



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

INDUÇÃO DE CELULASES E XILANASE POR *Trichoderma reesei* E *Penicillium variable* EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

MARIA CLARA DE OLIVEIRA E ALMEIDA

FLORIANÓPOLIS

2012

MARIA CLARA DE OLIVEIRA E ALMEIDA

INDUÇÃO DE CELULASES E XILANASE POR *Trichoderma reesei* E *Penicillium variable* EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientador: Dr. Ariovaldo Bolzan

Coorientador: Dr. William James Nogueira Lima

**FLORIANÓPOLIS – SC
2012**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Almeida, Maria Clara de Oliveira e

Indução de celulasas e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos [dissertação] / Maria Clara de Oliveira e Almeida ; orientador, Ariovaldo Bolzan ; coorientador, William James Nogueira Lima. - Florianópolis, SC, 2012.

145 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Cultivo em estado sólido. 3. Celulasas. 4. Bolzan, Ariovaldo. II. Lima, William James Nogueira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

INDUÇÃO DE CELULASES E XILANASE POR *Trichoderma reesei* E *Penicillium variable* EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Por

MARIA CLARA DE OLIVEIRA E ALMEIDA

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Orientador

Prof. Dr. William James Nogueira Lima
Coorientador

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
Coordenador

Banca examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares

Dr. José Carlos de Oliveira Filho

Prof. Dr. William James Nogueira Lima

Florianópolis, 30 de novembro de 2012

*Dedico aos meus pais, Cláudio e
Maria de Fátima, aos meus irmãos,
Pedro Henrique e Maria Cecília e ao
meu noivo, Eder.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me iluminado e me dado forças para concluir mais essa etapa na minha vida.

À BIOMM SA, em especial ao diretor científico Luciano Vilela, pela permissão e apoio para realizar este trabalho.

À FACIT, em especial a professora Ângela e Daniela, pelo incentivo para realizar o mestrado.

Ao professor Dr. Ariovaldo Bolzan pela orientação, por ter acreditado em mim e no meu trabalho. Muito obrigada.

Ao professor Dr. William James, pela amizade, confiança e ensinamentos. Muito obrigada.

Ao José Carlos, companheiro de laboratório que se tornou um grande amigo. Obrigada pelo incentivo e apoio sempre. Sua ajuda foi essencial nesse trabalho.

Aos professores Dra. Cíntia Soares e Dr. Agenor Furigo por aceitarem participar da banca e pelas contribuições indispensáveis neste trabalho.

À Malu, obrigada pela amizade sempre. Por ter confiado, mais uma vez, em mim e na minha capacidade. Por ter me ajudado a realizar o trabalho e permitido o seu desenvolvimento nos laboratórios da BIOMM.

Aos amigos e alunos de iniciação científica da FACIT, Helberth, Letícia, Anamaria, Laiane e Mariana, sem vocês não teria conseguido concluir esse trabalho. E, todos do laboratório da BIOMM que torceram e acreditaram no meu trabalho. Muito obrigada.

À minha família pelo incentivo, pela paciência, apoio nos momentos em que estive longe e nos momentos difíceis. Muito obrigada.

Ao Eder e sua família, obrigada por me apoiar sempre, por sua paciência e compreensão. Essa vitória também é sua.

Aos meus amigos de Florianópolis, obrigada pelas horas de estudos e companhia. Vocês são especiais.

Aos professores do programa da pós-graduação da UFSC pelos ensinamentos.

Ao Edevilson por sempre me ajudar na secretaria da Pós-Graduação em Engenharia Química.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que me ajudaram e apoiaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Muito obrigada.

*"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."
Louis Pasteur*

RESUMO

A cana-de-açúcar constitui uma fonte de energia renovável e abundante e tem sido muito utilizada no Brasil. Pode-se aproveitar o seu caldo para produção de etanol via fermentação e o seu bagaço é utilizado para geração de energia por meio de queima. Uma alternativa para a valorização do bagaço é a separação da celulose, que pode ser liberada por hidrólises enzimáticas, o que produz açúcares fermentáveis que serão utilizados para a produção de etanol, denominado etanol de segunda geração (2G). O elevado custo das enzimas celulolíticas representa o maior desafio para a viabilidade do processo. O cultivo em estado sólido pode ser considerado como uma alternativa para o aproveitamento dessa biomassa gerada, pois pode utilizar os resíduos agrícolas como substratos indutores para produção das enzimas celulolíticas e reduzir o custo de produção dessas enzimas, viabilizando o processo. As celulasas são geralmente produzidas por fungos em cultivo submerso, porém os fungos celulolíticos ocorrem naturalmente em ambientes não submersos. Dessa maneira, neste trabalho, foram avaliados diferentes substratos para cultivo fúngico em estado sólido, sendo eles, o farelo de trigo e o bagaço de cana-de-açúcar seja *in natura* ou tratado com hidróxido de amônia 15% ou com hidróxido de sódio 4% ou termicamente, para produção de enzimas celulolíticas e xilanase, as quais poderão ser aplicadas à hidrólise celulósica para obtenção de etanol de segunda geração. Os fungos utilizados foram o *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ATCC 56765) e o *Penicillium variabile* (isolado em ambiente canavieiro na região Norte de Minas Gerais). Os cultivos em estado sólido foram realizados em frascos por 28 dias. A melhor umidade inicial do meio testado foi de 70% para ambos os microorganismos. Para o *T.reesei*, o meio contendo bagaço tratado termicamente foi um bom indutor para produção de CMCase e FPase atingindo valores de 205,9 e 6,09 UI/g substrato, respectivamente, em 21 dias de cultivo. Para a produção de β -glicosidase, o bagaço tratado com NaOH foi melhor e para xilanase o meio contendo farelo de trigo foi melhor indutor. Além dos meios contendo 100% bagaço *in natura* ou tratado e 100% farelo de trigo, foi testada uma mistura de 25% de bagaço de cana com 75% de farelo de trigo. Apenas para xilanase e β -glicosidase a mistura dos substratos foi melhor indutora. O *P. variabile* alcançou o máximo de produção no meio contendo farelo de trigo, resultando em 42,819, 75,972, 1,077 e 95,261 UI/g substrato para β -glicosidase, CMCase, FPase e xilanase, respectivamente. Diferente do *T.reesei*, o meio contendo a mistura de 25% de bagaço/75% de farelo de

trigo aumentou a produção de todas as enzimas em relação ao meio contendo bagaço *in natura* ou tratado, sem mistura.

Palavras-chave: cultivo em estado sólido, celulase, bioetanol.

ABSTRACT

The sugarcane is a source of abundant and renewable energy and has been widely used in Brazil. You can take advantage of its juice for ethanol production via fermentation and its pulp is used for power generation through burning. An alternative to the appreciation of the bagasse is the separation of cellulose that can be released by enzymatic hydrolysis, which produces fermentable sugars that will be used for ethanol second generation (2G). The high cost of cellulolytic enzymes represents the greatest challenge to the viability of the process. The solid state cultivation can be an alternative to take this generated biomass, because it can use this residues as a inductor substrate to produce cellulolytic enzymes and reduce the cost to produce this enzymes, making the process viable. The cellulases are generally produced by fungi in submerge fermentation, however the cellulolytics fungi occurs naturally in the non submerge environment. Thus, in this article, it was evaluated different substrate applied to solid state fungi cultivation, since one of those, the wheat bran and sugar cane bagasse is *in natura* or treated with 15 % ammonia hydroxide or 4 % sodium hydroxide or heat, for production of cellulolytic enzymes and xylanase, applied to the hydrolysis of cellulose to obtain second generation ethanol. The fungi used were *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ATCC 56765) and *Penicillium variable* (isolated from sugarcane environments in the north of Minas Gerais). Solid state cultivations were performed in vials for 28 days. The best initial moisture content of the tested medium was 70% for both micro-organisms. For *T.reesei*, the medium containing heat treated bagasse was a good inducer for production of CMCase and FPase reaching values of 205.9 and 6.09 IU/g substrate, respectively, 21 days of cultivation. Production of β -glucosidase using bagasse treated with NaOH was better and for xylanase the medium containing wheat bran was better inducer. Besides media containing 100% of raw or treated bagasse and 100% wheat bran, it was tested a blend of 25% of bagasse with 75% of wheat bran content. This mixing only for xylanase and β -glucosidase substrates was the best inducer. The *P. variable*, the maximum production was reached in medium containing bran being 42.819, 75.972, 1.077 and 95.261 IU/g substrate for β -glucosidase, CMCase, FPase and xylanase respectively. Unlike the *T.reesei*, the medium containing a mixture of 25 % bagasse/75 % wheat bran increased production of all enzymes compared to the medium containing sugarcane bagasse or treated without mixing.

Key words: solid state cultivation, cellulase, bioethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da distribuição dos componentes lignocelulósicos na parede celular vegetal.....	37
Figura 2: A) unidade de β -D-glicose B) celobiose, polímero linear de D-glicose ligado por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$	39
Figura 3: Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose.....	40
Figura 4: Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré- tratamento.....	43
Figura 5: Sinergismo entre endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidasas.....	49
Figura 6: Tipos de biorreatores para CES.....	66
Figura 7: Bagaço de cana lavado, moído e pré-tratado.....	74
Figura 8: Cultivo em estado sólido realizado em frascos.....	75
Figura 9: Esquema do processo fermentativo para obtenção do extrato enzimático.....	77
Figura 10: Atividade enzimática de CMCase (1) e FPase (2) do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	86
Figura 11: Atividade enzimática de β -glicosidase (1) e xilanase (2) do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	88
Figura 12: Comparação da atividade enzimática de CMCase (1) e FPase (2) do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido, em meio sem mistura e com mistura de diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	90
Figura 13: Comparação da atividade enzimática de β -glicosidase (1) e xilanase (2) do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido em meio sem mistura e com mistura de substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	92
Figura 14: Atividade enzimática de CMCase (1) e FPase (2) do extrato obtido de <i>P. variable</i> , em cultivo em estado sólido em	

diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	96
Figura 15: Atividade enzimática de β -glicosidase (1) e Xilanase (2) do extrato obtido de <i>P. variable</i> , em cultivo em estado sólido nos diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	97
Figura 16: Comparação da atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de <i>P. variable</i> e <i>A. awamori</i> , cultivo em estado sólido nos diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.....	98
Figura 17: Esquema simplificado de uma planta piloto para produção de celulases por cultivo submerso.....	106
Figura 18: Esquema simplificado de uma planta piloto para produção de celulases pelo cultivo em estado sólido.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do complexo lignocelulósico de resíduos agroindustriais.....	37
Tabela 2: Composição do meio Mandels e Weber (1969) modificado (pH 5,0) para cultivo do inóculo.....	72
Tabela 3: Composição do meio Breccia et al. (1995) modificado (pH 5,0) para inóculo.....	73
Tabela 4: Composição da solução nutritiva (pH 5,0) para o cultivo em estado sólido.....	75
Tabela 5: Atividade enzimática de CMCase do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	82
Tabela 6: Atividade enzimática de FPase do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagem de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	82
Tabela 7: Atividade enzimática de xilanase do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	83
Tabela 8: Atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de <i>T. reesei</i> RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	84
Tabela 9: Atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de <i>P. variable</i> , em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	93
Tabela 10: Atividade enzimática de FPase do extrato obtido de <i>P. variable</i> , em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	94
Tabela 11: Atividade enzimática de xilanase do extrato obtido de <i>P. variable</i> , em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo	

de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	94
Tabela 12: Atividade enzimática de CMCase do extrato obtido de P.variable, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.....	94
Tabela 13: Comparação dos valores máximos de produção das enzimas celulolíticas e xilanase pelo P. variable na mistura de substratos e no meio puro em UI/g substrato.....	100
Tabela 14: Média da produção de celulases e hemicelulases pelo T. reesei por cultivo submerso em frascos agitados.....	102
Tabela 15: Média da produção de celulases e hemicelulases pelo T. reesei por cultivo em estado sólido em frascos.....	102
Tabela 16: Média da produção de celulases e xilanase pelo P.variable por cultivo submerso em farelo de trigo ou bagaço de cana.....	103
Tabela 17: Média da produção de celulases e xilanase pelo P.variable por cultivo em estado sólido em farelo de trigo ou bagaço de cana.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. awamori</i>	<i>Aspergillus awamori</i>
B-sidase	β -glicosidase
CBH	Exoglucanases ou celobiohidrolase
CBM	Módulo de ligação a celulose
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade de endoglucanases sobre o CMC
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
EG	Endoglucanases
FPase	Atividade de celulases total sobre o papel de filtro
CES	Cultivo em estado sólido
CS	Cultivo submerso
CG	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
PD&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
<i>P. variable</i>	<i>Penicillium variable</i>
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
USDOE	<i>United States Department of Energy</i>
PD&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1 Biotecnologia – Biocombustível - Etanol de Segunda Geração	33
3.2 Processos Fermentativos para Produção de Enzimas	35
3.3 Matérias-primas Lignocelulósicas	36
3.3.1 Celulose	38
3.3.2 Hemiceluloses	39
3.3.3 Lignina	40
3.4 Hidrólise enzimática da celulose	41
3.5 Pré-tratamento	42
3.6 Enzimas Celulolíticas: Classificação, Mecanismo de Atuação e Produção	46
3.6.1 Celulases	48
3.6.2 Classificação e mecanismo de ação das celulases	50
3.6.2.1 Endoglucanases	50
3.6.2.2 Exoglucanases	50
3.6.2.3 β -glicosidases	51
3.7 Mercado de Celulases	51
3.8 Micro-organismos Produtores de Celulases	52
3.9 Extração e Purificação	53
3.10 Hemicelulases	54
3.11 Processos Fermentativos	55
3.12 Cultivo em Estado Sólido	56
3.12.1 Definição	56
3.12.2 Histórico	57

3.12.3 Principais características	57
3.12.4 Fatores que influenciam a produção de enzimas por CES.....	60
3.12.4.1 Umidade	60
3.12.4.2 Temperatura.....	61
3.12.4.3 pH	61
3.12.4.4 Medida de biomassa	61
3.12.5 Principais micro-organismos utilizados no cultivo em estado sólido	63
3.12.6 Substrato – bagaço de cana	63
3.12.7 Tipos de biorreatores para CES.....	65
3.12.7.1 Biorreatores tipo bandeja	66
3.12.7.2 Biorreatores tipo leito fixo.....	67
3.12.7.3 Biorreatores tipo leito fluidizado e leito agitado	68
3.12.7.4 Biorreatores tipo tambor rotativo.....	68

4. MATERIAL E MÉTODOS.....71

4.1 Micro-organismos	71
4.2 Preparo do Inóculo	71
4.3 Composição do Meio de cultivo.....	73
4.3.1 Preparo do substrato	73
4.3.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de amônio	74
4.3.1.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio.....	74
4.3.1.3 Pré-tratamento térmico	74
4.4 Cultivo em estado sólido	75
4.5 Cultivo submerso.....	76
4.6 Extração das enzimas	76
4.7 Determinação das atividades e concentrações enzimáticas do complexo celulolítico e hemicelulolítico.....	78
4.7.1 Atividade carboximetilcelulase – CMCase	78
4.7.2 Atividade FPase.....	78

4.7.3 Atividade β -glicosidase	79
4.7.4 Atividade hemicelulase (xilanase).....	79
4.7.5 Cálculo da atividade enzimática	79
4.8 pH e dosagem de proteína	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 Cultivo em estado sólido pelo <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30.....	81
5.1.1 Em diferentes porcentagens de umidade inicial no meio	81
5.1.2 Cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores	84
5.1.3 Cultivo em estado sólido com mistura de substratos indutores	89
5.2 Cultivo em estado sólido por <i>Penicillium variable</i>	93
5.2.1 Em diferente porcentagem de umidade inicial no meio	93
5.2.2 Cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores	94
5.2.3 Cultivo em estado sólido com mistura de substratos indutores	99
5.3 Produção enzimática por cultivo submerso e por cultivo em estado sólido pelo <i>T. reesei</i>	101
5.4 Produção enzimática por cultivo submerso e por cultivo em estado sólido pelo <i>Penicillium variable</i>	103
5.5 Comparação entre o Cultivo Submerso e o Cultivo em estado sólido	104
6. CONCLUSÃO	111
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
8. REFERÊNCIAS	115
ANEXOS	135

1. INTRODUÇÃO

Diante do aumento da demanda por energia e da necessidade de geração de nova matriz energética sustentável no mundo atual, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm sido de interesse global. Por esse motivo, os materiais resultantes das atividades agrícolas de origem lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha, madeira, restos de culturas de grãos e frutíferas, têm sido objeto de pesquisa para aproveitamento nos processos de obtenção de energia renovável. A reutilização e reciclagem destes resíduos podem minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminuir o uso de combustíveis fósseis, além de resultar em um melhor aproveitamento da matéria-prima, que é de grande importância na atualidade (RABELO, 2007).

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, apresentando características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais (MACIEL, 2006).

O processo de produção de etanol no Brasil ocorre pela via de fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar e gera como resíduos a vinhaça, a palha e o bagaço, os quais são parcialmente utilizados por meio da queima para geração de energia (vapor e eletricidade) e para adubação das áreas de plantio. Parte considerável deste subproduto não é utilizada, causando transtornos e problemas no que se refere a sua destinação e processamento (SILVA, 2009).

A possibilidade de produzir combustíveis derivados da lignocelulose, maior fonte de carbono existente no planeta, incentivou grandes investimentos na indústria de biocombustíveis recentemente (BANSAL *et al.*, 2009). O bioetanol de segunda geração, proveniente de biomassas lignocelulósicas, apresenta-se como uma tecnologia promissora, considerando-se que a matéria-prima é extremamente abundante e ainda pode contribuir majoritariamente na redução dos gases do efeito estufa. Uma mistura de 10 % de bioetanol na gasolina reduz a emissão de dióxido de carbono de 3 a 6 %, tornando o bioetanol um combustível mais limpo, além de ser uma alternativa renovável em comparação ao petróleo (SINGHANIA *et al.*, 2010). O Brasil possui vantagem logística em relação a esta tecnologia, considerando-se que o bagaço é gerado na própria usina, prescindindo do caro transporte da biomassa para o local de processamento (BASSO, 2010).

As biomassas vegetais contêm grandes quantidades de celulose, além de outros polissacarídeos que, hidrolisados, podem gerar glicose para fermentação a etanol combustível ou para a produção de outros produtos químicos de interesse. Na natureza, a biodegradação da biomassa é lenta, pois a lignina e a cristalinidade dos substratos restringem o acesso das enzimas hidrolíticas aos componentes dos polissacarídeos. Entretanto, a biomassa pode ser pré-tratada e fracionada, utilizando processos que envolvem altas temperaturas e pressão, combinadas a catálises ácidas ou básicas, tornando os materiais lignocelulósicos mais acessíveis ao ataque das enzimas (PALONEN, 2004).

As celulasas são enzimas de importância econômica, comercializadas em grande volume e com diferentes aplicações industriais como, por exemplo, na produção de ração animal, na fermentação de grãos para produção de álcool e nas indústrias de papel e têxtil (OGEL et al., 2001). As celulasas são usualmente uma mistura de diversas enzimas envolvidas na degradação da celulose. Os três maiores grupos de celulasas que estão no processo de hidrólise são: endoglucanases (EG); exoglucanases ou celobiohidrolase (CBH) e β -glucosidase (SUN e CHENG, 2002).

O cultivo em estado sólido (CES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento dos resíduos sólidos. Neste contexto, destaca-se a grande variedade e disponibilidade de recursos naturais renováveis, especialmente no Brasil, que podem ser transformados, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado e de interesse industrial através da CES. Neste processo ocorre a síntese de diversos compostos como resultado do crescimento microbiano e os desdobramentos de seu metabolismo. Algumas considerações importantes para o desenvolvimento da CES incluem a seleção adequada do substrato e do micro-organismo, a otimização dos parâmetros do processo e a separação e purificação dos produtos. De uma maneira geral, este é um processo que emerge como uma tecnologia em potencial para a produção de diversos produtos de origem microbiana, principalmente para a produção de enzimas fúngicas (PANDEY, 2003).

Os micro-organismos utilizados nas fermentações industriais devem ter características desejáveis a fim de tornar o processo operacional viável. Muitos grupos de micro-organismos podem crescer em substrato sólido. Fungos filamentosos, entretanto, possuem melhor capacidade de crescer em condições adversas, como por exemplo, em presença de pouca água livre. As bactérias e leveduras crescem preferencialmente na

superfície, enquanto os fungos filamentosos penetram nas partículas do substrato (PANDEY, 2003).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a produção de celulases e xilanase por cultivo fúngico em estado sólido a partir de substratos de baixo custo para produção de etanol de segunda geração.

Com intuito de facilitar a compreensão, esta dissertação foi organizada em sete seções. Na seção 1, foi apresentada uma breve introdução destacando os principais pontos que levaram ao desenvolvimento deste trabalho. Na seção 2, são apresentados os objetivos principais e específicos inerentes ao trabalho. Na seção 3, é apresentada uma revisão de literatura sobre os principais tópicos relacionados ao trabalho, como: os biocombustíveis, os processos de cultivo para produção de enzimas, as principais matérias-primas lignocelulósicas, a hidrólise da celulose, os principais pré-tratamentos, as características, classificação, mecanismo de atuação e produção das celulases e hemicelulases e, por último, é apresentada a definição, histórico, principais características e tipos de biorreatores do cultivo em estado sólido. Na seção 4 são apresentados os materiais e as metodologias empregadas para a realização do trabalho. Na seção 5, são apresentados os principais resultados alcançados no cultivo em estado sólido, nos diferentes substratos testados pelos micro-organismos utilizados nesse trabalho e uma comparação da produção das celulases em cultivo em estado sólido e cultivo submerso. As considerações finais são apresentadas na seção 6 e as sugestões para trabalhos futuros são apresentadas na seção 7.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produção de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* RUT C-30 e *Penicillium variable* em cultivo no estado sólido a partir de substratos de baixo custo destinadas a produção de etanol de segunda geração.

