em que foram realizadas as análises e expressos em g/L, sendo analisados apenas os tempos em que houve uma maior concentração de açúcares redutores na melhor temperatura de hidrólise enzimática. Utilizou-se um sistema de CLAE Agilent Série 1260 Infinity (Wilmington, Delaware, EUA). O sistema de cromatografia consistiu de uma bomba quaternária (modelo G1311B), um amostrador automático (modelo G1329B), um compartimento de colunas termostatzadas (modelo G1316A) e um detector de índice de refração (modelo G1362A) e uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Solução de H₂SO₄ a 5 mmol.L⁻¹ em água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizado como fase móvel na taxa de 0,5 mL.min⁻¹ a 65 °C e uma corrida de 20 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL.

3.17 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 95% de confiança, utilizando o programa Statistica versão 7.0 (Statsoft), sendo os resultados expressos como médias \pm desvio padrão.

Foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%, para a comparação entre as médias, para os dados onde metodologia de superfície de resposta não pôde ser aplicada. Os gráficos comparativos foram elaborados por meio do programa OriginPro versão 8.0 (OriginLab).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção do substrato e da linhagem fúngica melhor produtora de celulases

Foram isolados dois fungos morfológicamente distintos a partir da casca do coco. Todos se mostraram capazes de degradar a celulose como única fonte de carbono. Contudo, apenas *Melanoporia* sp. CCT 7736 foi selecionado para os ensaios posteriores, pois apresentou melhores resultados de atividade enzimática em relação ao *Mucor circinelloides* CCT 7737 (outra linhagem estudada neste trabalho). E os resultados foram os seguintes: para *Melanoporia* sp. utilizando a casca de coco $3,03 \pm 0,35$ FPU/mL; palha de cana-de-açúcar $1,74 \pm 0,01$ FPU/mL e bagaço de cana-de-açúcar $0,48 \pm 0,06$ FPU/mL. Enquanto que, para *Mucor circinelloides* foram os seguintes: para a casca de coco $1,99 \pm 0,02$ FPU/mL; palha de cana-de-açúcar $0,33 \pm 0,03$ FPU/mL e bagaço de cana-de-açúcar $0,29 \pm 0,04$ FPU/mL.

Quanto ao substrato indutor na produção da enzima, melhores resultados de atividade foram encontrados quando utilizou-se o pó da casca de coco verde como substrato em comparação ao bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Esses resultados são coerentes, uma vez que, o fungo *Melanoporia* sp. foi isolado da casca de coco e portanto, melhores condições de adaptações do micro-organismo foram encontradas nesse resíduo. Segundo Moraes (2001), para um processo economicamente viável é desejável isolar linhagens que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo em curto período de tempo.

4.2 Caracterização da casca de coco

Diante da escolha do pó da casca de coco como substrato para a produção de celulases foi feita a caracterização quanto à sua composição em celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização do pó da casca de coco *in natura* e após pré-tratamento de deslignificação com NaOH

Pó da casca de coco	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
<i>in natura</i>	23,36 ± 2,12	12,10 ± 1,03	40,85 ± 1,26	21,00 ± 1,37	6,36 ± 2,30
pré-tratada	39,58 ± 0,28	16,65 ± 0,28	32,60 ± 5,42	7,67 ± 0,05	4,24 ± 0,47

Para o pó da casca de coco submetido à pré-tratamento de deslignificação as porcentagens de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos foram, 39,58%, 16,65%, 32,60%, 7,67% e 4,24%, respectivamente. Observa-se na Tabela 4 que os teores de celulose aumentaram para as amostras pré-tratadas com NaOH em relação ao substrato *in natura*, confirmando a eficiência do pré-tratamento. Entretanto, para a lignina o resultado não seguiu o mesmo comportamento, ou seja, o teor de lignina diminuiu em decorrência da ação do tratamento alcalino. Segundo Rabelo (2010), uma deslignificação completa é bastante difícil devido ao fato da lignina se localizar profundamente na parede celular, apresentar uma elevada consistência e fortes anéis de ligação C-O-C, C-C, além de uma tendência à recondensação (complexo lignina-carboidrato) durante a deslignificação.

Os resultados apresentados na Tabela 4 estão de acordo com os esperados, uma vez que o principal objetivo do pré-tratamento alcalino é remover lignina, sem solubilizar a hemicelulose e a celulose. O pré-tratamento alcalino possibilitou um aumento de 67,85% no teor de celulose e uma diminuição de 20,19% no teor de lignina, em relação ao substrato não tratado.

4.3 Otimização da temperatura e pH de determinação da atividade enzimática

Inicialmente este ensaio foi realizado em pH 6,5, pois de acordo com Oliveira (2010) este foi o pH de melhor atividade enzimática da enzima celulase de *Melanoporia* sp. em fermentação semi-sólida. Os resultados encontrados no referido ensaio univariado com a finalidade de encontrar a melhor condição para a determinação da atividade enzimática estão apresentados nas Figuras 7 e 8. A Figura 7 descreve o perfil de atividade celulásica em diferentes temperaturas.

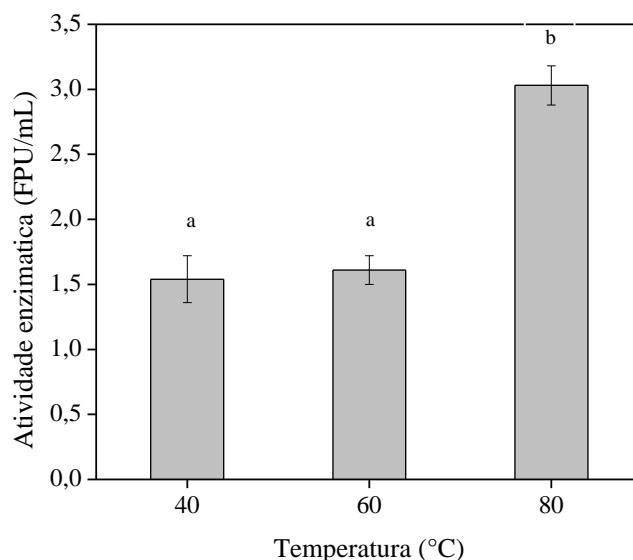


Figura 7 - Influência da temperatura na determinação da atividade enzimática de celulases produzidas por *Melanoporia* sp. em pH 6,5.

De acordo com os resultados obtidos na Figura 7 para a fermentação utilizando pó da casca de coco como fonte de carbono, o melhor resultado de atividade enzimática obtido foi na temperatura de 80 °C. Dentro deste contexto, percebe-se que a atividade enzimática aumentou com o aumento da temperatura. Deste modo, analisando as temperaturas de 40 °C e 60 °C houve um pequeno aumento da atividade enzimática (sem diferença estatística, $p < 0,05$), sendo que a mesma aumentou drasticamente na temperatura de 80 °C, apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

O aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C proporcionou um acréscimo de apenas 4,54% na atividade enzimática; entretanto, um acréscimo igual a 88,20% foi observado com o aumento da temperatura de 60 °C para 80 °C, indicando que a temperatura ótima da celulase analisada é de 80 °C e que a enzima produzida possivelmente apresenta característica termoestável.

Segundo Riegel (2003), a atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão de um reagente adequado (substrato) e está estritamente vinculada com os agentes desnaturantes, isso pelo fato da sua função catalítica depender da conformação na qual

a enzima se apresenta. A temperatura e o pH, por exemplo, são um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas mais importantes (SOHAIL *et al.*, 2009).

De acordo com Saha (2004) uma endoglucanase se mostrou termoestável à temperatura de 60 °C por 30 minutos, perdendo apenas 10% de sua atividade na temperatura de 70 °C por 30 minutos. A atividade máxima foi obtida na temperatura de 55 °C. Este resultado de temperatura ótima de 80 °C para *Melanoporia* sp. pode ser considerado bastante promissor em processos industriais, pois a estabilidade enzimática garante uma redução na desnaturação das celulasas submetidas a altas temperaturas.

A Figura 8 apresenta os resultados da influência do pH na atividade enzimática de celulasas.

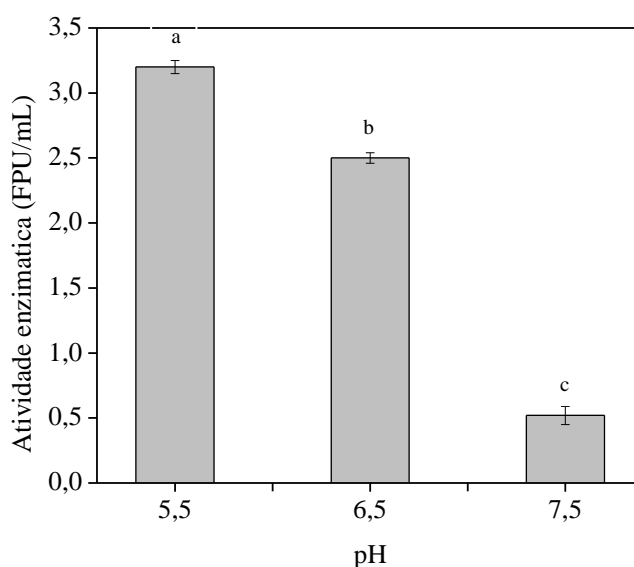


Figura 8 - Influência do pH na determinação da atividade enzimática a temperatura de 80 °C de celulasas produzidas por *Melanoporia* sp..

De acordo com os resultados obtidos para as fermentações utilizando pó da casca de coco como fonte de carbono, os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos a temperatura de 80 °C e pH 5,5 para *Melanoporia* sp. de acordo com as Figuras 7 e 8.

Em relação ao pH, esse é outro parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. Os resultados permitem afirmar que a atividade celulásica foi afetada na faixa de pH estudada. Observou-se que o pH ótimo de atividade das celulasas foi 5,5, onde obteve-se o valor máximo de atividade de $3,20 \pm 0,05$ FPU/mL (diferindo

estatisticamente dos demais pH's, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Matkar *et al.* (2013) também utilizando uma linhagem fúngica, verificou que o pH de melhor atividade de celulasas foi 5,5 com valor de 0,17 FPU/mL. No entanto, nesse estudo com *Melanoporia* sp. pode-se dizer que a linhagem conseguiu produzir celulasas com eficiência e assim, obter atividades superiores em relação às linhagens supracitadas.

De acordo com a Figura 8 o aumento no valor de pH, causa uma redução significativa na atividade da enzima, uma provável explicação para este comportamento parece estar relacionada ao fato que houve uma redução na velocidade da reação devido a alteração na concentração de íons H^+ , alterando a estrutura tridimensional das proteínas (TORTORA *et al.*, 2005). Assim, para os experimentos de hidrólise da casca de coco, o meio reacional teve seu valor de pH ajustado em 5,5, uma vez que este representa o máximo da atividade da enzima.

Goldbeck *et al.* (2012) avaliaram a atividade celulolítica de uma nova cepa de *Acremonium strictum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e verificaram que as melhores condições para a atividade de β -glucosidase foi em pH 5,0. Os mesmos autores também relataram que a maior atividade enzimática foi obtida com o aumento da temperatura, conforme observado no presente estudo.

Estes dados são de extrema importância na estratégia de purificação destas celulasas, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução da afinidade do método empregado.

4.4 Otimização da composição do meio de cultura para produção de celulasas

4.4.1 Efeito e concentração de sais minerais

Dos dez sais minerais avaliados no planejamento Plackett-Burman, apenas fosfato de potássio (KH_2PO_4) e sulfato de ferro ($FeSO_4$) apresentaram efeito positivo e significativo ($p > 0,05$) na produção da enzima celulase, sendo comprovado pela análise do Diagrama de Pareto de acordo com a Figura 9.

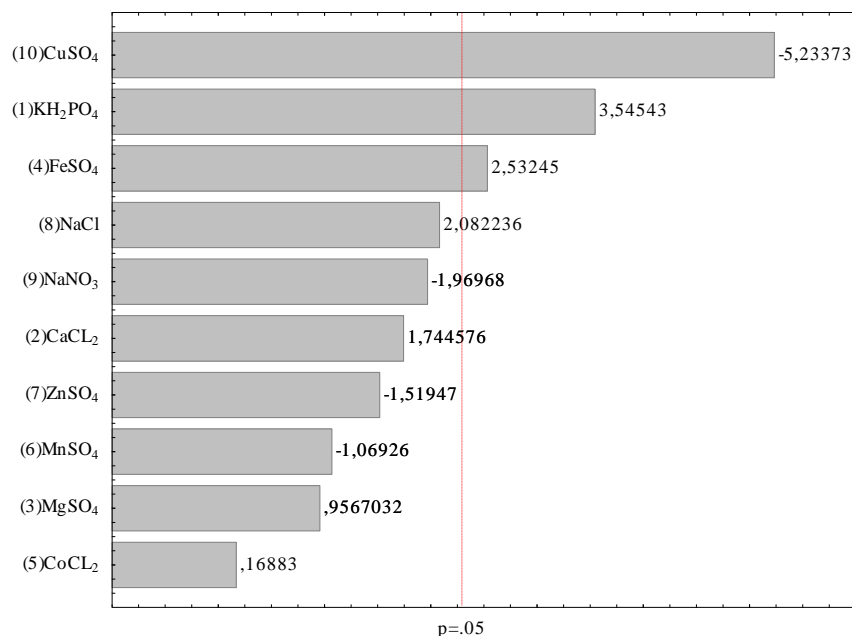


Figura 9 - Diagrama de Pareto indicando o efeito estimado dos sais minerais na produção de celulases por *Melanoporia* sp.

Alguns estudos afirmam a importância dos sais minerais na composição do meio de produção enzimática, pois os mesmos estão diretamente relacionados com o metabolismo dos micro-organismos, podendo estimular ou inibir a produção de enzimas (MACIEL *et al.* 2008), entretanto, a maioria dos sais testados neste estudo não apresentaram influência na produção de celulases. Este resultado confirma que o fungo *Melanoporia* sp. não é muito exigente nutricionalmente para secretar celulases.

É possível verificar que, embora sulfato de cobre (CuSO₄) tenha apresentado um efeito significativo, este foi negativo sobre a produção da enzima. Sabe-se que, para alguns micro-organismos, o cobre é um nutriente essencial sendo usado como catalisador de reações bioquímicas, estabilizador de proteína e mantenedor do equilíbrio osmótico da célula (SANTOS, 2006), mas neste estudo seu efeito não foi positivo. Isto pode ser explicado pelo fato de que alguns metais são essenciais para o metabolismo dos fungos, no entanto, eles podem se tornar tóxicos quando presentes em concentrações levemente superiores às requeridas para seu metabolismo (VALE *et al.* 2011). Desta forma, a adição de CuSO₄, pode ter exercido um possível efeito inibitório sobre a produção da enzima. Por outro lado, sabe-se que alguns metais, podem exercer o efeito de indução sobre a atividade de algumas enzimas celulolíticas, mas os íons Cu⁺²

e Zn^{2+} são os que mais frequentemente não induzem a ação de celulasas, podendo até provocar a perda total da atividade catalítica, quando presentes em determinadas concentrações (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

Como este tipo de planejamento tem por objetivo selecionar variáveis, os sais que não apresentaram efeito significativo não necessitam ser adicionados ao meio de produção de celulasas. Portanto, a partir das variáveis selecionadas com efeito significativo, ou seja, KH_2PO_4 e FeSO_4 , estes foram otimizados quanto a concentração, de forma a potencializar a variável resposta, através de um planejamento experimental composto central rotacional. A Tabela 5 apresenta os resultados da otimização da concentração de KH_2PO_4 e FeSO_4 .

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental composto central rotacional para otimização das concentrações de KH_2PO_4 e FeSO_4 na produção de celulasas

Ensaio	KH_2PO_4 (g/L)	FeSO_4 (g/L)	Atividade enzimática (FPU/mL)
1	0,100	0,005	$1,065 \pm 0,155$
2	0,100	0,100	$1,776 \pm 0,000$
3	1,000	0,005	$1,716 \pm 0,059$
4	1,000	0,100	$1,894 \pm 0,00$
5	0,100	0,052	$1,539 \pm 0,118$
6	1,000	0,052	$2,427 \pm 0,044$
7	0,555	0,005	$1,212 \pm 0,211$
8	0,555	0,100	$1,480 \pm 0,059$
9*	0,555	0,052	$1,851 \pm 0,019$
10*	0,555	0,052	$1,835 \pm 0,059$
11*	0,555	0,052	$1,854 \pm 0,025$
12*	0,555	0,052	$1,862 \pm 0,055$
13*	0,555	0,052	$1,861 \pm 0,066$

Nota: A temperatura de incubação do meio de produção da enzima foi de 30 °C na rotação de 150 rpm durante 72 horas; Os valores da atividade enzimática referem-se à média \pm desvio padrão.

