



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

TATIANE CAVALCANTE MACIEL

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
A PARTIR DE *Melanoporia* sp. E *Mucor circinelloides* E UTILIZANDO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

FORTALEZA,

2013



TATIANE CAVALCANTE MACIEL

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
A PARTIR DE *Melanoporia* sp. E *Mucor circinelloides* UTILIZANDO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.

FORTALEZA,
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

M139p Maciel, Tatiane Cavalcante.
Produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de *Melanoporia* sp. E *Mucor circinelloides* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. / Tatiane Cavalcante Maciel. - 2013.
89f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Prof^o. Dr^a. Sueli Rodrigues.

1. Bagaço de cana - Indústria. 2. Biomassa vegetal. 3. Enzimas microbianas. 4. Fermentação. I.

Título.

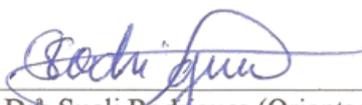
TATIANE CAVALCANTE MACIEL

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A
PARTIR DE *Melanoporia* sp. E *Mucor circinelloides* UTILIZANDO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

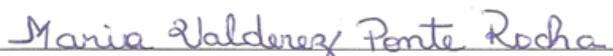
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 22 / 02 / 2013

BANCA EXAMINADORA



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



Prof.^a Dr.^a Maria Valdevez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a Dr.^a Gorete Ribeiro de Macedo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

A minha mãe, minha irmã e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por seu infinito amor e cuidado com a minha vida.

À minha mãe, Jeanne Maria, por sua sensatez, compreensão, dedicação e amor. Obrigada por estar presente, em minha vida, em todos os momentos.

À minha irmã, Amanda Cavalcante, por seu companheirismo e paciência. Sua mansidão e domínio próprio me inspiram.

Ao meu irmão, Gabriel Levi, por me ensinar o valor das pequenas coisas.

À Lívia Nery, por sua amizade, disponibilidade e eficiência. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À Soraya Sancho, por sua amizade, paciência, disponibilidade e constante incentivo. Muito obrigada pela correção minuciosa deste trabalho. À você minha profunda gratidão.

À Thatyane Vidal, por sua amizade e disponibilidade. Obrigada por compartilhar comigo sua experiência, suas sugestões em meus experimentos foram muito valiosas.

À Simone Lopez, por sua amizade e experiência. Como sua bolsista, aprendi muito. Obrigada por confiar em meu trabalho e impulsionar minha vida acadêmica.

À Cristiane Rabelo, por sua amizade e companheirismo. Suas atitudes me inspiram! Muito obrigada por tudo!

À Niédila Afonso, por sua amizade, amor e conselhos valiosos. Você tem um papel muito importante em minha vida!

À Natália Lima, por sua amizade e companheirismo. Muito obrigada por toda dedicação dispensada a mim.

À Cláudia Patrícia, por sua amizade, humildade, disponibilidade e inspiradora força de vontade.

À Mariana Santiago, por sua amizade e alegria. Obrigada por seu carinho!

À Nair Sampaio, por sua amizade. Obrigada por suas palavras cheias de graça que me acalmaram tantas vezes!

À Ana Raquel, por sua amizade e eficiência.

À Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues, por sua dedicação, compreensão e profissionalismo. Obrigada por sua preciosa contribuição para minha formação acadêmica.

Ao Dr. Gustavo Saavedra, por sua participação em minha Qualificação. Obrigada pela dedicação dispensada a este trabalho.

À Profª. Drª Valderéz Rocha, por sua participação em minha Qualificação e Defesa. Sua correção minuciosa contribuiu sobremaneira para melhoria da discussão dos resultados apresentados neste trabalho. Muito obrigada!

À Profª. Drª. Gorete Ribeiro, por sua participação em minha Defesa. Obrigada pela criteriosa correção deste trabalho. Sua experiência na área de bioprocessos contribuiu significativamente para a melhoria do *layout* do mesmo. Muito obrigada!

À CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“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

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico obtido a partir do esmagamento e moagem da cana-de-açúcar para extração do seu caldo. Esta biomassa é abundante no Brasil pois, o país é o maior produtor mundial de açúcar e etanol. O emprego deste resíduo como substrato, em processos fermentativos, para a produção de enzimas microbianas, como as celulasas é uma opção viável e interessante, uma vez que o custo destas enzimas ainda é alto, o que tem limitado sua utilização industrial. O potencial produtor de celulasas de diversos micro-organismos tem sido extensivamente estudado, a fim de desenvolver novos bioprocessos menos onerosos na produção de enzimas celulolíticas. No presente trabalho foram avaliadas a capacidade de produção de celulasas, pelos micro-organismos *Mucor circinelloides* e *Melanoporia* sp., a partir da fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar e a influência de alguns parâmetros na produção da enzima. Foram investigados os seguintes parâmetros físico-químicos, relacionados com o crescimento do micro-organismo e produção da enzima: pH inicial do meio de crescimento, tempo e temperatura de produção da enzima. Quanto aos parâmetros nutricionais, o efeito do Tween 80 e de diferentes fontes de sais minerais e nitrogênio orgânico foram estudados. Além disto, foram realizados ensaios no intuito de definir a melhor combinação de pH e temperatura para a determinação da atividade enzimática. Para *M. circinelloides*, a atividade enzimática máxima (15,87 FPU/g) foi obtida utilizando-se 3 g de bagaço, com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 0,1 g/L de CuSO₄, 9,0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g/L de KH₂PO₄ e Tween 80 a 0,8% (v/v) em pH 5,48. A temperatura e o tempo que resultaram na maior produção da enzima foram 34,4 °C e 48 horas, respectivamente. A maior atividade enzimática foi quantificada em pH 6,5 e 60 °C. Em relação ao *Melanoporia* sp., a atividade enzimática máxima alcançada foi 14,21 FPU/g como resultado da produção utilizando 3 g de bagaço, com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 9,0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g/L de KH₂PO₄ e Tween 80 a 0,2% (v/v) em pH 6,28. A produção máxima da enzima foi observada após 48 horas de fermentação a 30 °C. A maior atividade enzimática foi quantificada em pH 7,0 e 60 °C. Os resultados demonstraram o elevado potencial produtor de celulasas pelas duas cepas fúngicas num curto período de tempo, apresentando maior atividade enzimática em pH próximo da neutralidade, consistindo num diferencial atrativo do ponto de vista industrial.

Palavras-chave: Celulasas. Fermentação em Estado Sólido. Bagaço de cana-de-açúcar. *Mucor circinelloides*. *Melanoporia* sp..

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is a lignocellulosic residue obtained from sugarcane mechanical pressing for juice extraction. This biomass is abundant in Brazil because the country is the world's largest manufacturer of sugar and ethanol. The use of sugarcane waste as substrate for enzymes production, such as cellulases, is an interesting and viable option since the production costs of these enzymes are high, which limits its industrial use. In this context, potential cellulase-producing strains have been extensively studied in order to develop less costly cellulolytic enzymes complexes. In this study, the production of cellulases by *Mucor circinelloides*. and *Melanoporia* sp through solid state fermentation of sugarcane bagasse and the effects of selected parameters for enzyme production were evaluated. The investigated physicochemical parameters associated with the growth of the microorganisms and enzyme production were: initial pH of the growth medium, temperature and time of enzyme production. Regarding nutritional parameters, the effect of Tween 80 and different sources of mineral salts and organic nitrogen and were studied. In addition, tests were performed in order to define the best combination of pH and temperature for the determination of enzyme activity. For *M. circinelloides*, the maximal enzyme activity (15.87 FPU / g) was achieved with a fermentation medium composed of 3g of sugarcane bagasse, 2mL of saline solution containing 0.1 g/L of CuSO₄, 9.0 g/L of (NH₄)₂SO₄ e 1.0 g/ L of KH₂PO₄ and 0.8% Tween 80 (v/v) at pH 5.48 incubated at 34.4 °C for 48 hours. The optimum combination of pH and temperature was at pH 6.5 and 60 °C. For *Melanoporia* sp. the higher enzymatic activity obtained was 14.21 FPU / g as a result of using 3g of sugarcane bagasse with the addition of 2mL of saline solution containing 9.0 g/L of (NH₄)₂SO₄, 1.0 g/ L of KH₂PO₄ and 0.2% Tween 80 (v/v) at pH 6.28 and incubated at 30°C for 48 hours. The optimized conditions of pH and temperature for enzymatic activity determination were pH 7.0 and 60°C. The results demonstrated the high potential of the two strains under investigation, which presented the higher enzyme activity at pH in the neutral range. This result represents a technical advantage from the industrial viewpoint.

Keywords: Cellulases. Solid State Fermentation (SSF). Sugarcane bagasse. *Melanoporia* sp.. *Mucor circinelloides*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica	17
Figura 2 -	Unidade estrutural do polímero celulose	18
Figura 3 -	Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na estrutura da celulose	19
Figura 4 -	Produção de cana-de-açúcar (a), açúcar (b) e etanol (c)	21
Figura 5 -	Perfil de moagem de cana-de-açúcar no Brasil no intervalo de 35 anos	22
Figura 6 -	Etapas envolvidas na produção de etanol de segunda geração, a partir de bagaço de cana-de-açúcar	26
Figura 7 -	Representação esquemática do efeito sinérgico das enzimas que compõe o complexo celulolítico	28
Figura 8 -	Representação esquemática dos domínios catalíticos em celulasas ...	29
Figura 9 -	Fluxograma representativo das etapas empregadas	35
Figura 10 -	Aspecto microscópico (a) e macroscópico (b) de <i>M. circinelloides</i>	46
Figura 11 -	Aspecto microscópico (a) e macroscópico (b) de <i>Melanoporia</i> sp.....	47
Figura 12 -	Diagrama de Pareto com o efeito estimado dos sais na produção de celulasas por <i>M. circinelloides</i> através do planejamento Plackett–Burman realizado	49
Figura 13 -	Diagrama de Pareto com o efeito estimado dos sais CuSO_4 e ZnSO_4 na produção de celulasas por <i>M. circinelloides</i>	50
Figura 14 -	Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização da concentração dos sais CuSO_4 e ZnSO_4 adicionados ao meio de produção de celulasas por <i>M. circinelloides</i>	52
Figura 15 -	Efeito da adição de diferentes concentrações de CuSO_4 à solução salina [9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 g/L de KH_2PO_4] para a composição do meio de produção de celulasas por <i>M. circinelloides</i> em estufa B.O.D., a 30 °C por 24 h. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)	53
Figura 16 -	Efeito da adição de Tween 80 à solução salina para a composição do meio de produção de celulasas por <i>M. circinelloides</i> [9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g/L CuSO_4 e 1,0 g/L de KH_2PO_4] (a) e <i>Melanoporia</i> sp. [9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 g/L de KH_2PO_4] (b) em estufa B.O.D., a 30 °C por 24 h. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)	56
Figura 17 -	Efeito estimado do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo fermentativo em estufa B.O.D., a 30 °C por 24 h, por <i>M. circinelloides</i>	59
Figura 18 -	Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo fermentativo por <i>M. circinelloides</i>	60
Figura 19 -	Efeito estimado do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo	

	fermentativo em estufa B.O.D, a 30 °C por 24 h, por <i>Melanoporia</i> sp.....	62
Figura 20 -	Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo por <i>Melanoporia</i> sp.....	63
Figura 21 -	Influência do tempo de condução do processo fermentativo na produção de celulases por <i>M. circinelloides</i> e <i>Melanoporia</i> sp. em FES, em estufa B.O.D, a 30 °C por 10 dias. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)	65
Figura 22 -	Influência da temperatura na determinação da atividade enzimática das celulases produzidas por <i>M. circinelloides</i> (a) e <i>Melanoporia</i> sp (b). As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)	67
Figura 23 -	Influência do pH na determinação da atividade enzimática das celulases produzidas por <i>M. circinelloides</i> . As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)	69
Figura 24 -	Atividade enzimática da celulase produzida por <i>Melanoporia</i> sp. mediante a variação no pH de determinação da atividade enzimática. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos	18
Tabela 2 -	Composição química parcial dos minerais presentes no bagaço de cana	23
Tabela 3 -	Aplicações da fermentação em estado sólido	33
Tabela 4 -	Matriz do planejamento fatorial Plackett-Burman para seleção de sais para compor o meio de produção de celulases por <i>Melanoporia</i> sp. e <i>M. circinelloides</i>	39
Tabela 5 -	Matriz do planejamento composto central para otimização das concentrações de CuSO ₄ e ZnSO ₄ adicionados ao meio de produção de celulases por <i>M. circinelloides</i>	40
Tabela 6 -	Matriz do planejamento fatorial Plackett-Burman para seleção de fontes de nitrogênio orgânico para a composição do meio de produção de celulases por <i>Melanoporia</i> sp. e <i>M. circinelloides</i>	41
Tabela 7 -	Matriz do planejamento fatorial composto central (2 ²) para otimização do pH inicial do meio de produção de celulases e da temperatura do processo fermentativo na produção de celulases por <i>Melanoporia</i> sp. e <i>M. circinelloides</i>	43
Tabela 8 -	Matriz do planejamento composto central e resultados obtidos para a atividade enzimática como função das concentrações de CuSO ₄ e ZnSO ₄ adicionados ao meio de produção de celulases por <i>M. circinelloides</i>	50
Tabela 9 -	Matriz do planejamento experimental composto central (2 ²) e resultados obtidos para a atividade enzimática, como função do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo para a produção de celulases por <i>M. circinelloides</i>	58
Tabela 10 -	Matriz do planejamento experimental composto central (2 ²) e resultados obtidos para a atividade enzimática, como função do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo por <i>Melanoporia</i> sp	61
Tabela 11 -	Tempo de condução do processo fermentativo para a produção de celulases em função do micro-organismo e do meio de cultura empregados na FES	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Biomassa lignocelulósica	16
2.1.1	<i>Bagaço de cana-de-açúcar</i>	19
2.1.2	<i>Reaproveitamento da biomassa lignocelulósica</i>	24
2.2	Celulases	26
2.2.1	<i>Aplicação das celulases</i>	28
2.2.1.1	<i>Indústria têxtil</i>	28
2.2.1.2	<i>Indústria de papel</i>	29
2.2.1.3	<i>Indústria de alimentos</i>	29
2.2.1.4	<i>Indústria de produção de biocombustíveis</i>	29
2.3	Micro-organismos produtores de celulases	31
2.4	Fermentação em Estado Sólido	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	MATERIAIS e MÉTODOS	35
4.1	Micro-organismos utilizados	36
4.1.1	<i>Isolamento das linhagens fúngicas</i>	36
4.1.2	<i>Identificação molecular das linhagens fúngicas</i>	36
4.1.3	<i>Preparo do inoculo</i>	37
4.2	Composição do meio utilizado na produção de celulases por <i>Melanoporia sp.</i> e <i>M. circinelloides</i>	37
4.2.1	<i>Influência da quantidade de bagaço empregada na produção das enzimas</i>	38
4.2.2	<i>Estudo da suplementação do bagaço com fontes de sais minerais</i>	38
4.2.3	<i>Estudo da suplementação do bagaço com fontes de nitrogênio orgânico</i>	40
4.2.4	<i>Estudo da suplementação do bagaço com diferentes concentrações de Tween 80</i>	42
4.3	Otimização dos parâmetros físico-químicos do processo fermentativo	42
4.3.1	<i>Influência do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo</i>	42
4.3.2	<i>Influência do tempo de condução do processo fermentativo na produção de celulases</i>	43
4.4	Etapas posteriores ao processo fermentativo (etapas <i>downstream</i>)	43
4.4.1	<i>Recuperação da enzima do meio fermentado</i>	43
4.4.2	<i>Quantificação da atividade enzimática</i>	44
4.4.3	<i>Otimização do pH e da temperatura na quantificação da atividade enzimática</i>	45
4.5	Análise estatística	45
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	46
5.1	Isolamento e identificação das linhagens fúngicas	46
5.2	Composição do meio utilizado na produção de celulases por <i>Melanoporia sp.</i> e <i>M. circinelloides</i>	47
5.2.1	<i>Influência da quantidade de bagaço empregada na produção das</i>	

	<i>enzimas</i>	47
5.2.2	<i>Estudo da suplementação do bagaço com fontes de sais minerais</i>	48
5.2.3	<i>Estudo da suplementação do bagaço com fontes de nitrogênio orgânico</i>	54
5.2.4	<i>Estudo do efeito da adição de diferentes concentrações de Tween 80 ao bagaço de cana para a produção de celulases</i>	55
5.3	Otimização dos parâmetros físico-químicos do processo fermentativo	57
5.3.1	<i>Influência do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo</i>	57
5.3.2	<i>Influência do tempo de condução do processo fermentativo para a produção de celulases</i>	64
5.4	Etapas posteriores ao processo fermentativo (etapas downstream)	67
5.4.1	<i>Otimização do pH e da temperatura na quantificação da atividade enzimática</i>	67
6	CONCLUSÕES	72
	PERSPECTIVAS FUTURAS	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é o recurso natural renovável mais abundante da biosfera, sendo composta basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (BARR; MERTENS; SCHALL, 2012). Ela pode ser bioconvertida em glicose por um conjunto de enzimas denominadas celulasas (exo- β -1,4-glucanase; endo- β -1,4-glucanase e β -1,4-glucosidase) que atuam sinergisticamente na hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas. A glicose liberada pode então ser utilizada como substrato para a produção de produtos de fermentação de grande interesse para as indústrias de papel, têxtil, alimentícia, dentre outros (EL- BONDKLY; EL-GENDY, 2012; LO *et al.*, 2010).

A ampla utilização de celulasas em processos industriais, ainda é limitada pelos seus custos de produção. Por isto, celulasas microbianas têm sido extensivamente estudadas a fim de desenvolver novos bioprocessos menos onerosos na produção de enzimas celulolíticas, bem como rastrear enzimas com maior potencial que as disponíveis atualmente (CUNHA *et al.*, 2012; SINGHANIA, 2011; SINGHVI *et al.*, 2011).

No intuito de produzir enzimas a um menor custo, vários substratos lignocelulósicos, tais como, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha e farelo de trigo, dentre outros, têm sido analisados por vários autores na produção de celulasas representando uma alternativa economicamente viável e ecologicamente correta, em virtude da grande quantidade produzida destes subprodutos (DESWAL *et al.*, 2011).

No Brasil, somente a indústria da cana-de-açúcar gera em torno de 186 milhões de toneladas de bagaço anualmente (CUNHA *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2010). Com o aumento na demanda por cana-de-açúcar, devido ao crescente interesse por etanol combustível, a disponibilidade de bagaço também aumenta na mesma proporção (HOFSETZ; SILVA, 2012; WALTER *et al.*, 2011) pois, para cada tonelada de cana processada, tem-se em média 0,3 tonelada de bagaço (HOFSETZ; SILVA, 2012).

Tais resíduos podem ser utilizados como substrato em fermentação em estado sólido (FES), sendo necessária menor infraestrutura e equipamentos de fermentação mais simples, além de ser possível obter o produto de forma mais concentrada, o que representa grande vantagem econômica, em comparação com outras modalidades para a produção de enzimas (EL- BONDKLY; EL-GENDY, 2012; SUKUMARAN *et al.*, 2009).

Diferentes tipos de micro-organismos conseguem se desenvolver em meios sólidos. Entretanto, os fungos filamentosos se destacam em virtude de sua elevada capacidade em

utilizar substratos com baixa atividade de água e a presença de suas hifas, que favorecem a colonização do meio (ROCHA, 2010). Neste contexto, estes micro-organismos conseguem utilizar adequadamente os substratos lignocelulósicos, como fonte de carbono, em processos fermentativos, produzindo grandes quantidades de celulasas e hemicelulasas, que são secretadas no meio (enzima extracelular) facilitando os processos de extração e purificação destas enzimas (BANSAL *et al.*, 2012; DHILLON *et al.*, 2012). Além disto, a FES proporciona condições de crescimento semelhantes ao ambiente o qual os fungos filamentosos são naturalmente adaptados (DHILLON *et al.*, 2012).