2.2. Objetivos específicos

- i. Avaliar a produção de celulases e xilanase a partir de farelo de trigo e bagaço de cana como substrato indutor.
- ii. Avaliar a eficiência dos pré-tratamentos no bagaço de cana-de-açúcar: NaOH 4%, NH₄OH 15% e térmico, para produção das celulases e xilanase.
- iii. Determinar a influência da umidade inicial do meio para produção das enzimas celulolíticas e xilanase.
- iv. Avaliar a mistura dos meios de bagaço de cana e farelo de trigo como substrato indutor.
- v. Comparar a produção de celulases e xilanase em cultivo submerso e cultivo em estado sólido utilizando o farelo de trigo e o bagaço de cana *in natura* como substrato indutor.

A seguir é apresentada a revisão de literatura a respeito do tema deste trabalho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biotecnologia – Biocombustível - Etanol de Segunda Geração

A busca por fontes renováveis de energia e de alternativas ao uso do petróleo está mobilizando internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental (PEREIRA Jr., 2007).

Formas de se obter energia que sejam mais limpas, menos impactantes para a natureza e renováveis têm sido pesquisadas e desenvolvidas intensamente nas últimas décadas para substituir a energia obtida de usinas térmicas convencionais ou nucleares. Estas energias provêm de usinas pequenas que geram pouca poluição e que utilizam fontes renováveis como matéria-prima. Os principais tipos de energias renováveis são a energia solar, eólica, energia das marés, energia geotérmica, energia das ondas e da biomassa (CRISPIM, 2010).

Os padrões atuais de produção e consumo de energia são baseados nas fontes de energia de reservas fósseis, o que gera emissões de poluentes, que são os gases de efeito estufa, e põem em risco seu suprimento de longo prazo no planeta. Há um consenso de que é preciso mudar esses padrões, estimulando a produção e uso de energias renováveis e, nesse sentido, o Brasil apresenta uma condição bastante favorável em relação a outros países (CRISPIM, 2010).

A principal fonte de etanol no país vem do cultivo da cana-de-açúcar. O bagaço da cana é o responsável pela geração de energia dentro da usina, sendo transformado em energia mecânica, térmica e elétrica. O bagaço tem sido uma ótima opção para gerar energia, pois o que é excedente na usina é distribuído a outros tipos de indústria que não a do ramo sucroalcooleiro. A palha da cana também é uma fonte de energia, e quando deixada uma parte dela no solo após a colheita, é um excelente contribuinte para a qualidade do solo (CRISPIM, 2010).

O Brasil possui uma experiência bem sucedida na produção de etanol de primeira geração, que se iniciou na década de 70 impulsionada pelo Projeto Proálcool (Programa Brasileiro de Álcool) (HIRA e OLIVEIRA, 2009; ZANIN *et al.*, 2000). No entanto, o desenvolvimento da tecnologia que possibilitará o uso da biomassa para a produção de combustível é considerado indispensável para que o Brasil não fique defasado, tendo em vista que investimentos bilionários no setor estão sendo feitos em outros países (PRASAD, SINGH e JOSHI, 2007). Com

o interesse dos países desenvolvidos, o Brasil terá competidores que o obrigam a incorporar ciência mais avançada (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

Até o ano de 2020 está previsto o aumento da produção de etanol, no Brasil, dos atuais 28 bilhões para 65 bilhões de litros por ano (CONAB, 2010; UNICA, 2010). Esses níveis de produção serão alcançados através do aumento da área de plantio, do aperfeiçoamento do processo de produção já existente, do melhoramento genético da cana-de-açúcar e de micro-organismos fermentadores e também pelo desenvolvimento de tecnologias de conversão dos resíduos agroindustriais lignocelulósicos em fontes de açúcares fermentáveis (GRAY, ZHAO e EMPTAGE, 2006).

A produção de etanol de segunda geração é obtida através da transformação dos materiais lignocelulósicos, que se destacam como fontes energéticas, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, em etanol. Uma tonelada de cana contém a energia equivalente a 1,2 barris de petróleo, sendo que cerca de 1/3 dessa energia está armazenada quimicamente no caldo (açúcares) e o restante na biomassa de cana: metade no bagaço e metade na palha, aproximadamente. A produção de etanol através da utilização de resíduos lignocelulósicos pode representar um adicional significativo de 15 % na produção (GOES, 2008). Como vantagem em relação à maior parte dos interessados na corrida pelo etanol de segunda geração, o Brasil possui características que o colocam em uma posição privilegiada devido à extensão de área agrícola disponível, clima favorável, água em abundância e por sua vasta experiência na produção e no uso do etanol de primeira geração. Outro aspecto importante é que a biomassa que pode ser usada nesse processo no Brasil, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, são rejeitos da própria indústria do etanol de primeira geração (SILVA, 2010).

O grande desafio da produção de etanol de segunda geração é o de transformar a biomassa não aproveitada também em álcool combustível. Para que a biomassa seja transformada em etanol, algumas etapas precisam ser estudadas, estabelecidas e realizadas: o pré-tratamento, a produção de enzimas celulolíticas, a hidrólise enzimática, a fermentação e a destilação do produto final.

Grandes investimentos estão sendo efetuados para viabilizar a produção de combustível a partir de celulose, estimando-se que, em 2020, apenas nos EUA, cerca de 30 bilhões de litros de álcool poderão ser obtidos dessa fonte. Para isso, será necessário investir recursos elevados em PD&I, especialmente na hidrólise da celulose (EMBRAPA, 2006).

3.2 Processos Fermentativos para Produção de Enzimas

Os processos fermentativos para obtenção de um produto a partir de um determinado micro-organismo podem ser bem variados; dependem do tipo de biorreator utilizado, do estado do cultivo (submersa ou sólida) e de outras características como ser descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo ou contínuo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia em expansão, movimentando bilhões de dólares por ano (VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003). Até 2001, conheciam-se aproximadamente 4000 enzimas, e destas, cerca de 200 foram comercializadas, sendo que a maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

O uso prático de enzimas é explorado pelos seres humanos há milhares de anos de forma direta, via emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal, ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano. A produção e o uso de enzimas de origem microbiana, de maneira controlada, são relativamente recentes, porém constituem atualmente o maior setor da indústria biotecnológica (BORTOLAZZO, 2011).

A indústria mundial de enzimas teve um faturamento de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com previsão de crescimento anual que gira em torno de 6,5 %. Celulases e amilases são as enzimas do grupo das carbohidrolases de maior impacto econômico, respondendo juntas por 23 % do total das enzimas de uso industrial. O mercado de celulases em 2004 movimentou valores próximos a US\$ 300 milhões, superior ao de amilases, pois as celulases podem ser aplicadas na indústria de alimentos, ração animal, em processos de extração de óleos vegetais, de maceração de frutas, como também na fabricação de cerveja e vinho. No entanto, sua principal aplicação está voltada para a formulação de ração animal, correspondendo a 21 % do total de enzimas utilizadas neste setor. A tendência do mercado mundial é pelo aumento no consumo das celulases, tanto no segmento das enzimas industriais como no de enzimas especiais. (SANTOS, 2011).

Muitos trabalhos sobre o cultivo em estado sólido (CES) foram recentemente publicados utilizando subprodutos agrícolas para produção de enzimas. Processos de CES são de interesse, em especial para os países com uma abundância de resíduos agroindustriais, pois estes constituem uma alternativa de matéria-prima de baixo custo comparado

a outros substratos e contribuem com a redução dos problemas de poluição e/ou estocagem desses resíduos. Comparando a produtividade volumétrica obtida nos processos submersos em relação ao processo em estado sólido, a CES tem apresentado grande superioridade na produção de enzimas (VARGAS *et al.*, 2004), com um desempenho 10 vezes maior (DURAND, 2003).

3.3 Matérias-primas Lignocelulósicas

Os materiais de origem lignocelulósica são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza. Na sua maioria, são provenientes de atividades agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha, madeira, restos de culturas de grãos, que tem sido aproveitados visando a utilização nos processos para renovação energética. Esses resíduos podem ser utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por micro-organismos. A lignocelulose é o principal componente estrutural das plantas lenhosas como grama e representa uma importante fonte de matéria orgânica renovável. As propriedades químicas de seus componentes fazem dela um substrato de grande valor biotecnológico (MALHERBE e CLOETE, 2003). A abundância em celulose desses resíduos, e também a sua disponibilidade a um baixo custo, representam um importante recurso para a produção de glicose via processo de sacarificação (REYES, ZAMORA e DURAN 1998; FUJITA *et al.*, 2004).

Em termos nacionais, toneladas de resíduos celulósicos são geradas mensalmente, tais como: algodão, bagaço da cana-de-açúcar, casca de arroz, palhas, serragem, entre outros. Quando não são queimados para geração de energia, estes substratos causam problemas ambientais, por exemplo, lixiviação de rios pelo depósito do bagaço da cana-de-açúcar, ou o despejo em estradas vicinais e mananciais de água (LIMA e RODRIGUES, 2007).

A produção global de biomassa lignocelulósica é cerca de 200×10^9 toneladas por ano. Dentre esse montante, apenas de 8 a 20×10^9 toneladas da biomassa disponível é acessível. No entanto, a utilização do material lignocelulósico não é sempre prático devido à disponibilidade das safras, do clima alterado e do alto custo de transporte e armazenamento de grande quantidade de material orgânico, e também a utilização da tecnologia em escala industrial (TANAKA *et al.*, 2006; PALONEN, 2004).

A biomassa lignocelulósica é constituída por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas

entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa e resistente a ataques microbianos (JEFFRIES, 1990). O modelo da parede celular apresentando o complexo lignocelulósico pode ser observado na Figura 1:

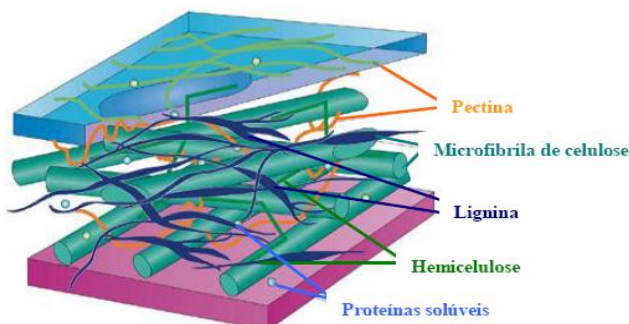


Figura 1: Representação da distribuição dos componentes lignocelulósicos na parede celular vegetal. Fonte: Adaptado de STICKLEN, 2008.

A composição e proporção dos constituintes dos resíduos lignocelulósicos variam não apenas de acordo com o tipo do resíduo, mas também com fatores relacionados à origem, safra, condições e tempo de armazenamento do resíduo. A Tabela 1 apresenta a composição do complexo lignocelulósico de alguns resíduos agrícolas.

Tabela 1: Composição do complexo lignocelulósico de resíduos agroindustriais.

Resíduos Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	32-44	27-32	19-24
Casca de soja	40-53	14-33	1-8
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
Palha de milho	25-41,2	34	14
Palha de arroz	32,1	24	18
Palha de trigo	29-35	26-32	16-21
Resíduos de banana	13,2	14,8	14
Gramíneas	25-40	24-50	10-30
Folhas	15-20	80-85	0
Jornal	40-55	25-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Resíduos Urbanos	26	40	20

Fonte: ZAMBOM et al., 2001; HOWARD et al., 2003; PRASAD, SINGH e JOSHI, 2007; PARIS, 2008; SÁNCHEZ, 2009; AGUIAR, 2010.

A matéria-prima, geralmente, acrescenta um custo elevado aos bioprocessos. Desta maneira, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos agroindustriais e florestais como matérias-primas para processos microbianos industriais é uma alternativa econômica e ambientalmente viável, pois irá agregar valor a esses resíduos podendo reduzir um problema ambiental causado pelo seu acúmulo excessivo.

3.3.1 Celulose

A celulose é o mais abundante composto orgânico renovável da Terra. Muitos estudos estão sendo feitos com a finalidade de encontrar aplicações econômicas para esse resíduo que representa mais de 60 % dos resíduos agrícolas. A maioria desses materiais é usada como ração animal ou queimada como fonte de energia. Esse resíduo agrícola contém uma mistura de lignina e hemicelulose ligadas fortemente a celulose dificultando a decomposição enzimática (KANSO, ESSAM e ZEINAT, 1999).

As plantas produzem cerca de 180 bilhões de toneladas de celulose por ano em escala mundial, tornando este polissacarídeo o maior reservatório de carbono no mundo (FESTUCCI-BUSSELLI, OTONI e JOSHI, 2007). A celulose apresenta um vasto potencial de utilização pelas indústrias para a produção de diversos produtos (papel, tecidos, açúcares, ácidos orgânicos, tensoativos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos), além do chamado “etanol de segunda geração” (GUSAKOV, et al., 2007 e KUMAR, SINGH e SINGH, 2008).

Na natureza podemos encontrar a celulose quase que exclusivamente na parede celular das plantas, apesar de ser produzida por alguns animais (ex. tunicatos) e poucas bactérias. Apesar de grandes diferenças na composição e na estrutura anatômica da parede celular de várias plantas, um alto conteúdo celulósico – cerca de 35 a 50 % do peso seco da planta – é uma característica geral (LYND et al., 2002).

A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas formando açúcares que são, posteriormente, convertidos quimicamente ou por micro-organismos, em etanol ou butanol ou também em vários outros produtos, como acetona, ácidos orgânicos ou glicerol (WYMAN, 1994).

Estritamente, a celulose é composta por monômeros de celobiose repetindo-se e apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004) como mostra a Figura 2.

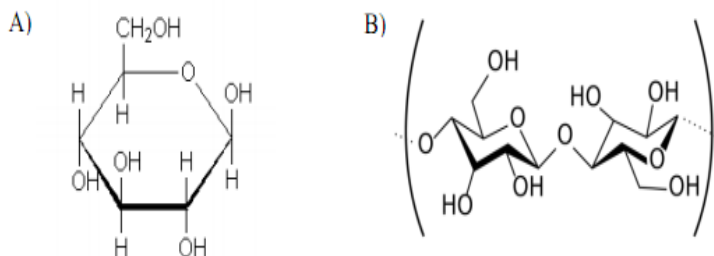


Figura 2: A) unidade de β -D-glicose B) celobiose, polímero linear de D-glicose ligado por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Fonte: ESPOSITO e AZEVEDO, 2004.

Ao contrário de sua simplicidade química, a estrutura física e morfológica da celulose é complexa e heterogênea (ATALLA, 1993). Durante a biossíntese da celulose, as cadeias glicosídicas formadas interagem umas e as outras por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, cristalizando-se e formando redes insolúveis. As cadeias individuais de celulose são orientadas paralelamente com a extremidade redutora e a extremidade não redutora em lados opostos. Esta subestrutura resulta em microfibrilas que contém cadeias organizadas em zonas altamente cristalizadas, bem como regiões amorfas, onde as cadeias não são organizadas paralelamente. Por isso, as estruturas secundárias e terciárias da celulose são complexas e podem variar de acordo com o organismo produtor. Além do mais, os polímeros de celulose da parede celular de plantas superiores são intrinsecamente associados com lignina e hemicelulose, resultando em morfologias ainda mais complexas.

3.3.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses, o segundo componente mais abundante da biomassa lignocelulósica, são polímeros heterogêneos de pentoses (incluindo xilose e arabinose), hexoses (principalmente manose, menos glicose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando flexibilidade ao agregado (DASHTBAN, SCHRAFT e QIN, 2009).

A hemicelulose interage por ligações de hidrogênio e as microfibras de celulose, atuando como um elo químico entre a celulose e a lignina, fornecendo a espinha dorsal da parede celular.

A porção de hemiceluloses nas plantas contribui significativamente como potencial para a produção de combustíveis a partir da lignocelulose. No entanto, espécies de leveduras e bactérias comumente usadas na produção de etanol não são muito eficientes na metabolização de açúcares pentose tais como xilose e arabinose, estes açúcares podem inibir o desenvolvimento desses organismos. Uma das abordagens para superar este problema em particular é a identificação na natureza ou engenheiramento de micro-organismos que possam usar eficientemente as pentoses (GOMEZ, STEELE-KING e MCQUEEN-MASON, 2008).

A Figura 3 representa alguns monossacarídeos que formam as estruturas das hemiceluloses.

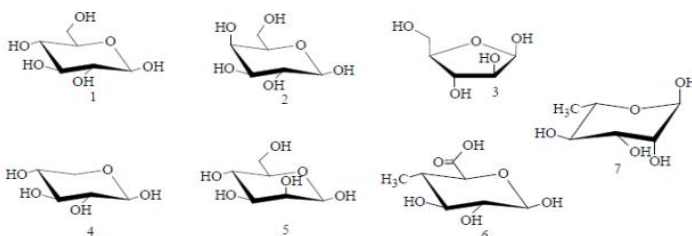


Figura 3: Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose. Fonte: MARTINS, 2005.

3.3.3 Lignina

A lignina é a terceira macromolécula principal dos resíduos lignocelulósicos. Nas plantas, é encontrada como parte integral da parede celular, emaranhada em uma complexa matrix de celulose e hemicelulose. O isolamento de lignina nativa, quando possível, é muito complicado (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignina é uma complexa macromolécula fenólica, hidrofóbica, constituída por unidades de fenilpropano, de característica tridimensional e amorfa, representando de 20 % a 30 % do total dos lignocelulósicos. A biossíntese da lignina é um campo de pesquisa muito ativo, principalmente por causa de sua relevância econômica (FENGEL e WEGENER, 1989; PALONEN, 2004).

As funções biológicas da lignina são: (1) fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico; (2) tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; (3) conferir resistência contra ataques microbianos (KUHAD, SINGH e ERIKSSON, 1997; LEE e MOON, 2003).

A lignina acrescenta uma resistência mecânica significativa às paredes celulares, reduzindo a suscetibilidade ao ataque enzimático, patogênicos e oxidativos. A lignina também reduz a digestibilidade do material vegetal pelos animais. Sem dúvida é o grande problema para a hidrólise, fazendo com que o material lignocelulósico seja recalcitrante para hidrólise (BASSO, 2010).

A lignina possui uma estrutura tridimensional altamente complexa e alta massa molar. Em ácidos a lignina é insolúvel, enquanto pode ser solubilizada em soluções básicas concentradas ou solventes orgânicos (SIPOS, 2010).

3.4 Hidrólise enzimática da celulose

A conversão inicial da biomassa em açúcares é o gargalo chave no processo de produção de biocombustíveis e novas soluções biotecnológicas são necessárias para melhorar sua eficiência, o que pode reduzir o custo global da produção de bioetanol (BON, FERRARA e CORVO, 2008).

Sun e Cheng (2002) comentam as extensas pesquisas que já foram realizadas nas últimas duas décadas visando converter o material lignocelulósico em etanol. Pode-se verificar a necessidade de duas etapas para o processo: a hidrólise ácida ou enzimática desse material em açúcares redutores fermentáveis e a fermentação desses açúcares. Na hidrólise ácida a quebra das moléculas de celulose (presentes nas fibras do bagaço e da palha) por meio da adição de ácido aos resíduos. No caso da hidrólise enzimática utilizam-se enzimas secretadas por microorganismos lignocelulolíticos (OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2006).

Durante a hidrólise enzimática alguns fatores podem interferir como: acesso a área de superfície devido à porosidade do material, presença de fibras cristalinas na celulose e presença de lignina e hemicelulose, as quais dificultam o acesso da enzima à celulose

resultando em redução da eficiência do processo de hidrólise (SUN e CHENG, 2002).

Na hidrólise de substratos solúveis, ocorrem basicamente os seguintes fenômenos: a adsorção das celulases aos sítios disponíveis no substrato celulósico; formação de um complexo ativo celulases-substrato; hidrólise das ligações glicosídicas do polímero celulósico; e dessorção do complexo celulósico do substrato hidrolisado (ZHANG e LYND, 2006).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo de produção das celulases (SUN e CHENG, 2002).

Geralmente, a hidrólise enzimática é conduzida em condições amenas de pH e de temperatura (pH = 4,8 e temperatura = 45-50 °C) e não apresenta problemas de corrosão, como observado nas hidrólises com ácidos e/ou com bases (DUFF e MURRAY, 1996). Entretanto, para uma eficiente hidrólise enzimática, é necessário primeiramente submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento, para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático. Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (FERRAZ et al., 1994; CARRASCO, 1992).

A degradação microbiana dos resíduos celulósicos e dos produtos derivados resulta da ação de várias enzimas, principalmente das celulases, as quais são produzidas por muitos micro-organismos e incluem diferentes classificações enzimáticas. O principal desafio na conversão da biomassa a bioetanol é alcançar rendimentos que tornem seu custo competitivo aos combustíveis fósseis (SUKUMARAN, SINGHANIA e PANDEY, 2005).

3.5 Pré-tratamento

A conversão da maioria dos materiais lignocelulósicos a álcool a partir da celulose requer pré-tratamento antes da hidrólise deste polissacarídeo. O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, deve evitar a degradação ou perda de

carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os microorganismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes (SUN e CHENG, 2005).