*Pontos centrais

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a concentração mais adequada dos sais minerais significativos na produção de celulasas foi referente ao ensaio 6, quando utilizou-se 1,0 g/L de KH_2PO_4 e 0,052 g/L de FeSO_4 , pois nessas condições obteve-se a maior atividade enzimática no valor $2,43 \pm 0,14$ FPU/mL. Mesmo efeito também foi observado por Annamalai *et al.* (2014), quando verificou que o KH_2PO_4 apresentou efeito significativo na produção de celulasas, sendo sua concentração otimizada através do planejamento composto central.

Os demais sais avaliados (CaCl_2 , MgSO_4 , CoCl_2 , MnSO_4 , ZnSO_4 , NaCl , NaNO_3) não apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) de modo que não foram utilizados na etapa de otimização das concentrações, esse resultado sugere que as concentrações desses sais podem estar inibindo a produção da enzima, pois além de ser uma análise muito importante, possibilita a formulação da composição do meio que obtém-se a máxima produção enzimática, ainda reduz o custo final do processo, evitando o uso de componentes no meio de produção sem necessidade.

Portanto, o modelo matemático que representa a atividade enzimática dentro da região avaliada (pelo planejamento composto central), bem como o efeito das variáveis independentes (sais minerais) do ensaio enzimático foi expresso sob a forma da seguinte equação (Eq. 4)

$$Y = 0,857 - 0,147x + 0,989 x^2 + 28,140 y - 196,322 y^2 - 6,232 x*y \quad (4)$$

Onde:

x = Concentração de KH_2PO_4 (g/L);

y = Concentração de FeSO_4 (g/L);

Y = Atividade enzimática (FPU/mL).

De acordo com a Tabela de ANOVA, o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática (FPU/mL) foi igual a 13, ou seja, maior que o valor de $F_{5,7}$ tabelado (3,97) no intervalo de 95% de confiança. Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste F .

Adicionalmente a análise deste resultado o modelo apresentou um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,92$) demonstrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados de atividade enzimática obtidos na Equação 2, pois

quanto mais próximo de um for este valor, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de variância para a atividade enzimática (FPU/mL)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	1,30	5	0,26	13
Residual	0,11	7	0,02	
Total	1,41	12		
Coeficiente de determinação (R^2)	0,92			
F tabelado (95%)				$F_{5,7} = 3,97$

Diante do exposto, foi realizada a análise do planejamento composto central para otimizar a concentração dos sais minerais significativos, de acordo com o gráfico de superfície de resposta (Figura 10).

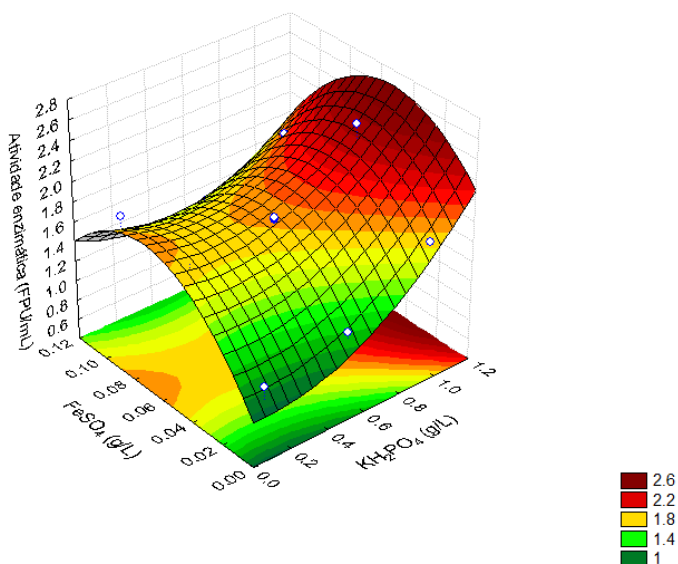


Figura 10 - Superfície de resposta para a atividade de celulasas produzidas por *Melanoporia* sp. em função da concentração de KH_2PO_4 e FeSO_4 .

A Figura 10 apresenta a superfície de resposta do efeito da concentração de fosfato de potássio e sulfato de ferro sobre a produção de celulasas. Observou-se que a produção de celulasas foi maior com o aumento da concentração de fosfato de potássio, pois a região

vermelho-escuro indica os melhores resultados de produção de celulases com atividade no valor de $2,43 \pm 0,04$ FPU/mL (ver Tabela 5). Este resultado mostra-se interessante pelo fato de que o fosfato tem um importante papel regulatório na síntese de metabólitos primários e secundários dos micro-organismos assim como seus efeitos no crescimento do organismo, na produção de enzimas e na estabilidade do pH (GUPTA *et al.*, 2003; PAPAGIANNI, 2004; SPIER, 2005).

Entretanto, com o aumento da concentração de ferro não foi observado o mesmo comportamento, uma hipótese é que a enzima possa ter sofrido inibição com o aumento da concentração de ferro (PAPAGIANNI, 2004).

4.4.2 Efeito da fonte de nitrogênio e tween 80

O Diagrama de Pareto mostra os resultados da suplementação de fontes de nitrogênio e *tween* 80, ao meio de produção enzimática, que apresentaram efeito significativo na produção de celulases (Figura 11).

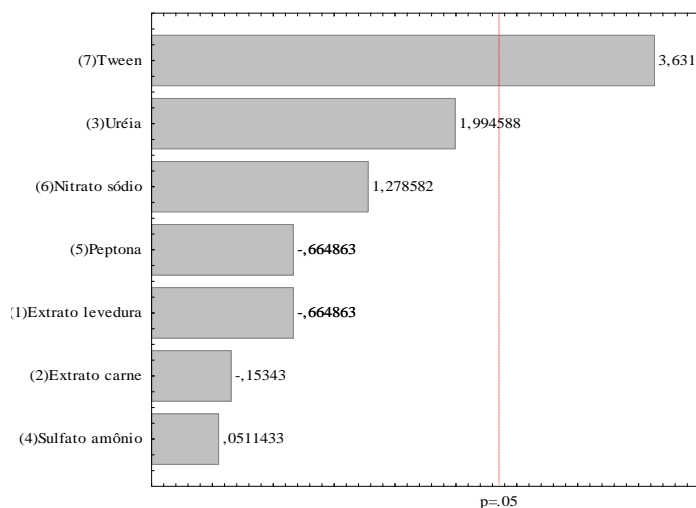


Figura 11 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função das fontes de nitrogênio e *tween* 80 na produção de celulases produzidas por *Melanoporia* sp.

Segundo Putzke e Putzke, (2002) o nitrogênio, por sua vez, influencia na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e de algumas vitaminas.

Sendo que, na análise do efeito das fontes de nitrogênio, nenhuma destas, apresentou efeito significativo, portanto, não serão utilizadas nos ensaios de otimização da composição do meio de produção da enzima. Este resultado é interessante do ponto de vista econômico, visto que o principal objetivo da indústria biotecnológica no desenvolvimento de bioprocessos, para produção de enzimas microbianas, utilizando resíduos lignocelulósicos, é reduzir custos pois, o meio de cultura empregado no processo, pode incidir em até 60% no valor final do produto (BANSAL *et al.*, 2012; DHILLON *et al.*, 2012).

Pesquisas mostram que, as fontes de nitrogênio como peptona, extrato de levedura, milhocina, nitrato de sódio, sulfato de amônio e nitrato de amônio apresentaram pouco efeito ou efeito negativo sobre a produção de celulase por *Trichoderma viride* GIM 3.0010, utilizando casca de banana como substrato (SUN *et al.*, 2011). Ncube *et al.* (2012) produziram celulasas a partir de *A. niger*, utilizando como fontes de nitrogênio nitrato de sódio, cloreto de amônio, peptona e mistura de peptona, extrato de levedura e extrato de malte, observando também que não houve aumento significativo na atividade de celulase como consequência da adição destes nutrientes como fontes de nitrogênio. Vale ressaltar que Shahriarinnour *et al.* (2011), também verificaram uma inibição na atividade enzimática pela adição de sulfato de amônio e uréia como fontes de nitrogênio, na produção de celulasas por *A. niger*.

Ramanathan *et al.* (2010) verificaram que a suplementação do meio com peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio e uréia, como fontes de nitrogênio para a produção de celulasas por *Fusarium oxysporum*, houve aumento na atividade enzimática. O mesmo comportamento foi verificado por Mrudula e Murugamma (2011) utilizando extrato de carne e levedura, peptona e nitrato de sódio na produção de celulasas por *Aspergillus niger*.

Entretanto, no presente estudo, as mesmas fontes de nitrogênio avaliadas não apresentaram efeito significativo na produção da enzima; somente a adição de *tween* apresentou efeito positivo e significativo sendo, portanto, utilizado para a otimização de sua concentração na composição do meio de cultura. Uma vez que, diversos estudos têm demonstrado o efeito estimulante de surfactantes sobre a produção de enzimas microbianas em fermentação submersa (DESWAL *et al.*, 2011). Esses agentes tensoativos normalmente utilizados são *tween* 80, Triton X-100 e polietilenoglicol (PEG), sendo o *tween* 80 o mais comumente utilizado (LIU *et al.*, 2006). Provavelmente estes compostos aumentam a permeabilidade da membrana da célula,

resultando em maior secreção das enzimas para o meio extracelular (ASSAREH *et al.*, 2012). Por isto, o efeito do *tween* 80 sobre a produção de celulases foi avaliado.

4.4.3 Efeito da concentração da casca de coco, lactose e *tween* 80 na produção de celulase

Com o objetivo de avaliar a influência da fonte de carbono na produção de celulases foi feito um ensaio para avaliar o efeito da lactose isolada e em associação com a casca de coco. Logo após foi realizado um planejamento composto central para otimizar as concentrações dessas fontes de carbono juntamente com *tween* 80. A Figura 12 apresenta os resultados do meio de produção enzimática com lactose isolada e em associação com a casca de coco como substratos.

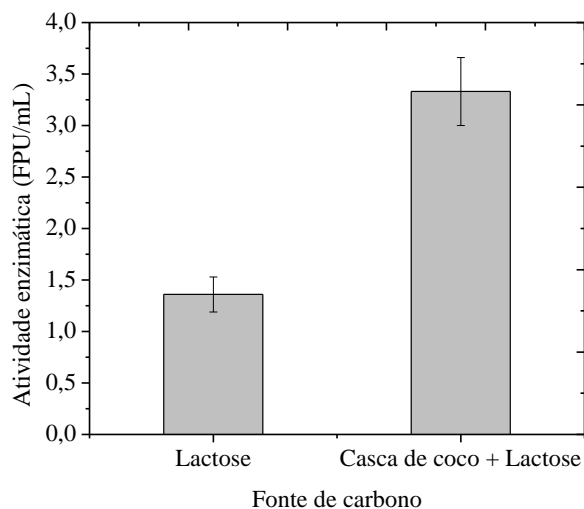


Figura 12 - Efeito da lactose e casca de coco na produção de celulases produzidas por *Melanoporia* sp.

Os resultados da Figura 12 denotam a boa capacidade de *Melanoporia* sp. em produzir celulases a partir de substratos lignocelulósicos e o bom efeito indutor da casca de coco associada à lactose como fontes de carbono.

Dentro desse contexto, Ramanathan *et al.* (2010) estudaram a produção de celulases por *Fusarium oxysporum*, utilizando lactose como única fonte de carbono e encontraram uma atividade máxima igual a 0,12 FPU/mL. Neste estudo, utilizando *Melanoporia* sp. nas mesmas

condições de fermentação, observou-se uma atividade enzimática igual a $1,36 \pm 0,17$ FPU/mL e ao utilizar como fonte de carbono, lactose e casca de coco, a atividade enzimática aumentou para $3,33 \pm 0,33$ FPU/mL.

Apesar dos resíduos lignocelulolíticos se apresentarem como um substrato promissor para o crescimento de linhagens fúngicas e produção de enzimas celulolíticas (BRIJWANI *et al.* 2010), esses podem não ser suficientes para fornecer os nutrientes necessários para o micro-organismo na produção máxima da enzima. Deste modo, a adição de nutrientes ao meio podem melhorar o crescimento celular e induzir a produção da enzima. A matriz do planejamento experimental para a avaliação da adição de lactose, *tween* e pó da casca de coco ao meio de produção de celulasas é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental composto central rotacional para a otimização das concentrações de *tween*, casca de coco e lactose no meio de produção de celulasas

Ensaio	<i>Tween</i> (%)	Casca de coco (g/L)	Lactose (g/L)	Atividade enzimática (FPU/mL)
1	0,500	5,000	5,000	0,230 ± 0,023
2	0,500	5,000	15,000	1,430 ± 0,357
3	0,500	15,000	5,000	0,953 ± 0,119
4	0,500	15,000	15,000	2,474 ± 0,008
5	1,500	5,000	5,000	1,371 ± 0,059
6	1,500	5,000	15,000	2,146 ± 0,120
7	1,500	15,000	5,000	1,013 ± 0,059
8	1,500	15,000	15,000	2,384 ± 0,000
9	0,159	10,000	10,000	2,044 ± 0,357
10	1,840	10,000	10,000	2,026 ± 0,238
11	1,000	1,591	10,000	1,811 ± 0,238
12	1,000	18,408	10,000	1,551 ± 0,000
13	1,000	10,000	1,591	1,073 ± 0,119
14	1,000	10,000	18,408	2,044 ± 0,059
15*	1,000	10,000	10,000	2,086 ± 0,038
16*	1,000	10,000	10,000	2,051 ± 0,060
17*	1,000	10,000	10,000	2,105 ± 0,059

Nota: A temperatura de incubação do meio de produção da enzima foi de 30 °C na rotação de 150 rpm durante 72 horas; Os valores da atividade enzimática referem-se à média ± desvio padrão.

*Pontos centrais

As fontes de carbono são elementos essenciais para os micro-organismos durante o período de crescimento e metabolismo (NAGAR *et al.*, 2010). No presente estudo, a lactose (utilizada como fonte de carbono) melhorou a produção de celulasas em comparação ao controle (meio fermentativo sem adição de lactose). Segundo alguns autores a lactose é considerada como um indutor potente para a produção de celulasas (KATHIRESAN; MANIVANNAN, 2006; SUN

et al. 2010; MATKAR *et al.* 2013) e essa afirmação mesmo sendo um enigma, sua semelhança estrutural com a celobiose pode explicar esse fato (MORIKAWA *et al.*, 1995).

É possível que várias substâncias possam atuar como indutores para bioprodução de celulasas. Para explorar a natureza de um indutor natural, vários pesquisadores avaliaram o potencial de moléculas como a lactose (SUN *et al.*, 2010) na produção de celulasas por fungos filamentosos (HECK *et al.*, 2005).

Morikawa *et al.* (1995) descreveram o papel da lactose como um indutor na produção de celulasas por *T. reesei* PC-3 e 7. Os autores concluíram que a lactose pode agir como um indutor, se consumida no micélio de *T. reesei* e os outros açúcares podem, supostamente, induzir a produção de lactose permease. Estudos realizados por Portnoy *et al.* (2011) verificaram que a lactose induziu a expressão do gene de *T. reesei* para a produção de celulasas, sendo utilizada como uma fonte de carbono indutora.

Com o intuito de melhorar a produção de celulasas, avaliou-se o efeito do surfactante *tween* 80 na produção da enzima, pois de acordo com a literatura, o mesmo pode efetivamente melhorar a eficiência da produção dessas enzimas. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão completamente elucidados (YANG *et al.*, 2011). Acredita-se que o *tween* aumenta o sítio de adsorção da celulose, o que significa que a taxa de conversão de celulose também aumenta, pois a superfície do polímero fica mais acessível à ação da celulase (SEO *et al.*, 2011). Além disso, os surfactantes alteram a estrutura do substrato, disponibilizando a celulose ao ataque enzimático e aumentam a estabilidade enzimática, reduzindo a desnaturação (YANG *et al.*, 2011). A Figura 13 apresenta o diagrama de Pareto, indicando as variáveis que apresentaram efeito na produção de celulasas por *Melanoporia* sp., quando avaliou-se o efeito da lactose, casca de coco e *tween*.