Segundo DELABONA *et al.* (2012) num processo fermentativo, no intuito de obter a máxima produção da enzima, é importante observar que o nível de produção de celulasas depende de alguns fatores, como a cepa microbiana utilizada, a composição do meio de crescimento (fontes de carbono, nitrogênio, sais, vitaminas) e as condições de cultivo (pH do meio e temperatura de incubação).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade de produção de celulasas por *Mucor circinelloides* e *Melanoporia* sp., fungos isolados por nosso grupo de pesquisa, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, em fermentação em estado sólido (FES), bem como estudar a influência dos parâmetros importantes envolvidos no processo. As melhores combinações de pH e temperatura na determinação das atividades enzimáticas das celulasas produzidas também foram definidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

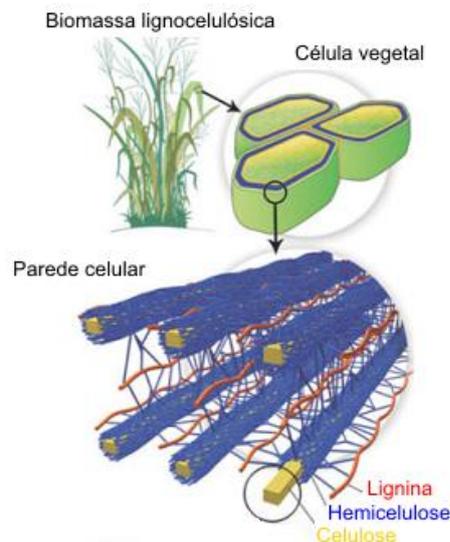
2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa vegetal compreende todos os materiais orgânicos, não fósseis, que tenham conteúdo de energia química em seu interior, incluindo todas as vegetações aquáticas e terrestres, árvores, resíduos agrícolas e agroindustriais (OMACHI *et al.*, 2004). Tais resíduos compõem a biomassa lignocelulósica, sendo o recurso renovável mais abundante na Terra (CHU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012).

Sua composição inclui, essencialmente, moléculas de celulose emaranhadas com lignina e hemicelulose (SANTOS *et al.*, 2012b; SOCCOL *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2012), formando a microfibrila celulósica que, por sua vez, constitui a parede celular vegetal (CANILHA *et al.*, 2010).

A parede celular das plantas (Figura 1) é uma das principais estruturas que diferencia a célula vegetal da célula animal, sendo formada por agrupamentos de macromoléculas de natureza heterogênea e composição química muito diversificada. Proporcionar rigidez mecânica à célula e manter sua morfologia, controlar a expansão celular e transporte intercelular e proteger a célula contra uma grande quantidade de organismos potencialmente patogênicos e/ou predadores, são algumas funções atribuídas a esta estrutura (BRAGATTO, 2010).

Figura 1 - Estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica



Fonte: Santos *et al.* (2012a).

A biomassa lignocelulósica geralmente apresenta 30-45% de celulose, 20-30% de hemicelulose e 5-20% de lignina em sua composição, conforme Tabela 1 (BARR; MERTENS; SCHALL, 2012). Estes componentes representam mais de 90% da massa seca, sendo as cinzas, pectinas, proteínas, gomas, gorduras, dentre outros, os constituintes minoritários (BRAGATTO, 2010).

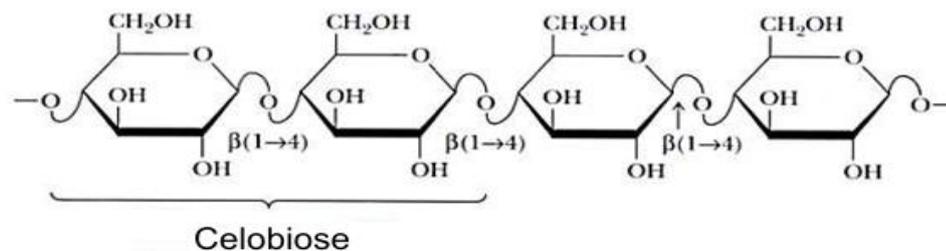
Tabela 1 - Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1

Fonte: Silva (2010).

A celulose é um polissacarídeo linear de cadeia longa formado nas plantas através da fotossíntese, sendo um dos recursos renováveis mais abundantes em todo o mundo (JI; WU; WANG, 2012). A unidade estrutural deste polímero é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas (COCINERO *et al.*, 2009). A Figura 2 apresenta a estrutura da celulose, destacando sua unidade estrutural, a celobiose.

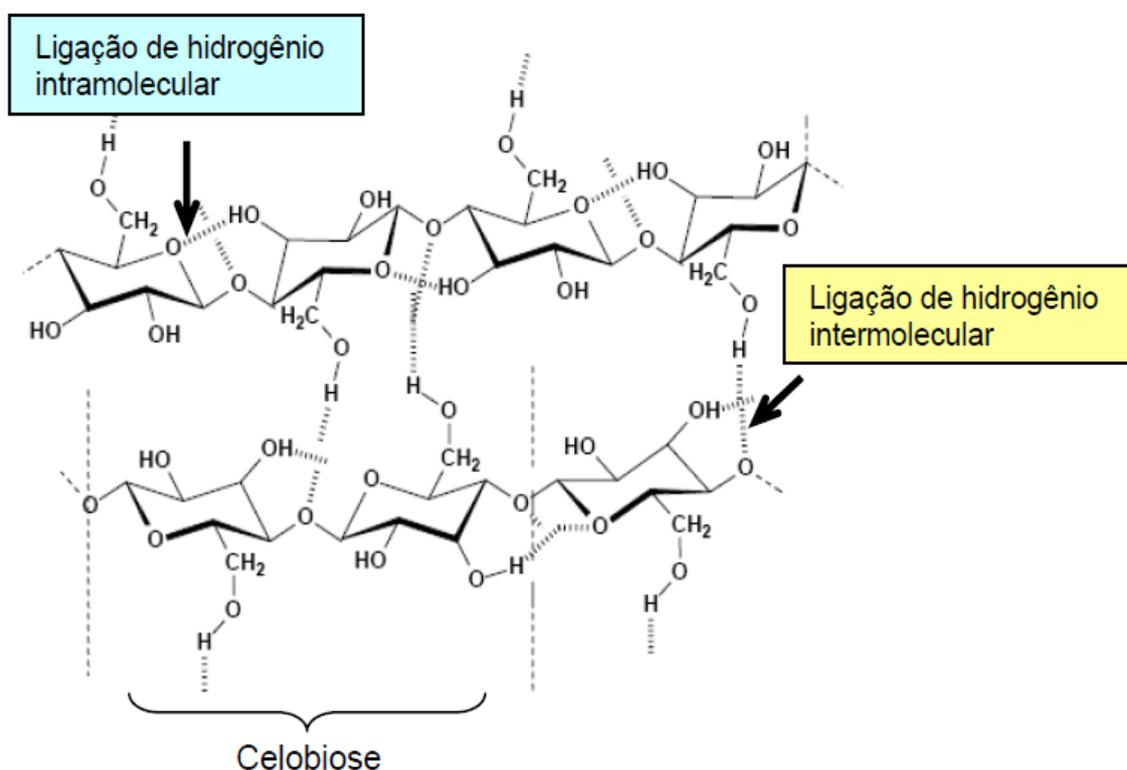
Figura 2 – Unidade estrutural do polímero celulose



Fonte: Aguiar (2010).

Este polímero apresenta uma estrutura química relativamente simples, entretanto não é facilmente degradável, pois, a configuração das ligações glicosídicas, formadas entre as moléculas de glicose, favorece a formação de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 3); como resultado, as cadeias celulósicas se agregam conferindo elevado grau de cristalinidade à molécula, o que explica sua insolubilidade num grande número de solventes e, em parte, sua resistência à degradação microbiana (CANILHA *et al.*, 2010).

Figura 3 – Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na estrutura da celulose



Fonte: Silva (2010).

A hemicelulose é uma macromolécula altamente ramificada e composta de xilose, arabinose, glucose, galactose e manose. Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular e não contém regiões cristalinas sendo, portanto, mais facilmente hidrolisada em açúcares fermentescíveis (LIU *et al.*, 2012).

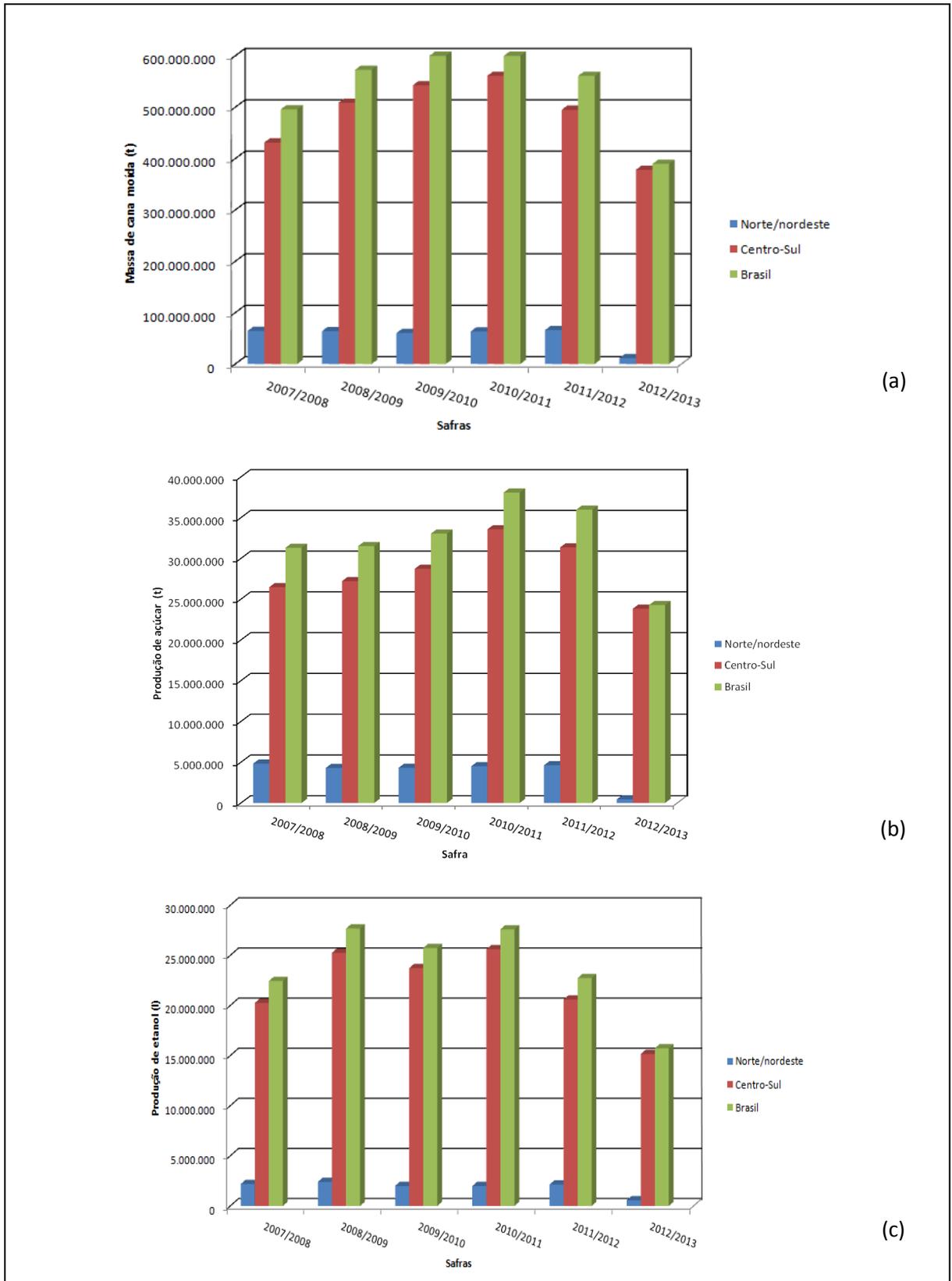
A lignina é uma macromolécula amorfa constituída por três unidades de fenilpropano diferentes. As principais funções da lignina são conferir à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano. Devido a sua estrutura amorfa, a lignina é insolúvel em água, o que dificulta a sua degradação (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi introduzida no Brasil durante o período colonial e se transformou numa das principais culturas da economia brasileira. O país além de ser o maior produtor mundial de cana, com uma área de cultivo estimada em cerca de 7,5 milhões de hectares (FIGUEIREDO; SCALA JÚNIOR, 2011), é também, o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol (UNICA, 2012).

A colheita da cana é sazonal, ocorrendo no Brasil, no período de março a dezembro para a região Centro-Sul e de setembro a março, para a região Norte-Nordeste. É por esta razão que uma estação é nomeada com dois anos como, por exemplo, 2011/2012. Atualmente, a região Centro-Sul é responsável por mais de 85% da produção total de cana (HOFSETZ; SILVA, 2012), dominando também a produção de açúcar e álcool, conforme observado na Figura 4.

Figura 4 - Produção de cana-de-açúcar (a), açúcar (b) e etanol (c)

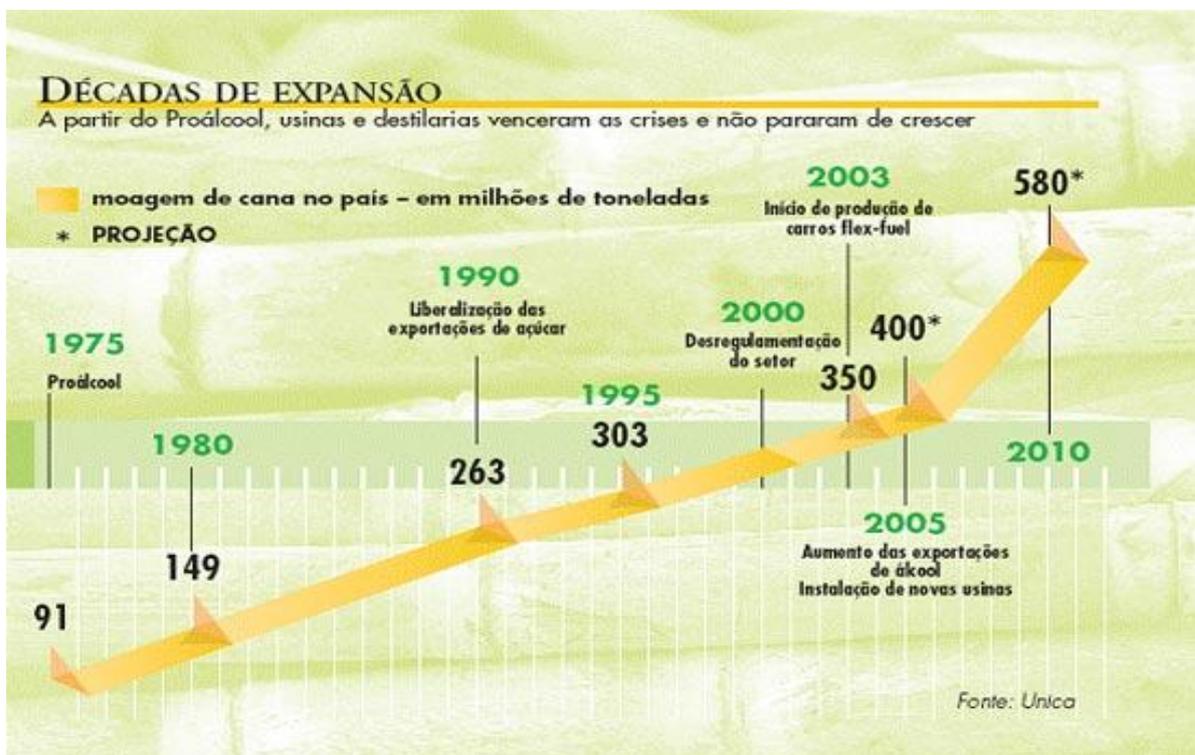


Fonte: UDOP (2012).

A projeção da União da Indústria da Cana de Açúcar (UNICA) na safra 2012/2013 aponta para a moagem de 518,50 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com produção de 32,70 milhões de toneladas de açúcar e 21,05 bilhões de litros de álcool (UNICA, 2012).

Em relação ao açúcar, o Brasil é responsável pela produção de metade do volume comercializado no mundo, sendo estimado, um aumento, em relação ao período de 2007/2008, de 47,34 milhões de toneladas do produto até 2018/19 (UNICA, 2012). Com relação ao etanol combustível, sua produção teve início no país em 1975, quando o governo brasileiro elaborou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) que diversificou a atuação da indústria açucareira, provocando o aumento da produção de cana e a implantação de destilarias de etanol (HOFSETZ; SILVA, 2012). As mudanças sofridas pela matriz energética brasileira a partir deste período, repercutiram em vários setores da economia e da sociedade e a indústria do etanol se tornou parte integrante da economia nacional (FREITAS; KANEKO, 2011). Atualmente, o Brasil tem mais de 80% de seus veículos funcionando com etanol e inclusive motores de pequenos aviões estão sendo desenvolvidos para funcionar com este combustível (SOCCOL *et al.*, 2010). A Figura 5 apresenta o perfil de moagem de cana, no Brasil, desde a criação do Proálcool (1975) até 2010.

Figura 5 - Perfil de moagem de cana-de-açúcar no Brasil no intervalo de 35 anos



Fonte: Vieira *et al.* (2010).

De maneira semelhante à época das crises de petróleo na década de 70, atualmente, o mundo está empenhado em encontrar uma solução duradoura e sustentável para seu problema energético (VIEIRA *et al.*, 2010). Neste contexto, a contribuição do etanol brasileiro para mitigar o aquecimento global tem sido destaque em várias pesquisas importantes, designando o etanol de cana como um biocombustível avançado, que reduz as emissões de gases do efeito estufa em mais de 60%, quando comparado com a gasolina (HOFSETZ; SILVA, 2012). Desta forma, estima-se um crescimento sem precedentes para o setor sucroalcooleiro brasileiro (FREITAS; KANEJO, 2011).

Os esforços atuais para atender ao aumento na demanda por etanol combustível no Brasil, e em outros países, baseiam-se principalmente na construção de novas usinas e na expansão da área plantada para o cultivo de cana-de-açúcar (DIAS *et al.*, 2011; SOCCOL *et al.*, 2010). Neste sentido, o desenvolvimento de novas tecnologias, bem como a ocorrência de melhorias nos processos existentes, torna-se indispensável, a fim de se obter mais etanol por tonelada de cana. Somado a isto, a utilização de toda a planta (incluindo palha e bagaço) como matéria-prima para a produção de biocombustível acarretará um aumento na produtividade do processo (SOCCOL *et al.*, 2010).

O bagaço de cana juntamente com a palha são os resíduos remanescentes da indústria de cana. O bagaço é obtido após o esmagamento da cana e extração do seu caldo (SU *et al.*, 2012). Ele é composto de feixes de fibras e outros elementos estruturais, tais como vasos, parênquima e células epiteliais. Sua composição predominante apresenta 32-44% de celulose, 27-32% de hemicelulose e 19-24% de lignina (SOCCOL *et al.*, 2010). A composição química dos minerais presentes no bagaço encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química parcial dos minerais presentes no bagaço de cana

Elemento	Teor
Cálcio	0,25% em massa
Cádmio	< 2 ppm
Carbono	4,43% em massa
Chumbo	< 2 ppm
Cobre	23 ppm
Cromo	32 ppm
Hidrogênio	0,47% em massa
Magnésio	0,16% em massa
Merúrio	< 0,05 ppm
Níquel	5 ppm
Nitrogênio	< 0,1% em massa
Potássio	< 0,1% em massa
Sódio	36 ppm

Fonte: Valenciano e Freire (2004).

Com o aumento na demanda por cana-de-açúcar, a disponibilidade de bagaço também aumenta na mesma proporção (HOFSETZ; SILVA, 2012; WALTER *et al.*, 2011). Para cada tonelada de cana processada, tem-se em média 0,3 tonelada de bagaço (HOFSETZ; SILVA, 2012), sendo gerados em torno de 195 milhões de toneladas deste resíduo por ano, no Brasil (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010).

Atualmente, como forma de eliminar este resíduo, parte dele é queimado nas próprias usinas para co-geração de energia, ainda que de forma ineficiente (CUNHA *et al.*, 2012; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010). Todavia, em virtude do grande volume de bagaço gerado, um excedente de 12% permanece inaproveitado, podendo ser usado como matéria-prima para a produção de etanol celulósico, aumentando assim a produção por área plantada (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010).