No contexto da produção de etanol lignocelulósico baseado na tecnologia de conversão enzimática, as enzimas hidrolíticas precisam ter acesso livre à celulose e à hemicelulose para que se possa produzir hidrolisados de açúcares de forma economicamente viável. No entanto, a parede celular das plantas apresenta uma série de características que a tornam um substrato extremamente recalcitrante, diminuindo o acesso das enzimas hidrolíticas e, por isso, impedindo uma hidrólise eficiente da biomassa. Os fatores físico-químicos e estruturais relacionados ao substrato que diminuem a digestibilidade enzimática, em uma escala macro, estão normalmente associados com a porosidade da parede celular e ao tamanho de partícula da biomassa (ZADRAZIL e PUNIYA, 1995). Em uma escala micro, esses fatores estão associados à cristalinidade e ao nível de polimerização da celulose (FAN, GHARPURAY e LEE, 1987), às ramificações das cadeias laterais da hemicelulose (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000), à composição da lignina e às ligações da lignina com a hemicelulose (BESLE, CORNU e JOUANY, 1994). A Figura 4 representa um esquema do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré-tratamento.

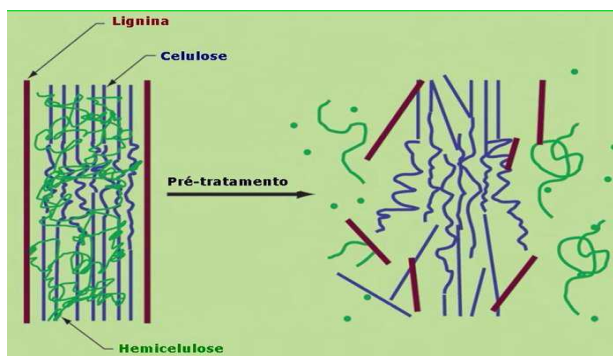


Figura 4: Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré-tratamento. Fonte: PEREIRA JR., 2007.

As condições de pré-tratamento podem ter dois efeitos opostos. Se o pré-tratamento for muito drástico, ocorre a degradação da fração celulósica e a formação de inibidores da fermentação; se for muito brando, a acessibilidade da enzima continuará sendo baixa (SENDELIUS, 2005).

O pré-tratamento de biomassa lignocelulósica é uma etapa operacional importante em termos de custo direto, também apresenta grande influência nos custos das etapas anteriores e subsequentes do processo. O pré-tratamento deve ser muito eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade para garantir acessibilidade à celulose, simplicidade operacional, segurança e higiene industrial e atributos ambientais, consumo reduzido de insumos químicos e energia, e ainda garanta adequada recuperação das pentoses e evite ou minimize a geração de compostos inibidores aos micro-organismos usados nos cultivos e às enzimas (BAUDEL, 2006).

O pré-tratamento pode ser físico (moagem da biomassa, aplicação de radiação), químico (pré-tratamento hidrotérmico, oxidação úmida – Wet Oxidation, pré-tratamento em meio ácido ou básico), biológico (micro-organismos decompositores da madeira) ou a combinação desses. A escolha das condições de pré-tratamento dependerá de uma avaliação global do processo, rendimento e manutenção da integridade dos insumos de interesse (GALBE e ZACHI, 2002).

Não existe um tratamento único aplicável a todas as biomassas e um mesmo pré-tratamento pode ser aplicado com diferentes graus de severidade.

Segundo Lynd et. al. (2002), pré-requisitos para um pré-tratamento ideal de lignocelulose consistem em: produzir fibras reativas; produzir pentoses em formas não degradáveis; não produzir compostos que inibem significativamente o cultivo; capaz de funcionar em reatores de tamanho razoável com custos moderados; produzir resíduos sólidos; ter um alto grau de simplicidade e ser efetivo em umidade baixa.

A maioria das tecnologias experimentais de pré-tratamento requer o desenvolvimento comercial de equipamentos para operar em larga escala (ZHU et al., 2009). Por outro lado, muitos dos equipamentos utilizados pela indústria madeireira para a fabricação de celulose podem ser adaptados para o tratamento de outros materiais lignocelulósicos (BIERMANN, 1993).

O bagaço de cana-de-açúcar é facilmente hidrolisado por um processo alcalino simples. O modo pelo qual o tratamento do substrato aumenta a capacidade de induzir a síntese do complexo celulolítico está relacionado com o aumento da concentração da celulose, indutor de celulasas, em função da remoção da lignina. Algumas bases podem ser usadas no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito alcalino no pré-tratamento depende da quantidade de lignina presente no material (FAN, GRARPURAY e LEE, 1987; McMILLAN, 1994).

Os processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operações, em termos de temperaturas e pressões, em comparação com sistemas ácidos. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali, geralmente cal ou soda, tende a causar um inchamento da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma (BAUDEL, 2006). Pelo inchaço da biomassa, a superfície é aumentada proporcionando maior abertura da estrutura para a água migrar para dentro do material. Uma vez dentro da biomassa, a água rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina-carboidrato (BALAT, BALAT e OZ, 2008). O efeito é a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina.

As vantagens do uso do álcali sobre os métodos ácidos são as condições mais amenas (próximo a temperatura atmosférica e as pressões) e a remoção da fração de lignina, sem a degradação dos outros componentes importantes. (BALAT, BALAT e OZ, 2008).

Outro pré-tratamento que tem sido muito relatado é o emprego do hidróxido de amônio (solução de NH_4OH). Esse pré-tratamento pode ser utilizado em vários tipos de matérias-primas utilizando diferentes processos. A solução de hidróxido de amônio é utilizada como um reagente para remover a lignina. Em altas temperaturas, o pré-tratamento com amônia aquosa resulta em alta deslignificação. No entanto, a sua desvantagem está no alto consumo de energia, formação de compostos tóxicos e perda de açúcares (KIM, NGHIEM e HICKS, 2009). Entretanto estudos têm comprovado que em baixas temperaturas de reação o hidróxido de amônio não é poluente, não é corrosiva e é de fácil manuseio, diminuindo as desvantagens observadas em altas temperaturas. O uso da solução a temperatura ambiente minimiza a sua interação com a hemicelulose e a formação de componentes tóxicos, aumentando os rendimentos de bioconversão e fermentação (KIM, NGHIEM e HICKS, 2009). A amônia consegue clivar as ligações C-O-C na lignina e as ligações de éster e éter entre a lignina e a hemicelulose, permitindo que a água penetre nas camadas internas da celulose aumentando a área superficial do material lignocelulósico (BALAT, BALAT e OZ, 2008).

Outro pré-tratamento que vem sendo utilizado pelos pesquisadores é o tratamento térmico. Em geral um tratamento térmico (por exemplo, 100 °C durante 45 min.) permite eliminar contaminações do bagaço de cana e inchar as fibras de celulose o suficiente para

permitir que um fungo filamentosos como o *Trichoderma harzianum* se desenvolva satisfatoriamente, produzindo celulases (SANTOS et. al., 2006).

Vale lembrar que existe uma variedade de matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de bioetanol. Nem sempre o pré-tratamento utilizado em uma determinada biomassa poderá ser utilizada em outra com a mesma eficiência. Uma metodologia de tratamento pode ser eficiente para um tipo de biomassa e não funcionar em outro material.

3.6 Enzimas Celulolíticas: Classificação, Mecanismo de Atuação e Produção

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (TOLAN, 2003).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas. Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Todos os organismos que degradam a celulose cristalina secretam sistemas de celulases complexos. Estes sistemas são compostos de uma variedade de enzimas com especificidade e modo de ação distinta, os quais agem em sinergia hidrolisando a celulose; dois tipos distintos de mecanismos controlam a síntese e secreção de celulases. Na maioria dos organismos, a produção de celulases é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolizáveis. Adicionalmente, em diversos sistemas, a síntese de celulase é regulada por celobiose ou sofrose, que são geradas a partir da degradação da

celulose por pequenas quantidades de celulasas constitutivas (BÉGUIN e AUBERT, 1994).

A degradação eficiente da celulose necessita da presença de diferentes enzimas. Uma característica da maioria das celulasas é possuir uma estrutura formada por um domínio catalítico, ligado a um ou mais domínios de ligação à celulose (CBM – Cellulose Binding Module). Sabe-se que os CBMs são necessários para a hidrólise eficiente de substratos cristalinos, mas sua ação exata ainda não é conhecida. Todas as enzimas celulolíticas possuem em comum a mesma especificidade pelas ligações β – 1,4 – glicosídicas, que são hidrolisadas levando a inversão ou a retenção da configuração do carbono anomérico (TOMME, WARREN e GILKES, 1995).

As celulasas podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias. O fungo *Trichoderma reesei* é o micro-organismo mais utilizado industrialmente para a produção de celulasas. Entretanto, como desvantagem, a sua produção de β -glicosidase é relativamente pequena. Assim, a aplicação de extrato enzimático proveniente de *T. reesei* para a degradação da celulose gera altas concentrações de oligômeros. Dessa forma, para conseguir um sistema de enzimas mais eficiente é necessário um suplemento de β -glicosidase proveniente de outros micro-organismos, como o *Aspergillus sp.* (SAAD, 2010).

O início do século XXI foi marcado por grandes investimentos na produção de celulasas, especialmente focada para sua aplicação na obtenção de etanol combustível. Em 2000, o USDOE (*United States Department of Energy*) iniciou parcerias para acelerar o desenvolvimento tecnológico e tornar viável economicamente a produção de etanol a partir de resíduos do milho (sabugo, palha e bráctea). O USDOE assinou um acordo com o Laboratório Nacional de Energias Renováveis (*National Renewable Energy Laboratory - NREL*) e as duas empresas líderes mundiais em produção de enzimas, Novozymes e Genencor, com a liberação de um montante de USD 17,1 milhões. A meta inicial de reduzir em 10 vezes o custo efetivo das celulasas na produção de etanol foi superada e já em 2004 as empresas haviam anunciado uma redução de 12 vezes no custo das enzimas.

O custo e o baixo rendimento dessas enzimas são os maiores problemas para a aplicação industrial (KANG *et al.*, 2004). No entanto, investigações quanto à habilidade de cepas de diferentes micro-organismos hidrolisarem celulose e hemicelulose utilizando substratos disponíveis e a preços acessíveis tem sido feita. Muitos trabalhos estão sendo direcionados ao desenvolvimento de uma alta produção microbiana enquanto focam o aprimoramento do processo de

fermentação (BORTOLAZZO, 2011). Camassola e Dillon (2007), na produção de celulase fúngica por cultivo em estado sólido (CES) comentam que, na produção de bioetanol, é necessário reduzir os custos das enzimas utilizadas para a hidrólise do material cru e aumentar a sua eficiência, a fim de tornar o processo economicamente viável. Além disso, existe um interesse geral na obtenção de novas enzimas, mais específicas e estáveis, além da possibilidade de reciclar toda ou parte das enzimas. Os autores obtiveram uma máxima atividade da enzima utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato por CES pelo fungo *Penicillium echinulatum*. Concluíram, então, que a aplicação de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas lignocelulolíticas por CES diminui os custos do processo de produção, beneficiando economicamente a produção de etanol.

3.6.1 Celulases

As celulases são usualmente uma mistura de diversas enzimas envolvidas na degradação da celulose. Os três maiores grupos de celulases que estão no processo de hidrólise são: endoglucanases (EG); exoglucanases ou celobiohidrolase (CBH) e betaglicosidase (SUN e CHENG, 2002). Conforme mostra a Figura 5, as celulases quebram a celulose em celobiose, que é subsequentemente clivada a glicose pela β -glicosidase (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização e criando, então, novas extremidades de cadeia. Exoglucanases (celobiohidrolases) agem em sequência em tais extremidades, ou seja, são capazes de se ligar aos domínios cristalinos e liberar celobiose ou glicoses das extremidades. A hidrólise completa da celulose ocorre, então, pela ação das β -glicosidasas, as quais hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose (MUÑOZ et al., 2001).

Dois tipos de sinergismo têm sido esclarecidos. O sinergismo exo-endo é interpretado como um mecanismo sequencial da ação enzimática. As endoglucanases atacam inicialmente as regiões amorfas da celulose liberando-as para a ação das exoglucanases. Outro modelo assume a competição entre as celulases individuais em regiões para adsorção de celulose (NIDETZKY et. al., 1994), mas esse sinergismo permanece não esclarecido. Outros sinergismos também são propostos no processo de hidrólise da celulose: 1) exoglucanase-exoglucanase (FAGERSTAM e PETTERSSON, 1980; WOOD e MCCRAE, 1979), 2) endoglucanase e endoglucanase 3) endoglucanase ou exoglucanase com

glicosidade, que reduz inibição por celobiose (WOODWARD, 1991), 4) sinergismo de aproximação devido à formação de complexos de celulose (SCHWARZ, 2001). O mecanismo de reação das celulases está esquematizado na Figura 5.

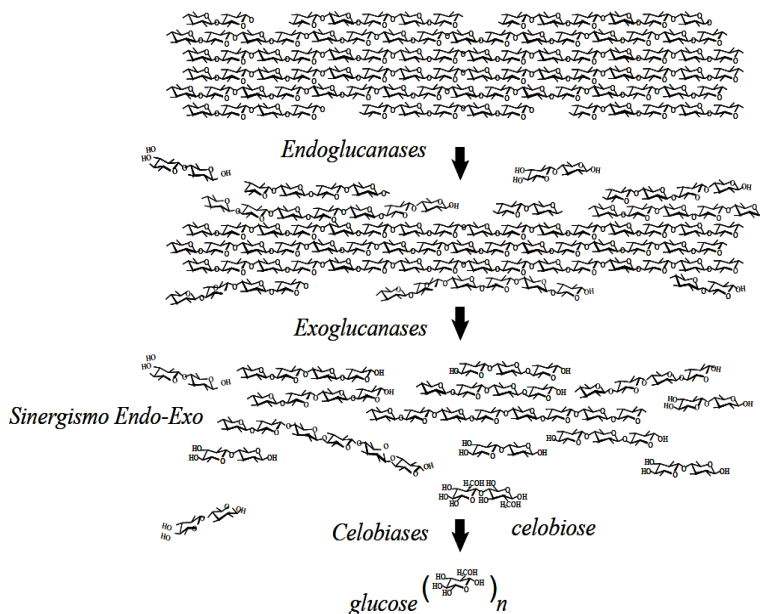


Figura 5: Sinergismo entre endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidasas. Fonte: Adaptado por Dillon, 2004.

A celulase total consiste de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidasas, as quais sinergicamente hidrolisam a celulose cristalina. A atividade de celulase total é sempre determinada em substrato insolúvel, incluindo o papel de filtro Whatman nº1. A União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) recomenda a utilização do papel de filtro como substrato ideal para a determinação da atividade celulásica total por estar facilmente disponível, ser barato e os ensaios fornecerem resultados reprodutíveis (COWARD-KELLY *et al.*, 2003; BASSO, 2010).

3.6.2 Classificação e mecanismo de ação das celulasas

3.6.2.1 Endoglucanases

As enzimas endoglucanases pertencem ao complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celulosas modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC). A celulose cristalina e o algodão, substratos com elevado grau de cristalinidade, são mais dificilmente hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando, conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (MARTINS, 2005; BASSO, 2010).

Uma endoglucanase típica cliva as ligações ao longo da fibra de celulose, causando um rápido decaimento no grau de polimerização do substrato. Como as cadeias de glicana ainda continuam associadas ao resto da fibra depois da quebra de uma ligação, um ataque do tipo endoleva um tempo relativamente maior para a geração de produtos solúveis. A atividade das endoglucanases pode atuar na redução da força das fibras de celulose (GUIMARÃES et al., 2002).

3.6.2.2 Exoglucanases

As exoglucanases (também conhecidas como celobiohidrolases) têm um papel importante na degradação da celulose devido a sua estrutura tridimensional específica (BOISSET et al., 2001): o sítio ativo destas enzimas é envolto por uma extensão de peptídeos que cobre os resíduos catalíticos e gera uma estrutura semelhante a um túnel (PARSIEGLA et al., 1998). Conseqüentemente, só as extremidades das cadeias de celulose podem ser alcançadas pelo sítio ativo da enzima. Elas podem atacar as regiões cristalinas da celulose, produzindo celobiose e reduzindo lentamente o grau de polimerização do substrato (DAVIES e HENRISSAT, 1995).

Essas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela ruptura física do substrato, promovendo aumento na taxa de hidrólise da celulose por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (ZHANG e LYND, 2006).

3.6.2.3 β -glicosidases

As β -glicosidases (β -D-glucoside glicohidrolase, E.C. 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose, prevenindo o acúmulo desse dissacarídeo que é inibidor da atividade das exoglucanases.

Acredita-se também que essas hidrolisam celo-oligossacarídeos em glicose. A secreção de β -glicosidases é altamente dependente do meio de cultivo, sendo que um pH relativamente alto pode aumentar a produção da mesma (JUHA'SZ et. al., 2005; ZHANG e LYND, 2006). A atividade das β -glicosidases pode ser determinada usando celobiose, a qual não é hidrolisada por endoglucanases nem exoglucanases (GHOSE, 1987).

3.7 Mercado de Celulases

As celulases são de grande utilidade na biotecnologia, pois podem ser utilizadas em vários processos industriais. Por exemplo, na indústria têxtil as celulases são utilizadas para substituir as pedras pome no processo de estonagem. Neste processo enzimático, as fibras de celulose dos tecidos são degradadas dando um aspecto de roupas usadas. Na indústria alimentícia, as celulases podem ser empregadas em uma gama de processos. Estes processos vão desde a extração e clarificação de sucos de fruta, produção de néctar de frutos, produção de cerveja, produção de vinho até na extração do azeite de oliva e produção de ração para animais. A indústria de papel e celulose também emprega as celulases em seus processos, como na melhoria das fibras, o que permite um melhor funcionamento das máquinas empregadas na produção de papel. Ainda na indústria de papel, as celulases podem auxiliar no processo de reciclagem de papel, retirando a tinta dos papéis usados (BHAT, 2000).

De acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior do governo federal sobre o mercado de enzimas do Brasil, no ano de 2005, o total de importações brasileiras foi de US\$ 95,7 milhões, enquanto as exportações foram de US\$ 5,4 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país. Desta forma, a utilização do bagaço para produção enzimática, é uma alternativa para as indústrias de biotecnologia obter enzimas hidrolíticas e oxidativas com um custo mais barato em relação às enzimas que estão no mercado. Além destas vantagens mencionadas, a produção destas enzimas utilizando o bagaço

de cana dispõe-se também como uma maneira viável de agregar valor a estes resíduos, e outros com características similares ao bagaço de cana, como resíduos de palha e casca de arroz, sabugo de milho, entre outros, diminuindo, assim, o impacto ao meio ambiente (VALASKOVÁ e BALDRIAN, 2006).

3.8 Micro-organismos Produtores de Celulases

Celulases são enzimas produzidas por uma grande variedade de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. No entanto, relativamente poucos organismos conseguem utilizar a celulose cristalina como fonte de carbono (BHAT e BHAT, 1997; COUTINHO e HENRISSAT, 1999; MAIJALA, 2000; LYND et al., 2002).

A partir da década de 60 descobriu-se que preparados fúngicos de enzimas extracelulares eram responsáveis pela ação hidrolítica, despertando o interesse por esses micro-organismos. A ideia de aproveitar essas enzimas na conversão de resíduos celulósicos em produtos de interesse alimentar e energético surgiu em 1973 e, em 1979 a equipe do Laboratório de Pesquisas em Natick, Massachussets, anunciou o isolamento de cepas mutantes de *Trichoderma reesei* com poder hidrolítico aproximadamente vinte vezes superior ao da cepa nativa (BORTOLLAZO, 2011).

Fungos são considerados os mais importantes micro-organismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (MENEZES, 1997), e os principais celulolíticos incluem: *Trichoderma reesei* (mais recentemente denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum sp*, *Chaetomium sp* e *Humicola sp* (SILVA, 1998). Esses fungos são fontes preferidas para obtenção de celulases em função de sua capacidade de produção de proteínas extracelulares, em comparação com as bactérias celulolíticas. São produzidas basicamente endoglucanases e exoglucanases, ambas envolvidas na hidrólise da celulose. Além disso, é incluída uma série de enzimas complementares, como β -glicosidase, hemicelulases e pectinases (BERLIN et al., 2005).

O *Trichoderma reesei* QM9414 e o *Trichoderma reesei* RUTC-30 são cepas mutantes obtidas a partir do *Trichoderma reesei* QM 6a (anteriormente designado *Trichoderma viride* QM 6a) com a finalidade de obter micro-organismos com alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas (MANDELS, 1975).

As espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulases e outras enzimas hidrolíticas, sendo *Trichoderma reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. O gênero é reconhecido pela produção de vários sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos (SANTOS, 2008).

Em geral, os fungos que decompõem substâncias lignocelulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulases, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, diversos substratos são utilizados com o objetivo de se induzir e/ou medir a atividade do complexo lignocelulolítico total, tais como: algodão, papel de filtro, carboximetilcelulose (CMC) e resíduos agrícolas (AGUIAR e MENEZES, 2000).

O maior interesse nos sistemas celulolíticos fúngicos reside no fato de serem extracelulares e, por isso, de mais fácil obtenção (COUGHLAN & LJUNGDAHL, 1988).

As duas principais estratégias para a produção de celulases por micro-organismos são o cultivo em estado sólido (CES) e o cultivo submerso (CS).