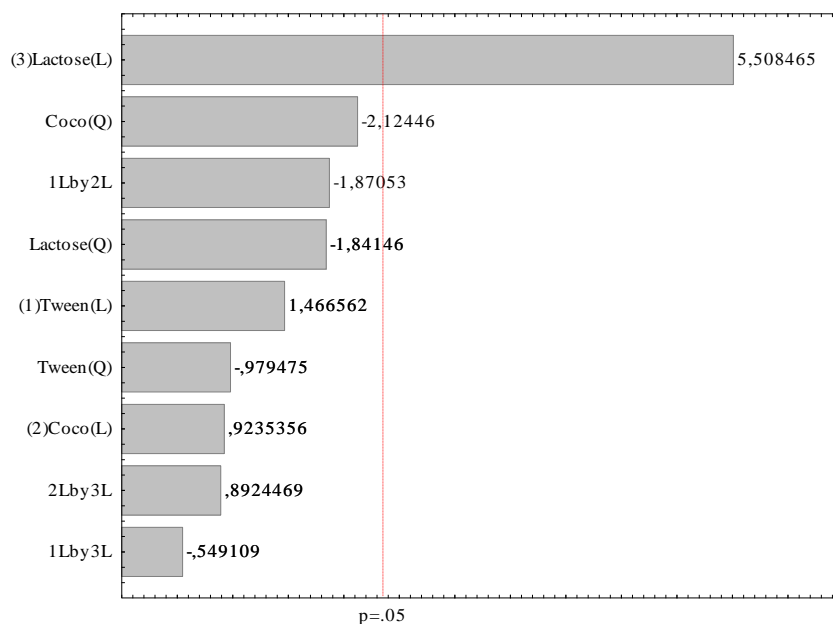


Figura 13 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função das fontes de lactose, coco e *tween* 80.

Das fontes de suplementação adicionadas ao meio observou-se que apenas a lactose apresentou efeito significativo e positivo na produção da enzima, no intervalo de confiança de 95%. Observando o diagrama de Pareto o efeito linear da lactose foi positivo, ou seja, quanto maior a concentração de lactose maior será a expressão de produção da enzima.

Dentro desse contexto, a adição de nutrientes ao meio fermentativo pode ter influenciado o metabolismo responsável pela produção da enzima. Enzimas normalmente possuem uma expressão no mecanismo de controle que pode ser estimulada ou inibida pelo produto presente no meio (SANTOS *et al.*, 2012).

Diante dos resultados encontrados, é possível concluir que a lactose pode ter “mascarado” o efeito do *tween* e da casca de coco. Deste modo, foi realizado outro planejamento composto central variando a concentração de coco e *tween* e fixando a lactose em 15 g/L, pois esta foi a concentração que proporcionou o melhor resultado de produção da enzima celulase.

A Tabela 8 apresenta o planejamento e os resultados da otimização das concentrações de *tween* e casca de coco.

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental composto central rotacional para otimização das concentrações de *tween* e casca de coco no meio de produção de celulasas

Ensaio	<i>Tween</i> (%)	Casca de coco (g/L)	Atividade enzimática (FPU/mL)
1	1,000	5,000	1,413 ± 0,181
2	1,000	15,000	1,917 ± 0,065
3	3,000	5,000	3,123 ± 0,030
4	3,000	15,000	2,342 ± 0,125
5	0,585	10,000	1,757 ± 0,065
6	3,414	10,000	2,667 ± 0,155
7	2,000	2,928	1,821 ± 0,190
8	2,000	17,071	1,847 ± 0,130
9*	2,000	10,000	1,300 ± 0,060
10*	2,000	10,000	1,310 ± 0,065
11*	2,000	10,000	1,301 ± 0,030

Nota: A temperatura de incubação do meio de produção da enzima foi de 30 °C na rotação de 150 rpm durante 72 horas; Os valores da atividade enzimática referem-se à média ± desvio padrão.

*Pontos centrais

A Figura 14 apresenta o diagrama de Pareto, apresentando os efeitos significativos para a suplementação do meio com *tween* e casca de coco na produção de celulasas.

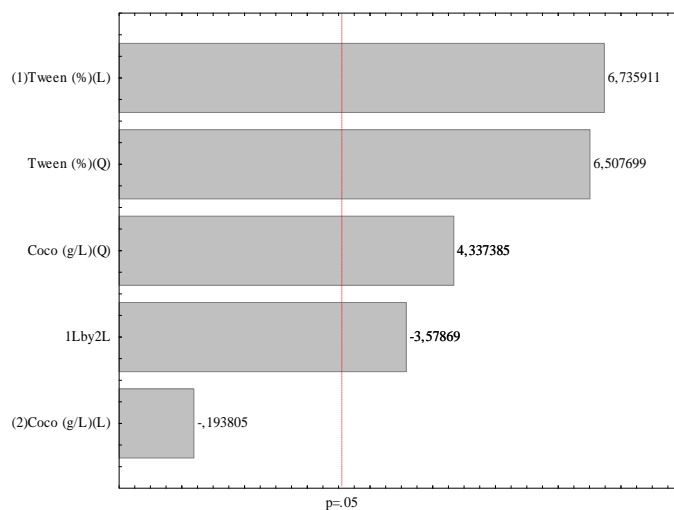


Figura 14 - Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável em função das fontes de casca de coco e *tween* 80 na produção de celulasas.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 14, o *tween* (linear) e (quadrático) e o coco (quadrático) apresentaram efeito significativo e positivo sobre a produção da enzima celulase, ou seja, ambos influenciam para melhorar o aumento da produção enzimática. Por outro lado, o efeito de interação foi negativo, isto quer dizer que, com o aumento simultâneo das concentrações de casca de coco e *tween* no meio, reflete em uma redução na produção da enzima. Portanto, o efeito quadrático do coco e *tween*, considerado como significativo, indicam o aumento exponencial da produção da enzima em função do aumento destes constituintes.

Vale ressaltar que, o programa estatística gera um modelo ajustado aos dados experimentais. E os termos lineares e quadráticos se referem aos termos do modelo gerado.

O modelo de regressão obtido para prever a atividade enzimática dentro da região avaliada, bem como o efeito das variáveis independentes (*tween* e coco) do ensaio enzimático está expresso sob a forma da Equação 5.

$$Y = 2,466 - 0,896 x + 0,491 x^2 - 0,136 y + 0,013 y^2 - 0,064 x*y \quad (5)$$

Onde:

$x = \textit{Tween}$ 80 (%);

$y = \text{Casca de coco}$ (g/L);

$Y = \text{Atividade enzimática}$ (FPU/mL).

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão obtido para a atividade enzimática, em função da concentração de *tween* e coco, é apresentada na Tabela 9. De acordo com a Tabela de ANOVA, o valor de F calculado para o modelo de atividade enzimática (FPU/mL) foi igual a 21,39, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,05) no intervalo de 95% de confiança. Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste F .

Tabela 9 - Análise de variância na produção de celulases (FPU/mL) em função da concentração de *tween* e coco (Lactose: 15 g/L)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	3,45	5	0,69	21,39
Residual	0,16	5	0,03	
Total	3,61	10		
Coeficiente de determinação	0,95			
F tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,05$

De acordo com o planejamento composto central obteve-se uma faixa ótima dentro do domínio experimental avaliado, ou seja, foi obtida uma atividade enzimática em torno de $3,12 \pm 0,03$ FPU/mL quando utilizou-se 3% de *tween* e 5 g/L de casca de coco para a produção da enzima, conforme pode ser visto na Figura 15.

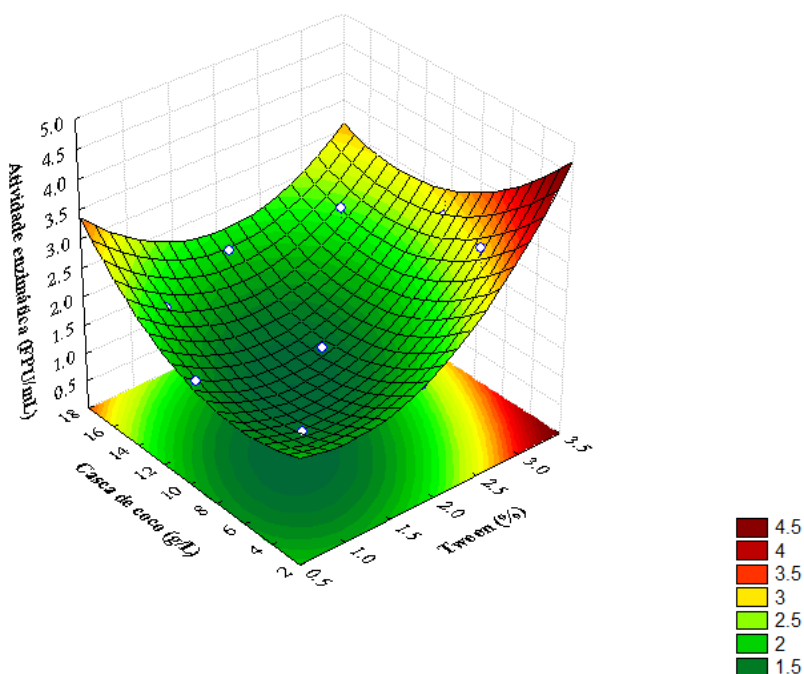


Figura 15 - Superfície de resposta para a atividade de celulase em função da concentração de coco e *tween*.

Através do gráfico de superfície de resposta (Figura 15), é possível observar que com a diminuição da concentração de casca de coco e *tween* no meio, a produção da enzima é

reduzida, confirmando que a casca de coco e o *tween* contribuem para o aumento da produção de celulases por *Melanoporia* sp. como já foi citado anteriormente.

Segundo Rodrigues e Iemma (2005) o estudo comparativo dos tipos de planejamento podem ser utilizados para uma triagem e análise dos efeitos das variáveis, sendo importante para mostrar que a metodologia de *screening design* é uma ferramenta muito útil para a avaliação prévia de variáveis, consistindo de uma estratégia sequencial para se obter a otimização de um processo.

4.5 Otimização do pH do meio de produção enzimática

A Figura 16 apresenta os resultados da atividade enzimática de celulases para os diferentes pH's avaliados na produção da enzima.

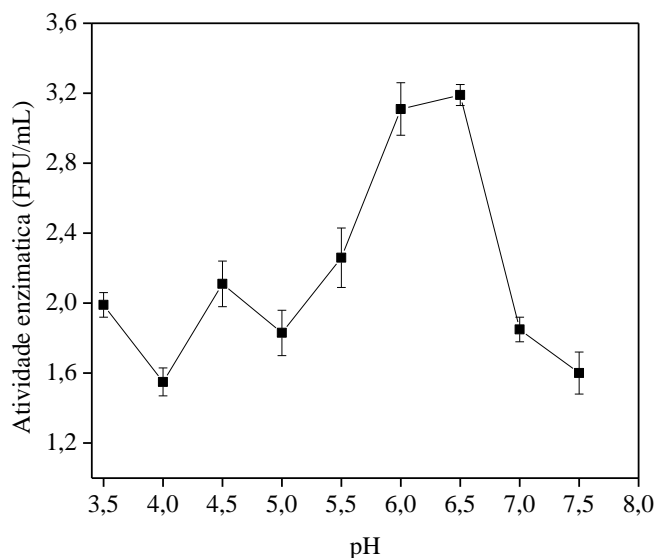


Figura 16 - Otimização do pH de produção da enzima celulase.

Ao analisar o pH de produção de celulases, verificou-se que a maior atividade enzimática quantificada foi em pH 6,5, onde foi obtido um valor de $3,20 \pm 0,36$ FPU/mL. Valor de pH similar também foi encontrado por Kathiresan e Manivannan (2006) quando estudaram o

pH ótimo de máxima produção da enzima celulase por *Penicillium fellutanum*, em fermentação submersa, utilizando substrato lignocelulósico, encontrando-se um pH ótimo de 6,5. De acordo com esses autores o pH de produção de uma enzima é um parâmetro crucial de estudo em processos fermentativos, pois o mesmo desempenha um papel importante na indução de alterações morfológicas, na secreção e na estabilidade de enzimas (MATKAR *et al.*, 2013; PAPAGIANNI, 2004).

Os resultados indicam que, com o aumento do pH (na faixa de 3,5 a 6,5) houve um aumento na produção da enzima. Mesmo comportamento foi observado por Azzaz *et al.* (2012), na produção de celulases por *A. niger*, utilizando palha de trigo como substrato, sendo encontrada um valor de 0,017 FPU/mL em pH 6,0, resultado este consideravelmente inferior ao encontrado no presente estudo.

Para a produção de celulases por *Melanoporia* sp. foi possível observar que o sistema celulolítico desta linhagem o torna promissor, pois foram obtidos valores de atividade elevados em pH próximo da neutralidade, enquanto a maioria dos micro-organismos produtores de celulases atuam em pH mais ácido. Estes dados sugerem que o sistema enzimático pode variar dependendo do metabolismo e da linhagem em estudo.

Segundo Miettinen-Oinonen *et al.* (2004), celulases com pH próximo da neutralidade apresentam vantagens em relação às celulases ácidas, para aplicação na indústria têxtil, uma vez que agredem menos o algodão, além de sua aplicação em detergentes (HAKAMADA *et al.*, 2001; SHIRAI *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2012). As celulases com ação em pH próximo da neutralidade, por sua vez, são úteis no processamento do amido, atuando como enzimas adicionais (ZHANG; XING; LIU, 2004) e no branqueamento da polpa de papel (TECHAPUN *et al.*, 2003).

Desta forma, este resultado estabelece *Melanoporia* sp. como um micro-organismo interessante na produção de celulases microbianas, devido a versatilidade de seu sistema enzimático (MACIEL, 2013).

Analisando os resultados do pH de produção enzimática na faixa de 3,5 a 5,5 é possível observar picos nos valores de atividade. Uma possível explicação para a ocorrência dos picos observados, está relacionada ao fato da enzima produzida, não ser uma enzima pura, e sim um extrato enzimático bruto, podendo estar presentes mais de uma enzima, com atividades celulolíticas em diferentes pH's (MACIEL, 2013). Segundo Silva (2008) tal comportamento é

possível, pois há relatos na literatura para alguns micro-organismos, como *Aspergillus nidulans* e *Chrysosporium lucknowense*, capazes de produzir mais de uma enzima com atividade celulolítica.

Vários relatos na literatura indicam faixas ácidas para este parâmetro, na atividade enzimática de celulases produzidas por fungos. Andrade *et al.* (2011) e Delabona *et al.* (2013) encontraram pH igual a 3,0 como o que maximizou a atividade catalítica de celulases produzidas a partir de *A. fumigatus* e *Trichoderma* sp. IS-05. Ncube *et al.* (2012) produziram celulases de *A. niger* por fermentação em estado sólido, e encontraram a atividade máxima em pH 4,0. Singh *et al.* (2009) verificaram que o pH 4,8 foi o ótimo para a atividade das celulases produzidas por *A. heteromorphus*.

Tendo em vista que grande parte das celulases reportadas na literatura científica apresentam valores de pH ótimo dentro da faixa ácida, os resultados deste estudo consistem em um diferencial atrativo, uma vez que foram observadas valores de pH próximo da neutralidade.

4.6 Resumo da otimização dos parâmetros estudados para a enzima celulase de *Melanoporia* sp. realizada em incubadora tipo *shaker*

Finalizando esta etapa de otimização das condições de máxima produção e atividade da enzima celulase, em agitador orbital, para em seguida prosseguir com o processo fermentativo em biorreator, os melhores resultados dos parâmetros analisados foram os seguintes: pH de produção da enzima: 6,5, a temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm; pH de atividade enzimática: 5,5; temperatura de atividade enzimática: 80 °C; tempo de fermentação: 72 h e composição do meio de produção da enzima sendo de 5 g/L de casca de coco; 15 g/L de lactose; 3% de *tween*; 1 g/L de KH_2PO_4 e 0,05 g/L de FeSO_4 .

4.7 Experimentos realizados em biorreator

4.7.1 Determinação do tempo de fermentação

Os resultados para o melhor tempo de fermentação por *Melanoporia* sp. utilizando a casca de coco como substrato foi analisado durante 72 horas, no entanto, a máxima atividade da enzima ($4,59 \pm 0,26$ FPU/mL) ocorreu em 24 horas de fermentação em condições controladas (pH 6,5 a 30 °C e 250 rpm), resultando em uma concentração de açúcares redutores de $12,00 \pm 0,07$ g/L, conforme resultado apresentado na Figura 17.