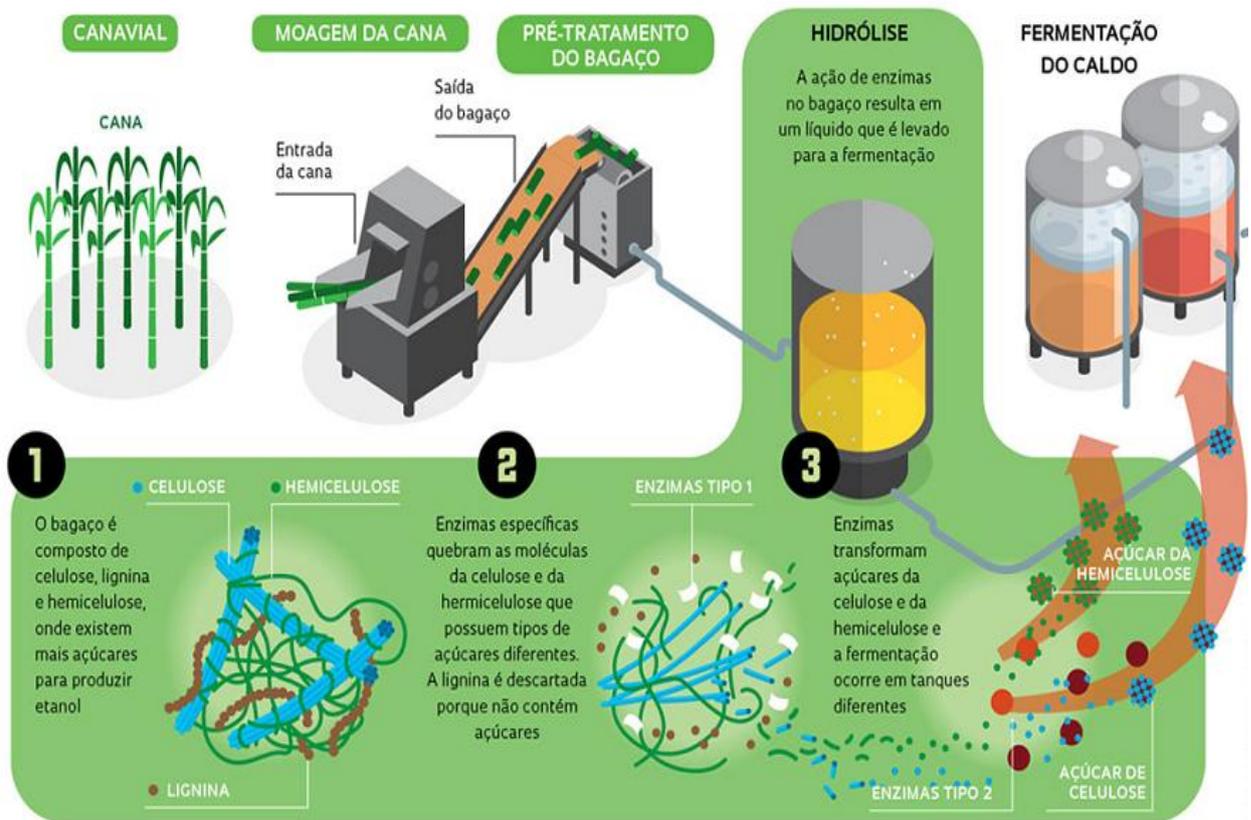
2.1.2 Reaproveitamento da biomassa lignocelulósica

Os elevados volumes de resíduos e subprodutos inerentes a todos os setores produtivos, somado ao aumento da consciência ecológica, demonstraram que o grande desafio da humanidade, para as próximas décadas, é equilibrar a produção de bens e serviços com o crescimento econômico, igualdade social e ambiental e sustentabilidade. Deste modo, tem sido motivada a criação de projetos que promovam a sustentabilidade dos sistemas de produção, dando lugar à disseminação cada vez maior dos conceitos atuais de reutilização de subprodutos, ao contrário do que aconteceu no passado, quando os resíduos eram indesejáveis (SANTOS *et al.*, 2012b).

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica é de grande interesse, uma vez que não possui custos de produção diretos, além de constituir uma forma de agregar valor e reduzir seu acúmulo, que representa um sério problema ambiental (BON *et al.*, 2008). Deste modo, o foco das pesquisas, em todo o mundo, tem sido estudar estratégias para seu eficiente reaproveitamento (WADA; IKE; TOKUYASU, 2010).

A glicose contida na biomassa pode ser empregada como fonte de carbono, em fermentações industriais, na produção de antibióticos, aminoácidos, enzimas e produtos químicos como o etanol de segunda geração (DENG *et al.*, 2011; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010). Todavia, para que esta molécula esteja disponível, a biomassa deve ser submetida a pelo menos dois processamentos, o primeiro consiste num pré-tratamento para abrir a cadeia lignocelulósica e remover lignina e o segundo, compreende a hidrólise da celulose para liberação de açúcares fermentescíveis, como a glicose (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010; SU *et al.*, 2012). Na Figura 6 encontra-se um esquema das etapas envolvidas na produção do etanol de segunda geração a partir da glicose contida no bagaço de cana.

Figura 6 – Etapas envolvidas na produção de etanol de segunda geração, a partir de bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Oliveira (2012).

As celulasas são as principais enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose, sendo seus custos de produção um entrave à sua ampla utilização industrial (CUNHA *et al.*, 2012). Desta forma, enzimas de baixo custo, estáveis e mais eficientes que as disponíveis atualmente tem sido investigadas. Com a finalidade de reduzir estes custos, tem sido avaliada a alternativa de utilização de vários resíduos lignocelulósicos como substratos em processos fermentativos (DESWAL *et al.*, 2011), o que representa uma alternativa economicamente viável e ecologicamente correta, em virtude da grande quantidade produzida destes subprodutos (CUNHA *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2010).

2.2 Celulases

A utilização de catalisadores enzimáticos, nos mais diferentes ramos industriais, é uma tendência cada vez maior em todo o mundo (MUSSATTO *et al.*, 2007), sendo o valor total do mercado estimado em 2,7 bilhões de dólares para 2014, o que representa um aumento de 5% (REPORTLINKER..., 2010). Atualmente, o uso de biocatalisadores é requerido, principalmente, pelas indústrias de cosméticos, produtos de higiene pessoal e de limpeza, farmacêutica, transformação de papel, alimentícia, ração animal e biocombustíveis (REPORTLINKER..., 2010).

Dentro do mercado mundial de enzimas, as celulases ocupam a terceira posição no *ranking* de negócios, o que representa 20% do volume total de enzimas comercializadas (SINGHANIA *et al.*, 2010), valor este que tende a aumentar, pois se estima que as celulases se tornem a enzima de maior volume industrial, caso o etanol obtido a partir da biomassa lignocelulósica se torne o principal combustível utilizado (OLSEN *et al.*, 2011; REPORTLINKER..., 2010; SINGHANIA *et al.*, 2010).

Celulases é um nome genérico para um grupo de três enzimas, classificadas como indutivas, uma vez que sua produção é induzida pela presença de celulose no meio, como única fonte de carbono (TRIVEDI *et al.*, 2011). As enzimas que fazem parte do complexo celulolítico são endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase e β -1,4-glucosidase e atuam sinergisticamente na hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas presentes no polímero celulose, liberando glicose (EL-BONDKLY; EL-GENDY, 2012; LO *et al.*, 2010; MAEDA *et al.*, 2012; NARRA *et al.*, 2012). Basicamente, a diferença entre estas enzimas está relacionada ao seu local de atuação na cadeia celulósica (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

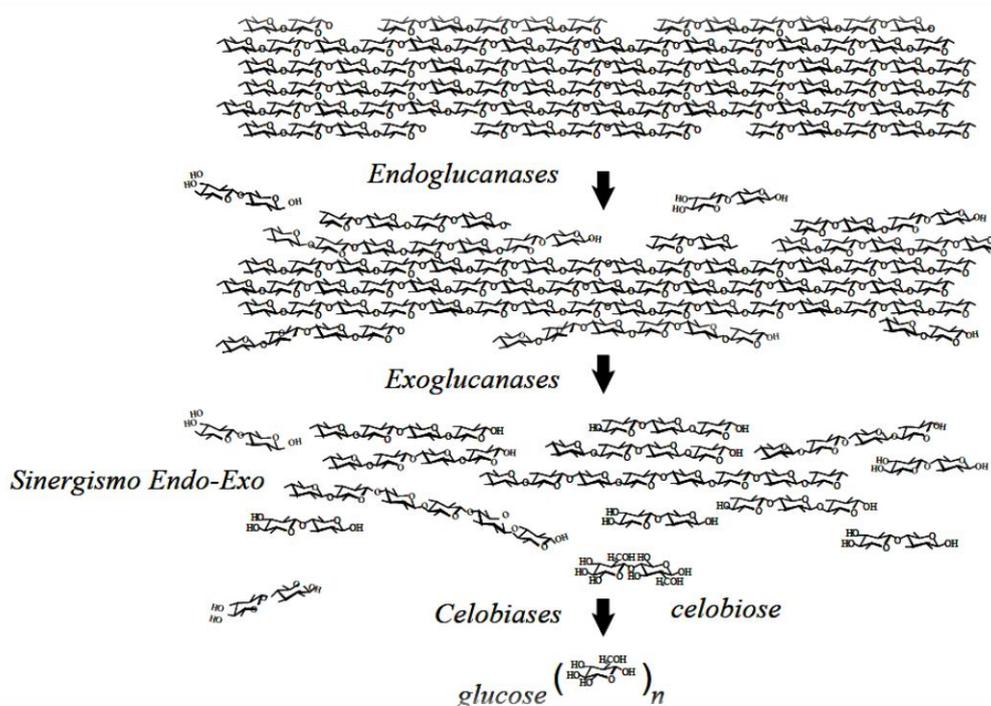
Endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) também conhecida como carboximetilcelulase, é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, clivando, de forma aleatória, as ligações intramoleculares da fibra de celulose gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e consequentemente novas cadeias terminais (BANSAL *et al.*, 2012; MAEDA *et al.*, 2012).

Exo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.91) também conhecida como celobiohidrolase, hidrolisam as extremidades redutoras e não-redutoras da cadeia da celulose liberando celobiose ou glicose (BANSAL *et al.*, 2012; MAEDA *et al.*, 2012; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Esta enzima sofre inibição por seu produto de hidrólise (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

β -1,4-glicosidase (EC 3.2.1.21) também conhecida como celobiase é responsável pela hidrólise da celobiose e dos oligossacarídeos solúveis em glicose (BANSAL *et al.*, 2012; MAEDA *et al.*, 2012), eliminando desta forma a inibição pela celobiose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, *et al.*, 2006).

Estas enzimas agem em sinergia (Figura 7) na hidrólise da celulose, de modo que, a falta de qualquer uma ou um desequilíbrio em suas quantidades, acarreta diminuição na eficiência de degradação do sistema (JI *et al.*, 2012; OLSEN *et al.*, 2011).

Figura 7 – Representação esquemática do efeito sinérgico das enzimas que compõe o complexo celulolítico



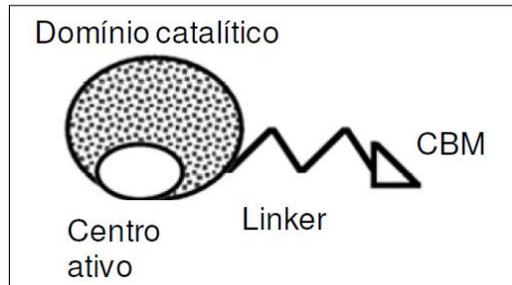
Fonte: Martins (2005).

A maior parte das enzimas que hidrolisam carboidratos, inclusive as celulases, são proteínas modulares, constituídas por um módulo catalítico (MC), que abriga o sítio ativo da enzima e por um módulo de ligação a carboidratos (MLC) (Figura 8), que tem por função promover o contato íntimo entre o substrato e a enzima, assegurando a orientação correta entre ambos (CANILHA *et al.*, 2010).

O estudo da organização estrutural dos módulos catalíticos sugere uma explicação para os diferentes mecanismos de ação das enzimas. As endoglucanases têm centros ativos relativamente abertos, em comparação com as exoglucanases, o que facilita a sua intervenção no interior das cadeias de celulose. As exoglucanases, por sua vez, têm centros ativos com

conformação em forma de túnel, o que provavelmente limita a sua ação às extremidades da cadeia (SOUSA, 2002).

Figura 8 - Representação esquemática dos domínios catalíticos em celulasas



CBM = Módulo de Ligação ao Carboidrato
Fonte: Silva (2008).

A glicose produzida a partir da ação das celulasas pode ser utilizada como substrato na síntese de produtos de fermentação, de grande interesse para as indústrias de alimentos, papel, têxtil e combustível (XUE *et al.*, 2012).

2.2.1 Aplicações das celulasas

2.2.1.1 Indústria têxtil

A utilização das celulasas na indústria têxtil data de 1980, quando Kao introduziu uma celulase em seu detergente alcalino Attack® (SCHAFER *et al.*, 2005). Atualmente, estas enzimas representam o terceiro maior grupo de catalisadores utilizados nesta indústria (PIRES, 2008).

No caso dos tecidos *jeans*, estas enzimas são utilizadas na remoção do excesso de corantes, processo denominado bioestonagem, o qual danifica menos as fibras do tecido quando comparado ao método tradicional que utiliza pedra-pomes além de conferir aspecto de desbotado mais uniforme. Outro benefício muito interessante decorrente da ação destas enzimas, refere-se ao realce e brilho das cores do tecido (MUSSATTO *et al.*, 2007). Entretanto, um dos grandes desafios da aplicação das celulasas na indústria têxtil decorre da utilização de formulações adequadas contendo as enzimas (SCHAFER *et al.*, 2005).

2.2.1.2 Indústria de papel

No processo de fabricação da polpa de celulose, é realizado o refino da mesma, sendo removidos materiais lenhosos que prejudicam a qualidade da polpa. O emprego de celulases torna possível a economia de, no mínimo, 20% de energia. Estas enzimas atuam na modificação das propriedades das fibras, permitindo seu enxágue, o que aumenta a velocidade de fabricação do papel (BHAT, 2000).

As celulases também desempenham um papel importante na reciclagem do papel, pois, agem na sua descoloração e ainda no tratamento de águas residuais (GEORGE *et al.*, 2001).

2.2.1.3 Indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, as celulases, em conjunto com as hemicelulases e pectinases, são utilizadas em processos de maceração enzimática, na fabricação de cerveja e vinho, extração de pigmentos de frutos, produção de néctares de frutos, purês e na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, alterando sua viscosidade e aumentando a taxa de filtração e estabilidade do produto final (BHAT, 2000; MUSSATTO *et al.*, 2007). São empregadas ainda como aditivos no preparo de enzimas digestivas, no aumento do rendimento de extração de amido, óleos vegetais, componentes do chá verde, proteína de soja e aromatizantes (BHAT, 2000).

Celulases e hemicelulases são também utilizadas na hidrólise de polissacarídeos, que compõem as rações de ruminantes, resultando em melhor assimilação dos nutrientes e, conseqüentemente, no aumento da produção de leite e ganho de peso pelos animais (BHAT, 2000).

2.2.1.4 Indústria de produção de biocombustíveis

O aumento na demanda global de energia tem como principais causas a industrialização e o crescimento da população. Estima-se que em 2030, esta demanda aumente em 43,64% do total atual e que os combustíveis fósseis permaneçam como a principal fonte de energia até este ano (LIM *et al.*, 2012). A forte dependência desta fonte energética contribui para o seu

inevitável esgotamento, o que torna cada vez mais urgente a criação de alternativas ao uso deste tipo de combustível (BINOD *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012).

Dentre as fontes alternativas de energia, os biocombustíveis oriundos da energia de biomassa desempenham um papel fundamental na redução dos impactos sobre o meio ambiente, causados principalmente pela emissão dos gases do efeito estufa, diminuindo as mudanças climáticas e melhorando a segurança ambiental (LIU *et al.*, 2012; SOCCOL *et al.*, 2011). Além de apresentar como vantagens o fato de ser provenientes de uma matéria-prima amplamente disponível e que não compete com a produção de alimentos (LIM *et al.*, 2012; MORAIS *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012b; SINGH; SINGH; BISHNOI, 2010; SINGHANIA, 2011) diferentemente da abordagem utilizando culturas de grãos, como milho e canola utilizadas atualmente (LIU *et al.*, 2012).

Para a produção do etanol celulósico, a biomassa deve ser submetida a um pré-tratamento para remoção da lignina e hemicelulose, seguida da hidrólise química ou enzimática para a liberação de açúcares fermentescíveis e finalmente, a fermentação anaeróbica com subsequente destilação (LIU *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2009).

Até o presente, a maioria dos estudos relacionados com a produção de biocombustíveis está centrada no desenvolvimento de um processo que seja economicamente viável, particularmente no que diz respeito ao pré-tratamento e a hidrólise (LIU *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012b).

O pré-tratamento tem a função de quebrar a rede lignocelulósica que recobre a celulose e lhe confere uma estrutura altamente resistente à hidrólise (BINOD *et al.*, 2011; MAEDA *et al.*, 2012). Com a remoção da lignina e quebra da hemicelulose, ocorre aumento de volume dos poros e da área superficial interna dos resíduos (MONTE; BRIENZO; MILAGRES, 2011), adicionalmente, torna a celulose mais disponível para a hidrólise, liberando açúcares fermentescíveis, como a glicose, fundamentais para a produção do bioetanol (SU *et al.*, 2012).

Recentemente, a hidrólise enzimática da celulose tem recebido notável atenção, pois é considerada amiga do ambiente e econômica em termos de energia (GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010; SU *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2009), tendo em vista que opera em condições brandas de temperatura, pH e pressão osmótica, diferentemente da hidrólise ácida. Além disto, a reação é seletiva e não libera produtos de degradação do açúcar, tais como furfural e hidroximetilfurfural, que além de diminuir a concentração de açúcar na biomassa resultante, causam inibição da enzima (CAMASSOLA; DILLON, 2012; MAEDA *et al.*, 2012).

As celulasas são as principais enzimas envolvidas neste processo, entretanto, sua ampla utilização industrial é limitada pelos seus custos de produção. Por isso, celulasas microbianas têm sido extensivamente estudadas, a fim de desenvolver novos bioprocessos, menos onerosos na produção de enzimas celulolíticas, bem como rastrear enzimas com maior potencial celulolítico que as disponíveis (BAEK *et al.*, 2012; BANSAL *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2012; PARK; NARUSE; KATO, 2011; SINGHANIA, 2011; SINGHVI *et al.*, 2011), para que a produção do etanol de segunda geração (2G) em larga escala, seja uma realidade num futuro próximo (HIDENO *et al.*, 2011; PARK; NARUSE; KATO, 2011).

2.3 Micro-organismos produtores de celulasas

A capacidade de micro-organismos em assimilar matéria orgânica depende de sua habilidade em produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (MARCO, 2012). Micro-organismos celulolíticos são aqueles capazes de utilizar a celulose presente nos materiais lignocelulósicos (SIGOILLOT *et al.*, 2012). Estes, por sua vez, precisam primeiramente degradar macromoléculas insolúveis em unidades monoméricas solúveis, o que é possível devido à secreção de enzimas específicas, reduzindo o tamanho das moléculas, até torná-las solúveis e atravessar a membrana celular (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Neste contexto, estes micro-organismos apresentam uma habilidade excepcional, o que promove um grande interesse comercial na sua aplicação em biodegradação de resíduos e produção de enzimas (BANSAL *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012; NARRA *et al.*, 2012; GRIMM *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2012b).

Entre os micro-organismos produtores de celulasas estão as bactérias e os fungos filamentosos, sendo estes de grande interesse pois, secretam suas enzimas extracelularmente (BANSAL *et al.*, 2012; PARK; NARUSE; KATO, 2011). Os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* se destacam devido a sua elevada atividade celulolítica (TRIVEDI *et al.*, 2011; WARD, 2012; ZHENG *et al.*, 2009). Entretanto, a fim de alcançar uma produção de celulasas diversificada e com maior potencial que as disponíveis atualmente, é interessante que a capacidade de produção e secreção de celulasas de outros fungos seja investigada (HIDENO *et al.*, 2011).

2.4 Fermentação em Estado Sólido

Existem dois tipos de processo fermentativo, a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSM), sendo o volume de água disponível no meio de cultura, um dos parâmetros mais decisivos para diferenciá-las (SANTOS *et al.*, 2012b).

A ocorrência da FES é mais antiga que o próprio homem, fazendo parte da dieta de diversos povos há muito séculos, sendo, portanto, muito difícil precisar quando se iniciou esta prática (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001). Há registros de que todos os processos de fermentação usados nos tempos antigos foram baseados nos princípios deste tipo de tecnologia (SINGHANIA *et al.*, 2009), como é o caso da produção do molho de soja e do queijo roquefort (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

O Japão é um dos pioneiros neste tipo de fermentação, especialmente para a produção de molho de soja, que tem como base o "koji", que consiste em uma massa de cereal (arroz, soja ou trigo) fermentada normalmente por *Aspergillus oryzae*, contendo amilases e proteases produzidas pelo micro-organismo. Por isto, este país é líder no fornecimento de equipamentos para a indústria de produção de molho de soja (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A partir de 1940, com o desenvolvimento da penicilina, a “droga maravilhosa”, através da FSM, os processos de FES foram praticamente abandonados nos países ocidentais. Porém, entre 1960-1970 a descoberta das micotoxinas produzidas por FES fez ressurgir o interesse neste tipo de processo (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A FES é definida como um processo de fermentação no qual o crescimento microbiano ocorre sobre ou dentro de uma matriz sólida (ZHU *et al.*, 2012), sendo que a umidade do meio deve ser suficiente para assegurar o crescimento e o metabolismo das células, sem, contudo, exceder a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida, ou seja, sem que haja água livre (SANTOS *et al.*, 2012b). A matriz sólida pode ser qualquer fonte de nutrientes ou simplesmente um suporte impregnado com nutrientes adequados ao desenvolvimento dos micro-organismos (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Os fungos filamentosos são amplamente empregados em FES devido a sua habilidade em se desenvolver, de forma eficiente, em substratos sólidos complexos, o que ocorre devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas hidrolíticas extracelulares (DHILLON *et al.*, 2012), além da semelhança com o seu ambiente natural (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2012; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Segundo Chancharonpong, Hsieh e Sheu (2012), a baixa umidade do meio empregado para a FES faz com que certos micro-organismos sejam capazes de produzir determinadas enzimas e metabólitos que normalmente não seriam produzidos por FSM. O que ficou comprovado no trabalho de ISHIDA *et al.* (1998), que observaram que o gene que codifica a expressão de glucoamilase foi expresso especificamente na FES, apresentando um nível muito baixo no cultivo submerso.