A produção de enzimas fúngicas, em escala industrial no mundo ocidental, tem sido realizada pelo cultivo do fungo em meio de cultura líquido como processo majoritário, provavelmente por ser tecnologicamente fácil de executar e controlar, bem como apresentar rendimentos de produção considerados satisfatórios (SANT'ANNA Jr., 2001). No Japão, entretanto, tem-se utilizado o cultivo em substrato sólido para a produção não apenas de alimentos e bebidas tradicionais, mas também, industrialmente, para a produção de enzimas fúngicas, procedimento mais compatível com o comportamento natural dos fungos. Os avanços tecnológicos que têm sido incorporados aos processos de cultivo em substrato sólido, como o aumento dos rendimentos de produção, têm, aos poucos, alterado o perfil da produção de substâncias de origem fúngica no ocidente (BORTOLAZZO, 2011).

3.9 Extração e Purificação

As enzimas apresentam um processo de isolamento e purificação diferenciado entre si. Mesmo assim, são poucas as técnicas disponíveis. No entanto, por meio da utilização e exploração dessas técnicas, tem

sido possível isolar enzimas puras ou quase puras. Algumas técnicas utilizadas para o isolamento de proteínas também promovem uma purificação satisfatória de enzimas (GACESA e HUBBLE, 1987).

Gacesa e Hubble (1987) comentam que as extrações de enzimas intracelulares tendem a ser um processo mais complexo devido à necessidade de promover a lise da célula por meio de técnicas de rompimento mecânico, sonicação, choque osmótico e tratamentos com detergentes.

Após a extração da enzima é necessário realizar sua purificação, pois a mesma encontra-se contaminada com muitos outros componentes que constituem a célula microbiana, esses componentes devem ser reconhecidos para só então serem determinados os estágios da etapa de purificação. Os estágios iniciais do processo de purificação são caracterizados por conseguirem remover a maior quantidade de contaminantes possível, de forma facilitada e custo reduzido.

Gacesa e Hubble (1987) comentam alguns métodos de purificação como: fracionamento, cromatografia de troca iônica, cromatografia de permeação em gel, cromatografia de afinidade, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC).

A purificação em larga-escala pode ser realizada através de adaptações da metodologia utilizada em laboratório; no entanto, problemas de engenharia extremamente importantes são observados como fluxo do líquido, transferência de massa e de calor (GACESA e HUBBLE, 1987).

3.10 Hemicelulases

As enzimas hemicelulolíticas hidrolisam os polissacarídeos a monômeros de xilose, manose, glicose, galactose, arabinose e pequenas quantidades de ramnose, ácido glicurônico, ácido metil glicurônico e ácidogalacturônico (KHANDEPARKER e NUMAN, 2008). Dentro do grupo das hemicelulases, as xilanases microbianas (1,4- β -D-xilana xilano-hidrolases) são os catalisadores preferidos pela indústria para a hidrólise da xilana devido à sua alta especificidade, baixa perda de substrato e baixa geração de resíduos (MICHELIN et al., 2008).

Sun e Cheng (2002) referem-se ao fato que nos últimos anos a bioconversão das hemiceluloses tem recebido especial atenção em virtude, principalmente, de suas potenciais aplicações em vários processos de conversão da biomassa hemicelulósica em combustíveis e outros produtos de interesse. Ressaltam, ainda, que a eficiente hidrólise

da hemicelulose é fundamental para consolidação do uso de biomassas vegetais para produção de etanol. Porém, de acordo com Bon, Ferrara e Corvo (2008), o desenvolvimento comercial de hemicelulases para a hidrólise de materiais lignocelulósicos não está tão avançado quanto o de celulases, pois as preparações celulásicas comerciais correntes têm sido principalmente, desenvolvidas para a hidrólise de biomassa pré-tratada com ácido diluído, em que a hemicelulose é removida antes da sacarificação de celulose. No entanto, com o desenvolvimento de pré-tratamentos totalmente enzimáticos, as hemicelulases serão compulsoriamente requeridas.

3.11 Processos Fermentativos

Existem dois tipos de processos que são utilizados para a produção de enzimas: o cultivo submerso e o cultivo em estado sólido. Os processos de cultivo submerso são amplamente conhecidos, estudados, aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classifica em processos descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semi-contínuo (MACIEL, 2006). Atualmente, a grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente é produzida fazendo uso da CS, geralmente utilizando-se micro-organismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção destas enzimas por CS é alto e o processo torna-se, muitas vezes, economicamente inviável (PANDEY *et al.*, 2000).

Para alguns produtos, o CES apresenta vantagens em relação ao cultivo submerso (CS) como, por exemplo, na economia de água, produtividade elevada, utilização de fontes de carbono baratas (resíduos agrícolas) e reduzida possibilidade de contaminação, já que a umidade utilizada nestes cultivos é baixa e restritiva para muitos micro-organismos (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000). Além disso, a disponibilidade restrita de água em CES pode estimular a produção de alguns produtos específicos que não seriam produzidos no cultivo submerso (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004) e, em alguns casos onde os produtos podem ser produzidos por CES ou CS, o CES apresenta uma maior produtividade volumétrica (MOO-YOUNG, MOREIRA e TENDERDY, 1983; SATO e SUDO, 1999).

Tengerdy (1996) relata que a eficiência da produção de celulase por CES pode ser de cem vezes em relação a cultivos submersos. A maior parte dos trabalhos publicados em CES reporta a produção em escala de laboratório. A ampliação de escala é desafiante por causa da formação de gradientes de temperatura, umidade e concentração de

substrato, os quais se intensificam ao longo do cultivo e têm efeito adverso sobre o crescimento especialmente em leitos estáticos, mas também em leitos com agitação (HÖLKER e LENZ, 2005). Ocorrem muitas variações nas construções e operação dos reatores para tentar solucionar ou minimizar os problemas relacionados à ampliação de escala de CES. Para a escolha do modelo de reator a ser utilizado deve ser considerada a possibilidade de monitoramento e controle dos parâmetros do processo, características do micro-organismo e do substrato e custos envolvidos (RAGHAVARAO, RANGANATHAN e KARANTH, 2003). Mitchell et al. (2004) fazem uma revisão dos modelos difusão de oxigênio, enzimas e substrato em meio sólido que auxiliam no entendimento de sua influência no crescimento celular e no desempenho de reatores.

3.12 Cultivo em Estado Sólido

3.12.1 Definição

O processo em estado sólido pode ser definido pelo cultivo de micro-organismos em um suporte sólido úmido ou em substratos insolúveis que podem ser usados como fonte de carbono e fonte de energia. O cultivo ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre. Assim, aproxima do ambiente natural no qual o micro-organismo está acostumado. O substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e ao metabolismo do micro-organismo (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Este tipo de processo fermentativo tem recebido atenção especial devido à grande quantidade de enzimas extracelulares produzidas durante o processo, dentre outros metabólitos (SATO e SUDO, 1999).

O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do mesmo, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006).

Por ser um processo com baixos níveis de água residual, a CES apresenta-se como um processo industrial limpo. Pode ser classificada em dois tipos: as condições para o crescimento do micro-organismo fermentador são propiciadas pelo próprio substrato; o crescimento do micro-organismo ocorre em um suporte inerte. Em todos os casos é necessária à seleção da matéria-prima, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita e o controle da mesma, bem como a extração e a purificação dos produtos que se deseja. Dentre os

parâmetros do processo, deve-se atentar a necessidade da utilização de pré-tratamentos do substrato, como a moagem e a lavagem, e para fatores físico-químicos e bioquímicos: temperatura de incubação, transferência de massa (O_2 , CO_2) e de energia (calor produzido na fermentação), suplementação de nutrientes ao substrato (N, C, P), aeração, umidade relativa do sistema, entre outros (PANDEY, 2003; RAMOS, 2003; SILVERSTEIN, 2004; MOSIER et al., 2004; PITARELO, 2007).

3.12.2 Histórico

O cultivo em estado sólido é uma prática empregada no Oriente há muitos séculos para a obtenção de alimentos fermentados (PANDEY *et al.*, 2000). Em meados de 1940 ocorreu uma redução drástica dos estudos envolvendo CES, principalmente devido ao incentivo para a produção da penicilina por cultivo submerso (CS) em meio à Segunda Guerra Mundial. Por isso, processos envolvendo cultivo submerso tornaram-se modelos em muitos bioprocessos, sendo extensivamente estudados ao longo dos anos. A partir dos anos 70 voltou-se a atenção para CES, devido à publicação de trabalhos referentes à produção de micotoxinas por fungos. Porém, a grande explosão do uso de CES ocorreu a partir dos anos 90 (PANDEY, 2003).

Foi desenvolvida originalmente no Japão onde se utilizavam subprodutos como farelo de arroz e cascas de frutas com substrato. No estado do Paraná, desde 1986 o Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná vem desenvolvendo pesquisas relacionadas à utilização de produtos e subprodutos agrícolas do Brasil em CES para a produção de metabólitos de alto valor agregado como: etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

3.12.3 Principais características

No processo de cultivo em estado sólido devem-se levar em consideração alguns aspectos importantes, como a seleção do micro-organismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros do processo, o isolamento e a purificação do produto, dentre outros fatores (PANDEY, 2003).

Uma das características principais do cultivo em estado sólido é a baixa atividade de água do meio. Baseando-se na classificação teórica, em termos de atividade de água, somente fungos e leveduras seriam

micro-organismos adequados para o cultivo em estado sólido. Culturas de bactérias exigem alta atividade de água e, portanto, não seriam adequadas à CES. No entanto, existem relatos que demonstram que bactérias podem ser usadas nestes processos, quando bem controladas e manipuladas (PANDEY, 2003).

A utilização de altos níveis de água na CES diminui a porosidade do meio, o que dificulta a penetração do oxigênio e facilita contaminações por bactérias. Em contrapartida, meios com baixa umidade podem dificultar a acessibilidade dos nutrientes, resultando em um crescimento microbiano reduzido (GERVAIS e MOLIN, 2003; PANDEY, 2003).

Segundo Bianchi, Moraes e Capalbo, 2001; Sato e Sudo, 1999, algumas características do cultivo em estado sólido são: a distribuição microbiana, o crescimento e a formação de produto ocorrem principalmente na superfície sólida; o calor gerado durante o crescimento e metabolismo do micro-organismo eleva a temperatura do leito de substrato, causando a redução da umidade do meio; o cultivo é geralmente estacionário, devido à dificuldade de agitação do meio. A agitação pode causar danos às células, em alguns casos. Nos casos em que é necessária a agitação utilizam-se fermentadores de leito fluidizado, leito fixo e de tambor rotativo.

Outra característica relevante do cultivo em estado sólido se dá na utilização de substratos com baixo valor agregado. Existem outras vantagens que estão resumidas a seguir (SATO e SUDO, 1999; PALMA *et al.*, 2000; GERMANO, 2000; BIANCHI *et al.*, 2001; PANDEY e SOCCOL, 2001; GERVAIS e MOLIN, 2003):

- i. pode-se adicionar nutrientes suplementares ao substrato sólido;
- ii. o volume de meio reacional é reduzido, implicando em um menor investimento capital em biorreatores;
- iii. os esporos dos micro-organismos podem ser utilizados diretamente na inoculação, evitando etapas prévias, como pré-cultivos que envolvem grandes volumes de meio e tanques para seu desenvolvimento;
- iv. o crescimento dos fungos ocorre em condições similares às do seu habitat natural;
- v. o fato de o meio de cultivo apresentar baixa atividade de água reduz o problema de contaminações, especialmente por bactérias;

- vi. altos rendimentos quanto à formação de metabólitos e simplicidade nas etapas de purificação, pois os produtos estarão concentrados no líquido da extração.

A aplicação comercial da CES pode ser dividida em dois tipos: aplicações socioeconômicas, tais como a compostagem de resíduos, valorização de produtos lignocelulósicos e fibras alimentares; aplicações economicamente lucrativas, tais como, a produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados (MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2002).

Os processos de cultivo em estado sólido têm um potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (CASTILHO *et al.*, 2000; PANDEY, 1992, citados por MACIEL, 2006).

Os resultados publicados despertaram interesse para utilizar do cultivo no estado sólido em escala industrial, não apenas devido aos produtos gerados, mas também em decorrência de características do processo. Foi observado que, em alguns casos, o cultivo no estado sólido pode apresentar maior produtividade, menores custos operacionais, menor investimento inicial e produtos com maior atividade do que a cultivo submerso (LEKHA e LONSANE, 1994; VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003; PANDEY e SOCCOL, 2001).

Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produção quando comparada ao processo de cultivo submerso. Além disso, as enzimas produzidas pelo CES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HÖLKER, HÖFER e LENZ, 2004).

No entanto, o processo de cultivo em estado sólido apresenta como principais desvantagens a dificuldade de medida e controle da aeração, da temperatura e da umidade durante o processo. O tamanho das partículas do substrato interfere diretamente nessas variáveis. Partículas maiores aumentam a aeração e impedem o aquecimento do sistema pela respiração do fungo, porém limitam a superfície do substrato no qual o micro-organismo tem acesso. Por outro lado, partículas menores podem ocasionar a compactação do substrato, dificultando a aeração e o equilíbrio térmico do processo. Além disso, a homogeneidade das condições do meio também é dificultada pela não

solubilização do substrato (HONG et al., 1988; RODRIGUES e SANT'ANNA, 2001).

3.12.4 Fatores que influenciam a produção de enzimas por CES

3.12.4.1 Umidade

O estabelecimento das relações entre a fisiologia dos micro-organismos e os fatores físico-químicos é o objetivo para o desenvolvimento de modelos adequados. Esses fatores incluem temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, as propriedades do meio, natureza do substrato sólido empregado, etc. Entre vários fatores, pode-se citar como relevantes a umidade e a natureza do substrato sólido. A definição da umidade depende do micro-organismo utilizado e também da natureza do substrato. Fungos necessitam menor umidade, 40-60% de umidade pode ser suficiente, mas a seleção do substrato depende de vários fatores, principalmente os relacionados com o custo e disponibilidade e, portanto, pode envolver a triagem de resíduos agroindustriais diversos (SINGHANIA *et al.*, 2009).

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia o cultivo em estado sólido. A natureza do substrato, as necessidades do micro-organismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar (PARIS, 2008).

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio fermentado. Isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Vale mencionar que, substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando uma menor produção do produto desejado. A umidade no cultivo sólido pode variar de 18 a 85%, variando em função da capacidade de absorção do meio de cultivo utilizado (BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001, citados por LIMA, *et al.*, 2001).

3.12.4.2 Temperatura

Um outro fator que interfere no cultivo em estado sólido é a temperatura. O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos micro-organismos.

Uma das grandes dificuldades dos processos de CES é a remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria fermentada. Para a CES em larga escala, o problema se agrava e os equipamentos para refrigeração mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico (HASAN, 2002).

Embora a CES seja uma alternativa para a maioria dos processos convencionais de cultivo líquido, o controle de temperatura, em grande escala, nas fermentações em estado sólido, é um difícil problema a ser resolvido (HASAN *et al.*, 2002). Industrialmente, este problema pode ser contornado pela introdução de ar comprimido no meio de cultura, controle de temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre o cultivo, ou com trocadores de calor encamisando o fermentador com circulação de água refrigerante (SCHMIDELL *et al.*, 2001b).

3.12.4.3 pH

O controle do pH durante a CES, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.12.4.4 Medida de biomassa

A determinação do crescimento microbiano é outra dificuldade encontrada em fermentações em estado sólido. A biomassa não pode ser determinada de forma direta, pois os micro-organismos se encontram intimamente ligados ao substrato. Estudos cinéticos do crescimento microbiano na CES descrevem um baixo nível de desenvolvimento, normalmente associado a fatores como a heterogeneidade do substrato, complexidade da interação micélio/substrato e a determinação indireta

da biomassa (GERMANO, 2000). Os métodos indiretos para determinação da biomassa no cultivo em estado sólido podem basear-se nos constituintes celulares (quitina, ergosterol, ácidos nucleicos, proteína), na atividade biológica (ATP, taxa de respiração e atividade imunológica) ou no consumo de algum componente do meio (nutrientes) (DESGRANDES *et al.*, 1991).

O método mais comum é a dosagem de glicosamina que tem por princípio a quantificação da quitina, um constituinte da parede celular dos fungos que é um polímero linear insolúvel, constituído por ligações α -1,4 de acetilglicosamina. O método de dosagem do monômero baseia-se na despolimerização, por hidrólise ácida ou básica, da molécula de quitina, seguida pelo ensaio, por espectrofotometria, da quantidade de glicosamina liberada (AIDOO *et al.*, 1981 ; LEKHA e LONSANE, 1994).

A hidrólise para despolimerização da quitina é realizada tanto na biomassa obtida quanto na matriz sólida, haja visto a extrema dificuldade de se separar o substrato sólido do micélio do fungo, após o cultivo. Todavia, os substratos sólidos utilizados como fonte de carbono no cultivo em estado sólido são, geralmente, resíduos agroindustriais e, quando hidrolisados, geram açúcares com estruturas químicas semelhantes a da glicosamina, interferindo no resultado obtido através do método colorimétrico, uma vez que este detecta não somente a glicosamina, mas todos os açúcares de seis carbonos presentes no meio (PENMAN *et al.*, 2000).

Embora muitos métodos de estimativa de biomassa indireta existam para CES, nenhum é idealmente usado para todas as situações, porque praticamente todos os componentes da biomassa variam de acordo com a fase de crescimento, a natureza do meio e a relação de C/N para um mesmo meio. Porém, em alguns casos, como o enriquecimento de proteína de um subproduto, é importante saber a quantidade de proteína produzida e, assim, a estimativa de biomassa no sentido restrito, não é de interesse. Da mesma maneira, a otimização da produção de uma enzima que é relacionada ao crescimento do microrganismo pode ser realizada sem a medida de biomassa (DURAND, 2003).

Outros fatores como, tamanho da partícula, aeração e agitação do meio e concentração inicial do inóculo podem interferir no desenvolvimento do micro-organismo, alterando o produto final.

3.12.5 Principais micro-organismos utilizados no cultivo em estado sólido

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. No entanto, a maioria dos processos de cultivo em estado sólido envolve o crescimento de fungos filamentosos, pois as condições de cultivo simulam as condições ambientais em que muitos destes micro-organismos são encontrados na natureza. Por este motivo, estes fungos, suas enzimas, seus esporos e seus metabólitos são melhores ajustados ao crescimento sobre substratos sólidos úmidos (HÖLKER e LENZ, 2005).

Como exemplos, podem ser citados o uso de culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento proteico e produção de enzimas, *Mucor* ou *Rhizopus* na produção de renina microbiana, *Penicillium* para a produção de penicilina e *Fusarium* ou *Giberella* para obtenção de ácido giberélico. Também pode ser citada a utilização das bactérias *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* para produção de ácido láctico (BIANCHI, MORAES, CAPALBO, 2001).

Culturas de fungos em substratos sólidos comportam-se de modo distinto no cultivo submerso. A repressão catabólica, geralmente observada no processo submerso, pode ser contornada pelo uso do cultivo em estado sólido. No caso, por exemplo, do *Aspergillus niger* as cepas podem crescer em CES com a vantagem de que as atividades enzimáticas e a produtividade geralmente são maiores, havendo tendência à secreção mais rápida de enzimas se comparada com a técnica CS (PANDEY 1992).

3.12.6 Substrato – bagaço de cana

Comumente utilizam-se produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, que tem como característica servir de matriz sólida e fornecer carbono e fontes de energia para o crescimento do micro-organismo, além de apresentarem um custo relativamente baixo. Pode-se também incorporar solução nutriente ao substrato, com o intuito de adequá-lo às condições nutricionais do micro-organismo. A granulometria deve ser adequada para proporcionar maior grau de conversão e dissipação de calor e gases produzidos (PARIS, 2008).

Diversos resíduos agroindustriais, como os farelos de cereais, bagaço de cana de açúcar, mandioca e laranja, polpa de café entre outros, podem ser utilizados como substratos para CES. As estruturas

básicas desses materiais (celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, fibras) conferem as propriedades de sólidos aos substratos e, geralmente, servem de fontes de carbono e energia para o desenvolvimento do micro-organismo fermentador (BRAVO et al., 2000; CAPUDI et al., 2003; CANUTO, 2006). Além de ser fonte de energia fornecendo nutrientes, esses substratos servem como suporte para o crescimento dos micro-organismos.

O custo e a viabilidade de uso são os fatores primordiais a serem analisados na escolha do substrato mais adequado para o cultivo em estado sólido (PANDEY et al., 2000). A utilização de resíduos agroindustriais é vantajosa economicamente, uma vez que o custo do processo é minimizado, já que estes resíduos são subprodutos de outras atividades industriais (COELHO et al., 2001).

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das mais importantes monoculturas agrícolas. O seu processamento produz uma grande quantidade de subprodutos agroindustriais, os quais representam um grande potencial energético. A disponibilidade dos subprodutos da cana-de-açúcar tem impulsionado vários grupos de pesquisa a desenvolver tecnologias com o objetivo do seu aproveitamento integral.

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea originária da Índia e introduzida no Brasil logo após seu descobrimento. Ela cresce na maioria dos países tropicais e subtropicais e é usada principalmente para a obtenção de açúcar e álcool. Além disso, a cana-de-açúcar é uma excelente lavoura: tem crescimento rápido, é resistente e pode ser colhida duas vezes ao ano por cinco consecutivos anos (SENDELIUS, 2005).