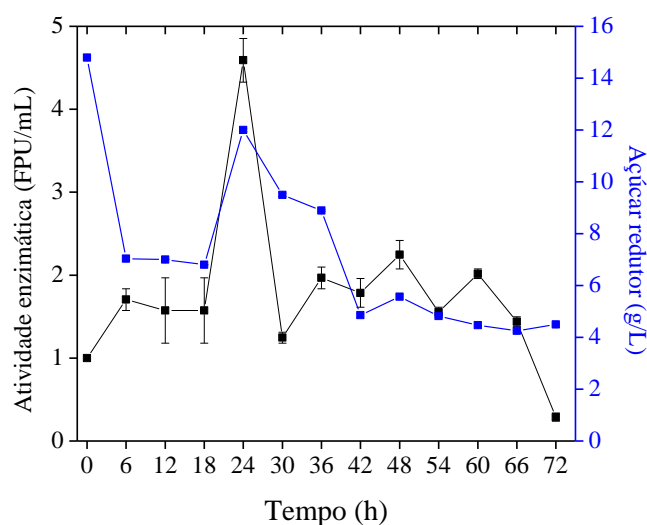


Figura 17 - Atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação por *Melanoporia* sp..

De acordo com os resultados apresentados na Figura 17, é possível observar um decréscimo na curva de açúcares redutores nas seis primeiras horas, é provável que o micro-organismo tenha consumido o açúcar contido no meio durante a fase inicial de crescimento, por isso a concentração de açúcares diminuiu rapidamente, mas com o decorrer do tempo de fermentação a concentração desses açúcares permaneceu constante de 42 h a 66 h, coincidindo com a atividade constante de celulasas.

Song e Wei (2010), também verificaram comportamento similar com uma linhagem fúngica em sua fase inicial de crescimento em relação ao consumo de açúcares redutores e a produção de celulasas.

Ainda de acordo com a Figura 17, observa-se um aumento na concentração de açúcares redutores (AR) à medida que aumenta a atividade enzimática. Após este tempo, os AR diminuíram gradativamente. Este processo pode ser explicado devido à produção de enzimas pelo fungo, as quais são responsáveis pela degradação da celulose presente no substrato em açúcares como celobiose e glicose (ZHANG *et al.*, 2006; RABELO, 2007; AGUIAR, 2010), os quais foram metabolizados pelo fungo.

Os resultados da Figura 17 também mostram um pico de atividade em 24 horas e uma redução dessa atividade enzimática após 24 horas de fermentação, isso pode ser atribuída à escassez de nutrientes necessários ao metabolismo do micro-organismo, ou ainda ao acúmulo de metabólitos secundários, levando a uma redução na produtividade (LIMA, 2010).

Os fungos filamentosos em fermentação submersa podem crescer sob a forma de *pellets* (aglomerado de células) ou na forma dispersa (concentrado de hifas e agregados), dependendo das condições de cultivo e da própria linhagem. Sabe-se que a morfologia influencia diretamente na produtividade (FAHEINA JÚNIOR, 2012). Neste trabalho, *Melanoporia* sp. cresceu sob a forma dispersa, levando a um aumento na viscosidade do meio ao longo do tempo de fermentação, o que pode ter dificultado a transferência de massa e calor no sistema. A Figura 18 apresenta o crescimento do fungo *Melanoporia* sp. no meio de produção da enzima antes e após a fermentação.

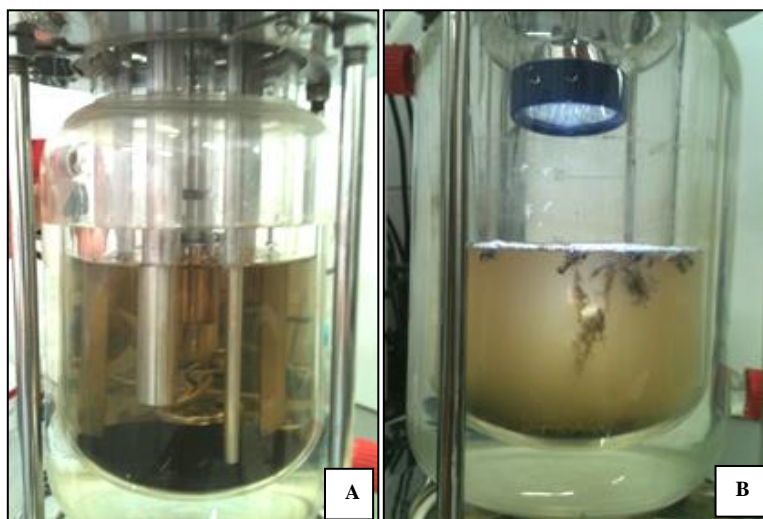


Figura 18 - Meio de produção da enzima antes (A) e após (B) a produção de celulasas por *Melanoporia* sp., utilizando a casca de coco como substrato.

Em um estudo avaliando a influência das condições nutricionais na morfologia de *Trichoderma* sp. RUT C-30 na produção de celulases, observaram que em meio fermentativo, sem a formação de *pellets*, houve uma maior produção de FPase em 72 h. Os autores enfatizam que o crescimento na forma de hifas em meio líquido, facilita a adesão dos fungos no material celulósico, auxiliando na obtenção de uma maior produtividade de enzimas celulolíticas. Este fenômeno possivelmente está relacionado à limitação da transferência de oxigênio dentro dos *pellets* (DOMINGUES *et al.*, 2001; PAPAGIANNI, 2004).

Por outro lado, a enzima produzida pode ter sofrido desnaturação devido aos metabólitos primários e secundários secretados pelo micro-organismo, ou ainda ter sofrido inibição pelo acúmulo de glicose e celobiose no meio (LIMA, 2010).

Resultados obtidos por Rocha (2010) para avaliação da produção da enzima celulase por diferentes linhagens de *Aspergillus niger* apontaram que as maiores produções de celulases ocorreram com 72 horas de fermentação. Considerando que neste trabalho obteve-se em 24 horas a produção máxima de celulases, ou seja, em 1/3 do tempo descrito por esse autor, observa-se que a linhagem *Melanoporia* sp. possui grande potencial para a produção desta enzima, visto que obteve-se uma atividade bem superior em um curto período de tempo, quando comparado com outros autores .

Confirmando a informação acima, Matkar *et al.* (2013) obtiveram uma atividade enzimática de 0,59 FPU/mL em um período de 144 horas de fermentação. Park *et al.* (2011) estudaram a produção de celulases por *Acremonium cellulolyticus* utilizando como fonte de carbono substrato celulósico em biorreator sob condições controladas. A máxima atividade enzimática foi igual a 0,73 FPU/mL após 96 horas de fermentação. Cabe ressaltar que, a atividade enzimática de celulases produzida por *Melanoporia* sp., em apenas 24 horas de fermentação, foi 6,3 vezes maior que o valor encontrado por esses autores. Diante dos resultados apresentados acima, optou-se por realizar as demais fermentações no período de 24 horas, pois foi obtida uma melhor atividade da enzima, mesmo utilizando extrato enzimático bruto.

4.7.2 Influência da injeção de O₂ durante o processo fermentativo na produção da enzima

Na fermentação realizada com injeção de O₂, a máxima atividade da enzima foi igual a $2,09 \pm 0,6$ FPU/mL. O processo de aeração não foi favorável para a produção de celulases por

Melanoporia sp., pois ocorreu uma redução de 54,47% no valor de atividade enzimática em relação ao processo fermentativo sem a injeção de O₂. Ritter (2009) alcançou melhores resultados para produção de celulases por *Penicillium echinulatum* ao mesmo nível de saturação utilizado nesse estudo. O que nos permite concluir que a exigência de O₂ vai depender do metabolismo do micro-organismo em questão.

Este resultado aponta que *Melanoporia* sp. não exige grandes quantidades de O₂ para produzir celulases, apenas o O₂ produzido pela agitação do rotor é suficiente. Raimbault (1998) mencionou que a agitação mantém as condições aeróbias, além de atuar na dessorção do dióxido de carbono formado durante a fermentação. Pelo processo de agitação, também é possível induzir reações metabólicas, tal como ocorre por estresse hídrico, estresse térmico ou mudanças de temperatura, podendo estes processos alterar drasticamente o comportamento bioquímico ou metabólico.

4.7.3 Influência do controle do pH durante o processo fermentativo na produção da enzima

Para a fermentação com e sem o controle de pH, os valores obtidos foram de $4,59 \pm 0,26$ FPU/mL e $1,77 \pm 0,19$ FPU/mL, respectivamente. No caso em que não houve o controle de pH, o mesmo variou de 6,5 para 3,8 ao final do tempo de fermentação. Segundo Camassolla e Dillon (2007), a redução da atividade enzimática pode estar relacionada à diminuição brusca no pH que podem interferir na desnaturação de proteínas e conseqüentemente, a produção da enzima, além de influenciar na fisiologia do micro-organismo. Portanto, a fermentação em biorreator se mostrou favorável para a produção de celulases visto que possibilitou o controle de pH, resultando em um aumento de 259,32% em relação ao processo conduzido sem o controle de pH. Nos demais ensaios, o pH foi mantido em 6,5 durante todo o processo fermentativo.

Este resultado evidencia que as condições controladas em fermentador são muito importantes para o bom desenvolvimento do processo fermentativo. A produção da enzima em agitador orbital (*shaker*) (dados apresentados anteriormente) apresentou resultado de atividade enzimática 48% inferior em relação ao rendimento obtido em fermentador. Além disso, a utilização do biorreator permitiu reduzir o tempo de produção da enzima em 48 horas (~ 67%), o que torna o processo economicamente viável para a indústria de bioprocessos.

4.8 Efeito do pré-tratamento alcalino sobre a produção de celulases

Os resultados de atividade enzimática para *Melanoporia* sp. utilizando o substrato submetido a pré-tratamento alcalino resultou em uma diminuição da atividade de celulases, ou seja, com a deslignificação da casca de coco não houve um aumento na atividade da enzima que foi de $1,64 \pm 0,06$ FPU/mL e $4,14 \pm 0,11$ FPU/mL utilizando a casca de coco *in natura* (lignificada). Pode ser que o pré-tratamento tenha inibido o crescimento do micro-organismo e portanto não permitiu a produção da enzima. Aparentemente, a lignina presente no resíduo não dificultou a indução da produção de celulases pelo micro-organismo, isto pode ser explicado pelo fato do fungo produzir ligninase e ter sido isolado da casca de coco, pois os fungos pertencentes ao gênero *Melanoporia* apresentam a capacidade de decompor substratos lignocelulósicos (ZHOU; DAI, 2012), sendo as enzimas celulases, hemicelulases e ligninases responsáveis por essa decomposição. Por isso, as atividades dessas enzimas foram quantificadas no complexo enzimático.

Nesse sentido, a degradação da lignina por fungos é possível através da secreção de enzimas denominadas de ligninases, as quais podem ser classificadas em fenoloxidasas (lacase) e peroxidases (lignina peroxidase e maganês peroxidase), podendo ser produzidas em quantidades e combinações diferentes pelos micro-organismos de acordo com sua capacidade e necessidade. A maior atividade observada foi de lignina peroxidase (Lip) ($3,49 \pm 0,22$ UI/L), enquanto que lacase (Lac) e maganês peroxidase (MnP) não foram quantificadas em quantidade considerável.

Como a deslignificação é uma etapa a mais no processamento da matéria-prima, em nível industrial não seria interessante, pois é um processo oneroso e de baixo rendimento.

Em um estudo realizado por Aguiar e Menezes (2000) para a produção de endoglucanases em bagaço de cana, foi observado que o bagaço sem tratamento de deslignificação apresentou níveis de produção enzimática para endoglucanases semelhantes aos bagaços tratados com hidróxido de sódio a 4% e vapor, como também foi observado neste trabalho.

Desta forma, optou-se por usar a casca de coco lignificada, pois os resultados de atividade enzimática foram superiores em relação à casca de coco pré-tratada com NaOH. Resultado esse similar foi encontrado por Oliveira (2010), quando utilizou-se casca de coco deslignificada por *Melanoporia* sp. para produção de celulases em fermentação semi-sólida, foi

também evidenciado que a deslignificação não agrega nada ao processo. Esse é um resultado muito interessante, pois a grande maioria dos trabalhos fazem pré-tratamento dos resíduos e por ser um processo caro, torna-se dispendioso, entretanto, neste trabalho não foi necessário. Uma vez que o pré-tratamento da casca de coco geraria um incremento no custo de produção das celulases.

Dentro deste contexto vale ressaltar que, o gênero *Melanoporia*, é apontado como causador de podridão marrom em madeira (KIM *et al.*, 2003), sendo capaz de degradar por completa a lignina (CAPELARI e ZADRAZIL, 1997), celulose e hemicelulose, reduzindo o substrato a pedaços cúbicos amarronzados (RYVARDEN, 1991; SAMUELSSON; GUSTAFSSON; INGELÖG, 1994). Apesar de *Melanoporia* apresentar a capacidade de decompor substratos lignocelulósicos, até o momento não foi encontrado na literatura relatos de sua utilização, na produção de celulases, em processos fermentativos.

4.9 Determinação das atividades enzimáticas de xilanase, CMCase e celobiase

Os valores das atividades do complexo celulásico foram de $164,97 \pm 0,79$ UI/mL para xilanase; $152,32 \pm 0,47$ UI/mL para CMCase e $23,71 \pm 0,95$ UI/mL para celobiase nas condições ideais de atividade de celulases, onde houve maior atividade enzimática, ou seja, na temperatura de 80 °C e pH 5,5. A Figura 19 apresenta os resultados das atividades enzimáticas supracitadas.

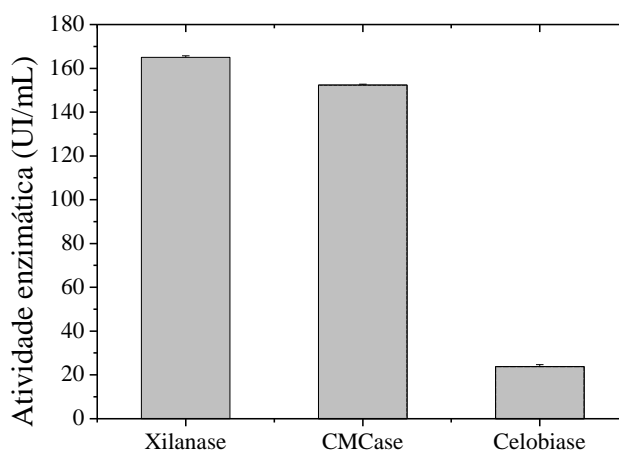


Figura 19 - Atividades enzimáticas do complexo celulásico de *Melanoporia* sp.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 19, as frações de xilanase e CMCase apresentaram atividades enzimáticas mais elevadas em relação à atividade de celobiase. Mesmo a atividade enzimática de celobiase (β -glicosidase) tendo sido inferior às demais enzimas, a mesma tem um papel importante (mesmo em pequena quantidade) no mecanismo de atuação das celulases, pois atua sobre a hidrólise da celobiose, que é um inibidor da atuação das celulases (SANTOS, 2011).

Sukumaran *et al.* (2009) obtiveram 14,98 UI/mL de CMCase, 0,22 UI/mL de β -glicosidase utilizando *Trichoderma reesei* RUT C-30. Vale ressaltar que esse micro-organismo é considerado um dos melhores produtores de celulases e neste trabalho foram encontrados resultados bastante superiores aos reportados para *T. reesei*. Os mesmos autores obtiveram 6,77 UI/mL de CMCase e 2,84UI/mL de β -glicosidase utilizando *Aspergillus niger* MTCC 7956.

Com base nos resultados apresentados neste estudo, os mesmos indicam que o complexo celulásico de *Melanoporia* sp. apresenta as três atividades enzimáticas necessárias para produzir glicose a partir de celulose, com grande potencial para ser utilizada na sacarificação enzimática de vários substratos lignocelulósicos, pois diferentemente da maior parte das linhagens de *Aspergillus* e *Trichoderma* reportadas na literatura, esta consegue produzir os 3 tipos de celulases com atividades superiores em relação às linhagens convencionais.

Comparando-se as atividades do complexo observou-se que, xilanase, CMCase e celobiase produzidas por *Melanoporia* sp. apresentaram estabilidade em altas temperaturas, ou seja, a 80 °C, este resultado confirma a viabilidade de aplicação destas enzimas em processos industriais.

4.10 Estabilidade enzimática em diferentes condições de pH e temperatura

Este planejamento foi realizado para otimizar as condições operacionais da enzima em estudo. Vale ressaltar que a atividade enzimática inicial foi de $4,59 \pm 0,26$ FPU/mL. A Tabela 10 apresenta os resultados dos ensaios do planejamento experimental para analisar o pH e a temperatura de estabilidade da enzima celulase produzida por *Melanoporia* sp.