A técnica de FES é muito eficaz e oferece inúmeras vantagens em relação à modalidade de FSM, tais como, elevado rendimento em produto, baixo requisito de energia, baixo risco de contaminação bacteriana, menor geração de águas residuais, além da facilidade de extração dos produtos, uma vez que não requer métodos complicados de tratamento do resíduo fermentado. Oferece também melhor oportunidade para a biossíntese de produtos de baixo-volume e elevado custo (BANSAL *et al.*, 2012; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). Por todas estas vantagens, a FES é relatada por diversos pesquisadores como uma excelente alternativa a FSM (BANSAL *et al.*, 2012; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; NARRA *et al.*, 2012). Na Tabela 3, estão descritas algumas aplicações da FES.

Tabela 3 – Aplicações da fermentação em estado sólido

Aplicações biotecnológicas	Referências
Proteínas aplicadas em ração animal	Hsu <i>et al.</i> (2012); Graminha <i>et al.</i> (2008)
Biopesticidas (esporos fúngicos)	Xu, Shi e Y (2008); Zhuang <i>et al.</i> (2011)
Fármacos (Antibióticos)	Ano <i>et al.</i> (2009)
Ácidos orgânicos (ácido cítrico, láctico e giberélico)	Dhillon <i>et al.</i> (2013); John, Nampoothiri, Pandey (2006); Corona, Sáez e Agosin (2005)
Biosurfactantes	Slivinski <i>et al.</i> (2012); Zhu <i>et al.</i> (2012)
Fitase	Rodríguez-Fernández <i>et al.</i> (2012)
Lacase	Karp <i>et al.</i> (2012)
α -amilase	Hashemi <i>et al.</i> (2011)
Liquenase	Maktouf <i>et al.</i> (2013)
Xilanase	Dhillon <i>et al.</i> (2012); Ncube <i>et al.</i> (2012),
Protease	Thanapimmtha <i>et al.</i> (2012)
Lipase	Santis-Navarro <i>et al.</i> (2011)
α -galactosidase	Shankar e Mulimani (2007)
Poligalacturonase	Gupta <i>et al.</i> (2008)
Celulase	Deswal <i>et al.</i> (2011); Dhillon <i>et al.</i> (2012); El-Bondkly e El-Gendy (2012); Herculano <i>et al.</i> (2011); Liu <i>et al.</i> (2011); Ncube <i>et al.</i> (2012)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. em produzir celulasas por fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, bem como estudar os parâmetros de influência na produção das enzimas.

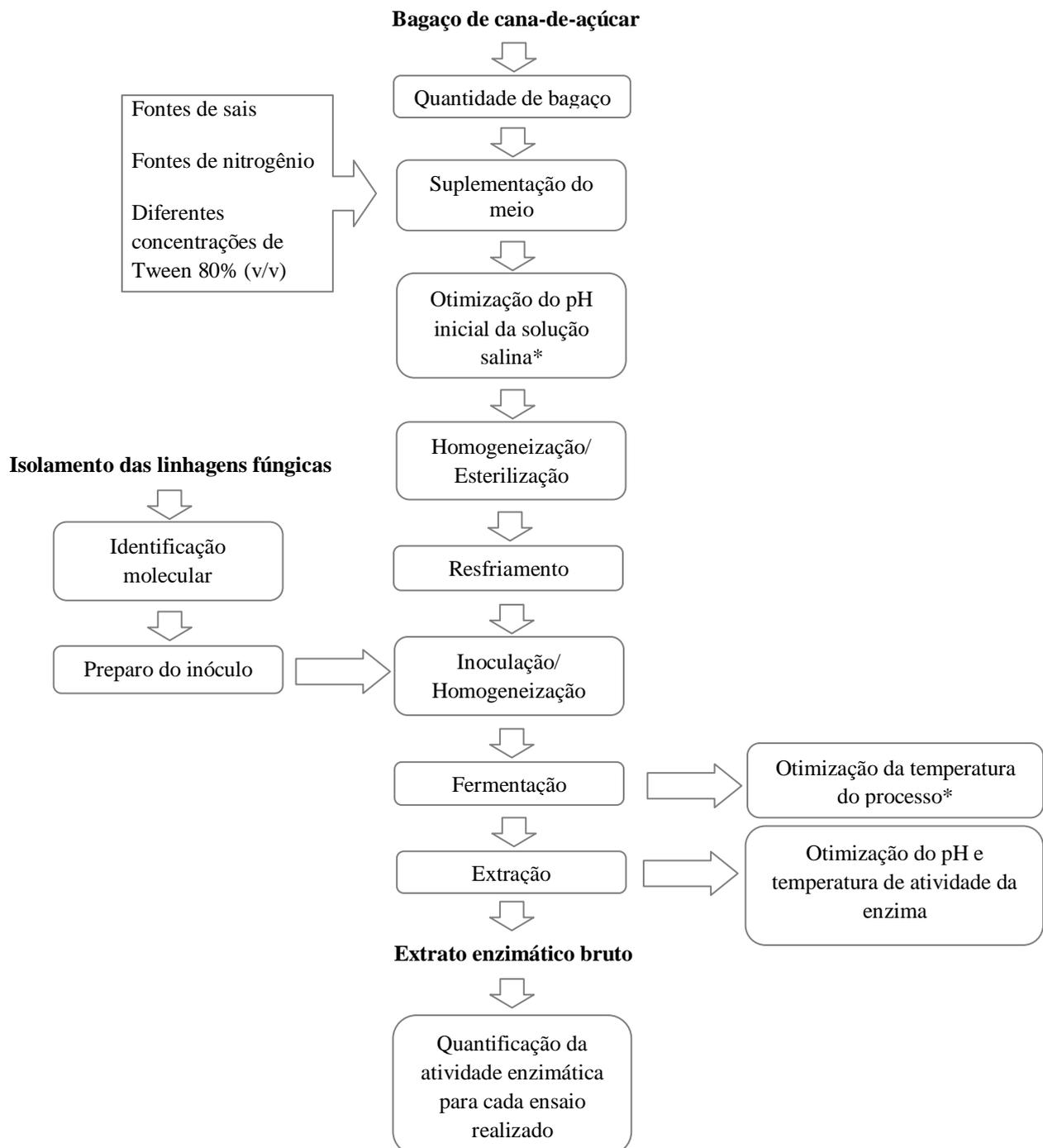
3.2 Objetivos específicos

- Estudar os parâmetros físico-químicos relacionados com o crescimento do micro-organismo e produção da enzima, tais como, pH inicial do meio de crescimento, temperatura de fermentação e tempo necessário para alcançar a produção máxima da enzima;
- Avaliar a necessidade de adição de fontes de sais minerais, nitrogênio orgânico e Tween 80 ao meio de crescimento;
- Definir a melhor combinação de pH e temperatura para a determinação da atividade celulolítica dos extratos enzimáticos obtidos a partir da fermentação.

4 MATERIAL e MÉTODOS

É possível observar na Figura 9 um fluxograma descritivo do processo fermentativo realizado neste estudo.

Figura 9 – Fluxograma representativo das etapas empregadas



* Ensaios realizados mediante um planejamento experimental composto central (2²).

4.1 Micro-organismos utilizados

4.1.1 Isolamento das linhagens fúngicas

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram isolados a partir de uma amostra de casca de coco com indícios de contaminação fúngica. Primeiramente, uma amostra deste material foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo o meio caldo batata dextrose, sendo incubado a 30 °C, em agitador orbital a 200 rpm, durante 48 horas. Após este período, uma alíquota do caldo fermentado foi inoculada em placas de Petri contendo o meio ágar batata dextrose (BDA). As diferentes colônias formadas foram transferidas para novas placas, contendo o referido meio, tantas vezes quantas fossem necessárias para obtenção de isolados fúngicos, sendo posteriormente incubados a 30 °C por 120 horas em placas de Petri contendo o meio ágar celulose (0,5 g/L de MgSO₄; 0,5 g/L de KCl; 3,0 g/L de NaNO₃; 0,01 g/L de FeSO₄.7H₂O; 1,0 g/L de K₂HPO₄; 15 g/L de ágar-ágar e 5,0 g/L de celulose microcristalina) para avaliação da capacidade celulolítica (BRAGA *et al.*, 2009). Os isolados fúngicos foram armazenados pelo método de Castellani (1967).

4.1.2 Identificação molecular das linhagens fúngicas

As linhagens isoladas foram submetidas à análise morfológica através do microcultivo entre lâmina e lamínula, coradas com lactofenol de Amann e azul de algodão e observadas ao microscópio óptico na objetiva de 40x (RIVALIER; SEYDEL, 1932).

A identificação molecular dos micro-organismos com atividade celulolítica foi realizada no Laboratório do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, sendo o DNA genômico das amostras extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). A metodologia consiste na amplificação das regiões ITS (International Transcribed Space) pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram ITS-1 e ITS-4 homólogos às extremidades da região ITS; os fragmentos amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático MegaBace 1000 (GE Healthcare).

Os *primers* utilizados para sequenciamento foram ITS-1 e ITS-4; as sequências parciais das regiões ITS obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um contig (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank e CBS. As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas, foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 4.0.

4.1.3 Preparo do inóculo

As linhagens foram cultivadas em placas de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA), durante 10 dias, 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 determinada em câmara de Neubauer, sendo requerida uma concentração igual a 1×10^6 esporos/mL para inoculação no meio de produção de celulasas (NCUBE *et al.*, 2012).

4.2 Composição do meio utilizado na produção de celulasas por *Melanoporia* sp. e *M. circinelloides*

Foi utilizado como substrato, para a produção de celulasas, bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*”, com tamanho médio de partícula entre 3 e 8 mm (HERCULANO *et al.*, 2011). O mesmo foi cortado e umidificado com solução salina em pH 5,5, com a seguinte composição: 9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 g/L de KH_2PO_4 (OLIVEIRA, 2010), sendo posteriormente acondicionado em frascos Erlenmeyers de 250 mL, homogeneizado com auxílio de bastão de vidro e autoclavado a 121°C por 15 minutos.

O meio esterilizado foi então inoculado com uma suspensão de esporos (conforme item 4.1.3), e incubado de forma estática em estufa B.O.D a 30 °C por 24 horas.

4.2.1 Influência da quantidade de bagaço empregada na produção das enzimas

Com o intuito de estabelecer a melhor proporção de substrato utilizado na produção de celulases, variou-se a quantidade de bagaço em 3, 4 e 5 g, os quais foram cortados e umidificados pela adição de 2,0; 2,66 e 3,33 mL, respectivamente, de solução salina.

Além disto, foram conduzidos estudos de suplementação deste resíduo a partir de fontes de sais minerais, nitrogênio orgânico e Tween 80, os quais se encontram descritos a seguir.

4.2.2 Estudo da suplementação do bagaço com fontes de sais minerais

Para os ensaios descritos neste subitem, a composição do meio base, ao qual os nutrientes foram adicionados, consistiu de 3,0 g de bagaço de cana-de-açúcar e 2,0 mL de solução salina.

Um delineamento estatístico Plackett-Burman (one-way) foi conduzido com a finalidade de selecionar sais com efeito significativo sobre a produção da enzima por ambos os micro-organismos, sendo avaliados os seguintes sais: NaNO₃, CoCl₂, ZnSO₄, KCl, MnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, CaCl₂, MgSO₄, K₂HPO₄ (MACIEL *et al.*, 2008). A matriz do planejamento fatorial se encontra na Tabela 4.

Tabela 4 – Matriz do planejamento fatorial Plackett-Burman para seleção de sais para compor o meio de produção de celulases por *Melanoporia* sp. e *M. circinelloides*

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

*pontos centrais. Onde, 0 (zero) significa que a fonte de sal não foi adicionada ao meio de cultivo e 1, que a fonte foi adicionada, na concentração de 0,1 g/L (ou 0,33 mg/g de bagaço) à solução salina descrita nesta secção.

Após analisar os resultados do planejamento descrito anteriormente, para *M. circinelloides* foi necessário avaliar o efeito de diferentes concentrações dos sais CuSO_4 e ZnSO_4 sobre a produção de celulases, o qual foi realizado por meio de um planejamento experimental composto central (2^2), conforme apresentado na Tabela 5. A faixa de concentração avaliada, para ambos os sais, esteve entre 0 e 0,1 g/L, sendo realizadas três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios.

Tabela 5 – Matriz do planejamento composto central para otimização das concentrações de CuSO_4 e ZnSO_4 adicionados ao meio de produção de celulases por *M. circinelloides*

Ensaio	CuSO_4 (g/L)	ZnSO_4 (g/L)
1	0,00	0,00
2	0,00	0,10
3	0,10	0,00
4	0,10	0,10
5	0,00	0,05
6	0,10	0,05
7	0,05	0,00
8	0,05	0,10
9*	0,05	0,05
10*	0,05	0,05
11*	0,05	0,05

*Pontos centrais

A partir dos resultados deste planejamento, foi realizado ainda um estudo univariado para investigar a melhor concentração de CuSO_4 . O intervalo de concentração do sal estudado variou entre 0,1 e 0,6 g/L.

4.2.3 Estudo da suplementação do bagaço com fontes de nitrogênio orgânico

Outro planejamento Plackett-Burman foi conduzido a fim de investigar o efeito de sete fontes de nitrogênio orgânico (uréia, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, triptona, caseína e proteína de soja) na produção da enzima. Este planejamento foi realizado após análise dos resultados do primeiro planejamento, por isto, os sais que apresentaram efeito significativo positivo sobre a produção da enzima foram adicionados à solução salina descrita no item 4.2. A matriz do planejamento fatorial encontra-se na Tabela 6. Para ambos os planejamentos foram realizadas três repetições no ponto central para avaliação do erro puro e reprodutibilidade do processo.

Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial Plackett-Burman para seleção de fontes de nitrogênio orgânico para a composição do meio de produção de celulases por *Melanoporia* sp. e *M. circinelloides*

Ensaio	Peptona	Ext. levedura	Ext. carne	Triptona	Caseína	Uréia	Proteína de soja
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	0	0	0	0	1	1
12	0	0	0	0	0	0	0
13*	0	0	0	0	0	0	0
14*	0	0	0	0	0	0	0
15*	0	0	0	0	0	0	0

*Pontos centrais. Onde 0 (zero) significa que a fonte de nitrogênio não foi adicionada ao meio e 1,0, que a fonte foi adicionada. A cada Erlenmeyer foi adicionado, no máximo, 3% (m/m) de fontes de nitrogênio, em relação à massa do meio de cultivo. As fontes de nitrogênio foram solubilizadas na solução salina e então adicionadas ao bagaço.

4.2.4 Estudo da suplementação do bagaço com diferentes concentrações de Tween 80

Após finalizar os testes de suplementação do meio para produção de celulasas com sais e fontes de nitrogênio orgânico, um estudo univariado foi realizado para avaliar a influência da adição de Tween 80 (% v/v) ao meio de produção da enzima. As concentrações avaliadas foram 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,0% (v/v). No ensaio controle não foi adicionado Tween 80. Este ensaio foi realizado após análise dos resultados dos planejamentos anteriores, de modo que, os sais que apresentaram efeito significativo positivo sobre a produção da enzima foram adicionados à solução salina descrita no item 4.2.

4.3 Otimização dos parâmetros físico-químicos do processo fermentativo

4.3.1 Influência do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo fermentativo

A composição do meio de produção de celulasas neste item foi definida a partir dos resultados obtidos no item anterior. Para *M. circinelloides*, utilizou-se 3 g de bagaço, com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 0,1 g/L de CuSO₄, 9,0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g/L de KH₂PO₄ e Tween 80 a 0,8% (v/v). Em relação ao *Melanoporia* sp., foi utilizado 3 g de bagaço, com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 9,0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g/L de KH₂PO₄ e Tween 80 a 0,2% (v/v). O pH destas soluções variou de acordo com o planejamento experimental descrito a seguir.

O pH inicial do meio e a temperatura de condução do processo fermentativo foram otimizados através de um planejamento fatorial composto central (2²). O pH da solução salina (descrita no item 4.2), adicionada ao meio de cultura variou entre 4,0 e 7,0 e a temperatura esteve entre 25 e 35 °C. A escolha destes valores baseou-se nos trabalhos de Brijwani *et al.* (2010), Guowei *et al.* (2011), Deswal *et al.* (2011), Liu *et al.* (2011), Herculano *et al.* (2011) e Haq *et al.* (2006). Foram realizados 11 ensaios, sendo três destes repetições no ponto central. A matriz do planejamento fatorial encontra-se representada na Tabela 7.

Tabela 7 – Matriz do planejamento fatorial composto central (2^2) para otimização do pH inicial do meio de produção de celulasas e da temperatura do processo fermentativo na produção de celulasas por *Melanoporia* sp. e *M. circinelloides*

Ensaio	pH	Temperatura (°C)
1	4,0	25
2	4,0	35
3	7,0	25
4	7,0	35
5	4,0	30
6	7,0	30
7	5,5	25
8	5,5	35
9*	5,5	30
10*	5,5	30
11	5,5	30

*pontos centrais

4.3.2 Influência do tempo de condução do processo fermentativo na produção de celulasas

Com a finalidade de definir o tempo de condução do processo fermentativo, para a máxima produção da enzima, a síntese enzimática foi acompanhada ao longo de 10 dias consecutivos a 30 °C, sendo a atividade enzimática determinada a cada 24 horas.

4.4 Etapas posteriores ao processo fermentativo (etapas *downstream*)

4.4.1 Recuperação da enzima do meio fermentado

Em todos os ensaios descritos acima, a medida da atividade enzimática foi utilizada como indicador da síntese de celulasas. Após cada fermentação, a recuperação da enzima do meio fermentado ocorreu a partir da adição de 20 mL do tampão adequado para cada enzima, de acordo com o ensaio descrito no subitem 4.4.3, sendo submetida à agitação de 200 rpm, em agitador orbital, por 30 minutos a 30 °C, de acordo com Oliveira (2010). Decorrido este tempo, o material foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, com a finalidade de separar o resíduo da fermentação do sobrenadante contendo as enzimas, sendo este denominado de extrato enzimático bruto e utilizado para a quantificação da atividade celulásica.

4.4.2 Quantificação da atividade enzimática

Para o ensaio de quantidade de bagaço, a atividade celulásica da enzima produzida foi determinada através da incubação de 125 µL do extrato enzimático bruto com 125 µL de uma solução de celulose microcristalina (Avicel®) em banho termostático. A mistura foi incubada por 1 hora a 60 °C. Decorrido o tempo de reação, a mesma foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente ácido 3,5 -dinitrosalicílico (DNS). A atividade hidrolítica foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação, quantificados pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa em UI/g (unidade internacional por grama de substrato sólido) sendo 1 UI definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio (BINOD *et al.*, 2007).

Para os demais ensaios, foi quantificada a atividade celulásica total segundo a metodologia de Ghose (1987) modificada, sendo utilizados a temperatura e pH ótimos para o ensaio enzimático, determinados através do ensaio descrito no item 4.4.3. Após o período de reação, a mesma foi interrompida pela adição do reagente ácido 3,5 -dinitrosalicílico (DNS). A atividade hidrolítica foi determinada através da quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação, quantificados pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi expressa em FPU/g (unidades de papel de filtro por grama de substrato sólido) sendo 1 FPU definido como a quantidade de enzima capaz de liberar 0,18 µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio.

4.4.3 Otimização do pH e da temperatura na quantificação da atividade enzimática

Uma vez que pH e temperatura são parâmetros que influenciam sobremaneira a atividade enzimática, o primeiro ensaio realizado neste estudo, teve como objetivo determinar os referidos parâmetros.