Ao se produzir álcool e açúcar, o processamento da cana gera vários resíduos agrícolas, como a palha, o bagaço, a torta de filtro, a vinhaça e águas residuárias. Para cada tonelada de cana produzida são gerados 140 kg de bagaço (LABAT e GONÇALVES, 2008; SAAD et al., 2008) e a produção de bagaço para a safra de 2010/11 foi estimada em aproximadamente 87 milhões de toneladas.

A grande parte desse bagaço é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina. Atualmente, elas já são auto-suficientes em vapor e energia elétrica através da combustão do bagaço e algumas já até possuem termoelétricas acopladas, gerando energia adicional para as concessionárias elétricas da região. Com uma eficiência de 80 a 85 % na combustão, um excedente da ordem de 10 % tem sido gerado em usinas que utilizam caldeiras de baixa pressão e um excedente de 30 % que pode chegar a 50 % em usinas com caldeiras mais modernas de alta pressão (maior que 50bar) (GONÇALVES, 2011). Assim, um grande

volume de bagaço é acumulado nos pátios das usinas, gerando vários problemas, como a disposição do material e o risco de incêndio. Dessa forma, é crescente o número de pesquisas utilizando o bagaço como substrato para o cultivo em estado sólido.

3.12.7 Tipos de biorreatores para CES

Os biorreatores, nos processos fermentativos, devem criar um ambiente propício para o crescimento e a atividade dos micro-organismos. Para isto, o biorreator deve ser projetado de forma a permitir o estreito contato entre o meio e o micro-organismo, durante o cultivo. Um biorreator, para ser considerado ideal, deve ser construído com material atóxico, sendo capaz de suportar altas pressões, para o caso das esterilizações; possuir um sistema de agitação e/ou aeração, bem como permitir a retirada periódica de amostras, sem comprometer o processo; possuir um mecanismo de resfriamento, de forma a controlar a temperatura do ambiente de reação e, por fim, ser capaz de operar em condições assépticas (THIEMANN, 2001).

A escolha do reator adequado pode minimizar, ou até mesmo solucionar, vários problemas relativos à condução do cultivo em estado sólido (DURAND *et al.*, 1993).

Embora haja numerosos projetos para fermentadores industriais usando o cultivo submerso, houve um desenvolvimento limitado para processos usando o cultivo em estado sólido (PANDEY, SOCCOL e LEON, 2001).

Os biorreatores mais comumente utilizados em processos em estado sólido são os biorreatores em bandeja, tambor rotativo, de leito fixo e de leito fluidizado (BIANCHI, MORAES e CAPALBO 2001; ROBINSON e NIGAM, 2003).

Os reatores mais simples são os reatores em bandeja e os de colunas de leito fixo. Em escala de laboratório comumente se utilizam placas de Petri, erlenmeyer de boca larga, béqueres e outros tipos de recipientes que promovam uma boa superfície de contato entre o meio e o ar atmosférico. Usualmente em escala reduzida somente se controla a temperatura do ambiente no qual o frasco contendo o meio inoculado é incubado. Este tipo de estratégia é apropriada para avaliações iniciais sobre os tipos de micro-organismos e meios adequados ao processo de interesse, por ser prática e de fácil manuseio para um grande número de experimentos (DURAND, 2003).

Poucas melhorias têm sido desenvolvidas em termos de biorreatores para CES. Na maioria dos casos, o escalonamento se baseia em procedimentos empíricos e na mecanização de fermentadores de leito ou bandejas, utilizando-se agitadores mecânicos ou diferentes tipos de tambores rotativos (DURAND, 2003). No entanto, avanços significativos têm sido realizados no sentido de desenvolver abordagens quantitativas da transferência de calor e massa em biorreatores de CES (MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2003) e desenvolvimento de modelos matemáticos de biorreatores e de crescimento microbiano (MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2003).

A Figura 6 apresenta de uma forma resumida, os principais tipos de biorreatores utilizados no cultivo em estado sólido.

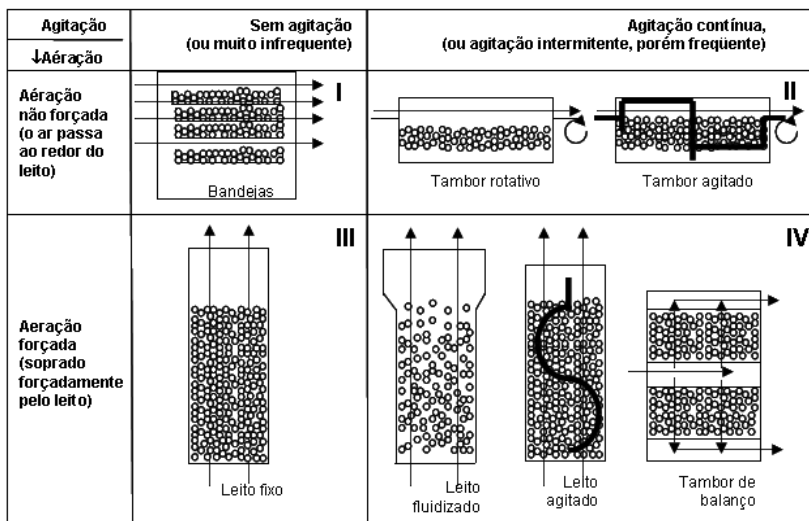


Figura 6: Tipos de biorreatores para CES. Fonte: MITCHELL et al, 2006.

3.12.7.1 Biorreatores tipo bandeja

São os mais simples biorreatores usados em CES. As bandejas podem ser construídas usando: madeira, metal (ferro ou alumínio) ou plástico. Se for de ferro, deve ser de aço inoxidável ou pintado para evitar corrosão. O fundo da bandeja deve ser perfurado de modo a sustentar o substrato e permitir a aeração (DURAND, 2003).

Geralmente esses biorreatores apresentam uma fina camada de substrato onde o micro-organismo é inoculado. São incubados em uma

câmara com controle de umidade e temperatura. O número de bandejas pode ser alterado sempre que preciso com o objetivo de atingir a capacidade de processamento exigida pelo processo.

São empregados há séculos no Oriente na fabricação de alimentos tradicionais (shoyu, miso). A dificuldade em automatizar o trabalho com as bandejas, entretanto, cria uma demanda por grande quantidade de mão de obra (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000a).

3.12.7.2 Biorreatores tipo leito fixo

Os biorreatores de leito fixo também são bastante utilizados em escala laboratorial. Neste tipo de biorreator, o meio pré-inoculado é acondicionado em colunas pequenas que são incubadas em banho termostático. Ar úmido é forçado através do leito, buscando expandir o mesmo, aumentando a superfície de contato e, assim, propiciando uma melhor transferência de calor. O ar utilizado deve ser saturado em água para minimizar a evaporação. Este sistema facilita o acompanhamento do crescimento microbiano através de técnicas de respirometria (SATO e SUDO, 1999; MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2003). Este equipamento também apresenta outras vantagens, como o baixo custo e uso relativamente fácil (DURAND, 2003).

A natureza estática do leito o torna próprio para o desenvolvimento de organismos sensíveis às tensões de cisalhamento decorrentes da agitação, como os fungos. Sua aplicabilidade em escala industrial, porém, ainda é difícil, mas boas alternativas, como o biorreator Zymotis, têm surgido (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000a). A vantagem dos biorreatores de leito fixo é que são relativamente simples e permitem um melhor controle que os de bandeja. Consequentemente, têm sido relatados muitos estudos com biorreatores de leito fixo. As desvantagens associadas com os biorreatores de leito fixo incluem dificuldades para esvaziar o biorreator ao final do processo, não uniformidade no crescimento celular e baixa remoção de calor em grande escala (DOELLE, MITCHELL, ROLZ, 1992).

3.12.7.3 Biorreatores tipo leito fluidizado e leito agitado

Neste biorreator, as partículas de substrato são fluidizadas por ar (ou outro gás) soprado verticalmente a uma velocidade suficientemente alta. É importante notar que este design não é aplicável a todos os tipos de substrato, uma vez que a aplicabilidade depende das características de fluidização das partículas (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2000a).

No caso de biorreatores de leito agitado, diversos mecanismos de agitação têm sido empregados como alternativas para obter uma melhor uniformização das propriedades do leito. Mitchell, BEROVIC e KRIEGER (2000b) apresentam várias configurações diferentes de biorreatores de leito agitado, onde, na grande maioria dos casos, a agitação é realizada pelo uso de pás dispostas no centro do biorreator.

Este modelo consiste basicamente de uma câmara vertical, a qual é alargada na parte superior para impedir que as partículas sejam carregadas para fora do biorreator. Na parte inferior costuma haver um misturador, que quebra eventuais agregados de partículas que se formam.

3.12.7.4 Biorreatores tipo tambor rotativo

Nos biorreatores de tambor rotativo, o uso da rotação promove a agitação e aeração do meio, sendo que estes biorreatores podem ainda ser utilizados em processos contínuos. Durante o cultivo é possível se fazer uma pulverização de água na superfície do leito, permitindo, desta forma, o uso de ar seco para remover o calor gerado durante o cultivo. No entanto, no substrato pode haver problemas de aglomeração ou atrito. O uso da agitação pode promover e facilitar a transferência de massa e calor e uma distribuição mais uniforme dos nutrientes (SATO e SUDO, 1999; ROBINSON e NIGAM, 2003).

A principal diferença entre os biorreatores do tipo tambor rotativo e os biorreatores de leito fluidizado e de leito agitado é a maneira pela qual ocorre o sistema de aeração do leito. Em biorreatores de leito fluidizado e reatores de leito agitado o ar é injetado diretamente no leito contendo o substrato, como ocorre nos biorreatores de leito fixo, melhorando consideravelmente a área de contato entre o gás e as partículas sólidas, enquanto que no biorreator de tambor rotativo o ar é injetado no *headspace* do biorreator. No caso de biorreatores do tipo

leito fluidizado, os mesmos não podem ser assumidos perfeitamente agitados, mas a remoção de calor por convecção é efetiva, de maneira que o balanço de energia é desconsiderado na grande maioria das vezes, limitando-se somente ao balanço de massa, especificamente, o balanço para água (MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2003).

A seguir são descritos os materiais e métodos utilizados neste trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e as metodologias utilizadas para a preparação e desenvolvimento dos cultivos em estado sólido, bem como as metodologias utilizadas para determinação das atividades enzimáticas.

Os experimentos deste trabalho foram realizados nos Laboratórios da BIOMM S.A. na cidade de Montes Claros, Minas Gerais.

4.1 Micro-organismos

As cepas utilizadas nesse trabalho foram o *Trichoderma reesei* RUT C-30 (ATCC 56765), *Aspergillus awamori* B.361 U2/1, gentilmente cedida pela Dra. Elba Pinto da Silva Bon do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Química da UFRJ, o qual foi usado como referência em comparação ao *Penicillium variabile*, gentilmente cedido pela MSc. Maria Lúcia Gomes e Souza, pesquisadora da BIOMM S.A., responsável pelo isolamento desse micro-organismo. Esse fungo selvagem foi isolado em ambientes canavieiros na região Norte de Minas Gerais, próximo a Montes Claros-MG.

Para obtenção e manutenção do estoque de esporos, foram realizados repiques em placas de Petri, contendo meio Agar dextrose batata (PDA), incubados em estufa a 30 °C até a esporulação e então recolhidos e aliquotados em microtubos contendo 20 % de glicerol e estocados em N₂(liq.).

4.2 Preparo do Inóculo

Foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio. Os frascos foram esterilizados a 121 °C por 30 minutos e, posteriormente adicionado o micélio fúngico na forma de discos de 7 mm de diâmetro e incubados a 28 °C ± 2 durante 48h sob agitação 150 rpm.

O meio utilizado para o *T. reesei* RUT C-30 foi o meio Mandels e Weber (1969) modificado e para o *Aspergillus awamori* B.361 U2/1 e o *Penicillium variabile* foi o meio Breccia et al. (1995) modificado (Tabelas 2 e 3). O uso do Tween 80 teve o objetivo de aumentar a solubilidade do meio, possibilitando maior acesso do fungo ao substrato.

Tabela 2: Composição do meio Mandels e Weber (1969) modificado (pH 5,0) para cultivo do inóculo.

Componentes	Concentração
Uréia - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	0,3 g/L
Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g/L
Fosfato de potássio monobásico - KH_2PO_4	0,2 g/L
Cloreto de cálcio - CaCl_2	0,3 g/L
Sulfato de magnésio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
Sulfato ferroso heptahidratado - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g/L
Cloreto de cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
Sulfato de manganês tetrahidratado - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0016 g/L
Sulfato de zinco heptahidratado - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0014 g/L
Extrato de levedura	6 g/L
Tween 80	0,5 mL/L
Lactose	3,0% (p/v)

Tabela 3: Composição do meio Breccia et al. (1995) modificado (pH 5,0) para inóculo.

Componentes	Concentração
Nitrito de sódio - NaNO_3	1,2 g/L
Fosfato de potássio monobásico - KH_2PO_4	6,0 g/L
Fosfato de potássio dibásico - K_2HPO_4	3,0 g/L
Cloreto de cálcio - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 g/L
Sulfato de magnésio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
Sulfato ferroso heptahidratado - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g/L
Cloreto de cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
Sulfato de manganês tetra hidratado - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0014 g/L
Sulfato de zinco heptahidratado - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0014 g/L
Extrato de levedura	12 g/L
Tween 80	0,5 mL/L
Farelo de Trigo	3,0% (p/v)

4.3 Composição do Meio de cultivo

4.3.1 Preparo do substrato

Para os cultivos em estado sólido foi utilizado como substrato o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo. O bagaço de cana foi obtido em pontos de vendas de caldo de cana-de-açúcar no comércio de Montes Claros-MG. O farelo de trigo fino, da marca Granunn, foi comprado no comércio da cidade de Montes Claros-MG. O bagaço de cana foi submetido a várias lavagens em água corrente para retirada do excesso de açúcar e sujeiras. Posteriormente foi seco em estufa e ao ar livre por 24 horas e armazenado para posterior uso nesse trabalho. Para utilização, o bagaço foi triturado em moinho elétrico de facas e submetido a três pré-tratamentos. A Figura 7 mostra o bagaço de cana-açúcar lavado, moído e pré-tratado. O farelo de trigo não passou por nenhum pré-tratamento para utilização nos experimentos.



Figura 7: Bagaço de cana lavado, moído e pré-tratado.

4.3.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de amônio

Foi baseado no protocolo de Silva (2011) e adaptado. Para o pré-tratamento utilizou-se solução de NH_4OH 15 %. Foram pesados 200 g de bagaço, colocados em béquer de 5000 mL. Adicionou-se 1000 mL de NH_4OH 15 %. Em seguida foi colocado em um banho a 100 °C por 1h. Após o término da reação, o bagaço foi lavado com água destilada várias vezes. Foi seco em estufa a 100 °C por 24hs.

4.3.1.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio

Foi baseado no protocolo de Aguiar e Menezes (2000) e adaptado. Pesou-se 200 g do bagaço de cana, adicionou-se 4000 mL da solução de hidróxido de sódio a 4 %. Em seguida, colocou-se em banho a 100 °C durante 1h. Após esse tempo lavou-se o material até o pH da solução ficar neutro. Secou-se em estufa a 100 °C por 24h.

4.3.1.3 Pré-tratamento térmico

Foi baseado no protocolo de Marques (2010) e adaptado. Pesou-se 200g do bagaço de cana em um béquer e adicionou-se água destilada

até cobrir o bagaço. O material foi autoclavado a 121 °C por 20min. Posteriormente foi lavado e seco em estufa a 100 °C por 24h.

4.4 Cultivo em estado sólido

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 30 g de substrato e solução nutritiva (Tabela 4), acrescidos de 10 g de casca de arroz para possibilitar maior aeração do meio.

Tabela 4: Composição da solução nutritiva (pH 5,0) para o cultivo em estado sólido.

Componentes	Concentração
Fosfato de amônio dibásico – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	10g/L
Sulfato de magnésio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
Cloreto de potássio – KCl	0,2 g/L
Tween 80	0,5 mL/L

Os frascos contendo a solução nutritiva e o substrato indutor foram autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Após o inóculo acrescentado, os mesmos foram incubados a 28 °C \pm 2 durante 28 dias em cultivo estático e, a cada 7 dias, era retirada uma amostra para análise enzimática. A Figura 8 mostra uma CES conduzida em frasco Erlenmeyer.



Figura 8: Cultivo em estado sólido realizado em frascos.

Para ajustar a porcentagem de umidade inicial no meio, neste trabalho foram realizadas fermentações em dois substratos diferentes, farelo de trigo ou bagaço de cana tratado termicamente, variando as proporções em 30%, 50% e 70% de umidade. O objetivo dessa parte do trabalho foi encontrar a umidade, dentre as testadas, que proporcionasse o melhor desenvolvimento do micro-organismo para expressão de suas enzimas celulolíticas.

4.5 Cultivo submerso

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio com 3g do indutor, farelo de trigo ou bagaço de cana *in natura*. Os frascos foram esterilizados a 121 °C por 30 minutos e, posteriormente adicionado 1 mL de inóculo. Para o *T. reesei* RUT C-30 foi utilizado o meio Mandels e Weber (1969) modificado e para o *Penicillium variable* foi o meio Breccia et al. (1995) modificado (Tabelas 2 e 3). Os mesmos foram incubados a 28 °C \pm 2 durante 96h e 168h, respectivamente. A cada 24h era retirada uma amostra para análise enzimática.

4.6 Extração das enzimas

No meio sólido, a cada 7 dias era retirado um frasco de cada condição de experimento. Ao meio fermentado adicionava-se 400 mL de água. Essa suspensão permaneceu sob agitação contínua por 30 minutos. Após esse tempo, o extrato foi filtrado em tela de nylon para remoção dos sólidos e uma amostra foi recolhida. Essa amostra foi submetida à centrifugação refrigerada por 20 minutos a 18.000 rpm. Para o meio submerso, a cada 24h era retirado uma amostra que era submetida à centrifugação refrigerada por 20 minutos a 18.000 rpm.

O sobrenadante foi utilizado para avaliar a produção das enzimas celulolíticas, além da medida de pH e dosagem de proteína extracelular total pelo método apresentado por Bradford, (1976). A Figura 9 representa um esquema do cultivo em estado sólido.

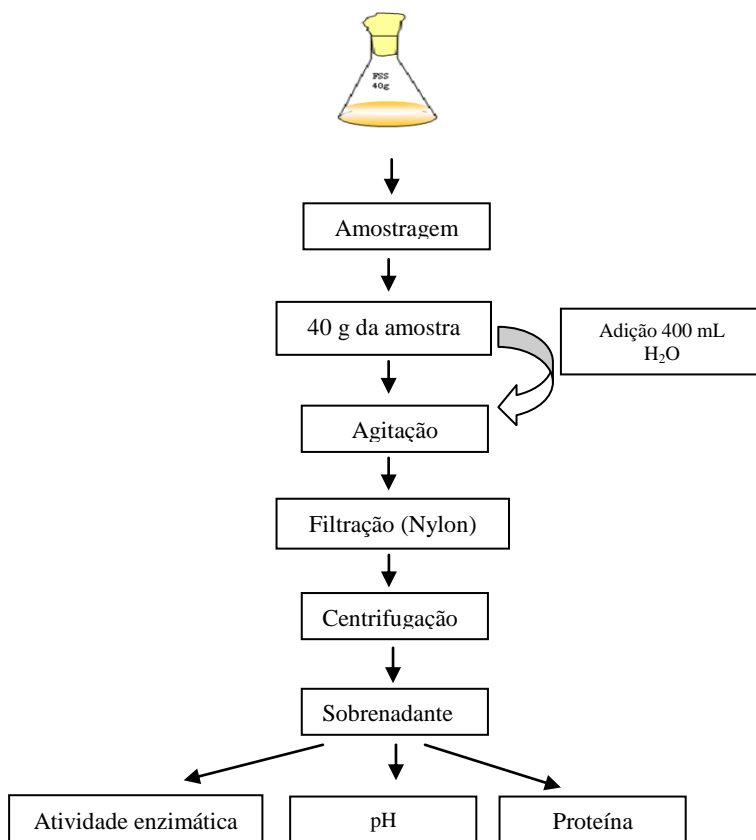


Figura 9: Esquema do processo fermentativo para obtenção do extrato enzimático.

4.7 Determinação das atividades e concentrações enzimáticas do complexo celulolítico e hemicelulolítico.

4.7.1 Atividade carboximetilcelulase – CMCase

Foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (Ghose, 1987). O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC).

O meio reacional foi formado por 0,250 mL de uma solução de CMC 4 % g/L em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,250 mL do sobrenadante das culturas (extrato enzimático). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição imediata de 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática, obtida após fervura por 5 minutos a 96 °C. Após o resfriamento dos tubos, foi feita leitura em espectrofotômetro em absorbância 540 nm (MILLER,1959). Para a determinação da concentração de açúcares, uma curva padrão foi construída de acordo com o recomendado por Ghose (1987), (Anexo 1). A atividade enzimática é expressa em: UI (μmol de produto açúcar redutor liberado / minuto).

4.7.2 Atividade FPase

Foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (Ghose, 1987) modificado. O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro.

O meio reacional foi formado por 0,5 mL do sobrenadante das culturas, 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e uma tira de papel filtro Whatmann nº1 medindo 1,0 x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de DNS a um tubo contendo 0,5 mL da mistura reacional. A determinação da concentração de açúcares redutores foi realizada em seguida, como já descrita no item 4.6.1. Para a determinação da concentração de açúcares, uma curva padrão foi construída de acordo com o recomendado por Ghose (1987), (Anexo 1). A atividade enzimática é expressa em: UI (μmol de produto açúcar redutor liberado / minuto).