Tabela 10 - Planejamento experimental para otimização dos parâmetros de estabilidade da enzima celulase durante 24 h e 48 h

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade enzimática (FPU/mL) em 24 h	Atividade enzimática (FPU/mL) em 48 h
1	50	5,0	1,95 ± 0,00	1,24 ± 0,24
2	50	8,0	2,70 ± 0,00	2,67 ± 0,19
3	80	5,0	3,90 ± 0,25	2,86 ± 0,00
4	80	8,0	2,02 ± 0,19	1,95 ± 0,39
5	50	6,5	1,70 ± 0,06	1,37 ± 0,06
6	80	6,5	2,15 ± 0,06	1,82 ± 0,26
7	65	5,0	2,28 ± 0,06	2,08 ± 0,00
8	65	8,0	2,85 ± 0,19	3,64 ± 0,31
9 (*)	65	6,5	2,08 ± 0,03	1,96 ± 0,07
10(*)	65	6,5	2,18 ± 0,06	1,85 ± 0,09
11(*)	65	6,5	2,09 ± 0,04	1,79 ± 0,00

(*) pontos centrais

A análise dos resultados apresentados na Tabela 10 confirmam a importância de analisar os parâmetros pH e temperatura em conjunto, visto que a interação entre as duas variáveis têm influência direta. Por isto, decidiu-se estudar a influência destes parâmetros na estabilidade da enzima através de um planejamento experimental, uma vez que essa ferramenta possibilita avaliar o efeito de interação de diferentes variáveis independentes na variável resposta. Por exemplo, nos ensaios 1 e 2 é possível observar a influência direta do pH, neste caso ao variar o pH, na mesma temperatura houve um aumento na atividade após 24 horas.

Diante desse resultado é possível afirmar que, em processos fermentativos, onde cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras variáveis é essencial que seja utilizado um método de otimização que permita detectar as possíveis interações, de modo que um ponto ótimo ou região ótima seja escolhido, nas condições experimentais.

A Figura 20 apresenta os efeitos das variáveis independentes pH e temperatura de estabilidade enzimática. Observa-se que no intervalo de 95% de confiança, os efeitos de pH (quadrático) e a interação pH *versus* temperatura apresentaram efeito significativo sobre a estabilidade enzimática do extrato bruto nos dois tempos avaliados. No caso do pH, o efeito quadrático foi positivo, ou seja, para aumentos nos valores de pH resultam em atividades enzimáticas maiores, mas dentro do domínio experimental analisado. Por outro lado, a interação pH e temperatura apresentou efeito negativo, ou seja, à medida que aumentam pH e temperatura, tem-se uma redução na atividade da enzima. As variáveis temperatura (linear e quadrático) e pH (linear) não apresentaram efeito significativo.

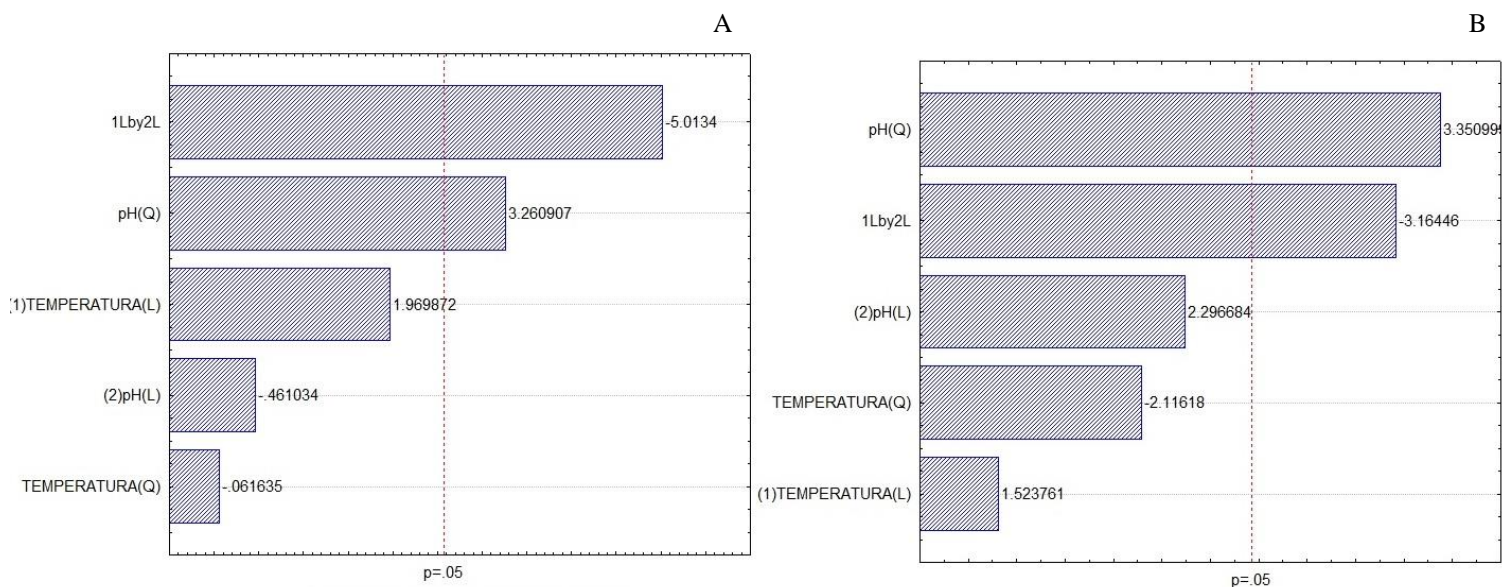


Figura 20 - Efeitos estimados sobre o pH e temperatura de estabilidade de celulasas em 24 (A) e 48 (B) horas sob as condições do planejamento experimental

Os modelos de regressão obtidos para as atividades enzimáticas durante 24 horas e 48 horas estão expressos pelas (Eq. 6 e 7), respectivamente.

$$Y = -1,44 + 0,23x - 0,00005 x^2 - 1,37y + 0,26 y^2 - 0,032xy \quad (6)$$

$$Y = -6,14 + 0,46x - 0,002 x^2 - 2,57 y + 0,34 y^2 - 0,02xy \quad (7)$$

Onde:

Y = atividade enzimática (FPU/mL)

x = temperatura

y = pH

Os modelos foram estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%, uma vez que os valores de F calculado (8,11 para a Eq. 6 e 6,08 para a Eq. 7) foram maiores que

o valor de F tabelado ($F_{5,5} = 5,05$). Os coeficientes de correlação foram $R^2 = 0,89$ (Eq. 6) e $R^2 = 0,86$ (Eq. 7). A Figura 21 mostra as superfícies de resposta construídas a partir das Eq. 6 e 7.

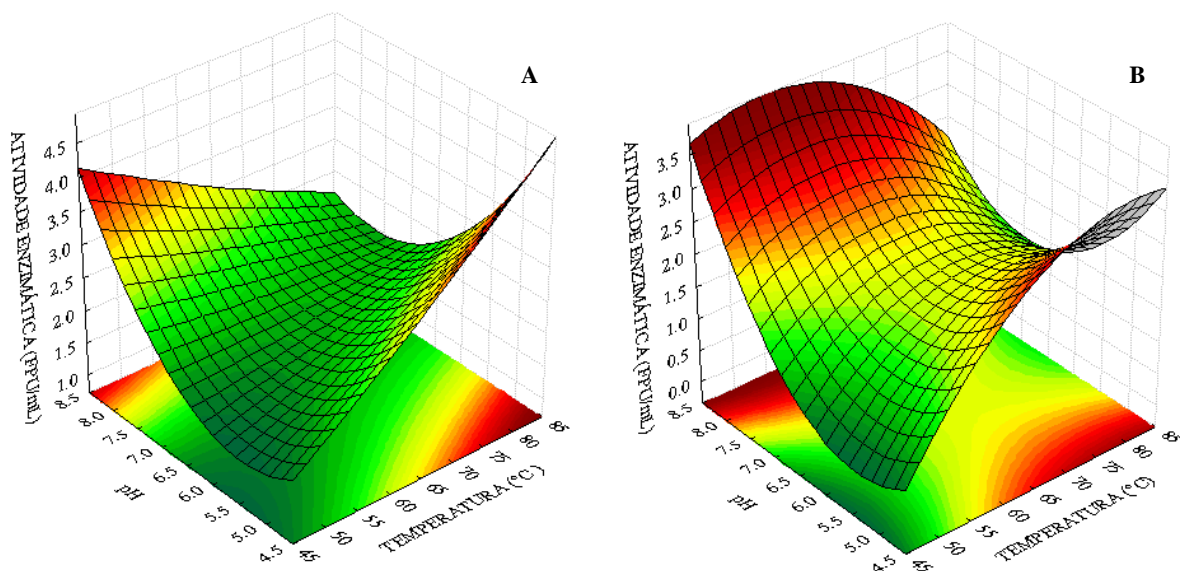


Figura 21 – Superfície de resposta para a estabilidade enzimática durante 24 (A) e 48 horas (B).

Analisando a Figura 21 observa-se que as superfícies de resposta obtidas apresentaram um ponto de sela. Neste caso, os modelos estimados não possuem um único ponto ótimo. Dentro das condições experimentais avaliadas, duas regiões ótimas se destacaram nas temperaturas de 65 °C e 80 °C.

Na temperatura de 80 °C (ensaio 3), obteve-se o maior valor de atividade enzimática após 24 horas. O que denota a elevada estabilidade da enzima produzida por *Melanoporia* sp. durante um longo período de tempo, em contraste com resultados de outras celulasas citadas na literatura. Ressaltando que, a maioria das referências consultadas, apresentavam ensaios de estabilidade de enzimas, no máximo, em 1 h ou 2 h.

Deve-se considerar que esse resultado foi obtido com a enzima bruta, ou seja, a mesma não passou por nenhum processo de purificação, o que é interessante do ponto de vista econômico, uma vez que as etapas *downstream* contribuem sobremaneira para o valor final do produto.

A estabilidade observada para a enzima produzida por esta linhagem apresenta diversas vantagens potenciais, na hidrólise de materiais lignocelulósicos, conforme indica Farinas *et al.* (2010), sendo elas: estabilidade mais elevada (que permite tempos de hidrólise longos) e uma maior flexibilidade para as configurações do processo. Portanto, o uso de enzimas termoestáveis ou em condições operacionais que não comprometam sua estabilidade é interessante e viável do ponto de vista industrial (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Entretanto, considerando que esta temperatura é muito alta para condução de processos a nível industrial, nos quais são desejadas condições de trabalho mais brandas. Por isso, optou-se por utilizar a temperatura de 65 °C, pois além de ser a condição que gerou a segunda melhor estabilidade enzimática, é uma temperatura amena para processos de hidrólise. Com a finalidade de confirmar que em até 48 horas a enzima manteve-se estável e definir uma região ótima, realizou-se um ensaio univariado fixando a temperatura em 65 °C e variando o pH de 5,0 a 8,0. A Figura 22 apresenta os resultados de atividade residual durante 2, 4, 6, 24 e 48 horas.

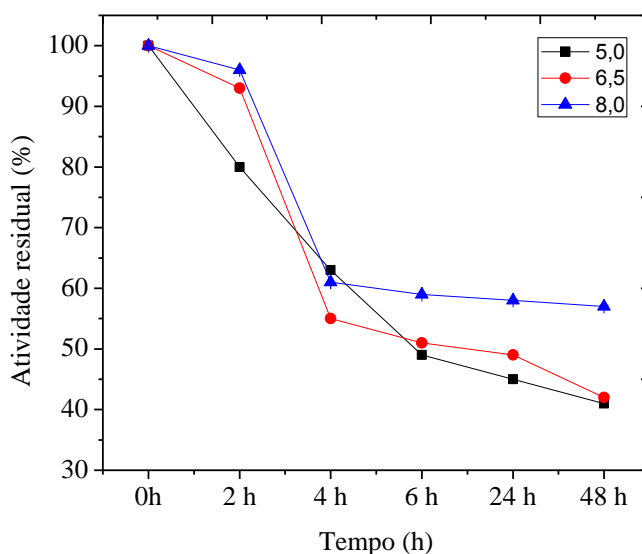


Figura 22 - Atividade residual de celulasas em diferentes pH's a temperatura de 65 °C.

Analisando a Figura 22 verifica-se que em pH 8,0 a atividade residual após 2 horas e 48 horas a temperatura de 65 °C foi de 96% e 57%, respectivamente, ou seja, houve uma pequena redução na atividade residual da enzima no decorrer do tempo.

De acordo com os resultados analisados pode-se dizer que, o extrato bruto enzimático submetido à temperatura de 65 °C por 2, 4, 6, 24 e 48 horas, apresentou boa estabilidade em uma ampla faixa de pH 5,0 a 8,0 em relação a maioria das celulasas reportadas na literatura. O que pode ser confirmado pelos valores de atividade residual descrito acima. Esses ensaios confirmam que a enzima pode ser aplicada em hidrólise enzimática sem perder a estabilidade, pois, os tempos de hidrólise enzimática são da ordem de 48 horas (SINGHANIA *et al.*, 2014; WAGHMARE *et al.*, 2014) e a enzima deve apresentar atividade durante todo o processo, ou seja, a enzima precisa tolerar às condições submetidas, sendo estável.

A tolerância de celulasas a altas temperaturas não é uma característica comum. A maioria dos estudos de caracterização de celulasas é realizado com as enzimas purificadas, como é o caso dos estudos apresentados por Xu *et al.* (2014), que estudaram a estabilidade de celulasas numa ampla faixa de temperatura e pH e concluíram que a 80 °C a enzima teve a sua atividade reduzida em 17% após 40 minutos. Balasubramanian e Simões (2014) estudaram a estabilidade térmica de carboximetilcelulase e verificaram que na temperatura de 50 °C a enzima reteve 84,4% de sua atividade em 2 horas. No estudo realizado por NG *et al.* (2010), os autores avaliaram a estabilidade térmica de β -glucosidase purificada a 58 °C e observaram que nesta temperatura, a atividade foi reduzida a metade de sua atividade inicial em 2 horas.

Vale ressaltar que, valores extremos de pH, podem causar desnaturação protéica considerável e conseqüente inativação enzimática. Por isso, é muito importante saber em que faixa de pH a enzima é mais estável, já que o pH de máxima estabilidade nem sempre coincide com o de máxima atividade.

Segundo Nelson e Cox (2011), mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas. Enquanto que mudanças mais brandas podem induzir a uma dissociação da enzima, e algumas vezes podendo levar a formas mais ativas, ou também a sua completa inativação. Essas alterações podem causar diminuição seguida de aumento na atividade enzimática devido à alteração da estrutura terciária. A enzima por ser uma molécula de cadeia longa pode requerer um tempo para se estabilizar.

4.11 Estabilidade de celulasas em função da estocagem em baixas temperaturas

O efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade das celulasas produzidas por *Melanoporia* sp. foi determinado como um parâmetro importante para a utilização comercial desta enzima. Primeiramente, os resultados mostram a atividade residual (%) da enzima estocada em baixas temperaturas ao longo do tempo, e em seguida, é apresentado o tempo de meia-vida da enzima. A Figura 23 apresenta o perfil linear de inativação para a enzima celulase em função do decréscimo da atividade residual com o tempo.

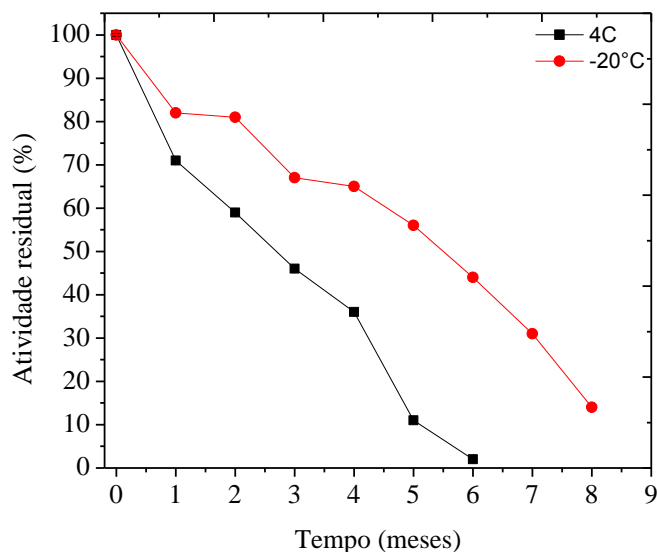


Figura 23 - Perfil de atividade residual durante o armazenamento do extrato bruto da enzima celulase nas temperaturas de 4 °C (■) e -20 °C (●) durante 8 meses.