Deste modo, dois ensaios univariados foram conduzidos para ambos os micro-organismos. No primeiro, a temperatura foi mantida constante em 60 °C e avaliou-se a influência do pH na atividade enzimática. O valor do pH do tampão adicionado ao meio fermentado, para recuperar a enzima, variou entre 4,0 e 10,0. Com o objetivo de alcançar a faixa de pH desejada, foram utilizados os tampões acetato de sódio (pH 4,0 a 6,5), fosfato de sódio (pH 7,0 a 8,0) e glicina NaOH (pH 8,5 a 10,0), com força molar igual a 20 mM. O segundo ensaio teve como objetivo avaliar a influência da temperatura na atividade enzimática, a qual variou entre 40 e 80 °C, sendo realizado em pH fixo, determinado a partir do ensaio anterior.

4.5 Análise estatística

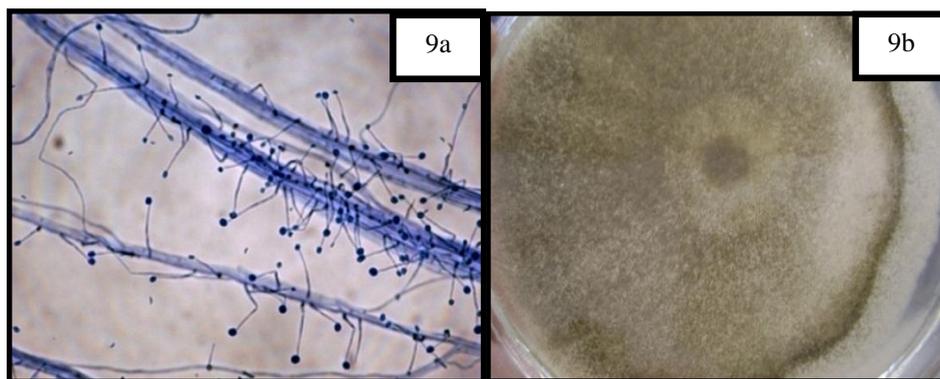
Todas as análises foram realizadas em triplicata sendo calculadas a média e o desvio padrão. Os planejamentos experimentais e as análises dos gráficos de superfície de resposta foram efetuados com o auxílio do software Statistica v. 7.0 (Statsoft). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a significância do modelo matemático ao nível de 90% de confiança. As médias dos demais ensaios foram tratadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação das linhagens fúngicas

O teste do ágar celulose utilizado consistiu numa análise qualitativa para investigar a capacidade de uma cepa em produzir celulasas, uma vez que, neste meio de cultura, a única fonte de carbono é a celulose. Os fungos isolados a partir da casca do coco apresentaram capacidade celulolítica, sendo identificados molecularmente como *Mucor circinelloides* e *Melanoporia* sp.. Na Figura 10 pode-se observar o aspecto microscópico (objetiva de 40x) e macroscópico (crescimento em ágar batata dextrose) do micro-organismo isolado e identificado como *M. circinelloides*.

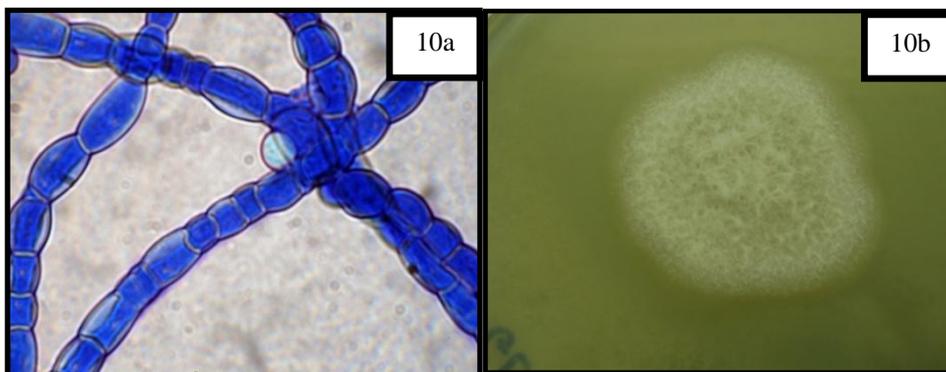
Figura 10 - Aspecto microscópico (a) e macroscópico (b) de *M. circinelloides*



M. circinelloides, pertencente à classe dos Zigomicetos, apresenta a capacidade de se desenvolver aerobicamente e anaerobicamente, sendo esta propriedade denominada dimorfismo (LI *et al.*, 2011); além disto, é um fungo tipicamente saprófita do solo (ANDRADE *et al.*, 2002). Entretanto, até o presente, não foram encontrados na literatura estudos investigando a possibilidade de produção de enzimas celulolíticas por este fungo, estando concentrados em sua capacidade de produzir, de forma eficiente, lipases (MINTRA *et al.*, 2012), quitosanases (STRUSZCZYK *et al.*, 2009), carotenóides (FRASER *et al.*, 1996), dentre outros. Sua capacidade de acumular lipídeos, em níveis elevados no micélio, é conhecida e tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas, como relatado por Mintra *et al.* (2012), que investigaram a utilização da biomassa de *M. circinelloides* na produção de biodiesel, como uma alternativa ao uso dos óleos vegetais.

Na Figura 11 pode-se observar o aspecto microscópico (objetiva de 40x) e macroscópico (crescimento em ágar batata dextrose) do micro-organismo isolado e identificado como *Melanoporia* sp.

Figura 11 - Aspecto microscópico (a) e macroscópico (b) de *Melanoporia* sp.



O gênero *Melanoporia*, pertencente à classe dos Deuteromicetos, é apontado como causador de podridão marrom em madeira (KIM *et al.*, 2003), sendo capaz de degradar 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 (ZHOU; DAI, 2012), até o momento não foi encontrado na literatura relatos de sua utilização, na produção de celulases, em processos fermentativos.

5.2 Composição do meio utilizado na produção de celulases por *Melanoporia* sp. e *M. circinelloides*

5.2.1 Influência da quantidade de bagaço empregada na produção das enzimas

Os resultados de atividade enzimática obtidos para a enzima produzida por *M. circinelloides* foram de $0,620 \pm 0,01$; $0,553 \pm 0,02$ e $0,353 \pm 0,06$ UI/g para 3,0; 4,0 e 5,0 g de substrato, respectivamente. É possível observar que os maiores resultados foram obtidos com a utilização de 3,0 e 4,0 g de bagaço, não diferindo significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A redução da atividade celulásica, com o aumento da quantidade de bagaço de cana empregada na fermentação, pode ser um indicativo da ocorrência de inibição da síntese da enzima pelo substrato ou ainda, de problemas relacionados com a aeração no sistema fermentativo (PANDEY, 2008). Por isto, a fim de evitar tais problemas, 3,0 g foi selecionada como a melhor quantidade de bagaço.

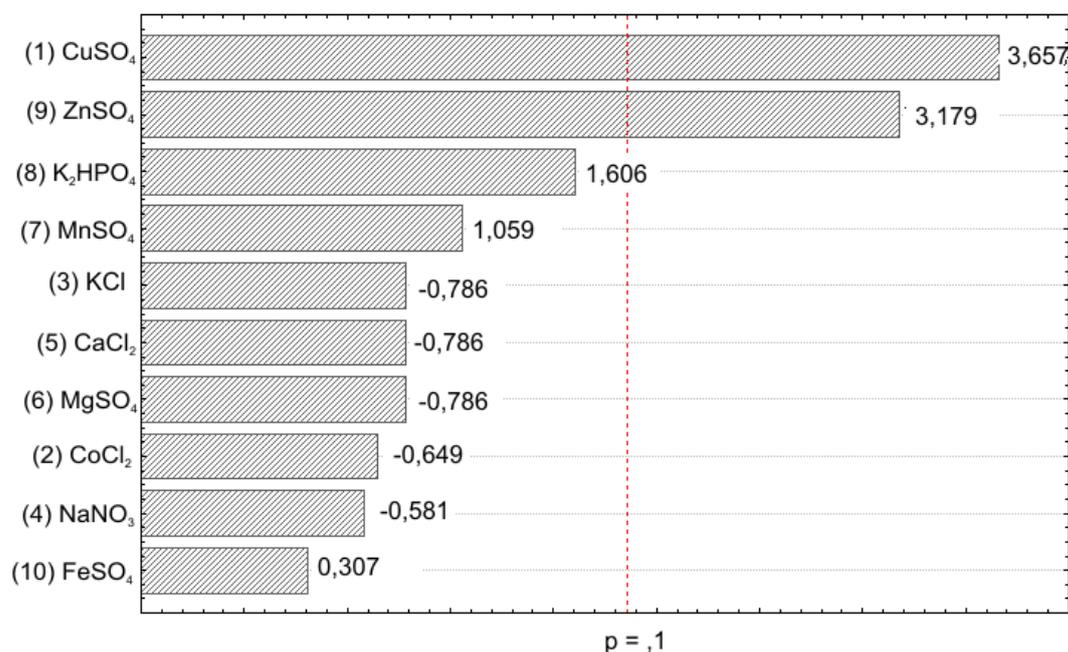
No caso da enzima produzida por *Melanoporia* sp., os valores de atividade enzimática quantificada foram iguais a $0,65 \pm 0,01$; $0,89 \pm 0,03$ e $0,95 \pm 0,03$ UI/ g para 3,0; 4,0 e 5,0 g de substrato, respectivamente. Estes valores não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de significância de acordo como teste de Tukey. Logo, pelo mesmo motivo apresentado anteriormente, decidiu-se utilizar 3,0 g de bagaço de cana.

5.2.2. Estudo da suplementação do bagaço com fontes de sais minerais

Um fungo pode se desenvolver melhor num meio de cultura do que em outro, ou mesmo nem crescer em determinado meio, por isto, é necessário que seus requisitos nutricionais sejam conhecidos. A classificação dos nutrientes, de acordo com a quantidade necessária na dieta dos fungos, compreende os macronutrientes, tais como, carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre, cálcio e magnésio e micronutrientes, tais como, ferro, manganês, cobalto, cobre e zinco (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Segundo Maciel *et al.* (2008), os sais estão diretamente relacionados com o metabolismo dos micro-organismos, podendo estimular ou inibir a produção de enzimas. O nitrogênio, por sua vez, é utilizado na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e de algumas vitaminas (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Desta forma, investigou-se o efeito da suplementação do meio de crescimento dos fungos estudados, com sais minerais e fontes de nitrogênio orgânico, na produção de celulasas. A composição do meio base consistiu de 3,0 g de bagaço-de-cana e 2,0 mL de uma solução salina $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{KH}_2\text{PO}_4]$. A Figura 12 apresenta o Diagrama de Pareto com os efeitos dos 10 sais avaliados na produção de celulasas.

Figura 12 – Diagrama de Pareto com o efeito estimado dos sais na produção de celulases por *M. circinelloides* através do planejamento Plackett–Burman realizado



Através do Diagrama de Pareto (Figura 12), observa-se que apenas os sais CuSO₄ e ZnSO₄ apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a variável resposta. Sabe-se que, para alguns micro-organismos, o cobre e o zinco são nutrientes essenciais sendo usados como catalisadores de reações bioquímicas, estabilizadores de proteínas e mantenedores do equilíbrio osmótico da célula (SANTOS, 2006).

O efeito estimulante do cobre também foi verificado sobre a produção de xilanases por *A.niger* LPB 326 (MACIEL *et al.*, 2008) e celulases por *Fomitopsis* sp. RCK2010 (DESWAL *et al.*, 2011). Estes autores verificaram que o zinco não exerceu qualquer efeito sobre a produção das enzimas. O mesmo foi observado por Wen *et al.* (2005) na produção de celulases a partir de *Trichoderma reesei*.

Uma vez que o planejamento experimental empregado tem por objetivo selecionar variáveis, sais que não apresentaram efeito significativo não necessitam ser adicionados ao meio de produção. Desta forma, um planejamento experimental composto central foi realizado a fim de verificar quais as concentrações de CuSO₄ e ZnSO₄ que deveriam ser adicionadas à solução descrita no item 4.2, de forma a potencializar a variável resposta. Os resultados do referido planejamento encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz do planejamento composto central e resultados obtidos para a atividade enzimática como função das concentrações de CuSO_4 e ZnSO_4 adicionados ao meio de produção de celulases por *M. circinelloides*

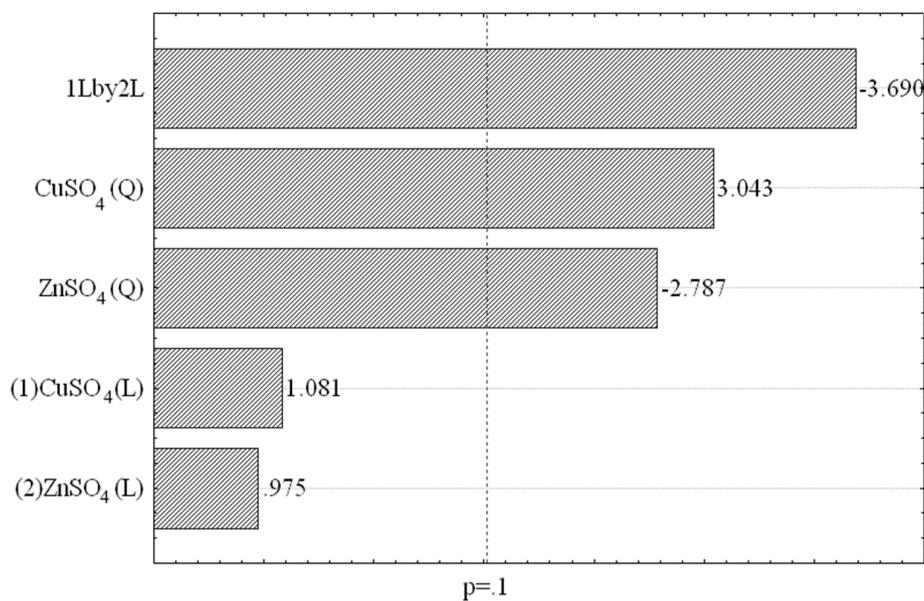
Ensaio	CuSO_4 (g/L)	ZnSO_4 (g/L)	Atividade enzimática (FPU/g)
1	0,00	0,00	$1,66 \pm 0,08$
2	0,00	0,10	$5,13 \pm 0,55$
3	0,10	0,00	$6,95 \pm 0,63$
4	0,10	0,10	$2,84 \pm 0,02$
5	0,00	0,05	$6,31 \pm 0,08$
6	0,10	0,05	$6,00 \pm 0,10$
7	0,05	0,00	$0,79 \pm 0,22$
8	0,05	0,10	$3,95 \pm 0,32$
9*	0,05	0,05	$3,86 \pm 0,07$
10*	0,05	0,05	$4,10 \pm 0,09$
11*	0,05	0,05	$3,95 \pm 0,16$

*Pontos centrais

Nota: os valores da atividade enzimática referem-se à média \pm desvio padrão (n = 3).

O efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis avaliadas exerceu sobre a variável resposta é representado pelo Diagrama de Pareto (Figura 13).

Figura 13 – Diagrama de Pareto com o efeito estimado dos sais CuSO_4 e ZnSO_4 na produção de celulases por *M. circinelloides*



Cabe destacar que apenas o fator correspondente ao efeito quadrático da variável CuSO_4 apresentou efeito significativo positivo e que a variável ZnSO_4 , bem como a interação entre ambas, apresentaram efeito significativo negativo.

O modelo de regressão obtido para prever a atividade enzimática de celulase em função das concentrações dos sais está representado pela Equação 1.

$$Z = 1,30 - 21,58x + 1032,80x^2 + 101,55y - 482,75y^2 - 1176,13x*y \quad (1)$$

Onde:

Z = Atividade enzimática (FPU/g);

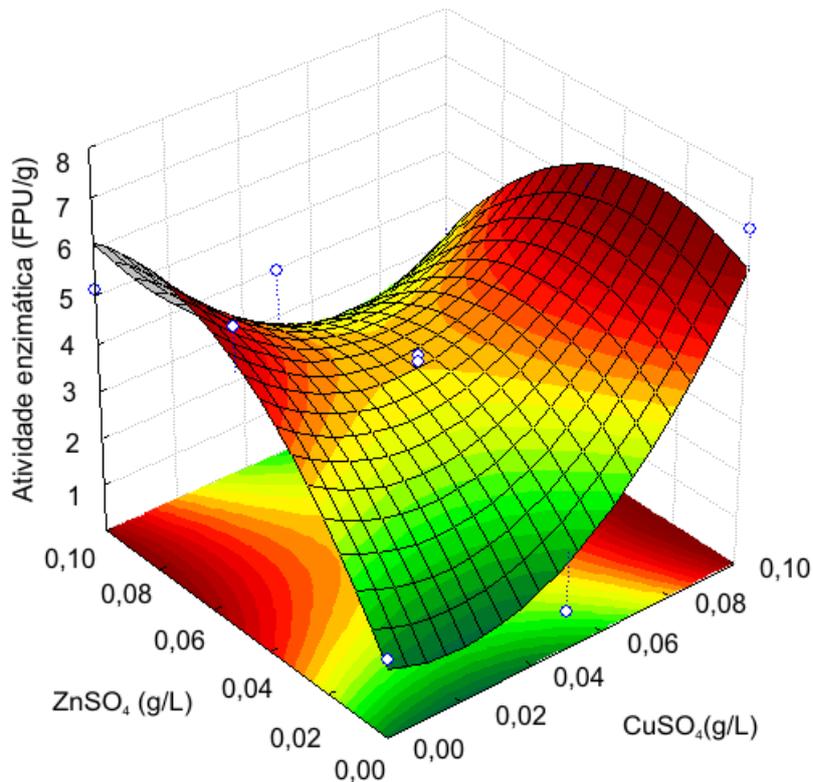
x = Concentração de CuSO_4 (g/L);

y = Concentração de ZnSO_4 (g/L).

A significância estatística dos efeitos principais e de interação das variáveis foi determinada por análise de variância (ANOVA). De acordo com os resultados da ANOVA, o valor de F calculado para o modelo estatístico foi 5,84, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (3,45) no intervalo de 90% de confiança. Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste de F. O modelo apresentou um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,85$) demonstrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados de atividade enzimática obtidos na Equação 1.

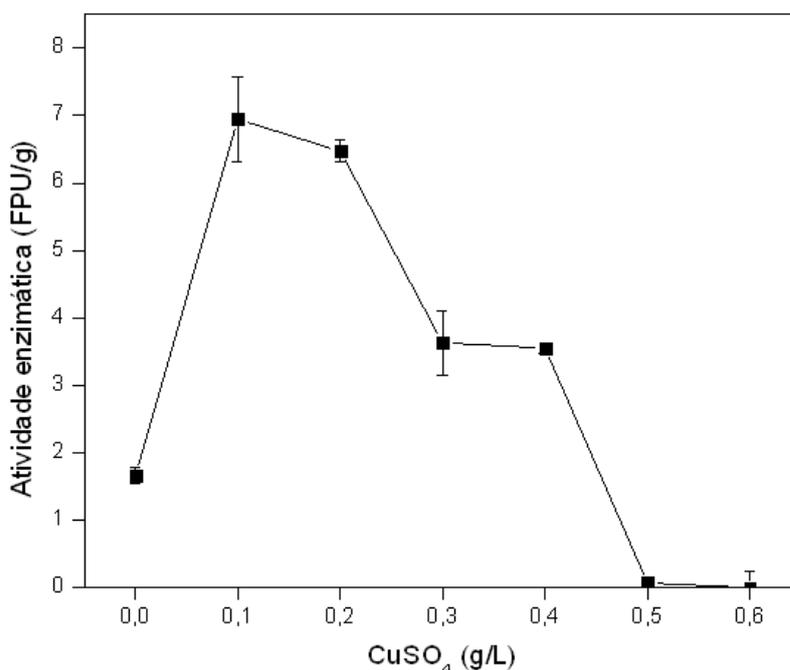
A superfície de resposta (Figura 14), gerada a partir do modelo matemático, apresentou um ponto de sela, assim, o modelo não possui um único ponto ótimo. A análise da superfície de resposta sugere que individualmente cada sal favorece a produção da enzima. O que se confirma ao analisar os resultados apresentados na Tabela 5, na qual para o ensaio controle (sem a adição de nenhum dos sais) a atividade é igual a $1,66 \pm 0,08$ FPU/g, aumentando para $5,13 \pm 0,55$ FPU/g somente com a adição de ZnSO_4 e para $6,95 \pm 0,63$ FPU/g somente com a adição de CuSO_4 . Entretanto, ao adicioná-los na mesma concentração (0,1 g/L), a atividade diminuiu ($2,84 \pm 0$ FPU/g), o que está representado pela região verde do gráfico. De acordo com o relatado anteriormente, a partir do próximo ensaio, o ZnSO_4 não foi adicionado ao meio de produção de celulases.