4.7.3 Atividade β -glicosidase

Foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (Ghose, 1987). O método se baseia na determinação da concentração de glicose liberada quando a enzima hidrolisa a celobiose.

O meio reacional foi formado por 0,5 mL do sobrenadante das culturas e 0,5 mL de solução de substrato (celobiose 15 mM em tampão citrato de sódio pH 4,8, 50mM). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi terminada colocando os tubos em água fervente por 5 minutos. A determinação da glicose foi realizada utilizando-se o kit para análise de Glicose GOD-POD[®] da Biosystems. A atividade enzimática é expressa em: UI (μmol de produto açúcar redutor liberado / minuto).

4.7.4 Atividade hemicelulase (xilanase)

A atividade de xilanase foi dosada utilizando a xilana solúvel como substrato, (xilana birchwood, Sigma). A reação consiste na mistura contendo 0,1 mL de sobrenadante das culturas, 0,2 mL de solução de 1 % de xilana em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0. A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,3 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em banho fervente por 10 minutos. A determinação da concentração de açúcares redutores, tendo como padrão a xilana, foi realizada em seguida, como já descrita no item 4.6.1. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μmol de açúcares redutores em 1 minuto a 50 °C.

A atividade enzimática é expressa em: UI (μmol de produto açúcar redutor liberado / minuto).

4.7.5 Cálculo da atividade enzimática

$$A_E = \frac{\text{Diluição} \times \Delta\text{Abs.} \times \text{Fator} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) \times \text{Vol. total da mistura reacional (mL)}}{\text{tempo (min.)}} \quad (4.1)$$

A concentração enzimática é expressa em UI/gsubstrato:

$$C_E = \frac{A_E \times \text{Volume total de água na extração da enzima (mL)}}{\text{vol. do sobrenadante (mL)} \times \text{Total de substrato em cada frasco (g)}} \quad (4.2)$$

A diluição da ocorre quando é necessário e o Fato é obtido da curva padrão para o DNS (para dosagens de Endoglucanases e Exoglucanases, Anexo A).

No caso da β -glicosidase o fator foi obtido pela amostra padrão nas dosagens de β -glicosidase utilizando o kit GOD-POD[®] (glucose oxidase/peroxidase) da Biosystems, onde a concentração do padrão = 5,55mM/L de glicose.

4.8 pH e dosagem de proteína

O pH foi medido sobre uma suspensão obtida após a centrifugação da homogeneização de 40 g de fermentado em 400 ml de água destilada a qual permaneceu em agitação contínua durante 30 minutos. A dosagem de proteína total foi realizada pelo método proposto por Bradford (1976).

Na próxima seção são apresentados os resultados experimentais obtidos e a sua discussão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos e discussão dos cultivos em estado sólido realizados com *Trichoderma reesei* RUT C-30 e com o *Penicillium variable*, a melhor porcentagem de umidade inicial no meio de cultivo dentre as testadas, o cultivo sólido em diferentes substratos e na mistura de substratos. Também será apresentada uma comparação da produção de celulasas e xilanase por esses fungos, em cultivo submerso e cultivo em estado sólido, bem como uma análise da produção dessas enzimas por cultivo submerso e no estado sólido.

5.1 Cultivo em estado sólido pelo *Trichoderma reesei* RUT C-30

A seguir serão discutidos os resultados obtidos pelo *T.reesei* RUT C-30 em cultivo em estado sólido em diferentes porcentagens de umidade inicial do meio, substratos indutores e mistura de substratos.

5.1.1 Em diferentes porcentagens de umidade inicial no meio

O teor de umidade no meio de cultivo é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido e, por isso, é um dos principais parâmetros que influencia o cultivo em estado sólido. O teor de água adequado para o crescimento microbiano deve permitir a formação de um filme de água na superfície do substrato, facilitando, assim, a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor. Portanto, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização dos processos de cultivo em estado sólido (GERVAIS e MOLIN, 2003; SANCHEZ, 2009).

As Tabelas 5 e 6 referem-se ao cultivo do *T.reesei* RUT C-30 no meio com bagaço de cana tratado termicamente ou meio contendo farelo de trigo, nas diferentes porcentagens de umidade inicial.

Com a análise dos resultados, foi possível observar que tanto para a produção de CMCase, quanto para a produção de FPase, o meio que continha bagaço de cana tratado termicamente foi melhor do que o farelo de trigo, com 21 dias de cultivo (Tabela 5 e 6). O aumento da produção das enzimas foi proporcional ao teor de umidade e os picos de atividade para CMCase atingidos com 30%, 50% e 70% foram de

101,36; 124,89 e 217, 93 UI/ g substrato, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para a FPase, sendo os picos de 1,75; 2,95 e 5,45 UI/ g substrato, respectivamente. Isso demonstra a importância da quantidade de água no meio de cultivo para o fungo desenvolver-se e expressar as enzimas. A baixa atividade de água influencia diretamente no metabolismo responsável pela produção enzimática.

Tabela 5: Atividade enzimática de CMCase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

CMCase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	36,816	51,474	49,098	8,038	42,390	72,645
14	30,279	9,111	69,514	74,595	54,501	137,775
21	29,590	27,113	45,466	101,364	124,899	217,935
28	29,453	11,905	51,854	71,430	103,223	175,851

Tabela 6: Atividade enzimática de FPase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagem de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

FPase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	1,232	1,817	3,627	0,509	2,037	3,219
14	1,892	0,530	2,104	2,009	2,622	3,870
21	0,723	0,874	1,641	1,748	2,952	5,448
28	1,830	0,499	1,879	1,631	2,402	5,235

A análise das Tabelas 7 e 8 mostra que o teor de umidade inicial não foi um fator determinante para produção de xilanase e β -glicosidase. O pico de produção da xilanase foi observado no sétimo dia de cultivo (1021,7 UI/g substrato) com 70% de umidade, no meio com farelo de trigo (Tabela 7). No caso dessa enzima, principalmente no meio contendo bagaço de cana tratado termicamente, o teor de umidade inicial não foi um fator determinante. No meio com farelo de trigo, a produção com 50% de umidade foi cerca de 42,8% da atividade com

70%. Já no meio com 30% essa diferença foi de 98,1% relação ao pico máximo de atividade com 70% de umidade.

A produção de β -glicosidase pelo *T.reesei* RUT C-30 atingiu o pico de concentração com 28 dias de cultivo (2,42 UI/g substrato), no meio que continha farelo de trigo com 70% de umidade (Tabela 8). Com o substrato bagaço de cana, a produção de β -glicosidase foi menor quando comparada à alcançada no farelo de trigo. Neste caso, a umidade não foi um parâmetro determinante, pois houve pouca variação na medida de atividade detectada.

O fungo *T. reesei* RUT C-30, apesar de ser um dos micro-organismos mais estudados em relação à produção de celulases, produz pouca β -glicosidase devido a mutações em seu genoma, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação da biomassa (KIM, KANG e LEE, 1997).

Os resultados revelam que, para o *T. reesei* RUT C-30, a melhor umidade inicial para produção de enzimas, dentre as testadas, foi de 70%. Dessa forma, para os experimentos seguintes, este valor de porcentagem de umidade inicial foi utilizado para produção das enzimas celulolíticas e xilanase em cultivo em estado sólido.

Tabela 7: Atividade enzimática de xilanase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

xilanase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	1002,46	437,228	1021,70	42,371	44,594	43,392
14	418,296	236,794	449,849	37,713	53,850	60,100
21	114,911	128,734	107,639	20,374	53,850	45,856
28	75,005	24,611	77,078	15,596	15,356	19,593

Tabela 8: Atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

B-glicosidase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	1,937	1,689	2,169	0,066	0,219	0,162
14	0,962	0,481	1,197	0,079	0,401	0,401
21	1,338	1,217	0,877	0,142	0,538	0,323
28	1,693	0,146	2,418	0,025	0,050	0,118

5.1.2 Cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores

Após a determinação do teor de umidade para farelo de trigo e bagaço tratado termicamente, foram realizados experimentos com diferentes substratos: farelo de trigo, ou bagaço de cana *in natura*, ou bagaço de cana tratado termicamente, ou tratado com hidróxido de sódio, ou tratado com hidróxido de amônio, acrescidos de casca de arroz e solução nutritiva (Tabela 4). O objetivo era determinar a melhor condição de pré-tratamento para o crescimento e a indução das enzimas celulolíticas e xilanase aproveitando o resíduo do bagaço de cana-de-açúcar. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de celulasas e xilanase por CES representa uma importante alternativa para redução dos custos dessas enzimas.

As Figuras 10 e 11 mostram a produção de celulasas e xilanase pelo *T. reesei* RUT C-30 obtida nos diferentes meios testados.

Observa-se que, para produção de CMCase e FPase, o meio que continha bagaço de cana moído e tratado termicamente foi o melhor indutor, alcançando pico de produção de 205,9 UI/g substrato e 6,09 UI/g substrato respectivamente, com 21 dias de cultivo (Figura 10). É interessante notar que o meio contendo bagaço *in natura* apresentou resultados próximos aos do tratado termicamente, sendo o pico de produção de CMCase=197,8 UI/g substrato e FPase=5,6 UI/g substrato, com 14 dias de cultivo (Figura 10). Diante do exposto, presume-se que o pré-tratamento térmico pode ter aumentado a acessibilidade do fungo ao substrato proporcionando maior expressão das enzimas, pois no meio tratado termicamente, a produção foi de 1,04 e 1,09 vezes maior para CMCase e FPase, respectivamente.

O trabalho desenvolvido por Basso (2010) mostrou atividade de CMCase de 3,5 UI/g e FPase de 2,3 UI/g, utilizando *T. reesei* RUT C-30 em CES com bagaço de cana *in natura* como indutor, em 15 dias de cultivo. Portanto, os valores obtidos no presente trabalho para CMCase e FPase foram superiores para ambas enzimas, 56,5 e 2,43 vezes, respectivamente. No entanto, a comparação dos resultados de diferentes estudos é limitada nas diferentes condições operacionais utilizadas e nos cálculos realizados para chegar aos valores encontrados. Chahal (1985), por exemplo, reporta valores de atividade de FPase superiores a 300 UI/g de celulose utilizando uma linhagem mutante de *T. reesei*, após 22 dias de CES em substrato de palha de trigo pré-tratada em meio alcalino.

Vale ressaltar que existe a possibilidade de melhoria dos pré-tratamentos testados nesse trabalho, para os substratos indutores de celulasas. Uma estratégia poderia ser o aumento do tempo de reação na autoclave, causando um maior inchamento da fibra de celulose no meio ou testando outras concentrações de reagentes nos tratamentos alcalinos, uma vez que, para essas enzimas, não houve grande diferença entre esses pré-tratamentos. Porém, alguns pré-tratamentos severos podem gerar compostos como furfural, que são inibidores do crescimento microbiano (MARTÍN et al., 2007) que, conseqüentemente podem prejudicar a produção enzimática e a fermentação etanólica. Assim, deve ser feita a avaliação da viabilidade do uso de pré-tratamentos para o aumento da indução enzimática pelos substratos lignocelulósicos.

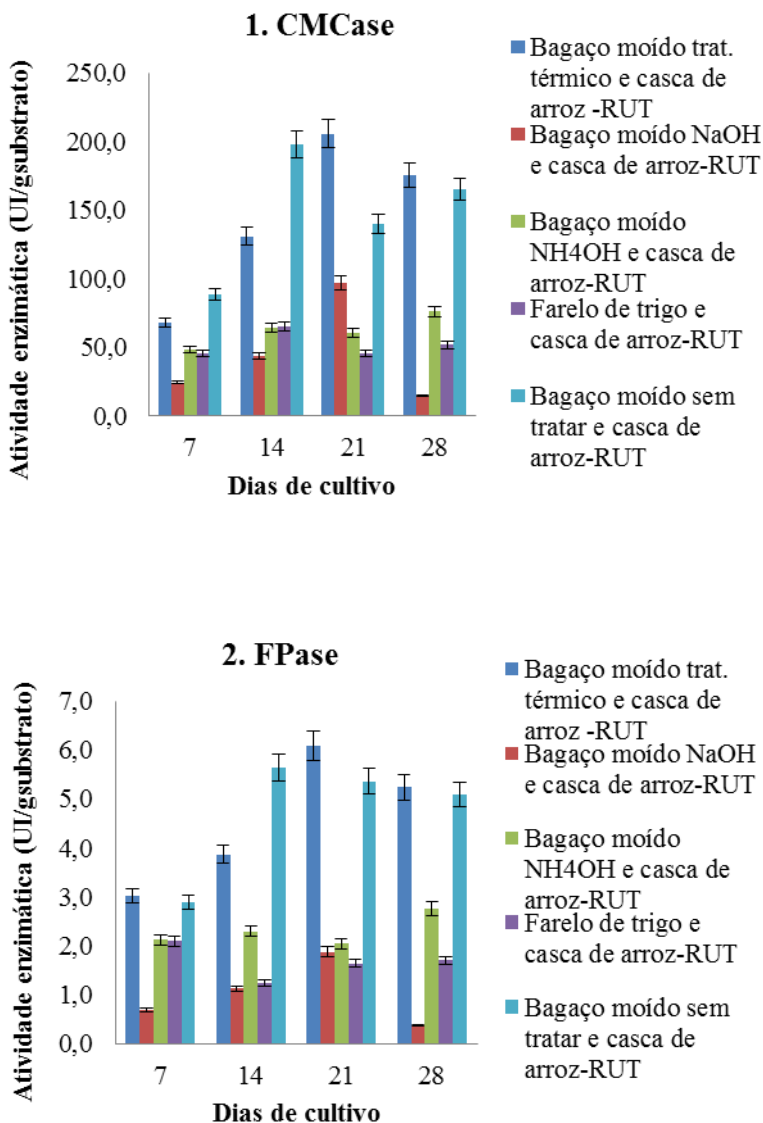


Figura 10: Atividade enzimática de CMCase (1) e FPase (2) do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

A produção de β -glicosidase pelo *T. reesei* RUT C-30, como já mencionado, é inexpressiva. Nesse trabalho obteve-se níveis de 2,46 UI/g substrato no meio que continha bagaço tratado com NaOH, em 7 dias de cultivo (Figura 11). Altos níveis de β -glicosidase são importantes para a completa conversão da celulose, devido à inibição pela celobiose, das atividades celobiohidrolase e endoglucanase. Para complementar o extrato enzimático, é necessário a produção de β -glicosidase por algumas espécies de *Aspergillus* (GARCIA-KIRCHNER, SEGURA-GRANADOS e RODRIGUES-PASCUAL, 2005).

Para xilanase, os meios com bagaço de cana não foram bons indutores, apresentando valores muito menores do que os com farelo de trigo, que obteve um pico de 434,8 UI/g substrato, com 7 dias de cultivo (Figura 11). A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal. Esse grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, dificultando a ação das celulases durante o processo de sacarificação (FARINAS et. al., 2008). A remoção parcial da hemicelulose pode explicar o menor nível de xilanase obtido nos meios com bagaço de cana pré-tratados em relação ao farelo de trigo.

Vale ressaltar que, tanto para β -glicosidase quanto para xilanase produzidas pelo *T. reesei* RUT C-30 em todas as condições de substrato, houve um decréscimo na atividade enzimática com o aumento do tempo de cultivo (Figura 11). Isso pode ser ter ocorrido devido à formação de metabólitos secundários resultantes do metabolismo microbiano durante os 28 dias de cultivo, além do esgotamento de nutrientes com o passar do tempo, afetando a indução dessas enzimas.

Os valores de atividade enzimática obtidos nos diferentes substratos indutores, durante os 28 dias de fermentação encontra-se no Anexo B.

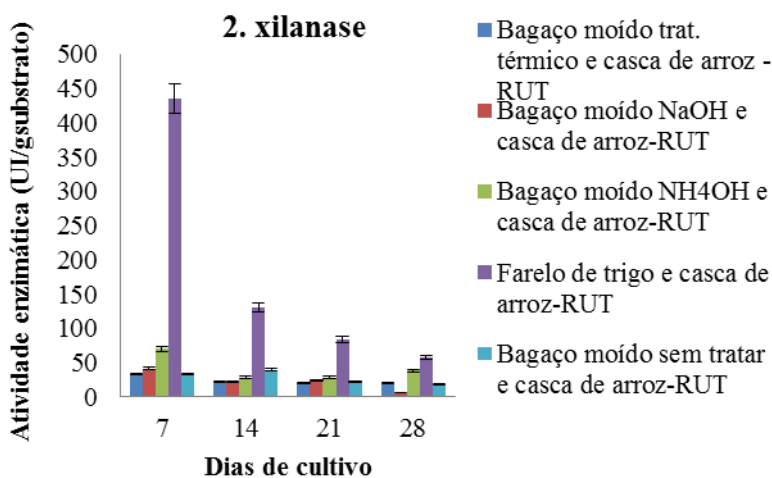
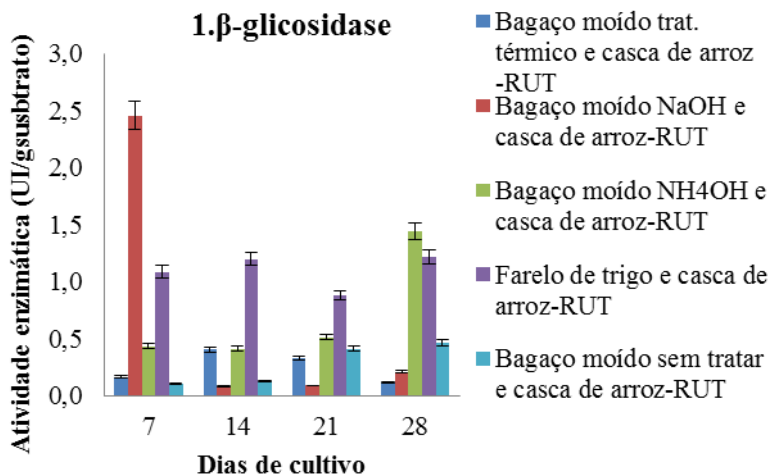


Figura 11: Atividade enzimática de β -glicosidase (1) e xilanase (2) do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

5.1.3 Cultivo em estado sólido com mistura de substratos indutores

No intuito de aumentar a produção das celulases e melhorar a utilização do bagaço de cana como substrato indutor, foram feitos experimentos com uma mistura de substratos contendo 75 % de farelo de trigo e 25 % de bagaço de cana em diferentes condições: *in natura*, tratado com NaOH 4 %, NH₄OH 15 % e termicamente, adicionados de casca de arroz e solução nutritiva (Tabela 4).

Com a mistura de farelo de trigo e bagaço *in natura* foram obtidos valores máximos de 93,7 UI/ g substrato para CMC_{Case}, em 21 dias de cultivo, e 3,71 UI/ g substrato para FPase, na mistura de farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente, em 14 dias de cultivo (Figura 12). A CES utilizando apenas bagaço de cana como indutor mostrou valores máximos de 205,9 UI/g substrato e 6,09 UI/g substrato, respectivamente (Figuras 10). Sendo assim, a produção da CMC_{Case} e FPase através do *T. reesei* RUT C-30 foi de 219,7% e 163,7% melhor, respectivamente, no meio sem mistura de substratos. O farelo de trigo é conhecido como bom indutor para espécies de *Aspergillus*, entretanto para o *T. reesei* RUT C-30 não se mostrou bom indutor, nem quando misturado com o bagaço de cana. O bagaço de cana tratado termicamente continuou expressando melhor as enzimas do que os demais tratamentos, como observado anteriormente. Além disso, o bagaço de cana *in natura* também continuou apresentado resultados próximos aos do tratado termicamente. Isso mostra o potencial do bagaço de cana como substrato indutor no processo de produção dessas enzimas e seu reaproveitamento no processo fermentativo.