Analisando o gráfico acima, a atividade residual da enzima bruta foi de 82% e 71% após 30 dias, sob as temperaturas de -20 °C e 4 °C, respectivamente. Entretanto, após 180 dias a temperatura de 4 °C a enzima praticamente perdeu toda sua atividade, apresentando um decaimento linear de maneira acentuada com atividade residual de 2%. Na temperatura de -20 °C, a atividade residual após 180 dias foi igual a 44% e com 240 dias chegou a 14%. Esse resultado confirma uma estabilidade considerável da enzima, em relação aos trabalhos citados na literatura, mesmo armazenada no caldo bruto e sem a presença de estabilizadores (como o glicerol, por exemplo), os quais são conhecidos por aumentar a estabilidade enzimática durante a estocagem

(SINGH *et al.* 1991; KAPOOR *et al.* 2008) e o tempo de meia-vida da enzima. Em relação ao estudo realizado por Maciel (2006) a estabilidade de uma xilanase sob temperatura de congelamento (-20 °C), na presença de glicerol, verificou que após 5 dias de armazenamento a atividade residual foi de 72%.

Segundo Narra *et al.* (2014), a estabilidade de uma endoglucanase purificada produzida por *A. terreus* e armazenada a 4 °C foi estudada e verificou-se que após 5 meses houve um decréscimo de 3 a 5% de sua atividade inicial. Em outro estudo realizado por Iqbal *et al.* (2011), uma endoglucanase de *T. viride* apresentou uma atividade residual em 58% após 30 dias armazenada sob as mesmas condições de temperatura (4 °C). Esses dados confirmam a boa estabilidade das enzimas produzidas por *Melanoporia* sp., pois apresentaram maior estabilidade nas temperaturas de armazenamento quando comparada com os resultados supracitados.

Segundo Heller *et al.* (1997), o congelamento à -20 °C ou -80 °C são os métodos mais comuns de armazenamento de proteínas à frio. No entanto, o congelamento de soluções enzimáticas frequentemente causa desnaturação estrutural e perda da função biológica, devido às variações de pH e “stress” (agregação, desdobramentos e dissociações) causados pela formação de cristais de gelo e ciclos de congelamento-descongelamento, o que reduz a estabilidade enzimática, mas para a enzima de *Melanoporia* sp. a temperatura de congelamento (-20 °C) foi a mais indicada por apresentar uma alta estabilidade e maior tempo de meia-vida por vários meses em armazenamento. Esse resultado é muito atrativo, pois a maioria das enzimas apresentam estabilidade inferior a 30 dias.

Para o cálculo dos parâmetros de estabilidade, constante de desativação e o tempo de meia-vida da enzima, foi utilizado o modelo de ajuste de dados linear (cinética de ordem zero), pois, os dados obtidos neste estudo não foram ajustados através de um ajuste exponencial. Enquanto a maioria das enzimas obedecem à um modelo de primeira ou segunda ordem, as enzimas produzidas por *Melanoporia* sp. obedecem à um modelo de ordem zero.

A partir dos resultados apresentados na Figura 22, conclui-se que houve um decaimento da atividade residual apresentando um perfil linear, esta informação foi útil para a busca de um modelo que fosse capaz de calcular a constante de desativação (k) e o tempo de meia-vida ($t_{\frac{1}{2}}$) do biocatalisador, desta forma, estes parâmetros de estabilidade foram obtidos através do modelo de ordem zero (Warnock *et al.*, 2009), para a enzima estocada em baixas

temperaturas. A Tabela 11 mostra os resultados do tempo de meia-vida para a enzima celulase produzida por *Melanoporia* sp..

Tabela 11 - Tempos de meia-vida ($t_{\frac{1}{2}}$) para a enzima estocada no caldo bruto nas temperaturas de 4 °C e -20 °C ao longo do tempo

Temperatura (°C)	Tempo de meia-vida (meses)	Constante de ordem zero (k)	Coefficiente de correlação (R^2)
4	3,12	$0,16 \pm 0,01$	0,97
-20	5,55	$0,09 \pm 0,006$	0,96

O modelo em que se utiliza o ajuste linear utilizando os parâmetros de uma inativação enzimática se adequou melhor aos dados experimentais, pois foram obtidos R^2 próximos de 1. Observou-se que, para as duas temperaturas, a perda de atividade da enzima armazenada a 4 °C foi superior a da enzima sob a temperatura de -20 °C, o que nos permite concluir que na temperatura de congelamento a enzima possui maior estabilidade por um longo período de tempo, e portanto possui um tempo de meia-vida maior em relação à temperatura de refrigeração, sendo dessa forma a temperatura de armazenamento escolhida por proporcionar uma melhor estabilidade enzimática.

Diante do exposto, fica evidente a estabilidade da enzima produzida por *Melanoporia* sp. sob a temperatura de congelamento. O que mais uma vez torna esta enzima interessante do ponto de vista industrial, uma vez que é possível tanto aplicá-la quanto armazená-la no extrato bruto sem necessidade de purificação.

4.12 Determinação do perfil de proteínas presentes no extrato enzimático de *Melanoporia* sp. através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel desnaturante é uma ferramenta muito utilizada para a caracterização de componentes protéicos após a separação do polipeptídeo desnaturado. Entre as principais vantagens desse método incluem a identificação de proteínas particulares na mistura e estimativa da massa molar da enzima (LACKS e SPRINGHORN, 1980; SANTOS, 2011).

Através desta técnica realizou-se a detecção da massa molar de proteínas do extrato enzimático obtido por uma linhagem fúngica em diferentes tempos de fermentação submersa. A Figura 24 apresenta o perfil eletroforético do extrato enzimático produzido por *Melanoporia* sp..

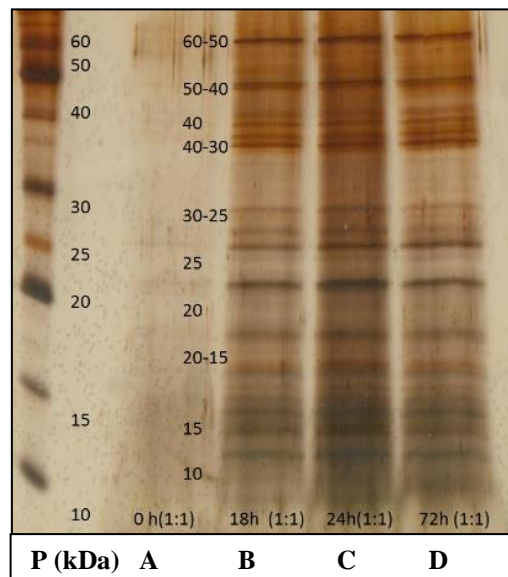


Figura 24 - Perfil eletroforético de proteínas em SDS-PAGE do extrato enzimático de *Melanoporia* sp. em tempos de fermentação diferentes. P é o padrão de massa molar; A, B, C e D são as amostras da fermentação nos tempos de 0h, 18h, 24h e 72h, respectivamente.

Os resultados mostram que o perfil eletroforético (SDS-PAGE) do extrato analisado reflete as múltiplas proteínas detectadas no gel e revelaram que a enzima apresentou várias bandas com massas molares que variaram entre 10 kDa e 60 kDa de acordo com a Figura 24. É importante ressaltar que o gel apresentou bandas até 60 kDa pois, a partir dessa massa molar não foram detectadas bandas protéicas. Destas bandas, as que se apresentaram no tempo de 24 horas de fermentação estão fortemente coradas e as bandas que se apresentaram nos tempos 0, 18 e 72 horas apresentaram nenhuma ou baixa intensidade. Com base nestes resultados, sugere-se que as bandas fortemente coradas no tempo de 24 horas apresentam maior produção de proteína, corroborando com os resultados anteriores, nesse estudo, que relataram uma maior atividade enzimática.

Diante do exposto, Dyka *et al.* (2009) analisando a separação das bandas de proteínas de um sistema celulolítico e hemicelulolítico de *Bacillus licheniformis* SVD1 com presença de atividades de avicelase e CMCase, observaram a presença de 14 bandas que variaram de 14 kDa

a 122 kDa. Annamalai *et al.* (2013) utilizando biomassa lignocelulósica como substrato para *B. halodurans* CAS 1 na produção de celulases, analisando a massa molar dessa enzima estimou um valor de 44 kDa, o autor afirma que esse resultado é bem maior em relação à massa molar de celulases de outras linhagens de *Bacillus* encontradas na literatura.

Quando comparamos os dados obtidos no presente trabalho com os descritos pela literatura, podemos concluir que o micro-organismo *Melanoporia* sp. apresenta variabilidade genética que resulta na síntese de diferentes isoformas de celulases.

Muitos micro-organismos quando induzidos a produzir celulases, acabam apresentando enzimas de massas molares distintas, por isso que se torna difícil sua identificação. Samuel *et al.* (2010) verificaram uma celulase produzida por *Bacillus* isolado de resíduos, a qual apresentou massa molar entre 6 kDa e 20 kDa.

Kim *et al.* (2009) e Annamalai *et al.* (2014) identificaram a massa molar das celulases e concluíram que pode variar bastante. Em um estudo com *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53, uma CMCase purificada e celulase, apresentaram massas molares estimadas em 56 kDa. Shrinivas *et al.* (2010), também identificou uma xilanase, de *Bacillus*, apresentando mesma massa molar.

A massa molar das celulases fúngicas pode variar muito, encontrando-se valores bem distintos (CASTRO; PEREIRA, 2010). A maioria das endoglucanases apresentam massa molar entre 25 kDa a 50 kDa. Enquanto as β -glicosidades são maiores, variando entre 165 kDa e 182 kDa. Estudos realizados por Eriksson *et al.* (1990) envolvendo *Phanerochaete chrysosporium* mostraram que a variação para esta espécie pode apresentar entre 28 kDa e 37 kDa para endoglucanases e 114 kDa para β -glucosidases.

Dentre as bandas detectadas neste estudo, obteve-se aproximadamente 15 bandas fortemente coradas em 24 horas de fermentação, sugerindo-se estarem relacionadas com as enzimas CMCase e endoglucanase, de acordo com as referências supracitadas.

Apesar dessa variedade encontrada entre massas molares, ainda não foi estabelecida uma correlação entre a atividade enzimática e o tamanho da enzima, mas sabe-se que enzimas de baixa massa molar, compostas de uma única cadeia polipeptídica e que possua pontes dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alta massa molar (FURIGO; PEREIRA, 2012).

4.13 Hidrólise enzimática da casca de coco

Para iniciar o processo de hidrólise da casca de coco foi necessário concentrar as proteínas do extrato enzimático de *Melanoporia* sp. para a obtenção de uma enzima menos diluída. Os resultados que avaliam o melhor método de concentração das enzimas estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Métodos de concentrações do extrato enzimático de *Melanoporia* sp.

Métodos de concentração	Atividade enzimática (FPU/mL)	Atividade específica ¹ (FPU/mg de proteína)
Extrato enzimático bruto	2,63 ± 0,45 ^a	10,40 ± 1,51 ^c
Ppt sulfato de amônio (0-20%)	0,22 ± 0,02 ^b	0,30 ± 0,09 ^a
Ppt sulfato de amônio (20-60%)	2,52 ± 1,62 ^a	0,60 ± 0,21 ^a
Ppt com PEG 1500	0,50 ± 0,16 ^c	2,03 ± 0,67 ^b
Ppt com PEG 4000	1,75 ± 0,16 ^d	8,40 ± 0,42 ^c
Sistema AMICON	3,14 ± 0,22 ^e	0,96 ± 0,00 ^a
Rotaevaporador	47,11 ± 2,89 ^f	16,53 ± 2,91 ^d

¹A atividade específica foi calculada dividindo-se a atividade enzimática pela massa de proteína;

Em uma mesma coluna, médias com letras iguais não diferem significativamente (p<0,05) entre si pelo teste de Tukey.

Ppt: precipitação; PEG: polietilenoglicol.

Analisando-se os resultados obtidos nos processos, de precipitação com sulfato de amônio e PEG, ultrafiltração (sistema AMICON) e concentração por rotaevaporação, foram selecionados os melhores resultados entre cada um deles visando identificar qual foi o mais indicado para concentrar o extrato celulolítico produzido por *Melanoporia* sp.. A comparação foi feita em termos de atividade específica.

De acordo com os resultados da Tabela 8 e avaliando-se as atividades específicas obtidas após precipitação com 0-20% de sulfato de amônio, verificou-se que os valores encontrados foram inferiores aos da precipitação com 20-60%, mas de acordo com o teste de Tukey não houve diferença significativa entre ambas as frações analisadas com sulfato de amônio. Esse resultado demonstra que a precipitação com sulfato de amônio não foi eficiente. Dentro desse contexto, Silva, (2011) avaliando a precipitação de celulasas com 20% de sulfato de amônio verificou que não foi possível observar nenhuma precipitação. Comparando as precipitações com PEG, a maior atividade específica foi obtida com o PEG 4000.

Dentre os processos de concentrações avaliados, a rotaevaporação apresentou a maior atividade específica em relação aos outros métodos de concentração das enzimas presentes na

amostra, apresentando um aumento de 58,94% na atividade específica em relação ao extrato bruto. Além de ser um processo economicamente barato, foi o método escolhido para avaliar o processo de hidrólise enzimática, visto que, melhor concentrou as proteínas do extrato enzimático de *Melanoporia* sp., apresentando elevada atividade específica, e diferença significativa de acordo com o teste de Tukey, quando comparado com os demais métodos avaliados.

Partindo agora para a análise do processo de hidrólise, vale ressaltar que, uma das etapas iniciais desse trabalho foi a obtenção do extrato enzimático celulolítico sintetizado por *Melanoporia* sp. utilizando casca de coco verde como substrato. Em seguida, a fim de analisar a eficiência da celulase produzida, avaliou-se o perfil de hidrólise dessa enzima, hidrólise esta catalisada pelo próprio extrato produzido. Segundo Ribeiro (2010), este mecanismo deve ser controlado em processos de síntese de enzimas de indução, como é o caso de enzimas do complexo celulolítico.

Os resultados dessa etapa estão apresentados na Figura 25 com o perfil de variação ao longo do tempo, da concentração de açúcares redutores no processo de hidrólise da casca de coco pré-tratada e não tratada nas temperaturas de 65 °C e 80 °C.

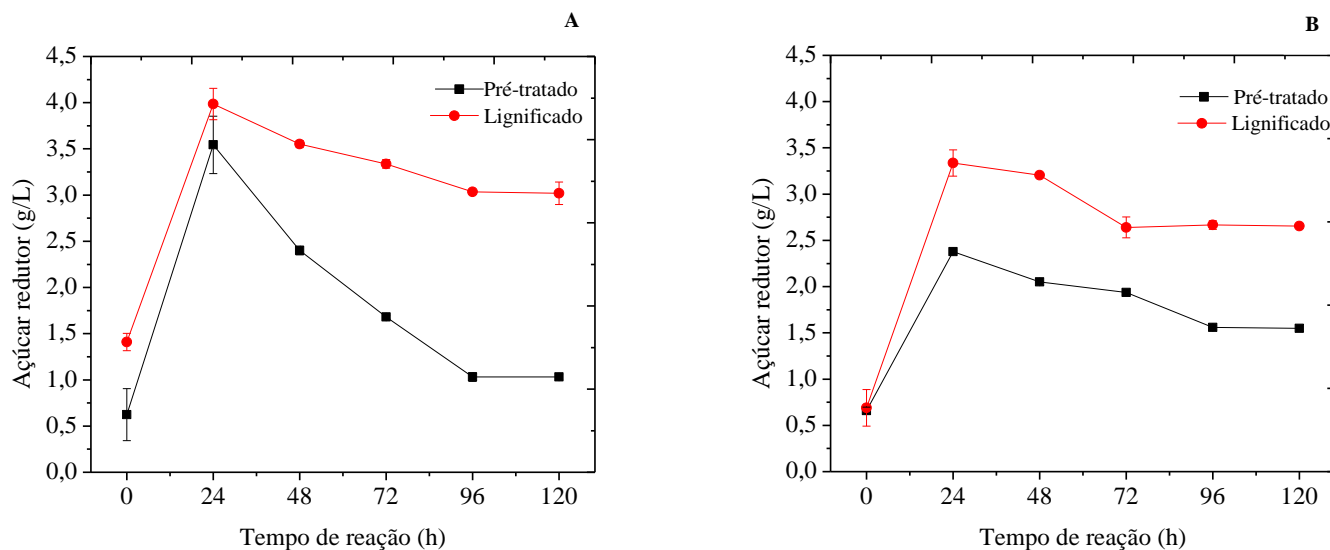


Figura 25 - Perfil da concentração de açúcares redutores produzidos durante a hidrólise enzimática da casca de coco utilizando a enzima produzida por *Melanoporia* sp. na temperatura de 65 °C (A) e 80 °C (B).