Figura 14 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização da concentração dos sais CuSO_4 e ZnSO_4 adicionados ao meio de produção de celulasas por *M. circinelloides*



Embora a superfície (Figura 14) não tenha fornecido um ponto ótimo para os parâmetros estudados, esta indicou que para valores de CuSO_4 maiores que os avaliados, a atividade da enzima poderia aumentar. Por isso, realizou-se um estudo univariado para verificar o efeito do aumento da concentração deste sal sobre a produção da enzima e os resultados obtidos encontram-se na Figura 15.

Figura 15 - Efeito da adição de diferentes concentrações de CuSO_4 à solução salina [9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 g/L de KH_2PO_4] para a composição do meio de produção de celulases por *M. circinelloides* em estufa B.O.D., a 30 °C por 24 h. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)



A Figura 15 permite concluir que a concentração de 0,1 g/L maximizou a produção da enzima, uma vez que a maior atividade enzimática ($6,95 \pm 0,63$ FPU/g) foi quantificada neste ponto. A partir desta concentração, a atividade enzimática diminuiu até zero, com a adição de 0,6 g/L do sal. Segundo Vale *et al.* (2011), alguns metais são essenciais para o metabolismo dos fungos, no entanto, estes podem se tornar tóxicos quando presentes em concentrações levemente superiores às requeridas para seu metabolismo. Desta forma, a adição de CuSO_4 , em concentração superior a 0,1 g/L, pode ter exercido um possível efeito inibitório sobre o crescimento de *M. circinelloides*.

Por outro lado, sabe-se que alguns metais, podem exercer efeito inibitório ou indutor sobre a atividade de algumas enzimas celulolíticas, sendo que os íons Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^+ e Zn^{2+} são os que mais frequentemente inibem a ação de celulases, podendo até provocar a perda total da atividade catalítica, quando presentes em determinadas concentrações (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010). A influência do CuSO_4 sobre a atividade de uma celulase, produzida por *A. phoenicis*, foi avaliada no estudo realizado por Silva (2008), tendo observado um efeito negativo decorrente da adição deste sal. Logo, no presente trabalho, não é possível afirmar, nem tampouco descartar a possibilidade deste sal ter exercido algum efeito na atividade da enzima produzida.

Um planejamento Plackett-Burman também foi realizado para avaliar o efeito da adição de sais ao meio de produção de celulases por *Melanoporia* sp., entretanto, nenhum dos sais avaliados exerceu efeito significativo sobre a produção de celulases.

5.2.3 Estudo da suplementação do bagaço com fontes de nitrogênio orgânico

A suplementação do meio de produção de celulases com fontes de nitrogênio orgânico não apresentou efeito sobre a produção das enzimas, por ambos os micro-organismos. O que sugere que o sulfato de amônio adicionado ao meio, supriu as necessidades dos micro-organismos em relação ao nitrogênio. Este resultado é interessante do ponto de vista econômico, visto que o principal objetivo do desenvolvimento de bioprocessos, para produção de enzimas microbianas, utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, 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).

Sun *et al.* (2011) observaram que todas as fontes de nitrogênio (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. Ncube *et al.* (2012) produziram celulases 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, observaram que não houve aumento significativo na atividade de celulase como consequência da adição destes nutrientes.

Deswal *et al.* (2011) por sua vez, verificaram que diferentes fontes de nitrogênio apresentaram efeitos variáveis na produção de celulases por *Fomitopsis* sp. RCK2010, sendo que a adição de caseína resultou em máxima produção de FPase (4,682 UI/g). No estudo de Long *et al.* (2009) dentre as fontes de nitrogênio avaliadas na produção de celulases por *Penicillium decumbens* L-06, sulfato de amônio resultou na atividade máxima (3,0 UI/g).

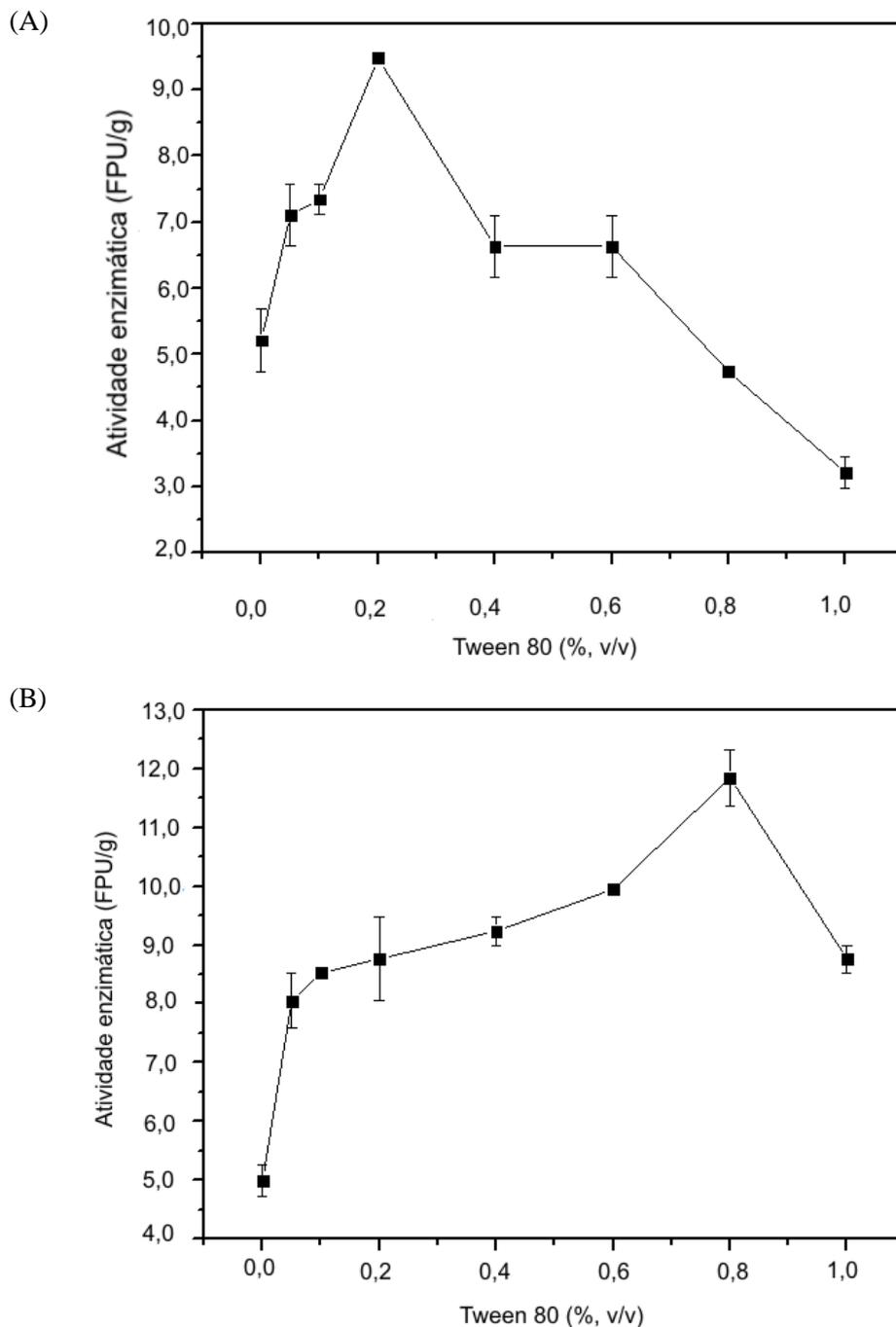
No presente estudo, as atividades enzimáticas máximas quantificadas para as enzimas produzidas por *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. foram iguais a 31,55 UI/g (5,68 ± 0,07 FPU/g) e 43,11 UI/g (7,76 ± 0,19 FPU/g), respectivamente, para o meio

sem suplementação com fontes de nitrogênio orgânico (ensaio controle), valores estes superiores aos relatados acima.

5.2.4 Estudo do efeito da adição de diferentes concentrações de Tween 80 ao bagaço de cana para a produção de celulases

Diversos estudos têm demonstrado o efeito estimulante de surfactantes sobre a produção de enzimas microbianas em FES e FSM (DESWAL *et al.*, 2011; KAPOOR *et al.*, 2008). Os agentes tensoativos normalmente utilizados são Tween 80, Tween 20, 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; DESWAL *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2006). Por isto, o efeito do Tween 80 sobre a produção de celulases a partir de *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. foi avaliado e os resultados se encontram na Figura 16.

Figura 16 – Efeito da adição de Tween 80 à solução salina para a composição do meio de produção de celulases por *Melanoporia* sp. [9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 g/L de KH_2PO_4] (a) e *M. circinelloides* [9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g/L CuSO_4 e 1,0 g/L de KH_2PO_4] (b) e em estufa B.O.D., a 30 °C por 24 h. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)



A Figura 16a demonstra que a concentração de Tween 80 (% , v/v) que possibilitou a maior atividade enzimática para a enzima produzida por *M. circinelloides* foi 0,80%, representando um aumento de 163,16%, em relação ao experimento controle, sem adição do surfactante. Para *Melanoporia* sp. (Figura 16b), foi observado um aumento de 57,74% na atividade enzimática quando foi adicionado 0,20 de Tween 80.

Resultado semelhante ao obtido para *Melanoporia* sp. foi encontrado por Soni *et al.* (2010), ao analisar a adição de Tween 80 [0,1 a 0,4%, (v/v)] ao meio de produção de celulases, por *A. fumigatus*. Estes verificaram que 0,24% de Tween 80 resultou na maior atividade enzimática. Deswal *et al.* (2011) por sua vez, avaliaram o efeito da adição de vários surfactantes, na produção de celulases por *Fomitopsis* sp. RCK, observando 87,15% de aumento, em relação ao experimento controle, quando 0,2% de Tween 80 foi adicionado.

Assareh *et al.* (2012) e Guowei *et al.* (2011) observaram um considerável incremento na produção de celulases por *Geobacillus* sp. T1 e *T. reesei* HY07, respectivamente, quando adicionaram Tween 80, na concentração de 0,1%, seguido de uma queda drástica na atividade enzimática quantificada, a partir desta concentração. Tal constatação sugere que apenas pequenas concentrações de Tween 80 favorecem a excreção da enzima para o meio extracelular.

De acordo com os resultados obtidos, para *M. circinelloides* a condição que resultou em maior atividade enzimática foi 3,0 g de bagaço com adição de 2,0 mL de uma solução, cuja composição continha 9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0,1 g/L de CuSO_4 e 0,8% de Tween 80. No caso de *Melanoporia* sp., 3,0 g de bagaço com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L de KH_2PO_4 e 0,2% de Tween 80 foram as melhores condições. Deste modo, os demais ensaios foram realizados nestas condições.

5.3 Otimização dos parâmetros físico-químicos do processo fermentativo

5.3.1 Influência do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo

A temperatura é uma das variáveis físicas mais importantes que afeta a FES, estando relacionada com o transporte de massa e com a transferência de oxigênio (WANG; YANG, 2007), influenciando assim, o crescimento do micro-organismo, a formação de esporos e produção de metabólitos de interesse (PANDEY, 2003). O pH do meio, por sua vez, é um dos fatores ambientais de maior relevância para esse tipo de fermentação, pois afeta diretamente o crescimento do micélio e o transporte de vários componentes através da membrana celular, influenciando assim a produção da enzima (KAPOOR *et al.*, 2008).

Devido a importância dos parâmetros pH e temperatura na FES, um planejamento experimental composto central foi realizado com a finalidade de otimizar estas variáveis. A matriz do planejamento e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Matriz do planejamento experimental composto central (2²) e resultados obtidos para a atividade enzimática, como função do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo para a produção de celulases por *M. circinelloides*

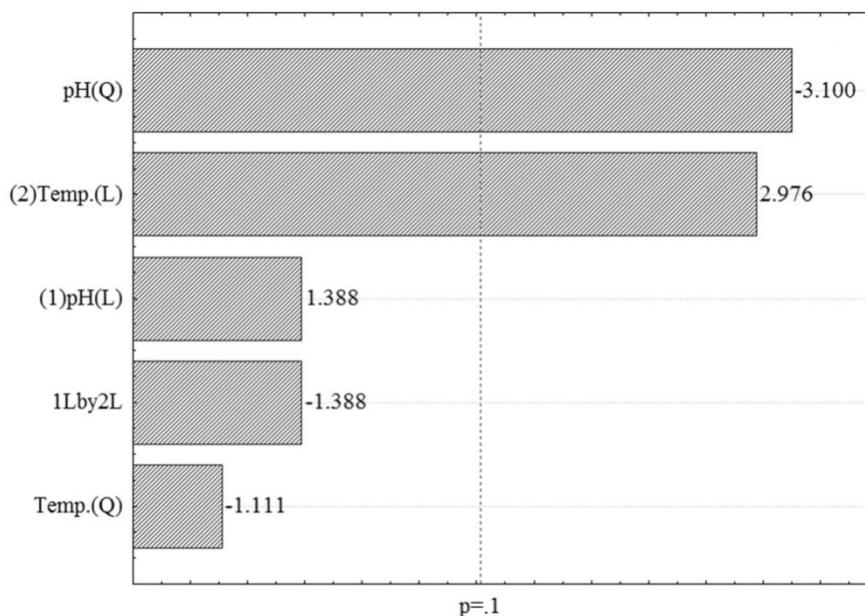
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade enzimática (FPU/g)
1	4,0	25	0 ± 0,08
2	4,0	35	4,66 ± 0,24
3	7,0	25	1,50 ± 0,39
4	7,0	35	3,0 ± 0,16
5	4,0	30	1,50 ± 0,07
6	7,0	30	5,52 ± 0,08
7	5,5	25	3,87 ± 0,82
8	5,5	35	6,0 ± 0,32
9*	5,5	30	5,13 ± 0,71
10*	5,5	30	5,37 ± 0,32
11*	5,5	30	5,25 ± 0,16

*Pontos centrais.

Nota: os valores da atividade enzimática referem-se à média ± desvio padrão (n = 3).

O efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis analisadas exerceu sobre a atividade enzimática do extrato produzido é dado pelo Diagrama de Pareto (Figura 17).

Figura 17 - Efeito estimado do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo em estufa B.O.D., a 30 °C por 24 h, por *M. circinelloides*



No presente estudo, apenas o efeito linear da temperatura apresentou efeito significativo positivo sobre a atividade enzimática, ao nível de 90% de confiança. O efeito quadrático do pH apresentou efeito significativo negativo dentro do intervalo de confiança analisado. Tal resultado sugere que esta enzima é mais sensível a variações de pH do que de temperatura.

O modelo de regressão obtido para prever a atividade enzimática de celulase em função das variáveis independentes, pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e temperatura de condução do processo fermentativo está representado pela Equação 2:

$$Z = -80,92 + 14,41x - 0,98 x^2 + 2,76y - 0,03y^2 - 0,11 x*y \quad (2)$$

Onde:

Z = Atividade enzimática (FPU/g);

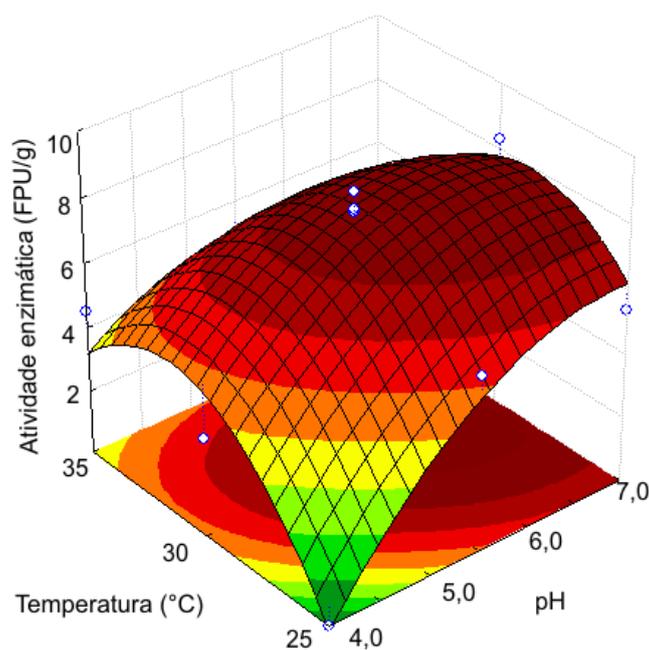
x = pH;

y = Temperatura (°C)

A significância estatística dos efeitos principais e de interação das variáveis foi determinada por análise de variância (ANOVA). De acordo com os resultados da ANOVA, o valor de F calculado para o modelo estatístico foi 5,27, ou seja, maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (3,45) no intervalo de 90% de confiança. Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com teste de F. O modelo apresentou um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,84$) mostrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados de Equação 2.

A superfície de resposta (Figura 18) gerada a partir do modelo matemático apresentou um ponto de máximo, pH 5,48 e 34,4 °C, no qual a atividade enzimática foi igual a $6,00 \pm 0,32$ FPU/g ou 33,33 UI/g.

Figura 18 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo fermentativo por *M. circinelloides*



Os parâmetros pH e temperatura também foram otimizados na produção de celulasas por *Melanoporia* sp., a matriz do planejamento e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental composto central (2^2) e resultados obtidos para a atividade enzimática, como função do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo fermentativo por *Melanoporia* sp.

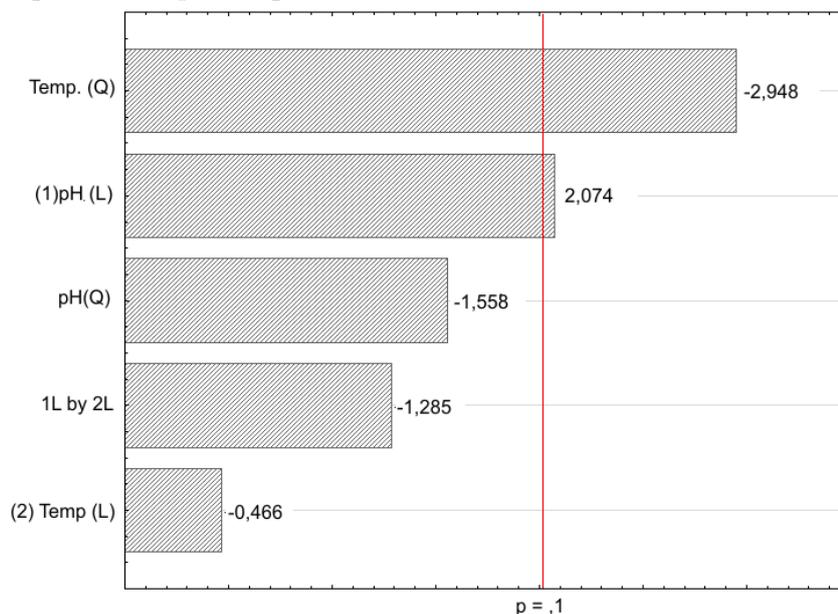
Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade enzimática (FPU/ g)
1	4,0	25	2,44 ± 0
2	4,0	35	4,50 ± 0
3	7,0	25	5,37 ± 0,15
4	7,0	35	3,70 ± 0,15
5	4,0	30	3,08 ± 0,08
6	7,0	30	8,29 ± 0,07
7	5,5	25	5,45 ± 0,09
8	5,5	35	3,39 ± 0
9*	5,5	30	7,97 ± 0,61
10*	5,5	30	8,05 ± 0,32
11*	5,5	30	8,60 ± 0,22

*Pontos centrais.

Nota: os valores da atividade enzimática referem-se à média ± desvio padrão (n = 3).

O efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis avaliadas exerceu sobre a atividade enzimática da celulase produzida por *Melanoporia* sp. é dado pelo Diagrama de Pareto (Figura 19).

Figura 19 - Efeito estimado do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulases e da temperatura de condução do processo fermentativo em estufa B.O.D, a 30 °C por 24 h, por *Melanoporia* sp.



No presente estudo, apenas o efeito linear do pH apresentou efeito significativo positivo, enquanto o efeito quadrático da temperatura apresentou efeito significativo negativo, ambos ao nível de 90% de confiança. Tal resultado sugere que esta enzima é mais sensível a variações de temperatura do que de pH.