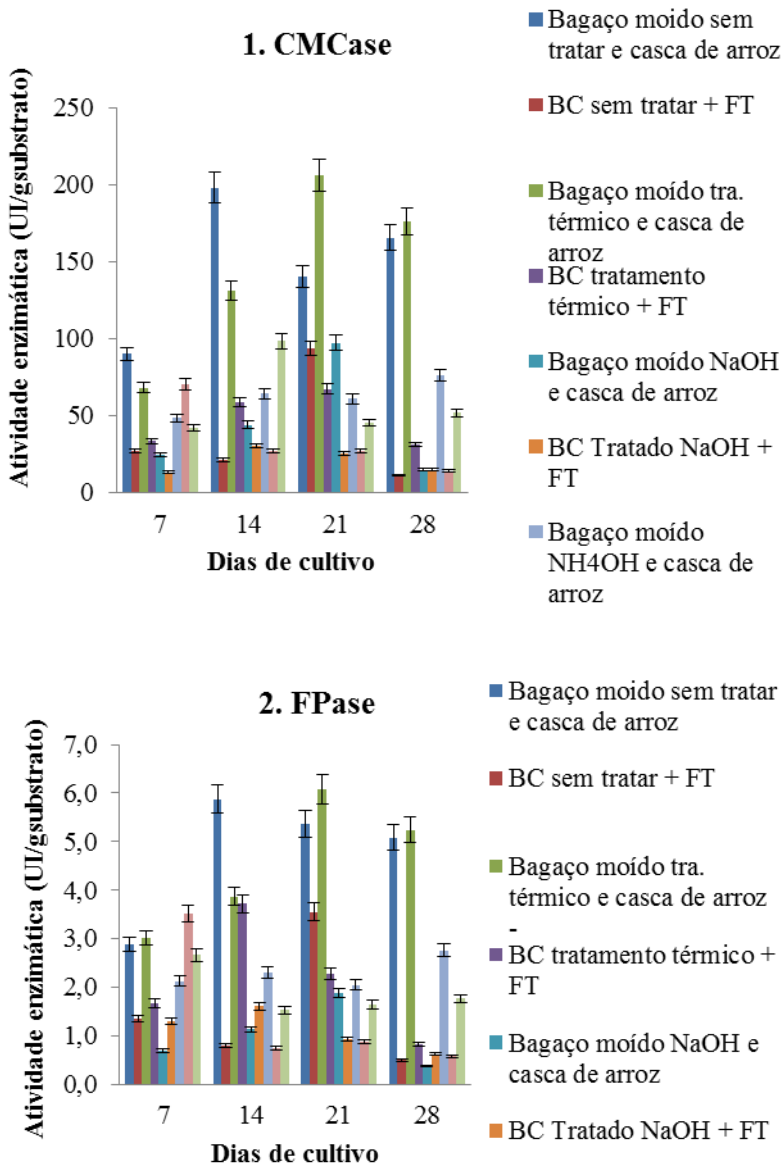


Figura 12: Comparação da atividade enzimática de CMCase (1) e FPase (2) do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido, em meio sem mistura e com mistura de diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

Para β -glicosidase a mistura dos meios de bagaço de cana *in natura* com farelo de trigo aumentou a produção da enzima. O pico foi de 4,18 UI/g substrato, com 21 dias de cultivo (Figura 13), enquanto que no meio que continha apenas bagaço de cana *in natura*, sem mistura, o pico de produção foi de 0,462 UI/ g substrato com 28 dias (Figura 11). Assim, para esse substrato, o aumento do meio contendo a mistura foi de 9,05 vezes. Esse aumento é significativo para a produção dessa enzima com o *T. reesei* RUT C-30. Porém fungos conhecidos como referência para produção dessa enzima produzem maiores níveis de β -glicosidase, como por exemplo, fungos do gênero *Aspergillus*.

No entanto, o meio com a mistura de bagaço de cana tratado com NaOH e farelo de trigo obteve pico de produção de 2,06 UI/g substrato, em 7 dias de cultivo, quando comparado com o pico do experimento anterior (2,46 UI/ g substrato), em que a máxima produção também foi com 7 dias (Figura 11). No meio contendo bagaço de cana tratado com NaOH sem mistura, houve uma redução de 1,19 vezes.

Em relação à xilanase, a mistura de substrato foi melhor do que o meio apenas com bagaço de cana ou farelo de trigo sem mistura (Figura 13). O meio contendo a mistura de bagaço tratado com NaOH e farelo de trigo atingiu pico de 659,78 UI/g substrato em 7 dias de cultivo. A produção aumentou em 1,52 % em relação ao meio com farelo de trigo sem mistura. Em relação ao meio contendo bagaço de cana tratado com NaOH sem mistura, o aumento foi de 15,99 vezes. Um aumento significativo, mostrando que, quando combinado ao farelo de trigo, o bagaço de cana pode ser reaproveitado como substrato indutor para produção dessa enzima.

Os valores de atividade enzimática obtidos nos meios contendo mistura de substratos indutores, durante os 28 dias de fermentação encontra-se no Anexo C.

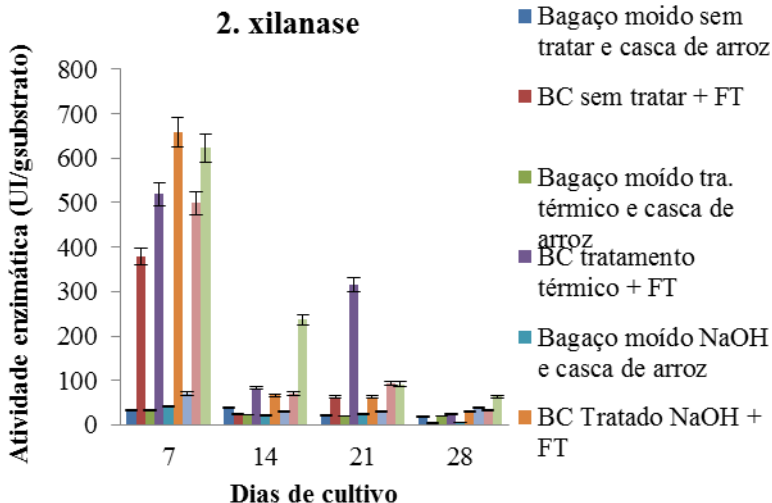
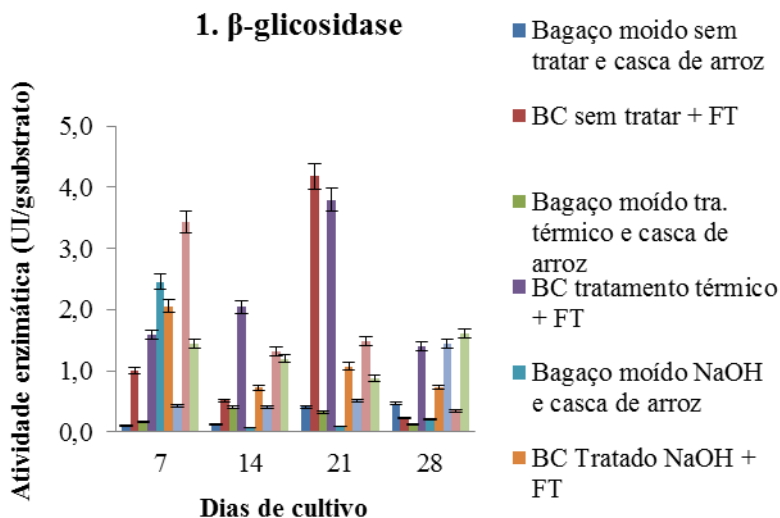


Figura 13: Comparação da atividade enzimática de β -glicosidase (1) e xilanase (2) do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido em meio sem mistura e com mistura de substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

5.2 Cultivo em estado sólido por *Penicillium variable*

A seguir serão discutidos os resultados obtidos pelo *P.variable* em cultivo em estado sólido, em diferentes porcentagens de umidade inicial do meio, substratos indutores e mistura de substratos.

5.2.1 Em diferente porcentagem de umidade inicial no meio

Conforme discutido no item 5.1.1, o teor de umidade no meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia o cultivo em estado sólido. Assim, para o *P. variable* também foram testadas as porcentagens de umidade de 30 %, 50 % e 70 %. De maneira análoga aos experimentos com *T. reesei* RUT C-30, a melhor umidade, dentre as testadas, para o crescimento do fungo e expressão das celulasas foi de 70 %. Neste caso, o meio contendo farelo de trigo foi o melhor indutor para produção das celulasas do que o meio contendo bagaço de cana tratado termicamente. O farelo de trigo, além de ter sido o melhor substrato indutor, complementa o meio, podendo ser utilizado como fonte de carbono. Para β -glicosidase, FPase e xilanase o pico de produção foi com 7 dias de cultivo, mostrando valores de 43,167; 1,077 e 95,261 UI/g substrato, respectivamente. Para CMCase foi 75,972 UI/g substrato com 21 dias de cultivo, como pode-se observar nas Tabelas 9, 10, 11 e 12.

Tabela 9: Atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de *P.variable*, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

β - glicosidase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmi co 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	32,088	18,780	43,167	0,046	0,433	1,751
14	14,478	33,645	42,808	0,030	0,446	1,542
21	24,532	33,705	36,889	0,157	1,262	1,311
28	22,791	28,540	42,810	0,101	0,112	1,111

Tabela 10: Atividade enzimática de FPase do extrato obtido de *P.variable*, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

FPase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	0,681	0,571	1,077	0,609	0,626	0,643
14	0,224	1,053	1,060	0,358	0,296	0,399
21	0,698	0,788	0,939	0,399	0,279	0,406
28	0,702	0,915	1,032	0,344	0,334	0,533

Tabela 11: Atividade enzimática de xilanase do extrato obtido de *P.variable*, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

xilana se	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	65,768	70,487	95,261	72,846	70,782	73,731
14	27,693	67,538	76,091	41,525	63,468	72,670
21	36,895	54,856	61,344	33,386	45,536	48,486
28	31,852	32,088	52,379	29,551	40,405	42,941

Tabela 12: Atividade enzimática de CMCase do extrato obtido de *P.variable*, em cultivo em estado sólido de bagaço de cana ou farelo de trigo, em diferentes porcentagens de umidade inicial, durante 28 dias, em UI/g substrato.

CMCase	Farelo de trigo 30%	Farelo de trigo 50%	Farelo de trigo 70%	Bag. Cana trat. Térmico 30%	Bag. Cana trat. Térmico 50%	Bag. Cana trat. Térmico 70%
7	33,306	22,021	49,753	12,800	26,150	27,595
14	29,315	54,777	57,805	16,860	24,429	27,320
21	62,071	65,030	75,972	19,956	14,176	19,956
28	47,620	60,695	74,320	14,974	12,772	15,552

5.2.2 Cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores

De acordo com Souza (2011), o *Penicillium variable* foi um fungo que se apresentou como um bom produtor de β -glicosidase, atingindo pico de produção em cultivo submerso de 1,34 UI/mL, maior

que o controle (cerca de 75% maior) *Aspergillus awamori* nas mesmas condições de cultivo.

O mercado atual oferece muitos coquetéis de celulase que contêm níveis baixos de β -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos de celulose. Uma vez que a celobiose apresenta um poder inibidor mais forte do que a glicose para as exoglucanases e sua hidrólise ocorre através da ação das enzimas β -glicosidasas, é indicado que se adicione no meio reacional uma quantidade mínima desta enzima proveniente de outras fontes de complexos enzimáticos. Desta forma, há uma diminuição da concentração de celobiose no meio reacional, ocasionando diminuição da inibição e aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996; SUN e CHENG, 2002).

O objetivo da utilização desse fungo nesse trabalho foi produzir β -glicosidase, CMCase, FPase e xilanase com a utilização de diferentes substratos indutores, tais como: farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, bagaço de cana tratado termicamente, tratado com hidróxido de sódio, tratado com hidróxido de amônia e a mistura desses substratos indutores. Com isso, foi determinado o melhor substrato para crescimento e produção das enzimas celulolíticas, aproveitando o resíduo do bagaço de cana-de-açúcar. Dessa maneira, os resultados alcançados nesta parte do trabalho podem contribuir para a finalidade de obtenção de um conjunto de enzimas celulolíticas satisfatório para ser utilizado na hidrólise celulósica para obtenção de etanol de segunda geração.

A análise dos resultados dos cultivos em estado sólido que foram realizados com *Penicillium variable*, mostrou que o meio contendo farelo de trigo foi melhor para indução e produção das enzimas celulolíticas e xilanase. Para β -glicosidase, FPase e xilanase o pico de produção foi de 43,167; 1,077 e 95,261 UI/g substrato, respectivamente, com 7 dias de cultivo. Para CMCase o pico foi de 75,972 UI/g substrato, em 21 dias de cultivo (Figuras 14 e 15). Nota-se que o *P.variable* produziu concentrações baixas de FPase.

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, ou mesmo tratado, não foi bom indutor quando comparado ao farelo de trigo para produção das enzimas celulolíticas e xilanase. Os picos alcançados para CMCase, β -glicosidase e xilanase foram de 27,59; 1,75 e 73,73 UI/g substrato, respectivamente, no meio contendo bagaço de cana tratado termicamente em 7 dias de cultivo (Figuras 14 e 15). Já para a FPase, o pico foi de 0,681 no meio contendo bagaço de cana *in natura*, em 7 dias

de cultivo (Figura 14). Possivelmente, o maior teor de lignina no bagaço tenha dificultado a indução da atividade enzimática.

Os valores de atividade enzimática obtidos nos diferentes substratos indutores, durante os 28 dias de fermentação encontra-se no Anexo D.

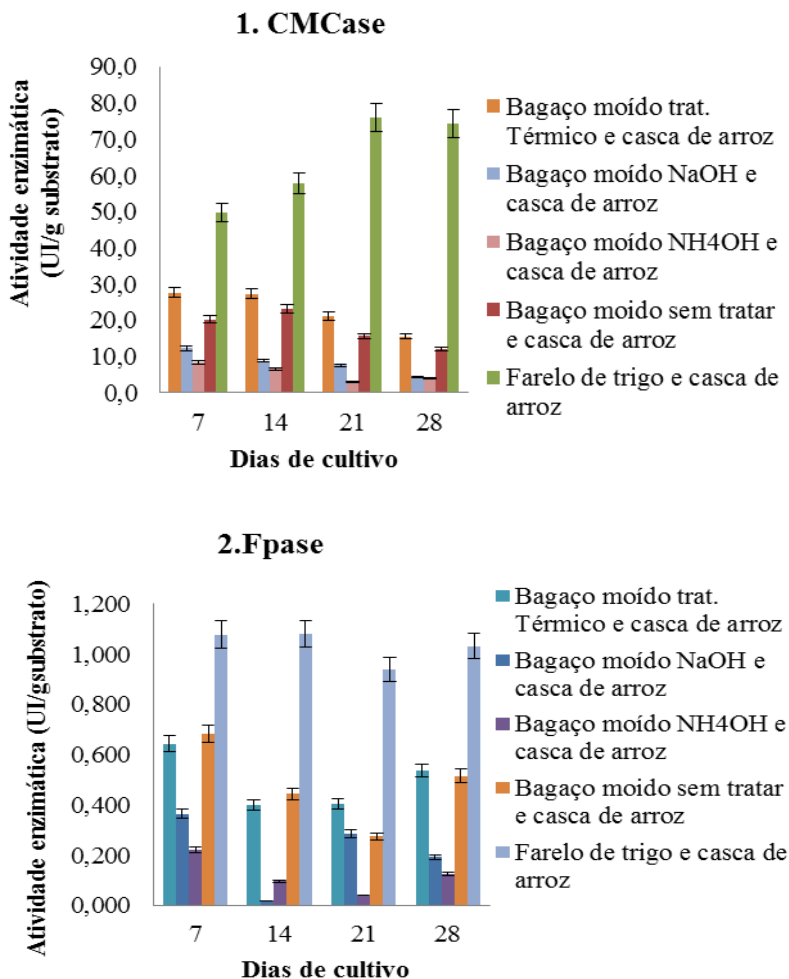


Figura 14: Atividade enzimática de CMCase (1) e FPase (2) do extrato obtido de *P. variabile*, em cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

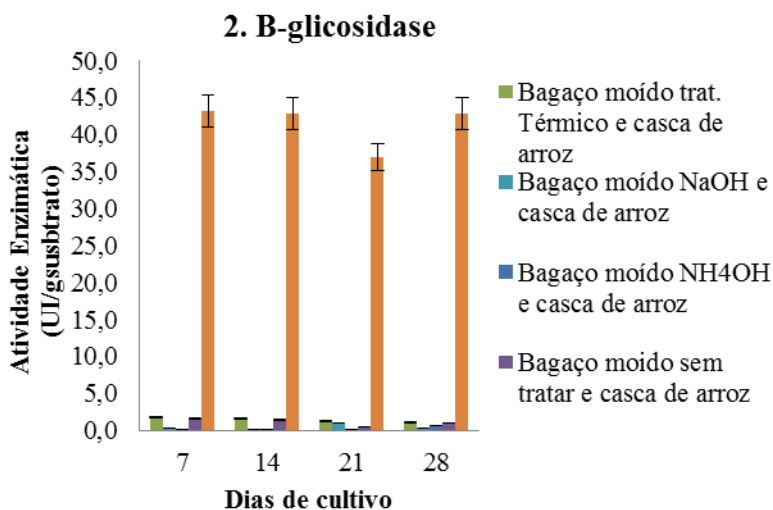
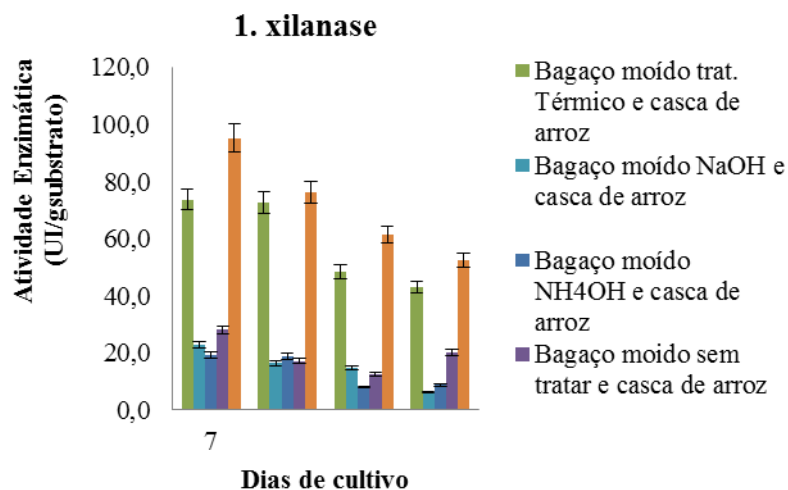


Figura 15: Atividade enzimática de β -glicosidase (1) e Xilanase (2) do extrato obtido de *P. variabile*, em cultivo em estado sólido nos diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

O *Aspergillus awamori* foi o fungo utilizado como referência padrão de produção de β -glicosidase. O cultivo deste fungo em CES apresentou valores de β -glicosidase de 39,595 UI/g substrato, em 14 dias de cultivo, enquanto que o *P. variable* mostrou valores de produção de 43,167 UI/g de substrato, com 7 dias de cultivo (Figura 16). Esse fato confirma que a utilização de *P. variable* para produção de β -glicosidase pode ser interessante, pois além do maior nível de atividade, o pico de produção foi atingido em menor tempo. Além disso, altas concentrações enzimáticas de CMCase e xilanase foram obtidas no meio contendo farelo de trigo. Entretanto, a produção de β -glicosidase por *A. awamori* com o uso de bagaço de cana-de-açúcar tratado termicamente, como substrato indutor, mostrou pico de 12,623 UI/g substrato, enquanto que o *P. variable* atingiu produção máxima de 1,751 UI/g substrato, no mesmo meio de cultivo (Figura 16). Esses resultados mostram que estudos para melhor utilização do bagaço como substrato indutor devem ser realizados objetivando melhorias no processo.

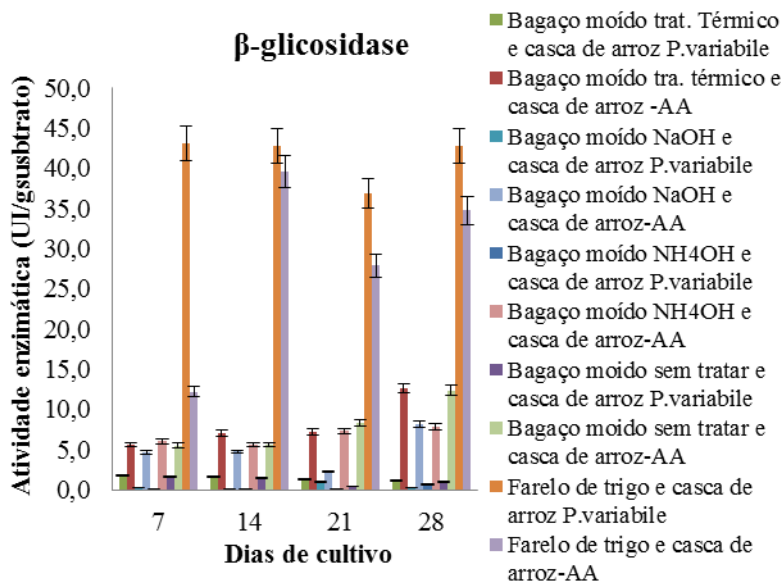


Figura 16: Comparação da atividade enzimática de β -glicosidase do extrato obtido de *P. variable* e *A. awamori*, cultivo em estado sólido nos diferentes substratos indutores, durante 28 dias de cultivo.

5.2.3 Cultivo em estado sólido com mistura de substratos indutores

Como observado no item 5.2.2, a produção enzimática pelo *P. variable* no meio com bagaço de cana foi muito baixa. Assim, para melhorar a produção enzimática e o aproveitamento do resíduo bagaço de cana, foram realizadas fermentações com uma mistura de 75 % de farelo de trigo e 25 % de bagaço de cana-de-açúcar como substratos indutores. Para todas as enzimas celulolíticas estudadas, o meio contendo a mistura aumentou a produção enzimática quando comparado ao meio com bagaço de cana sem mistura (Tabela 11). Para xilanase, a mistura aumentou a produção enzimática somente em relação ao bagaço, ao passo que a melhor produção dessa enzima foi com a utilização de farelo de trigo sem mistura.

Os resultados consolidados mostraram que para a β -glicosidase o pico foi de 56,995 UI/g substrato, no meio com farelo de trigo e bagaço de cana *in natura* (Tabela 13), em 28 dias de cultivo, o que representa um aumento de 38,02 vezes em comparação ao meio apenas com bagaço de cana. O melhor resultado para produção desta enzima, que havia sido alcançado com utilização de farelo de trigo, teve um aumento de 1,33 vezes.

Para CMCase o pico de produção de 91,042 UI/g substrato foi atingido com 14 dias, no meio com farelo de trigo e bagaço de cana *in natura* (Tabela 13). A comparação destes resultados com os anteriores mostra um aumento de produção de 3,95 e 1,2 vezes, quando comparados com os substratos bagaço e farelo, sem misturas, respectivamente.