Analisando a Figura 25, observa-se que os resultados sobre o efeito do tempo de hidrólise revelaram que a quantidade de açúcares redutores produzidos a partir da hidrólise da casca de coco aumentou progressivamente entre 0 e 24 horas, apresentando um pico em 24 horas, na temperatura de 65 °C e com concentração de açúcares redutores igual a $3,54 \pm 0,31$ g/L e $3,98 \pm 0,16$ g/L para casca de coco deslignificada e lignificada (*in natura*), respectivamente e rendimento em açúcares redutores de 85,22% e 44,71% para os resíduos *in natura* e pré-tratado, respectivamente. Analisando a temperatura de 80 °C, o perfil de hidrólise foi similar, ou seja, apresentou também um pico em 24 horas, com uma concentração de açúcares redutores igual a $2,37 \pm 0,01$ g/L e $3,33 \pm 0,14$ g/L, para casca de coco com e sem pré-tratamento, respectivamente, apresentando um rendimento em açúcares redutores de 71,30% para o resíduo *in natura* e 29,96% para o pré-tratado com NaOH.

Esse resultado apresenta a viabilidade da enzima produzida por *Melanoporia* sp., um fungo isolado da casca do coco, que produziu uma enzima com grande potencial de sacarificação e com um poder de hidrólise bem superior aos relatados na literatura, mesmo em condições não otimizadas. Cabe ressaltar que, a hidrólise enzimática foi mais eficiente na casca de coco *in natura* em 24 horas, comportamento este incomum para este tipo de reação. Uma hipótese para explicar tal comportamento, reside no fato de que quando as enzimas são utilizadas para hidrolisar a mesma biomassa na qual foram produzidas, observa-se maior eficiência e especificidade no processo de hidrólise, conforme Lynd *et al.* (2002).

Dentro desse contexto, Liu *et al.* (2011) relataram que a quantidade de açúcares redutores produzidos durante a hidrólise da forragem de milho pré-tratada, de celulasas bruta produzidas por *Aspergillus fumigatus* Z5, também aumentou progressivamente na fase inicial, sendo entre 6 h e 72 h, no entanto, a máxima concentração foi obtida depois de 120 horas de reação.

Waghmare *et al.* (2014) avaliando a concentração de açúcares redutores produzidos durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado encontrou um máximo de 0,3 g/L durante 48 horas e 0,08 g/L quando utilizou o bagaço *in natura*. Annamalai *et al.* (2014) avaliaram o efeito da hidrólise da palha de arroz por uma celulase purificada. Comparando os resultados obtidos neste estudo com o trabalho dos autores supracitados, o extrato enzimático, não purificado, de *Melanoporia* sp. apresentou melhor desempenho, ao hidrolisar os polissacarídeos da biomassa da casca de coco, e um poder de hidrólise superior quando

comparados com as enzimas purificadas. Característica bastante apreciável, tendo em vista que a utilização industrial de enzimas purificadas é economicamente inviável.

Por outro lado, é interessante ressaltar que, a produção das celulasas por *Melanoporia* sp. foi realizada por fermentação submersa, processo associado a uma série de etapas *downstream* após extração. E onerosas operações de concentração e purificação enzimática são necessárias para atingir os valores quantificados. No caso do complexo enzimático produzido neste trabalho, para sua aplicação na hidrólise enzimática foi necessário apenas concentrá-lo no rotaevaporador diretamente após a extração, representando uma alternativa viável e concreta de redução das etapas e com isto dos custos do processo de hidrólise de celulasas.

O perfil de hidrólise apresentado pelas enzimas nas temperaturas de 65 °C e 80 °C foi semelhante. No entanto, quando comparamos ambas as temperaturas fica claro que a 65 °C foi escolhida como a melhor temperatura para a hidrólise da casca de coco, visto que industrialmente não é uma temperatura muito abrasiva, e foi obtido uma maior concentração de açúcares redutores, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Podemos concluir que as celulasas produzidas pelo micro-organismo, *Melanoporia* sp., apresentaram uma eficiência no potencial de hidrólise da casca de coco. Fato que, nos estimula dar continuidade ao trabalho, no sentido de otimizar a hidrólise deste resíduo, viabilizando a aplicação industrial dessa enzima, pois alguns fatores como: temperatura, pH, tempo, concentração de enzima e substrato, condições reacionais, produtos que agem como inibidores enzimáticos precisam ser estudados, pois afetam a hidrólise enzimática da celulose. De modo que, para melhorar o rendimento e velocidade da ação enzimática, otimizar o processo deve ser focado (RODHE *et al.*, 2011; ESLAHI *et al.*, 2012; ANWAR *et al.*, 2014).

Ainda, em futuros experimentos de hidrólise, faz-se necessário a utilização de β -glicosidases para aumentar a conversão e, conseqüentemente evitar o acúmulo de celobiose e inibição das endoglucanases.

4.14 Análise dos produtos de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE

Nas hidrólises realizadas com as enzimas comercial e produzida por *Melanoporia* sp, as maiores concentrações de açúcares redutores ocorreram com 24 h e 48 h de hidrólise, por isso, essas foram as condições analisadas por CLAE. Os resultados podem ser vistos nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Produtos de hidrólise da casca de coco após 24 horas

Tempo (24 horas)	Açúcares (g/L)			
	Arabinose	Celobiose	Glicose	Xilose
Enzima <i>Melanoporia</i> sp. (lig.)	ND	3,333 ± 0,045	0,033 ± 0,002	0,060 ± 0,001
Enzima <i>Melanoporia</i> sp. (deslig.)	ND	3,304 ± 0,028	ND	0,058 ± 0,001
Enzima comercial (lig.)	0,326 ± 0,011	ND	ND	0,046 ± 0,011
Enzima comercial (deslig.)	0,334 ± 0,001	0,873 ± 0,011	0,220 ± 0,002	1,248 ± 0,010

A temperatura de hidrólise para a enzima de *Melanoporia* sp. e enzima comercial foi de 65 °C e 50 °C, respectivamente. A enzima comercial utilizada foi a celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921. A denominação lig. refere-se à casca de coco lignificada e deslig., à casca de coco deslignificada. ND: não detectado.

Tabela 14 - Produtos de hidrólise da casca de coco após 48 horas

Tempo (48 horas)	Açúcares (g/L)			
	Arabinose	Celobiose	Glicose	Xilose
Enzima <i>Melanoporia</i> sp. (lig.)	ND	2,822 ± 0,032	0,051 ± 0,002	0,085 ± 0,001
Enzima <i>Melanoporia</i> sp. (deslig.)	ND	1,749 ± 0,036	ND	0,042 ± 0,001
Enzima comercial (lig.)	0,359 ± 0,020	ND	ND	0,051 ± 0,011
Enzima comercial (deslig.)	0,399 ± 0,004	0,986 ± 0,020	0,307 ± 0,001	1,770 ± 0,011

A temperatura de hidrólise para a enzima de *Melanoporia* sp. e enzima comercial foi de 65 °C e 50 °C, respectivamente. A enzima comercial utilizada foi a celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921. A denominação lig. refere-se à casca de coco lignificada e deslig., à casca de coco deslignificada. ND: não detectado.

De acordo com os resultados citados acima, observa-se que houve uma maior concentração de celobiose nos tempos de 24 h e 48 h para a casca de coco lignificada e deslignificada. Os valores relacionados à arabinose não foram apresentados, visto que não houve acúmulo desse carboidrato no meio reacional. E, em relação aos carboidratos glicose e xilose, a concentração obtida foi bem inferior em comparação com a celobiose, o qual foi o único açúcar quantificado nessas análises iniciais. Resultado coerente, uma vez que, o extrato enzimático possui uma quantidade baixa de celobiase (enzima responsável pela hidrólise de celobiose).

Observa-se nas Tabelas 13 e 14 que seria necessário suplementar o sistema de hidrólise com a enzima β -glicosidase, para que o excesso de celobiose pudesse ser convertido à glicose, aumentando assim o rendimento desse açúcar. Procedimento esse comum nesse tipo de

ensaio, uma vez que não dificilmente um complexo enzimático apresenta quantidades suficientes de todas as enzimas envolvidas na reação de hidrólise (ROCHA *et al.*, 2009; SARITA, 2010).

Resultado similar também foi obtido por Chen *et al.* (2008) quando observaram uma elevada concentração de celobiose no hidrolisado celulósico. Segundo esses autores a alta concentração de celobiose causou inibição da enzima celulase, o que contribuiu para diminuir ainda mais o rendimento na etapa de hidrólise. Alguns autores relacionaram a causa da inibição a alguns fatores que incluem a concentração da enzima, a área superficial disponível da celulose e a atividade da β -glicosidase. Na maioria dos casos a inibição pode ser competitiva ou não-competitiva e a relação da enzima/substrato é um fator muito importante e que dependendo da concentração da enzima, diferentes inibições pelo produto final podem ser observadas (GUSAKOV e SINITSYN, 1992).

Com relação aos resultados obtidos com a enzima comercial observa-se que o produto de hidrólise de maior concentração obtido foi a xilose e em menor concentração a glicose. Para a celulase de *T. reesei* os resultados foram melhores para a casca de coco deslignificada, no entanto, o pré-tratamento apresenta-se como uma desvantagem tecnológica, devido ao elevado custo envolvido no processo, e a enzima de *Melanoporia* sp. apresentou melhores resultados com a casca de coco lignificada, contrastando com os resultados obtidos quando comparado com a enzima comercial. Deste modo, tecnologicamente a enzima de *Melanoporia* sp. foi superior à comercial quando comparada em relação à eficiência de hidrólise.

A maioria das leveduras não fermentam os açúcares xilose e arabinose, por isso, os mesmos não são interessantes para a produção de etanol, por exemplo. Pensando nessa aplicação, uma menor concentração desses açúcares é desejável, como aconteceu com o processo de hidrólise da enzima de *Melanoporia* sp.. Santos (2010) isolou 619 leveduras, tendo verificado que somente três dessas foram capazes de fermentar xilose, sessenta fermentaram celobiose e nenhuma foi capaz de fermentar arabinose. Cadete (2009) isolou 585 leveduras produtoras de exoenzimas para obtenção de bioetanol lignocelulósico e verificou que apenas 22 fermentaram xilose e nenhuma foi capaz de fermentar arabinose.

Vale ressaltar que, o objetivo era verificar se a enzima apresentava poder de hidrólise, e o mesmo foi alcançado, pois estes resultados foram obtidos em um ensaio preliminar de hidrólise para avaliar a viabilidade da enzima produzida por *Melanoporia* sp. na casca de coco.

5 Estimativa dos custos no processo de produção de celulases por *Melanoporia* sp.

A Tabela 15 apresenta os custos preliminares no processo de produção de celulases estudada nesta tese.

Tabela 15 – Custos preliminares na produção de celulases por *Melanoporia* sp.

	Valor (R\$)	Valor para 1 L (R\$)
Casca de coco	0,00	0,00
Lactose (500 g)	25,65	0,77
KH ₂ PO ₄ (500 g)	48,10	0,09
FeSO ₄ (1000 g)	13,45	0,0006
<i>Tween</i> 80 (500 mL)	181,00	1,14
Energia dos equipamentos (kWh) *	0,36	7,33
Total (1 fermentação)		9,33

* Valor do kWh: R\$ 0,36

* kWh gasto para produzir a enzima no biorreator: 2,80 em 24 horas.

Levando em consideração os custos com a produção da enzima com reagentes e energia elétrica realizou-se uma comparação de gastos com a enzima de *Melanoporia* sp. e a enzima comercial, e os cálculos estão demonstrados abaixo:

Atividade da enzima comercial: 203,67 FPU/mL
Em 50 mL: 10.183 FPU
Custo: R\$ 461,00

Atividade da enzima de *Melanoporia* sp. : 4,59 FPU/mL
Por fermentação (1 L): 4590 FPU
Custo por fermentação: R\$ 9,33

Para obter 10.183 FPU são necessárias 2,22 fermentações
Custo: R\$ 20,71

6 CONCLUSÃO

O reaproveitamento da casca do coco verde para a produção de celulases proposto nesse estudo foi alcançado, uma vez que, o fungo filamentoso *Melanoporia* sp. foi capaz de utilizar o resíduo, sem pré-tratamento, para a produção dessas enzimas, num curto período de tempo. Esse resultado torna essa linhagem bastante promissora na produção de celulases, em comparação com outras linhagens reportadas na literatura.

O complexo enzimático produzido nesse estudo apresentou algumas vantagens tecnológicas, tais como, elevada termoestabilidade, estabilidade no armazenamento, sob congelamento, por um período de oito meses e capacidade de hidrolisar de forma eficiente a casca de coco verde, além de baixo custo na produção da enzima.

REFERÊNCIAS

- ÁCS, K. Cloning and sequence analysis of *Mucor circinelloides* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and development of new vector systems for transformation of zygomycetes. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 47, n. 51, p. 1-4, 2003.
- AGOSTINHO, F.; BERTAGLIA, A. B. B.; ALMEIDA, C. M. V. B.; GIANNETTI, B. F. Influence of cellulase enzyme production on the energetic-environmental performance of lignocellulosic ethanol. **Ecological Modelling**. doi:10.1016/j.ecolmodel.2014.09.005. 2014.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Ceppa**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5979-5987, 2009.
- ANDRADE, J. P.; BISPO, A. S. R.; MARBACH, P. A. S.; NASCIMENTO, R. P. Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 isolated from sandy coastal plains of northeast Brazil. **Enzyme Research**, p. 1-7, 2011.
- ANJOS, M. N. V.; MOURA, P. A.; SILVEIRA, A. A. B.; SILVA, R. C. F. S.; OKADA, K. IN: Produção de astaxantina por *Mucor circinelloides*, através da formulação de meio de cultura de baixo custo. IN: 62ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2010, Natal. **Anais...** Natal: UFRN , 2010. p. 254.
- ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; BALASUBRAMANIAN, T. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 151-160, 2014.
- ANNAMALAIA, N.; RAJESWARIB, M. V.; ELAYARAJAB, S.; BALASUBRAMANIANB, T. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 409-415, 2013.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.

ASSAREH, R.; ZAHIRI, H. S.; NOGHABI, K. A.; AMINZADEH, S.; KHANIKI, G. B. Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 99-105, 2012.

AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; KHOLIF, A. M.; HANFY, M. A.; ABDEL GAWAD, M. H. Optimization of culture conditions affecting fungal cellulose production. **Research Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 23-31, 2012.

BAFFI, M. A.; ROMO-SÁNCHEZ, S.; ÚBEDA-IRANZO, J.; BRIONES-PÉREZ, A. I. Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, 2012.

BALASUBRAMANIAN, N.; SIMÕES, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 132–139, 2014.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R., SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Manage**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, Campinas: Editora da UNICAMP, 350 p. 2002.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In Hemicellulose and hemicellulases ed. Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P. p. 29-51. London: Portland Press, M. E., Pérez, R., Huitrón, C. β -xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp CHM - 1035. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 410-416, 1997.

BINOD, P.; SANDHYA, C.; PRADEEP, S.; GEORGE SZAK, G.; PANDEY, A. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2742-2748, 2007.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, 2001.

BOTHA, A.; KOCK, J. L. F.; COETZEE, D. J.; BOTES, P. J. Physiological properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *Circinelloides*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 201-206, 1997.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120-128, 2010.

CADETE, R. M. **Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulasas e xilanasas associadas à madeira em**

decomposição. 2009. Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.

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

CAPELARI, M.; ZADRAZIL, F. Lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw treated with brazilian tropical species of white rot fungi. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 5, p. 481-487 1997.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754 - 4766, 2010.

CASPETA, L.; CARO-BERMÚDEZ, M. A.; PONCE-NOYOLA, T.; MARTINEZ, A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. **Applied Energy**, v. 113, p. 277-286, 2014.

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

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P. K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R. S. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 5, p. 805-811, 2010.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1462-1466, 2008.

CHRISOSTOMO, W. **Estudo da compactação de resíduos lignocelulósicos para utilização como combustível sólido.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba. 2011.

COMYNS, A. E. Market Research forecasts industrial enzymes market at 6 bn by 2016. **Focus on Catalysts**, v. 2012, n. 6, p. 2, 2012.