O modelo de regressão obtido para prever a atividade enzimática de celulase em função das variáveis independentes, pH da solução adicionada ao meio de produção de celulases e temperatura de condução do processo fermentativo, está representado pela Equação 3:

$$Z = -164,07 + 15,73x - 0,77 x^2 + 8,35y - 0,11 y^2 - 0,21 x*y \quad (3)$$

Onde:

Z = Atividade enzimática (FPU/g);

x = pH;

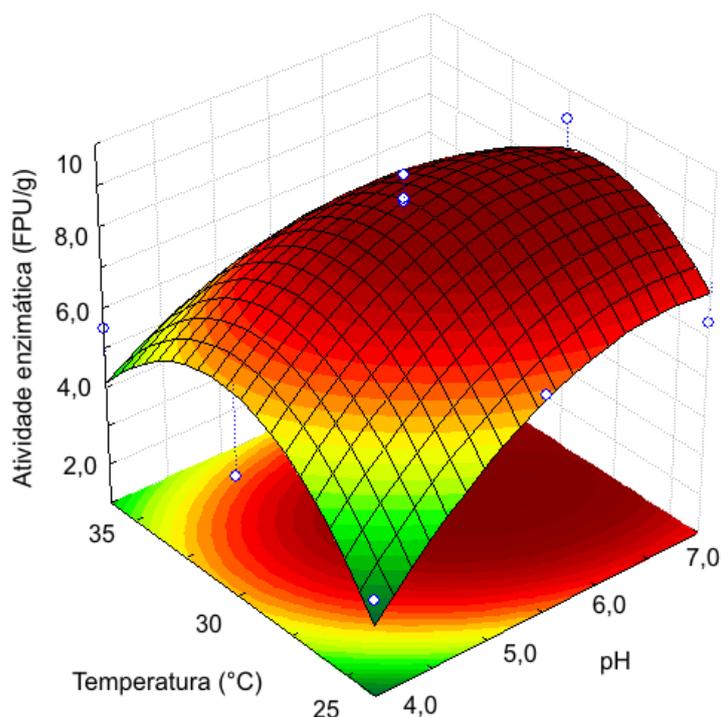
y = Temperatura (°C)

A significância estatística dos efeitos principais e de interação das variáveis foi determinada por análise de variância (ANOVA). De acordo com os resultados da ANOVA, o valor de F calculado para o modelo estatístico foi 7,73, ou seja, maior que o

valor de $F_{5,5}$ tabelado (3,45) no intervalo de 90% de confiança. Assim, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, de acordo com o teste de F. O modelo apresentou um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,81$) mostrando proximidade entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos resultados da Equação 3.

Os resultados da atividade enzimática de *Melanoporia* sp. apresentados na Tabela 9 foram analisados através do gráfico de superfície de resposta (Figura 20), que demonstrou que a combinação dos parâmetros estudados que conduziu a atividade enzimática máxima ($8,31 \pm 0,15$ FPU/g ou 46,16 UI/g) foi pH 6,28 e 30 °C.

Figura 20 – Superfície de resposta obtida a partir dos resultados do planejamento experimental para a otimização do pH da solução salina adicionada ao meio de produção de celulasas e da temperatura de condução do processo fermentativo por *Melanoporia* sp.



Brijwani *et al.* (2010) produziram celulase a partir de uma cultura mista de *T. reesei* e *A. oryzae* em FES. O pH do meio e a temperatura de incubação que conduziram a maior atividade enzimática foram 4,5 e 30 °C, respectivamente. Resultados similares (5,0 e 30 °C) foram obtidos por Guowei *et al.* (2011), em seu estudo com *T. reesei* HY07.

Narra *et al.* (2012) avaliaram o pH do meio de produção de celulasas utilizando *A. terreus* como agente da FES da palha de arroz no intervalo de pH entre 3,0 e 7,0, tendo 5,0 como o valor ótimo para este parâmetro. Herculano *et al.* (2011), por sua vez, ao avaliar a produção de celulasas por *A. Japonicus* URM5620, encontraram valores da ordem de 6,0 e 25 °C.

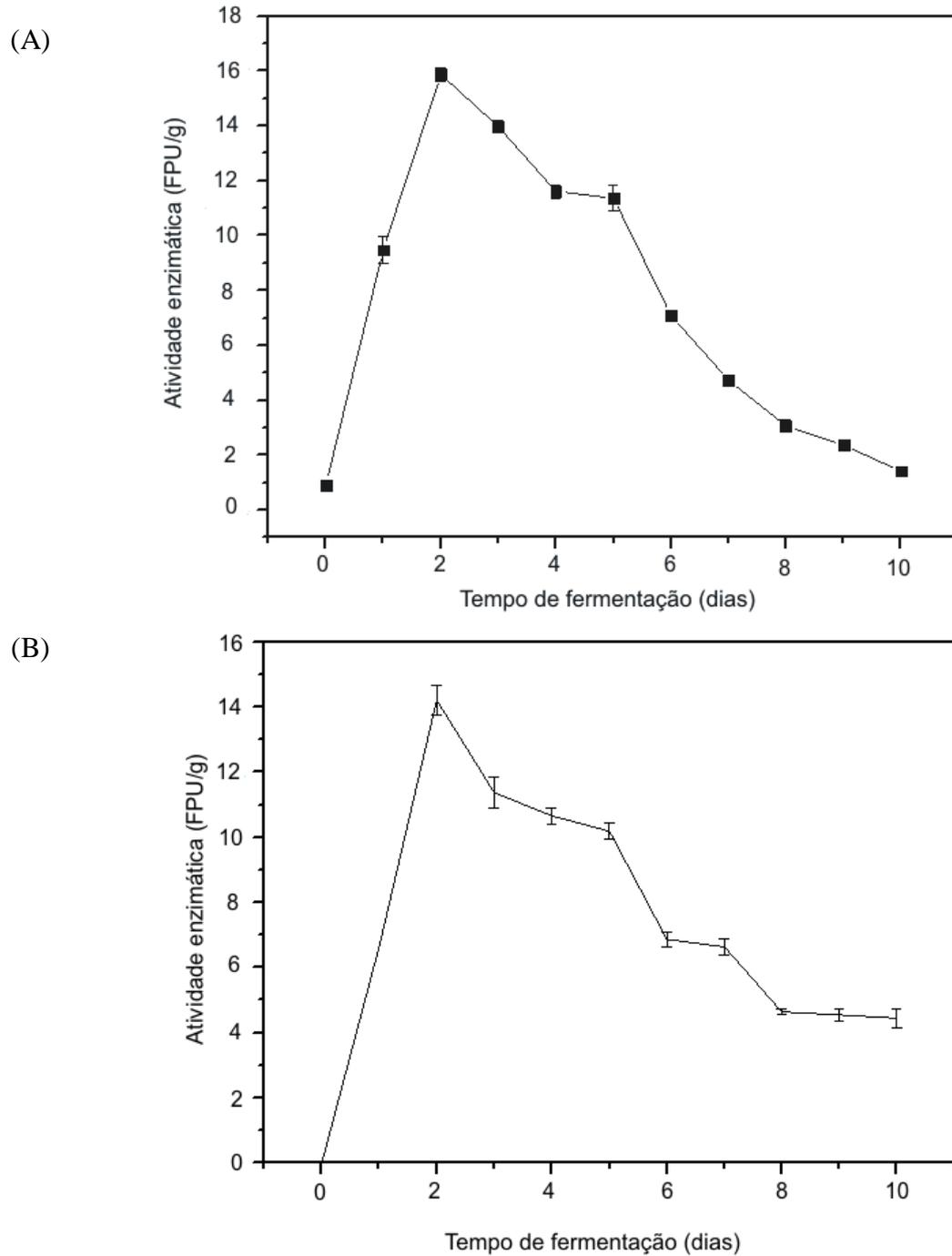
Deswal *et al.* (2011) também avaliaram a influência destes parâmetros na produção de celulasas por *Fomitopsis* sp. RCK 2010, encontrando maior atividade enzimática (3,31 UI/g) em pH 5,5 e 30 °C, sendo este resultado dez vezes inferior ao encontrado no presente estudo. Resultado semelhante foi observado por Liu *et al.* (2011), na produção de celulasas por *Penicillium decumbens* ML-017, encontrando atividade máxima igual a 5,15 UI/g em pH 5,7 e 30 °C.

Diante do exposto, observa-se que os valores de pH e temperatura que resultaram na maior produção da enzima, para *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. foram similares aos relatados na literatura científica e que o diferencial deste trabalho, encontram-se nos valores de atividade enzimática quantificados, que excedeu em pelo menos 10 vezes os resultados apresentados pelos autores supracitados.

5.3.2 Influência do tempo de condução do processo fermentativo para a produção de celulasas

A influência do tempo de condução do processo fermentativo na produção de celulasas por *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. encontram-se na Figura 21.

Figura 21 - Influência do tempo de condução do processo fermentativo na produção de celulases por *M. circinelloides* (a) e *Melanoporia* sp.(b) em FES, em estufa B.O.D, a 30 °C por 10 dias. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)



Para *M. circinelloides*, no primeiro dia de fermentação, a atividade enzimática foi 9,47 FPU/g, atingindo 16,0 FPU/g no segundo dia e diminuindo até o décimo dia de fermentação. O mesmo comportamento foi observado no processo utilizando *Melanoporia* sp. e a maior atividade de celulase quantificada foi $14,21 \pm 0,47$ FPU/g.

A diminuição da produção de celulases, ao longo do tempo de incubação, pode ter ocorrido devido ao consumo de nutrientes, produção de metabólitos tóxicos ao micro-organismo, liberação do calor metabólico (pode formar gradientes de temperatura no reator) prejudicando o crescimento do micro-organismo; ou ainda pela inibição de suas enzimas, em decorrência do acúmulo de glicose no meio. O tempo de condução do processo fermentativo para produção de algumas celulases microbianas encontra-se descrito na Tabela 11.

Tabela 11 - Tempo de condução do processo fermentativo para a produção de celulases em função do micro-organismo e do meio de cultura empregados na FES

Micro-organismo	Composição do meio de produção	Tempo de produção da enzima	Referência
<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	Farelo de trigo, farinha de soja, caseína, CuSO ₄ , Tween 80 e 4-hidroxiprolina	11 dias	Deswal <i>et al.</i> (2011)
<i>Penicillium decumbens</i> L-06	Bagaço-de-cana e farelo de trigo, sulfato de amônio	9 dias	Long <i>et al.</i> (2009)
<i>A. clavatus</i>	Farelo de soja, uréia, K ₂ HPO ₄ , NaNO ₃ , MgSO ₄ , ZnSO ₄ , FeSO ₄ e MnSO ₄	6 dias	Paris (2009)
<i>A. niger</i> ATCC 16404	Resíduo de arroz e casca de maracujá	4 dias	Rocha (2010)
<i>Trichoderma viride</i> GIM 3.0010	Polpa de maçã e milhocina	5 dias	Sun <i>et al.</i> (2010)
	Casca de banana	6 dias	Sun <i>et al.</i> (2011)

Diante do exposto na Tabela 11, pode-se verificar que o tempo de condução do processo fermentativo para alcançar a máxima produção da enzima está intimamente relacionado com o micro-organismo utilizado e a composição do meio de cultura. Vale ressaltar que nenhum trabalho foi encontrado na literatura científica relatando a produção de celulases por *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp.

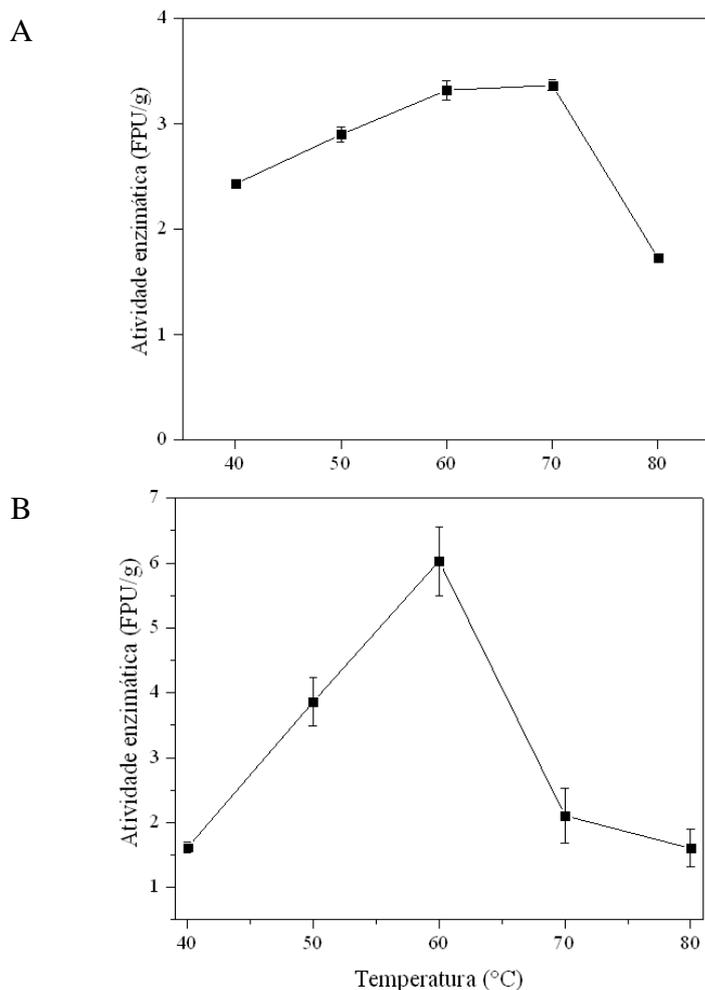
5.4 Etapas posteriores ao processo fermentativo (etapas *downstream*)

5.4.1 Otimização do pH e da temperatura na quantificação da atividade enzimática

Conforme relatado anteriormente, os parâmetros de pH e temperatura são determinantes para a atividade enzimática, de modo que consistiram no primeiro ensaio realizado neste estudo.

Os resultados de atividade enzimática das enzimas produzidas por *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp., em função da temperatura do ensaio enzimático, encontram-se na Figura 22. Tais determinações foram realizadas em pH 6,5, de acordo com Oliveira (2010), que estudou a produção de celulases por estes micro-organismos, utilizando a casca do coco como substrato.

Figura 22- Influência da temperatura na determinação da atividade enzimática das celulases produzidas por *M. circinelloides* (a) e *Melanoporia* sp (b). As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)



A enzima produzida por *M. circinelloides* apresentou uma faixa ótima de temperatura para a reação enzimática entre 60 e 70 °C (Figura 22a). Os valores de atividade enzimática quantificados nestas temperaturas foram 3,32 e 3,36 FPU/g, respectivamente, não diferindo significativamente entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey. Deste modo, a temperatura de 60 °C foi escolhida para a determinação da atividade das celulases produzidas por este micro-organismo, em todos os demais ensaios realizados neste estudo.

A atividade celulolítica da enzima produzida por *Melanoporia* sp. (Figura 22b) aumentou com a elevação da temperatura, apresentando um pico em 60 °C (6,03 FPU/g). Tal atividade apresentou uma redução considerável a partir desta temperatura, de modo que 60 °C também foi a temperatura selecionada para se determinar a atividade enzimática, em todos os demais ensaios realizados para este micro-organismo.

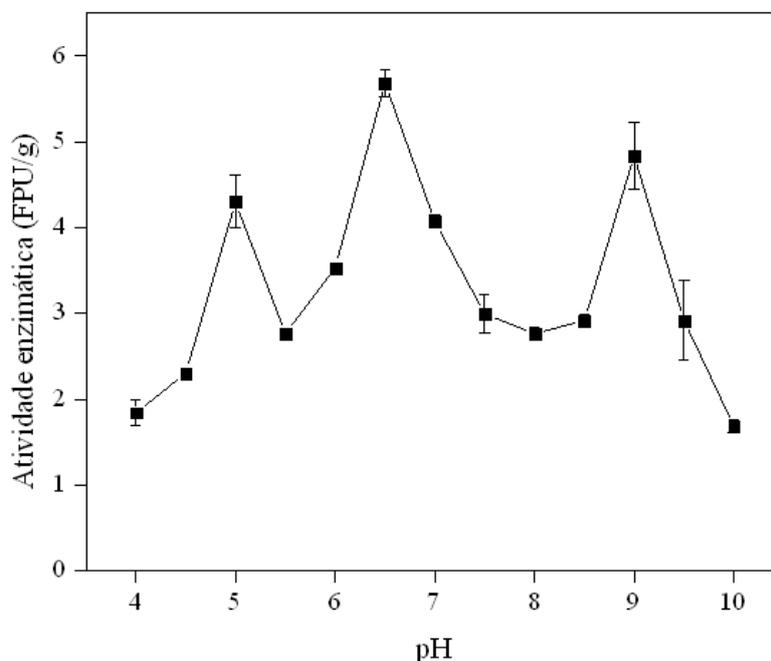
Em virtude do exposto, é possível verificar que a enzima produzida por *M. circinelloides* exibiu maior estabilidade frente a temperatura, quando comparada a enzima produzida por *Melanoporia* sp.

Mesmo comportamento foi observado por Andrade *et al.* (2011) que estudaram o efeito da temperatura, na atividade de celulases produzidas por *Trichoderma* sp. IS-05 e de uma preparação comercial, com atividade celulolítica (CAREZYME), tendo encontrado 60 °C como a temperatura ótima para ambas as enzimas. Os referidos autores também observaram uma redução considerável, nas atividades a partir desta temperatura.

Singh *et al.* (2009) em seu estudo com uma enzima termoestável, produzida por *A. heteromorphus*, também encontraram a temperatura de 60 °C como a que maximizou a atividade enzimática. Resultado semelhante foi obtido por Ncube *et al.* (2012) que avaliaram o comportamento da celulase produzida por *A. niger* frente a temperatura de determinação da atividade enzimática e verificaram que 65 °C foi o melhor valor para este parâmetro.

A influência de diferentes valores de pH na determinação da atividade enzimática da celulase produzida por *M. circinelloides*, encontra-se na Figura 23. Esta determinação foi realizada a 60 °C, conforme os resultados obtidos no ensaio anterior.

Figura 23 - Influência do pH na determinação da atividade enzimática das celulases produzidas por *M. circinelloides*. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)



De acordo com a Figura 23, é possível notar três picos de atividade enzimática, que ocorreram nos pH's 5,0; 6,5 e 9,0. Os valores encontrados para a atividade foram iguais a 4,0; 5,68 e 4,83 FPU/g, os quais diferiram significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Deste modo, o pH 6,5 foi selecionado, visto que resultou na maior atividade enzimática quantificada.

Uma possível explicação para a ocorrência dos três picos observados, pode estar relacionada ao fato do material utilizado, para a quantificação da atividade enzimática, 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. Segundo Silva (2008) tal comportamento é possível pois, há relatos na literatura para alguns micro-organismos, como *A. 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 FES, 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*.

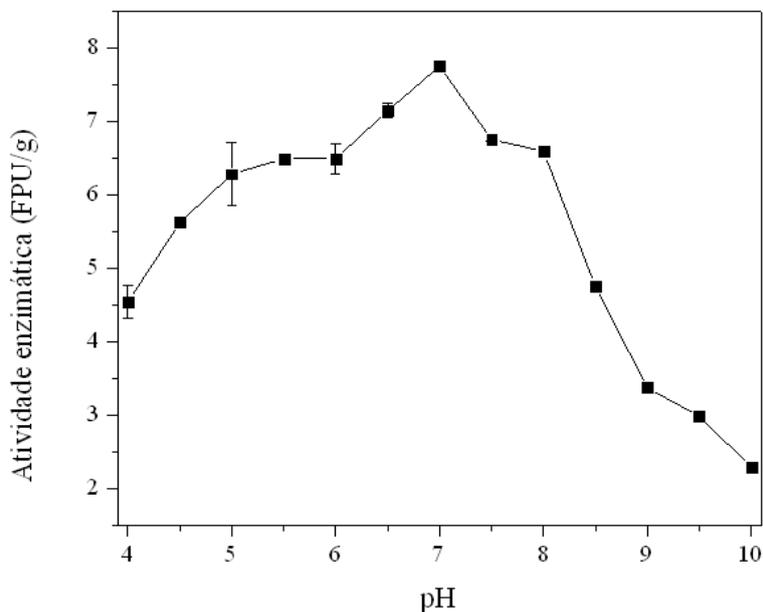
Tendo em vista que grande parte das celulases reportadas na literatura científica apresentam valores de pH ótimo dentro da faixa ácida, os resultados deste estudo consistem num diferencial atrativo, uma vez que foram observadas frações com atividade celulásica em pH's ácido, neutro e alcalino.

Segundo Miettinen-Oinonen *et al.* (2004), celulases neutras apresentam vantagens em relação às celulases ácidas, para aplicação na indústria têxtil, uma vez que agridem menos o algodão, além de sua aplicação em detergentes (HAKAMADA *et al.*, 2001; SHIRAI *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2012). As celulases alcalinas, 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 *M. circinelloides* como um micro-organismo interessante na produção de celulases microbianas, devido a versatilidade de seu sistema enzimático.

É válido ressaltar que, segundo a metodologia de Ghose (1987), o ensaio de determinação da atividade enzimática deve ser conduzido em pH igual a 4,8. Contudo, de acordo com os resultados discutidos acima, verificou-se que esta não foi a condição que resultou na maior atividade enzimática quantificada, demonstrando a importância de se investigar este parâmetro, a fim de realizar o ensaio em condições ótimas e assim maximizar a atividade enzimática quantificada.

Os resultados da influência do pH na atividade celulásica da enzima produzida por *Melanoporia* sp. encontram-se na Figura 24, sendo realizados a 60 °C, conforme os resultados obtidos no ensaio de determinação da temperatura, relatado anteriormente.

Figura 24 - Atividade enzimática da celulase produzida por *Melanoporia* sp. mediante a variação no pH de determinação da atividade enzimática. As barras de erro indicam desvio padrão (n = 3)



De acordo com a Figura 24, é possível observar que a atividade enzimática aumentou até pH igual a 7,0 quando então começou a diminuir. Os maiores valores de atividade quantificada ocorreram nos pH's 6,5 ($7,11 \pm 0,21$ FPU/ g) e 7,0 ($7,76$ FPU/ g $\pm 0,30$), entretanto, estes valores não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Desta forma, o pH 7,0 foi escolhido, destacando *Melanoporia* sp. em relação a outros micro-organismos celulolíticos, uma vez que grande parte das celulases comercializadas atualmente apresentam atividade enzimática em pH ácido, conforme discutido anteriormente.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados é possível concluir que os fungos filamentosos *Melanoporia* sp. e *M. circinelloides* exibiram capacidade celulolítica competitiva, em relação aos demais micro-organismos relatados na literatura. A utilização do bagaço da cana-de-açúcar como substrato, em fermentação em estado sólido, resultou na produção máxima das enzimas celulases, por ambos os micro-organismos, em apenas 48 horas, o que representa um diferencial atrativo destas cepas, tendo em vista que não foi encontrado na literatura períodos inferiores a 96 horas.

A proposta de produção de celulases a partir de um meio de cultivo de baixo custo foi satisfeita, uma vez que, para a produção das enzimas não houve necessidade de suplementar o meio com nitrogênio orgânico.

A produção máxima da enzima obtida a partir de *M. circinelloides* foi alcançada com a utilização de 3 g de bagaço, com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 0,1 g/L de CuSO_4 , 9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4 e Tween 80 a 0,8% (v/v) em pH 5,48. A temperatura e o tempo que resultaram na maior produção da enzima foram 34,4 °C e 48 horas, respectivamente. A maior atividade enzimática (15,87 FPU/g) foi quantificada em pH 6,5 e 60 °C.

Em relação ao *Melanoporia* sp., a maior produção da enzima foi obtida utilizando-se 3 g de bagaço, com adição de 2,0 mL de uma solução contendo 9,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4 e Tween 80 a 0,2% (v/v) em pH 6,28. A produção máxima da enzima foi observada após 48 horas de fermentação a 30 °C. A maior atividade enzimática (14,21 FPU/ g) foi quantificada em pH 7,0 e 60 °C. Algumas similaridades quanto a composição do meio e condições de cultivo de ambos os micro-organismos foram observadas.

A enzima produzida por *Melanoporia* sp. apresentou atividade máxima em pH neutro, o que a diferencia em relação a maioria das celulases produzidas por outros micro-organismos que apresentam atividade em pH ácido. *M. circinelloides* merece destaque em virtude da versatilidade de seu sistema enzimático, cujo extrato enzimático bruto exibiu atividade celulolítica em pH's ácido, neutro e alcalino.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Caracterização da massa molar das enzimas por eletroforese e zimograma;
- Estudo das melhores condições de recuperação da enzima do meio fermentado;
- Estabilização dos extratos enzimáticos brutos obtidos a partir de *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. para aplicação em hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos) – Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Toledo, 2010.

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 Res.**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

ANO, T.; JIN, G. Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M. S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. **J. Environ. Sci.**, Supplement, p. S162–S165, 2009.

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 Technol.**, v. 120, p. 99-105, 2012.

BAEK, S.; KIM, S.; LEE, K.; LEE, J.; HAHN, J. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 51, p. 366-372, 2012.

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.

BARR, C. J.; MERTENS, J. A.; SCHALL, C. A.; Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. **Bioresource Technol.**, v. 104, p. 480-485, 2012.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, v. 18, p. 355–383, 2000.

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford: Academic Press, 2011, ch. 10, p. 229-250.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L., NAGALAKSHMI, S.; KURIRN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 4767–4774, 2010.

BINOD, P.; SANDHYA, C.; SUMA, P.; SZAKACS, 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. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 2742-2748, 2007.

BON, E. P. S.; PEREIRA JÚNIOR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para a produção de enzimas. *In*: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol** Juliano Bragatto. 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Universidade Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

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 Biochem.**, v. 45, p. 120–128, 2010.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FILIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, p. 48-53, 2010.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Steam-exploded sugar cane bagasse for on-site production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Energ. Fuel.**, v. 26, p. 5316–5320, 2012.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **J Trop Med Hyg**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, NEI. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHANCHAROOPONG, C.; HSIEH, P.; SHEU, S. Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation. **APCBEEES Procedia**, v. 2, p. 57-61, 2012.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian J. Microbiol.**, v. 47, p. 323–328, 2007.

CHANDRA, R., TAKEUCHI, H., HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 16, p. 1462-1476, 2012.

CHEN, W.; XIE, T.; SHAO, Y.; CHEN, F. Genomic characteristics comparisons of 12 food-related filamentous fungi in tRNA gene set, codon usage and amino acid composition. **Gene**, v. 497, p. 116–124, 2012.

CHU, F.; LIN, C.; I, Y.; WU, C.; C, D. Hydrolysis of bamboo cellulose and cellulase characteristics by *Streptomyces griseoaurantiacus* ZQBC691. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.**, v. 43, p. 220–225, 2012.

COCINERO, E. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G.; SIMONS, J. P. The building blocks of cellulose: the intrinsic conformational structures of cellobiose, its epimer, lactose, and their singly hydrated complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 11117–11123, 2009.

CORONA, A.; SÁEZ, D.; AGOSIN, E. Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. **Process Biochem.**, v. 40, p. 2655–2658, 2005.

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 Technol.**, v. 112, p. 270-274, 2012.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONI, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnol. Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. cap. 13, p. 247-276.

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 Technol.**, 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. **Ind. Crops Prod.**, v. 42, p. 236-242, 2013.
- DENG, W.; LOBO, R.; SETTHAPUN, W.; CHRISTENSEN, S. T.; ELAM, J. W.; MARSHALL, C. L. Oxidative Hydrolysis of Cellobiose to Glucose. **Catal Lett.**, v. 141, p. 498–506, 2011.
- DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*.**Enzyme Microb.Tech.**, v. 37, p. 373-385, 2005.
- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulose production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp. RCK2010* under solid state fermentation. **Bioresource Technol.**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Ind. Crops Prod.**, v. 41, p. 78-84, 2013.
- 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.**Ind. Crops Prod.**, v. 38, p. 6-13, 2012.
- 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.**Ind. Crops Prod.**, v. 38, p. 6-13, 2012.
- DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROCHA, G. J. M.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technol.**, v. 102, p. 8964-8971, 2011.
- EL-BONDKLY, A. M. A.; EL-GENDY, M. M. A. Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant of a fungal endophyte of the marine sponge *Latrunculia corticata* for production of ethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 331-346, 2012.

- FIGUEIREDO, E. B.; SCALA JÚNIOR, N. L. Greenhouse gas balance due to the conversion of sugarcane areas from burned to green harvest in Brazil. **Agric Ecosyst Environ.**, v. 141, p. 77–85, 2011.
- FRASER, P. D.; RUIZ-HIDALGO, M. J.; LOPEZ-MATAS, M. A.; ALVAREZ, M. L.; ESLAVA, S. P.; BRAMLEY, P. M. Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1289, p. 203-208, 1996.
- FREITAS, L. C.; KANEKO, S. Ethanol demand in Brazil: Regional approach. **Energ. Policy**, v. 39, p. 2289–2298, 2011.
- GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresour. Technol.**, v. 77, p. 171-175, 2001.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** v. 59, p. 257-268, 1987.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochem. Eng. J.**, v. 51, p. 72–78, 2010.
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 144, p. 1-22, 2008.
- GRIMM L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, p. 375-384, 2005.
- GUOWEIA, S.; MAN, H.; SHIKAI, W.; HE, C. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environ. Sci.** v. 8, p. 25-26, 2011.
- GUPTA, S.; KAPOOR, M.; SHARMA, K. K.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 937–945, 2008.

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.

HASHEMI, M.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; SHOJAOSADATI, S.A. Mathematical modeling of biomass and α -amylase production kinetics by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation based on solid dry weight variation. **Biochem. Eng. J.**, v. 53, p. 159–164, 2011.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 10–18, 2009.

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 Microb. Tech.**, v. 48, p. 162–168, 2011.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 564-573, 2012.

HSU, P.; LIU, C.; LIU, L.; CHANG, C.; YANG, S. Protein enrichment and digestion improvement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation. **J Microbiol Immunol Infect**, 2012. No prelo.

ISHIDA, H.; HATA, Y.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; SUGINAMI, K. Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glabB*), expressed in solid-state culture (*koji*) of *Aspergillus oryzae*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 86, p. 301-307, 1998.

JI, G.; WU, Y.; WANG, C. Analysis of microbial characterization in an upflow anaerobic sludge bed/biological aerated filter system for treating microcrystalline cellulose wastewater. **Bioresour. Technol.**, v. 120, p. 60–69, 2012.

JOHN, R, P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochem.**, v. 41, p. 759–763, 2006.

KARP, S. C.; 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. **Bioresour. Technol.**, v. 114, p. 735–739, 2012.

KAPOOR, M.; NAIR, L. M.; KUHAD, R.C. Cost effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochem. Eng. J.** v. 38, p. 88-97, 2008.

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**, v. 83, p. 81-88, 2003.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.**, v. 16, p. 111-120, 1980.

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. **Ind. Crop. Prod.**, v. 43, p. 150–158, 2013.

LI, C. H.; SPRINGER, D. J.; BOEKHOUT, T.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTINEZ, S. R.; HEITMAN, J.; LEE, S. C. Sporangiospore Size Dimorphism Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. **Plos Pathog.**, v. 7, p. 1-18, 2011.

LIM, J. S.; MANAM, Z. A.; ALWI, S. R. W.; HASIM, H. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 16, p. 3084-3094, 2012.

LIU, J.; WANG, M. L.; TONNIS, B.; HABTESELASSIE, M.; LIAO, X.; HUANG, Q. Fungal pretreatment of switchgrass for improved saccharification and simultaneous enzyme production. **Bioresour. Technol.**, 2012. No prelo.

LIU, L.; SUN, J.; CAI, C.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicelluloses and cellulose degradation. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 5865–5871, 2009.

LIU, Y. T.; LUO, Z. Y.; LONG, C. N.; WANG, H. D.; LONG, M. N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **New Biotechnol.**, v. 28, p. 733-737, 2011.

LO, C. M.; ZHANG, Q.; CALLOW, N. V.; JU, L. K. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 717-723, 2010.

LONG, C.; OU, Y.; GUO, P.; LIU, Y.; CUI, J.; LONG, M.; HU, Z. Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. **Ann. Microbiol.**, v. 59, p. 517-523, 2009.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANA, L. M. M. ; PEREIRA JÚNIOR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **J. Biotech.**, 2012. No prelo.

MAKTOUF, S.; MOULIS, C.; KAMOUN, A.; CHAARI, F.; CHAABOUNI, S. E.; REMAUD-SIMEON, M. A laundry detergent compatible lichenase: Statistical optimization for production under solid state fermentation on crude millet. **Ind. Crops Prod.**, v. 43, p. 349–354, 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-açúcar>>. Acesso em: 16 novembro 2012.

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 Technol. Biotech.**, v. 46, p. 183-189, 2008.

MARCO, E. G. **Produção e caracterização de celulasas produzidas por um isolado de *Bacillus* sp.** Mestre (Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2012.

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 Microb. Tech.**, v. 34, p. 332–341, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v. 31, p.426-428, 1959

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

MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. **Appl. Energ.**, v. 88, p. 403-408, 2011.

MORAIS, M. S. A.; GEORGES, F.; ALMEIDA, S. R.; DAMASCENO, F. C.; MACIEL, G. P. S.; ZINI, C. A.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Analysis of products from pyrolysis of Brazilian sugar cane straw. **Fuel Process. Technol.**, p. 101, v. 35-43, 2012.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência H.**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresour. Technol.**, v. 121, p. 355-361, 2012.

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. **Ind. Crops Prod.**, v. 37, p. 118-123, 2012.

OLSEN, S. N.; BOHLIN, C.; MURPHY, L.; BORCH, K.; MCFARLAND, K. C.; SWEENEY, M. D.; WESTH, P. Effects of non-ionic surfactants on the interactions between cellulases and tannic acid: A model system for cellulase-poly-phenol interactions. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 49, p. 353-359, 2011.

OLIVEIRA, M.; Entre açúcares e genes. **Pesq. Fapesp.** V. 200, p. 86-91, 2012.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulases.** Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OMACHI, I. H.; RODRIGUES, L. G.; STOLF, M.; CANNAVAL, R.; SOBREIRO, R. Produção de biomassa florestal para exportação: o caso da Amcel. **Biomassa & Energ.**, v. 1, p. 29-36, 2004.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation.** National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, 2008. Disponível em: http://www.scitopics.com/Solid_state_fermentation.html. Acesso em: 08/ 06/ 2012.

- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- 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 Technol.**, v. 102, p. 6120–6127, 2011.
- PIRES, V. M. R. **Estrutura e função de módulos não catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal: o efeito de enzimas exógenas na valorização nutritiva de dietas à base de *Lupinus albus* para leitões**. TESE (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.
- PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, 2008.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002. 829 p.
- REPORTLINKER adds US enzymes market. *Markets and Business. Focus on Catalysts*, v. 2010, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1351418010704311#>>. Acesso em: 16 novembro 2012.
- RIVALIER, E.; SYDEL, S. Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué à l'étude microscopique des champignons deites. **Ann. Parasitol.**, v. 10, p. 444-452, 1932.
- 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.
- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; CARVALHO, J. C.; KARP, S. G.; STURM, W.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Influence of airflow intensity on phytase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technol.**, v. 118, p. 603–606, 2012.
- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; COURI, S.; NETO, V. B.; CRESTANA, S.; FARINAS, C. S. Integrated strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioenerg. Res.**, 2012. No prelo.

RYVARDEN, L. **Genera of Polypores - Nomenclature and Taxonomy**, Oslo: NHBS, 1991. 365 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** v. 4, p. 406-425, 1987.

SAMUELSSON, J.; GUSTAFSSON, L.; INGELÖG, T. **Dying and dead trees – a review of their importance for biodiversity**. Uppsala, Sweden: Swedish Threatened Species Unit, 1994, 109 p.

SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, T.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresource Technol.**, v. 102, p. 10080–10084, 2011.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012a.

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 Chem.**, v. 133, p. 1299–1304, 2012b.

SCHAFFER, T.; KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C.; PEDERSEN, S.; SALMON, S.; OLSEN, H. S.; DEINHAMMER, R.; LUND, H. Enzymes for Technical Applications. **Biopolymers Online**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2005. Disponível em: <http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v07/vol07_04.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2012.

SHANKAR, S. K.; MULIMANI, V. H. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 958–961, 2007.

SIGOILLOT, J.; BERRIN, J.; BEY, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; LEVASSEUR, A.; LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; UZAN-BOUKHRIS, E. Fungal strategies for lignin degradation. In: JOUANIN, L.; LAPIERRE, C. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. Versailles: Academic Press, 2012, ch. 8, p. 263-308.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SINGH, R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K.; BISHNOI, N. R. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, v. 48, p. 28–35, 2009.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renew. Energ.**, v. 50, p. 488-493, 2013.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of chemical pretreated rice straw by *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphus*. **J. Sci. Ind. Res.**, 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. 177-201.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 46, p. 541–549, 2010.

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

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

SHIRAI, T.; ISHIDA, H.; NODA, J.; YAMANE, T.; OZAKI, K.; HAKAMADA, Y.; ITO, S. Crystal Structure of Alkaline Cellulase K: Insight into the Alkaline Adaptation of an Industrial Enzyme. **J. Mol. Biol.**, v. 310, p. 1079-1087, 2001.

SLIVINSKI, C. T. ; MALLMANN, E.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochem.**, 2012. No prelo.

SOCCOL, C. R.; FARACO, V.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; WOICIECHOWSKI, A.; PANDEY, A. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E.(Ed.). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford: Academic Press, 2011, ch. 5, p. 101-122.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRERA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAIS, L. M. P.; ARAUJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource. Technol.**, v. 101, p. 4820–4825, 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. **Ind. Crops. Prod.**, v. 31, p. 277-283, 2010.

SOUSA, H. M. P. D. **Aplicação de celulasas e xilanases na reciclagem de fibras de papel**. 2002. 370 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Braga, 2002.

SILVA, L. A. D. Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2008.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

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

- SU, C. H.; CHUNG, M. H.; HSIEH, H. J., CHANG, Y. K.; DING, J. C.; WU, H. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar production. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.**, v. 43, p. 573–577, 2012.
- 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. **Renew energy**. v. 34, p. 421-424, 2009.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, v. 24, p.1596-1599, 2007.
- THANAPIMMETHA, A.; LUADSONGKRAM, A.; TITAPIWATANAKUN, B.; RINOPHAKUN, P. Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Ind. Crops Prod.**, v. 37, p. 1–5, 2012.
- TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydr. Polym.**, v. 83, p. 891-897, 2011.
- UDOP – União dos Produtores de Bioenergia. **Safras**. Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=safra>>. Acesso em: 16 novembro 2012.
- UNICA – União das Indústrias de Cana-de-açúcar. **UNICA revisa projeção para safra 2012/2013, aponta moagem maior mas queda na produção total de açúcar e etanol no Centro-Sul**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=40>>. Acesso em: 16 novembro 2012.
- VALENCIANO, M. D. C. M.; FREIRE, W. J. Características físicas e mecânicas de misturas de solo, cimento e cinzas de bagaço de cana-de-açúcar. **Eng. Agríc.**, v.24, p. 484-492, 2004.
- VIEIRA, A.; GABRIEL, C. V. L.; FABRES, E. L.; QUEIROS, G. B. Etanol: impactos do avanço do plantio de cana de açúcar sobre a produção de alimentos no Brasil. **Universo do Petróleo e Gás**, v. 01, p. 24-36, 2010.
- WADA, M.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 95, p. 543-548, 2010.

- WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C. P. F.; SEGERSTEDT, A. Sustainability assessment of bio- ethanol production in Brazil considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. **Energ. Policy**, v. 39, p. 5703-5716, 2011.
- WANG, W.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. *In*: YANG, S (Ed.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Elsevier, 2007, ch. 18, p. 465-489.
- SOCOL, C. R.; FARACO, V.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCOL, V.; WOICIECHOWSKI, A.; PANDEY, A. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C. G.; GNANSOUNOU, E.(Ed.). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford: Academic Press, 2011, ch. 5, p. 101-122.
- SUN, H.; GE, X.; HAO, Z.; PENG, M. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, p. 163-166, 2010.
- SUN, H.; LI, J.; ZHAO, P.; PENG, M. Banana peel: A novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 10, p. 17887-17890, 2011.
- WARD, O.; P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnol. Adv**, v. 30, p. 1119–1139, 2012.
- WONGWILAIWALINA, S.; RATTANACHOMSRIA, U.; LAOTHANACHAREONA, T.; EURWILAICHITRA, L.; IGARASHIB, Y.; CHAMPREDA, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and Multispecies lignocellulolytic enzyme system. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 47, p. 283–290, 2010.
- XU, X.; SHI, Y.; ZHU, Y. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation using inert carrier. **J. Biotechnol.**, v. 136S, p. S460-S495, 2008.
- XUE, D.; CHEN, H.; LIN, D.; GUAN, Y.; YAO, S. Optimization of a Natural Medium for Cellulase by a Marine *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 167, p. 1963-1972, 2012.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHAO, J.; SHI, P.; YANG, P.; LUO, H.; BAI, Y.; WANG, Y.; YAO, B. Two neutral thermostable cellulases from *Phialophora* sp. G5 act synergistically in the hydrolysis of filter paper. **Bioresource Technol.** v. 121, p. 404-410, 2012.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, p. 2459–2465, 2009.

ZHENG, G.; SHI, J.; YUAN, X.; LIU, J.; ZHANG, Z.; HUANG, G.; LI, J.; XI, B.; LIU, H. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 39, p. 1451–1456, 2006.

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

ZHU, Z.; ZHANG, G.; LUO, Y.; RAN, W.; SHEN, Q. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. **Bioresource Technol.**, v. 112, p. 254–260, 2012.

ZHUANG, L.; ZHOU, S.; WANG, Y.; LIU, Z.; XU, R. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. **Bioresource Technol.**, v. 102, p. 4820–4826, 2011.