CORRADINI, E.; ROSA, M. F.; MACEDO, B. P.; PALADIN, P. D.; MATTOSO, L. H. C. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 837-846, 2009.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 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. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulose production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK 2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulose and hemicellulose bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6-13, 2012.

DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 5 e 6, p. 394-401, 2000.

DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CARBAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 10, p. 771-775, 2001.

DURRANT, L. R. Biodegradation of lignocellulosic materials by soil fungi isolated under anaerobic conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 37, p. 189-195, 1996.

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

ESLAHI, N.; DADASHIAN, F.; NEJAD, N. H. Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers for nanoparticles production using response surface methodology. **Advanced Powder Technology**. doi: 10.1016/j.apr.2012.09.004, 2012.

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

FAHEINA JUNIOR, G. S. **Produção de celulasas por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais**. 2012. Dissertação de Mestrado, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO JÚNIOR, A.; TARDIOLI, P. W.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **Economic and Social Department**, The Statistical Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 out. 2014.

FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

FRASER, P. D.; RUIZ-HIDALGO, M. J.; LOPEZ-MATAS, M. A.; ALVAREZ, M. I.; ESLAVA, A. P.; BRAMLEY, P. M. Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circi nelloides*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1289, n. 2, p. 203-208, 1996.

FURIGO, A. J.; PEREIRA, E. B. **Enzimas e suas aplicações: cinética enzimática.** Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cinetica_enzimatica.pdf>. Acesso em: out. de 2013.

GARCÍA-KIRCHNER, O.; SEGURA-GRANADOS, M.; PASCUAL, P. R. **Effect of media conditions on production of b-glicosidase by *Aspergillus niger* C-6.** Departamento de Bioprocessos y Biología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. México, 2005.

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

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.034, 2012.

GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S67-S73. 2012.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. A. 1992. Theoretical analysis of cellulose product inhibition: effect of cellulose binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 663-671, 1992.

HAKAMADA, Y.; HATADA, Y.; OZAWA, T.; OZAKI, K.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus* alkaline cellulase by construction of chimeras from mesophilic and thermostable enzymes and site-directed mutagenesis. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 195, p. 67-72, 2001.

HATTORI, T. Host preferences of wood-decaying basidiomycetes in a cool-temperate area of Japan. In: the 7th International Mycological Congress. Oslo, Norway, 11–17 August 2002.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL 53. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2891-2895, 2005.

HELLER, M. C.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Manipulation of lyophilization-induced phase separation: implications for pharmaceutical proteins. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 5, p. 590-596, 1997.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 162-168, 2011.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANCEN, E. L.; HOWARD, R. Lignocellulosic biotechnology: issue of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.12, p. 602-619, 2003.

IBRAHIM, M. M.; EL-ZAWAWY, W. K.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; AGBLEVOR, F. A. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 720-726, 2011.

ILMEN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M. L.; PENTTILA, M. E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1298-1306, 1997.

IMMELMAN, M.; PREEZ, J. C.; KILIAN, S. G. Effect of C:N ratio on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, n. 2, p. 115-118, 1998.

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 viridae* under SSF and its detergent compatibility. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 149-156, 2011.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in valorization of lignocellulosic materials by bio-technology: an overview. **BioResources**, v. 8, n. 2, p. 3157-3176, 2013.

IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BUT, H. I.; AFROZ, A.; IKRAM, N.; RASHID, U. The industrial applicability of purified cellulose complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes. **BioResources**, v.8, n.1, p. 145-157, 2013.

KADAM, K.; KEUTZER, W. Enhancement in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30 due to citric acid. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1111-1114, 1995.

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, n. 2, p. 153-156, 2004.

KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Immobilization of xylanase from *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in production of xylo-oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 125-138, 2008.

KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.

KATHIRESAN, K.; MANIVANNAN, S. Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove rhizosphere soil. **Research Journal of Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 438-442, 2006.

KIM, S.Y.; PARK, S.Y.; KO, K. S.; JUNG, H. S. Phylogenetic analysis of Antrodia and related taxa based on partial mitochondrial SSU rDNA sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 83, p. 81-88, 2003.

KINNARINEN, T.; SHAKHANOVA, M.; HIETANEN, E.; SALMIMIES, R.; HÄKKINEN, A.; LOUHI-KULTANEN, M. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of cardboard waste: Saccharification yield and subsequent separation of the solid residue using a pressure filter. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 405-411, 2012.

KUMAR, N. S. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150-158, 2013.

LAEMMLI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. **Journal of Molecular Biology**, v. 80, p.575-599, 1973.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3634-3637, 2007.

LIMA, M. S. **Produção do complexo celulolítico a partir do engaço da bananeira (*Musa spp.*)**. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Recife, 2010.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 717-725, 2011.

LO, C-M; ZHANG, Q; CALLOW, NV; JU, L-K. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. **Bioresource Technology**, v.101, n. 2, p. 717-23, 2010.

LUBBEHUSEN, T. L.; NIELSEN, J.; MCINTYRE, M. Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. **Mycological Reserach**, v.107, n. 2, p. 223-230, 2003.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, 2002.

MACHADO, K. C.; DAMM, D. D.; JUNIOR, C. C. M. F. Reaproveitamento tecnológico de resíduo orgânico: casca de coco verde na produção de gabinetes ecológicos de computadores, In: Fórum Internacional de Resíduos Sólidos, 2., **Anais...** Porto Alegre, 2009.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WINDSON, C.; HAMINIUK, R. C. F., BIANCA, B. E. D.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 183-189, 2008.

MACIEL, T. C. **Produção de celulasas por fermentação em estado sólido a partir de *Melanoporia* sp. *Mucor circinelloides* e utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Fortaleza, 2013.

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

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 78, p. 24-33, 2013.

MIETTINEN-OINONEN, A.; LONDESBOROUGH, J.; JOUTSJOKI, V.; LANTTO, R.; VEHEMAANPERA, J.; BIOTEC, P. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 332-341, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITRA, D.; RASMUSSEN, M. L.; CHAND, P.; CHINTAREDDY, V. R.; YAO, L.; GREWELL, D.; VERKADE, J. G.; WANG, T.; LEEUWEN, J. H. V. Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource Technology**, v.107, p. 368-375, 2012.

MORAES, I. O. Produção de microrganismos. In.: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 3, p. 199-218, 2001.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Documentos 236. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. 54 p.

MORIKAWA, Y.; OHASHI, T.; MANTANI, O.; OKADA, H. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n.1 e 2, p. 106-111, 1995.

MORRYSSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**. v. 117, p. 307-310, 1981.

MRUDULA, S.; MURUGAMMA, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1119-1127, 2011.

NAGAR, S.; GUPTA, V. K.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R. C. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 71-83, 2010.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 150-161, 2014.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulose by *Aspergillus niger* FGSCA 733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118-123, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 5nd, Artmed, 1273p., 2011.

NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M.; HO, T. H. D. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1310-1317, 2010.

NOVOZYMES. **Travelling the path to cellulosic ethanol together**. Disponível em: <http://www.novozymes.com/en/solutions/bioenergy/case-studies-on-Bioenergy/Pages/Working-together-for-cellulosic-ethanol.aspx>. Acesso em: 20 nov. 2014.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, S. L. R.; FONTELES, T. V.; RODRIGUES, S. Determinação por superfície de resposta dos parâmetros pH e temperatura da atividade celulases produzida por *Trichoderma polysporum* em meio contendo casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.). In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2009, Natal. **Anais...** Natal, 2009.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARK, E. Y.; NARUSE, K.; KATO, T. Improvement of cellulase production in cultures of *Acremonium cellulolyticus* using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6120-6127, 2011.

PARMASTO, E.; KOLLOM, A. The genus *Melanoporia* (Polypores, Hymenomycetes). **Folia Cryptogamica Estonica**, v. 37, p. 67-78, 2000.

PAVÓN-OROZCO; SANTIAGO-HERNÁNDEZ; ROSENGREN, A.; HIDALGO-LARA, M. E.; STÅLBRAND, H. The family II carbohydrate-binding module of xylanase CflXyn11A from *Cellulomonas flavigena* increases the synergy with cellulase TrCel7B from *Trichoderma reesei* during the hydrolysis of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 622-630, 2012.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

PORTNOY, T.; MARGEOT, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; CROM, S. L.; CHAABANE, F. B.; LINKE, R.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 262-271, 2011.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. 829 p.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.

RAMANATHAN, G.; BANUPRIYA, S.; ABIRAMI, D. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 69, n. 6, p. 454-459, 2010.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597-603, 2013.

RIBEIRO, J. A. B. **Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768.** 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

RIBEIRO, R. R. **Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex – 1X8-50.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, Brasil, 1997.

RITTER, T. E. C. **Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em processo submerso utilizando biorreatores com agitação mecânica e *airlift* de circulação interna.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul, 2009.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with diluted sulfuric acid for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 407-417, 2009.

RODHE, A. V.; SATEESH, L.; SRIDEVI, J.; VENKATESWARLU, B.; RAO, L. V. Enzymatic hydrolysis of sorghum straw using native cellulase produced by *T. reesei* NCIM 992 under solid state fermentation using rice straw. **Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 207-215, 2011.

RODRIGUES, A. C.; FELBY, C.; GAMA, M. Cellulase stability, adsorption/desorption profiles and recycling during successive cycles of hydrolysis and fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 163-169, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** Campinas, SP: Casa do pão editora, 2005. 326 p.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95-100, 2008.

RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. The effect of dietary administration of the fungus *Mucor circinelloides* on non-specific immune responses of gilthead seabream. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 2, p. 241-249, 2004.

ROOPAN, S. M.; ROHI, T.; MADHUMITHA, G.; RAHUMAN, A. A.; KAMARAJ, C.; BHARATHI, A.; SURENDRA, T. V. Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 631-635, 2013.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 506-511, 2006.

ROSA, M. F. **Beneficiamento da casca de coco verde**. Fortaleza. Disponível em: <<http://www.cnpat.embrapa.br/home/portfolio/tecnologia.php?id=10>>. Acesso em: 15 set. 2013.

ROSA, M. F. **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 6 p. (Comunicado Técnico, 54).

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.; M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131. 2010.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade de celulasas de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RYVARDEN, L. 1991. **Genera of Polypores** - Nomenclature and Taxonomy, NHBS, Oslo. 1991.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1871-1876, 2004.

SAIBI, W.; GARGOURI, A. Purification and biochemical characterization of an atypical β -glucosidase from *Stachybotrys microspora*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 107-115, 2011.

SAMUELSSON, J.; GUSTAFSSON, L.; INGELÖG, T. 1994. Dying and dead trees – a review of their importance for biodiversity, Swedish Threatened Species Unit, Uppsala. 1994.

SANTOS, A. S. **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Seropédica, 2011.

SANTOS, R. O. **Leveduras fermentadoras de pentoses e produtoras de xinalases e celulasas associadas a bagaço de cana de açúcar em decomposição**. 2010. Dissertação, 2010.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1299-1304, 2012.

SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v.14, n. 3. p. 310-321, 2012.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. 2008. 298f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp, Campinas, 2008.

SEGUENKA, B. Produção de celulasas a partir de fungos filamentosos utilizando serragem de eucalipto (*Eucalyptus robusta*) como fonte de carbono. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17.,2009, Natal. **Anais...** Natal, 2009.

SEO, D. J.; FUJITA, H.; SAKODA, A. Effects of a non-ionic surfactant, *tween* 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. **Adsorption**, v. 17, n. 5, p. 813-822, 2011.

SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M. N. A.; MOHAMAD, R.; MUSTAFA, S.; ARIFF, A. B. Cyanobacterial biomass as n-supplement to oil palm empty fruit bunch (opefb) fibre for improvement of cellulase production by *Aspergillus terreus* in submerged fermentation. **BioResources**, v.6, n. 2, p. 1696-1706, 2011.

SHARMA, R. K.; ARORA, D. S. Solid state degradation of paddy straw by *Phlebia floridensis* in the presence of different supplements for improving its nutritive status. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 990-996, 2011.

SIGOILLOT, C.; RECORD, E.; BELLE, V.; ROBERT, J. L.; LEVASSEUR, A.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; FOURNEL, A.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHER, M. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, 346-352, 2004.

SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1389-1398, 2011.

SILVA, R. N. **Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) em presença de celulose e sofrose e durante o antagonismo contra *Pythium ultimum***. 2008. 129 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, 2008.

SINGH, A.; AGRAWAL, A. K.; DARMWAL, N. S.; ABIDI, A. B. Influence of additives on the storage stability of cellulases from *Aspergillus niger*. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 146, n. 6, p. 391-392, 1991.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 94-101, 2012.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of chemical pretreated rice straw by *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphous*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 69, p. 232-237, 2010.

SINGHANIA, R. R. Production of cellulolytic enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford: Academic Press, 2011, ch. 8, p. 177-2011.

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

SINGHVI, M. S.; ADSUL, M. G.; GOKHALE, D. V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6569-6572, 2011.

SLOMCZYNSKI, D.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Production and characterization of laccase from *Botrytis-cinerea* 61-34. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 907-912, 1995.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

SONG, J.; WEI, D. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass and bioenergy**, v. 34, p. 1930-1934, 2010.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 277-283, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 2005. 178p. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G.; RAJASEKHAR, B. Production of cellulase by *Aspergillus niger* on natural and pretreated lignocellulosic wastes. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 7, 2009.

STRUSZCZYK, K.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; WALCZAK, M.; POMIANOWSKA E.; ANTCZAK, T. Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 16-24, 2009.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424. 2009.

SUN Y.; CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p.1-11, 2002.

SUN, H.; GE, X.; HAO, Z.; PENG, M. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 163-166. 2010.

TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from rice straw by coculture with two high-performing fungi. **Frontiers of chemical science and engineering**, doi: 10.1007/s11705-012-1281-6, 2012.

TAKÓ, M.; TÓTH, A.; NAGY, L. G.; KRISCH, J.; VÁGVÖLGYI, C.; PAPP, T. A new β -glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 1, p. 1-10, 2010.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1327-1340, 2003.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 -requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.

TONELOTTO, M. **Produção de celulases, purificação e caracterização bioquímica-cinética da β -galactosidase produzida por fungo isolado da região amazônica**. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do São Carlos. São Carlos. 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª. Ed. São Paulo: Artmed, 2005.

WAGHMARE, P. R.; KADAM, A. A.; SARATALE, G. D.; GOVINDWAR, S. P. Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 136-141, 2014.

WANG, B.; XIA, L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4568-4572, 2011.

WANG, S.; GUO, X.; LIANG, T.; ZHOU, Y.; LUO, Z. Mechanism research on cellulose pyrolysis by Py-GC/MS and subsequent density functional theory studies. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 722-728, 2012.

WANG, W.; YUAN, T.; WANG, K.; CUI, B.; DAI, Y. Statistical optimization of cellulase production by the brown rot fungi, *Fomitopsis palustris*, and its application in the enzymatic hydrolysis of LHW-pretreated woody biomass. **Process Biochemistry**. doi: 10.1016/j.procbio.2012.08.004. 2012.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.

WARNOCK, M.; DAVIS, K.; WOLF, D.; GBUR, E. **Biodegradation of Three Cellulosic Fabrics in Soil**. Summaries of Arkansas Cotton Research, 2009.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. **Em Polysaccharides: Strutural Diversity and Functional Versatility**; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, cap. 43. 2005.

XIA, C.; XHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, n. 15, 2011.

XU, J.; HE, B.; WU, B.; WANG, B.; WANG, C.; HU, L. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresource Technology**, v.157, p. 166-173, 2014.

YAMASHITA, S.; HATTORI, T.; ABE, H. Host preference and species richness of wood-inhabiting aphyllophoraceous fungi in a cool temperate area of Japan. **Mycologia**, v. 102, n. 1, p. 11–19. 2010.

YANG, M.; ZHANG, A.; LIU, B.; LI, W.; XING, J. Improvement of cellulose conversion caused by the protection of *tween*-80 on the adsorbed cellulose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 125-129, 2011.

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.

ZHENGUANG, L.; MINGHAO, S. Optimization of fermentation conditions of laccase of *Melanoporia castanea*. **Journal of textile research**, v.12, 2011.

ZHONG, Y.; WANG, X.; YU, H.; LIANG, S.; WANG, T. Application of T-DNA insertional mutagenesis for improving cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 572-577, 2012.

ZHOU, L.; DAI, Y. Recognizing ecological patterns of wood-decaying polypores on gymnosperm and angiosperm trees in northeast China. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 2, p. 230-235, 2012.

ZÚNIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. Tese. Universidade de São Paulo, São Carlos, 228 p. 2010.