Do mesmo modo, a análise das atividades alcançadas para a FPase, mostra que o fungo não apresentou boa produção, houve um aumento com a mistura de substratos. O pico de produção foi de 1,669 UI/g substrato, no meio com farelo de trigo e bagaço de cana *in natura*, em 28 dias de cultivo (Tabela 13). Esse aumento é de 2,45 e 1,55 vezes em relação ao bagaço de cana e farelo de trigo, sem mistura, respectivamente.

Para a xilanase o pico de produção foi atingido no 7º dia de cultivo no meio com a mistura de farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente (Tabela 13). Porém, o meio apenas com farelo de trigo foi melhor em relação a mistura, cerca de 1,17 vezes maior.

Tabela 13: Comparação dos valores máximos de produção das enzimas celulolíticas e xilanase pelo *P. variabile* na mistura de substratos e no meio puro em UI/g substrato.

	Bagaço de cana in natura			Tratado com NaOH			Tratado com NH ₄ OH			Tratado termicamente		
	Mistura	Meio Puro	Mistura	Meio Puro	Mistura	Meio Puro	Mistura	Meio Puro	Mistura	Meio Puro	Mistura	Meio Puro
β -sidade	56,995	1,578	51,945	0,973	31,70	0,673	30,589	1,751				
CMCase	91,042	23,053	75,972	12,30	59,663	8,313	68,953	27,59				
FPase	1,669	0,681	1,087	0,365	1,500	0,224	1,469	1,077				
xilanase	68,423	28,136	75,552	22,94	58,159	19,28	81,399	73,73				

As análises dos resultados mostram que a produção de celulasas pelo *P. variabile* sofreu interferência dos pré-tratamentos, uma vez que os picos foram atingidos no meio em que continha farelo de trigo e bagaço de cana *in natura*, exceto para xilanase que foi no meio com farelo de trigo e bagaço de cana tratado termicamente. O tratamento térmico causa um aumento de volume devido ao inchamento nas fibras de celulose permitindo maior acessibilidade do fungo ao substrato. Supõe-se que os pré-tratamentos básicos podem ter gerado subprodutos que inibiram a produção de celulasas pelo fungo *P. variabile* e, dessa maneira, favoreceram o meio no qual o bagaço estava *in natura*. Assim, melhorias em relação aos pré-tratamentos do bagaço, composição dos meios de cultivo e nutrientes fornecidos, devem ser realizadas para proporcionar otimização do processo.

Mesmo com o aumento da produção no meio contendo a mistura de substratos, os valores obtidos ainda estão menores que os obtidos pelo fungo de referência, também no meio com mistura. Com a mistura, o *A. awamori* produziu β -glicosidase e CMCase de 57,975 e 278,59 UI/g substrato, cerca de, respectivamente, 1,02 e 3,06 vezes mais do que o *P. variabile* no meio contendo farelo de trigo e bagaço de cana *in natura*. Já para xilanase, a produção foi de 630,24 UI/g substrato (7,74 vezes maior), no meio contendo farelo de trigo e bagaço de cana tratado

termicamente. A presença do bagaço de cana na mistura de substrato foi capaz de induzir melhor os genes responsáveis pela produção enzimática do *A. awamori* do que os do *P. variable*. Além disto, já havia sido

observado que o meio contendo bagaço de cana sem mistura tinha proporcionado melhor indução para o *A. awamori*. Quando misturado com o farelo, essa proporção de bagaço continuou favorecendo esse fungo, ao contrário do *P. variable*.

Apesar destes estudos terem sido realizados em escala laboratorial, os resultados obtidos servem como um ponto de partida para o escalonamento do processo que, em escala industrial servirá como alternativa para utilização dos materiais lignocelulósicos provenientes dos resíduos agroindustriais. Dessa maneira, esta estratégia possibilitará a diminuição dos custos das enzimas celulolíticas para produção do etanol de segunda geração. Além disto, outras combinações de misturas e suas diferentes porcentagens podem ser realizadas para atingir maiores níveis de produção com a utilização desses substratos lignocelulósicos como indutores dos genes que expressam celulasas.

Na próxima seção são apresentados os resultados obtidos pela *T. reesei* RUT C-30 através do cultivo submerso, bem como, uma comparação entre os valores enzimáticos encontrados com o cultivo em estado sólido.

5.3 Produção enzimática por cultivo submerso e por cultivo em estado sólido pelo *T. reesei*

Para efeito de comparação com o cultivo em estado sólido foram feitas alguns cultivos submersos utilizando o bagaço de cana *in natura* ou o farelo de trigo como indutores em meio Mandels e Weber (1969) modificado (Tabela 2). O inóculo utilizado foi o mesmo para os dois cultivos.

As Tabelas 14 e 15 mostram a média dos valores máximos obtidos nos cultivos submersos e nos cultivos em estado sólido pelo *T. reesei* RUT C-30. Para efeito de comparação, foi feita uma conversão dos resultados obtidos nos cultivos em estado sólido de UI/g substrato para UI/mL, considerando a diluição na extração da amostra no meio sólido. No cultivo submerso, o meio contendo bagaço de cana alcançou melhores níveis de produção, apresentando valores superiores ao do farelo de trigo para CMC_{ase}, FPase e xilanase. Para β -glicosidase, o farelo de trigo se mostrou melhor indutor, com 96h de cultivo. Já no cultivo em estado sólido, o bagaço de cana foi melhor para a CMC_{ase} e

FPase, com 14 dias de cultivo. Para β -glicosidase e xilanase o farelo de trigo foi um indutor melhor, com 28 e 7 dias de cultivo, respectivamente.

Como pode ser observado pelos dados apresentados, tanto no meio com farelo de trigo quanto no meio com bagaço de cana como indutor, o cultivo em estado sólido foi melhor para produção de CMCCase, cerca de 1,65 e 2,56 vezes maior. Para FPase e β -glicosidase o cultivo em estado sólido foi melhor apenas no meio com bagaço de cana. Nos experimentos nos quais o farelo de trigo foi usado como substrato indutor, a produção de xilanase foi de 12,6 vezes maior, quando comparada aos valores obtidos pelo cultivo submerso.

Os valores apresentados neste trabalho revelam o potencial da CES e mostram a importância no melhoramento desse tipo de cultivo para produção das enzimas celulolíticas. Deve-se considerar a dificuldade de controle dos parâmetros na CES, tais como: pH, temperatura, agitação, oxigênio dissolvido e concentração de substrato. Além disso, no cultivo em estado sólido, o acesso dos fungos ao substrato e a consequente utilização e indução de enzimas é dificultada se comparada ao cultivo submerso. Estudos para melhorar esse acesso do fungo ao substrato, testando combinações, concentrações e pré-tratamentos de meios diferentes podem melhorar a indução e produção de celulasas por CES e diminuir o tempo de produção dessas enzimas.

Tabela 14: Média da produção de celulasas e hemicelulasas pelo *T. reesei* por cultivo submerso em frascos agitados.

CS	Farelo de trigo (UI/mL)	Bagaço de cana (UI/mL)
CMCase	4,029	7,729
FPase	0,320	0,482
β -glicosidase	0,255	0,033
xilanase	5,015	7,344

Tabela 15: Média da produção de celulasas e hemicelulasas pelo *T. reesei* por cultivo em estado sólido em frascos.

CES	Farelo de trigo (UI/mL)	Bagaço de cana (UI/mL)
CMCase	6,66	19,782
FPase	0,261	0,564
β -glicosidase	0,161	0,046
xilanase	63,043	3,968

Na próxima seção são apresentados os resultados obtidos pela *P. variable* em cultivo submerso e cultivo em estado sólido, bem como, uma comparação entre os valores enzimáticos encontrados.

5.4 Produção enzimática por cultivo submerso e por cultivo em estado sólido pelo *Penicillium variable*

Para comparação com o cultivo em estado sólido, *P.variable* foi cultivado em meio líquido utilizando o bagaço de cana *in natura* ou o farelo de trigo como indutores em meio Breccia et. al., (1995), modificado (Tabela 3). Estas fermentações submersas aconteceram durante sete dias, sendo retirada uma amostra a cada 24 horas para as dosagens enzimáticas.

As Tabelas 16 e 17 mostram a média dos valores máximos obtidos nos cultivos submersos e nos cultivos em estados estado sólido pelo *P. variable*. A produção de CMCCase, FPase, β -glicosidase e xilanase no meio contendo farelo de trigo em CS pelo *P.variable* apresentou picos de 14,946; 0,159; 8,886 e 8,765 UI/mL, respectivamente (Tabela 16). Os picos de produção para *A. awamori* foram de 12,28; 0,096; 7,942 e 6,369 UI/mL, respectivamente.

Na CES a produção foi melhor no meio contendo farelo de trigo, sendo de 7,597; 0,108; 4,317 e 9,526 para CMCCase, FPase, β -glicosidase e xilanase, respectivamente (Tabela 17). A produção de β -glicosidase por CES pelo *P.variable*, também foi melhor do que o do *A. awamori* (3,96 UI/mL), cerca de 1,09 vezes, confirmando o potencial desse fungo isolado na produção dessa enzima.

Os resultados, do extrato enzimático em UI/mL, apresentados mostram que a produção de CMCCase, FPase e β -glicosidase pelo *P. variable*, através do cultivo submerso no meio contendo farelo de trigo, foi melhor do que a CES. Já para a produção de xilanase, a CES foi melhor em ambos os meios. O bagaço de cana foi melhor indutor para a produção de CMCCase e FPase na CES do que na CS (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16: Média da produção de celulasas e xilanase pelo *P.variable* por cultivo submerso em farelo de trigo ou bagaço de cana.

CS (<i>P.variable</i>)	Farelo de trigo (UI/mL)	Bagaço de cana (UI/mL)
CMCase	14,946	1,171
FPase	0,159	0,058
β -glicosidase	8,886	1,569
Xilanase	8,765	1,616

Tabela 17: Média da produção de celulases e xilanase pelo P.variabile por cultivo em estado sólido em farelo de trigo ou bagaço de cana.

CES (P.variabile)	Farelo de trigo (UI/mL)	Bagaço de cana (UI/mL)
CMCase	7,597	2,305
FPase	0,108	0,068
β -glicosidase	4,317	0,158
xilanase	9,526	2,814

Na próxima seção será apresentado um esquema simplificado de uma planta piloto para produção de celulases por cultivo submerso e cultivo em estado sólido, com o objetivo de comparar a produtividade volumétrica da CS com a CES.

5.5 Comparação entre o Cultivo Submerso e o Cultivo em estado sólido

O uso do cultivo em estado sólido geralmente leva a uma comparação com o cultivo submerso para uma melhor compreensão do processo. A principal diferença entre a CS e CES está na capacidade de mistura dos sistemas. As fermentações submersas são consideradas reações de mistura perfeita, onde cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de micro-organismos, nutrientes e metabólitos e os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos. Estudos afirmam que o cultivo submerso é mais vantajoso do que o cultivo em estado sólido por facilitar o controle dos parâmetros, tais como: pH, temperatura, consumo de oxigênio e agitação. Porém o custo de funcionamento e manutenção é maior quando comparado a produção por cultivo em estado sólido (GERVAIS e MOLIN, 2003).

Nesta seção objetivou-se comparar a produtividade do cultivo submerso com o cultivo em estado sólido utilizando como parâmetro as produções enzimáticas do *T.reesei* RUT C-30, apresentadas nas Tabelas 12 e 13. Pode-se observar que para a produção de CMCase, no meio com bagaço de cana, temos 7,729 UI/mL e 19,782 UI/mL nas CS e CES, respectivamente. Considerando equipamentos com aproximadamente mesmo volume útil de operação, tais como: 1000 L para cultivo submerso e 1000 bandejas de 1 kg para o cultivo em estado

sólido obtemos uma concentração enzimática cerca de aproximadamente 10 vezes mais na CES, como pode-se observar pelas cálculos:

$$A_{EFS} = 7,729 \frac{UI}{mL} \times 1000.10^3 mL = 7,729 \times 10^6 UI \quad (5.1)$$

$$A_{EFS} = 19,782 \frac{UI}{mL} \times \frac{400mL}{40gsubstrato} \times 1000.10^3 gsubstrato = 19,782 \times 10^7 UI \quad (5.2)$$

Essa análise pode ser feita de forma análoga para FPase, β -glicosidase e xilanase.

A fim de comparar o modo de produção e os equipamentos foi proposto um esquema (Figura 17) que representa um modelo de uma planta piloto (escala 1000 L) para produção de celulasas por cultivo submerso. O fluxograma demonstra os principais equipamentos necessários para produção de enzimas pelo cultivo submerso.

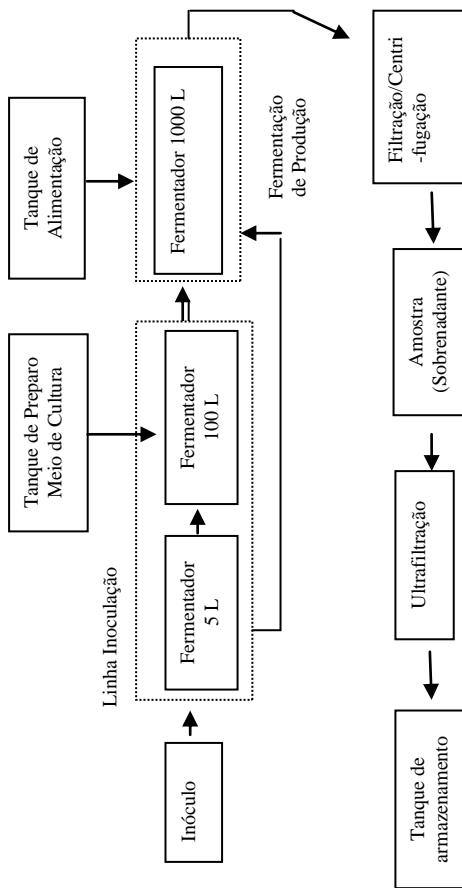


Figura 17: Esquema simplificado de uma planta piloto para produção de celulasas por cultivo submerso.

Além desses equipamentos é necessário avaliar custos destinados a instalações elétricas e de equipamentos, automação, custos com materiais de uso contínuo do laboratório e contratação de pessoal. Assim, a produção de enzimas por cultivo submerso requer uma área grande para funcionamento o que pode elevar o custo do processo.

Para o cultivo em estado sólido o modelo de planta piloto é mais simples, como mostra a Figura 18. São utilizados reatores tipo bandejas ou reatores de 5 m³. Com base nos estudos de Durand (2003), Lonsane et al. (1992) e Roussos (1991) a capacidade volumétrica dos reatores para produção das enzimas adotada é de 5 m³, pois, segundo esses autores, volumes superiores a 5 m³ dificultam o controle do processo quanto a temperatura, umidade e distribuição homogênea do micélio, resultando redução na produtividade das celulasas.

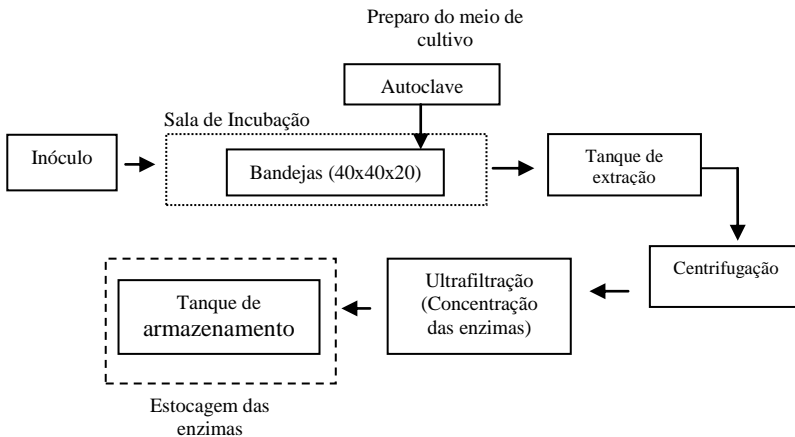


Figura 18: Esquema simplificado de uma planta piloto para produção de celulasas pelo cultivo em estado sólido.

Da mesma forma que é feito para o cultivo submerso, para o cultivo em estado sólido é necessário analisar os custos diretos, tais como: aquisição do terreno, instalações prediais, aquisição e instalação de equipamentos, instrumentação e controle, tubulações para as utilidades, sistemas elétricos e os custos indiretos, tais como: engenharia e supervisão na instalação das edificações, os equipamentos utilizados, sendo que os reatores utilizados em CES podem ser menores que a operação em CS.

Assim, a análise desses resultados mostra a potencialidade da utilização do cultivo em estado sólido, demonstrando que é possível a implementação desse processo para produção enzimática, pois, além da produtividade ser maior devido à diluição para extração das enzimas, o custo de instalação para CES pode ser menor. No entanto, vale ressaltar que essas considerações são baseadas em processos em escala laboratorial ou piloto. Na literatura não há informações de experimentos em reatores de grande escala dificultando a comparação real de custos de produção e produtividade em relação à CS. Estudos nos processos de pré-tratamentos de substrato para serem utilizados como suporte para o cultivo em estado sólido, separação e purificação das enzimas e análises econômicas de produtividade, devem ser realizados para otimização do processo em estado sólido.

Na próxima seção são apresentadas algumas conclusões em relação ao tema abordado.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostram o potencial do cultivo em estado sólido para produção das enzimas celulolíticas e xilanase utilizando os resíduos de farelo de trigo e bagaço de cana como substratos indutores.

Tanto para o *Trichoderma reesei* quanto para o *Penicillium variabile* a melhor porcentagem de umidade, dentre as testadas, para indução e produção das enzimas celulolíticas e xilanase foi de 70%.

Para produção de CMCase e FPase pelo *T. reesei*, o meio que melhor proporcionou a indução foi o bagaço de cana-de-açúcar tratado termicamente, com 21 dias de cultivo. Já para a produção de xilanase, pelo *T. reesei*, o meio contendo farelo de trigo foi o melhor indutor, com 7 dias de cultivo.

Para a produção de β -glicosidase pelo *T. reesei*, o meio que continham bagaço de cana tratado com NaOH foi o melhor substrato indutor, com 7 dias de cultivo.

A mistura de substrato com 25% de bagaço de cana nas diferentes condições testadas e 75% de farelo de trigo não aumentou a produção das enzimas CMCase e FPase no *T. reesei*. Já para β -glicosidase e xilanase a mistura proporcionou um aumento na produção nos meios que continha bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana tratado com solução de NaOH 4%, respectivamente.

O cultivo em estado sólido quando comparado ao cultivo submerso foi melhor para produção das enzimas CMCase em farelo de trigo e bagaço de cana. Para FPase e β -glicosidase, em bagaço de cana e para xilanase no meio com farelo de trigo como indutor.

A produção de β -glicosidase, FPase e xilanase pelo *P. variabile* foi melhor no meio contendo farelo de trigo puro, atingindo pico de produção com 7 dias de cultivo. A produção de CMCase foi melhor com 21 dias de cultivo, no mesmo meio de cultivo. O bagaço de cana, mesmo tratado, não se mostrou eficiente para indução das enzimas pelo *P. variabile*.

A produção de β -glicosidase pelo *P. variabile* foi melhor do que *A. awamori*, conhecidamente bom produtor desta enzima, tanto no cultivo em estado sólido quanto no cultivo submerso. Como esse fungo é uma cepa selvagem, há possibilidade de melhoramento da produção desta enzima em trabalhos futuros.

A mistura de substratos contendo 25% de bagaço de cana *in natura* e 75% de farelo de trigo aumentou a produção enzimática. Apenas para xilanase, o farelo de trigo sem mistura foi melhor substrato

indutor. O bagaço de cana tratado termicamente com farelo de trigo mostrou melhoria nos resultados em relação ao meio contendo somente bagaço de cana.

A próxima seção apresenta algumas sugestões para realização de trabalhos futuros.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nesta seção serão recomendadas algumas sugestões para trabalhos futuros em relação à produção de celulases pelo *T. reesei* e *P. variable* por meio do cultivo em estado sólido.

Recomenda-se então:

- i. realizar outros pré-tratamentos e um melhoramento nos pré-tratamentos utilizados, objetivando aumentar os níveis de indução enzimática no meio contendo bagaço de cana e, dessa forma, utilizar esse resíduo proveniente da indústria sucroalcooleira para reduzir o preço de produção das enzimas celulolíticas;
- ii. realizar a caracterização do bagaço de cana tratado para melhor entender o que acontece com a fibra de celulose e, assim, otimizar o processo de produção das enzimas celulolíticas;
- iii. avaliar as condições nutricionais e o efeito dos nutrientes sobre a produção de celulases;
- iv. testar as melhores condições observadas em um fermentador onde os parâmetros tais como: pH, temperatura, agitação e oxigênio dissolvido podem ser controlados;
- v. realizar testes de melhoramento genético, caracterização e estabilidade das enzimas produzidas pelo fungo selvagem *P. variable*;
- vi. realizar testes para dosagem de enzimas intracelulares produzidas pelo fungo selvagem, *P. variable*;
- vii. realizar a purificação e a concentração das enzimas produzidas e testar sua ação na hidrólise enzimática.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L. e MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ, usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar.** Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 18, p.57-70, 2000.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*.** Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado).

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. **Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.12, p.6-9, 1981.

ATALLA, R.H. **The Structures of Native Celluloses.** Espoo: Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1993.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. **Progress in bioethanol processing.** Progress of Energy Combined Science, v. 34, p. 551-573, out. 2008.

BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H., BOMMARIUS, A. S. **Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates.** Biotechnology Advances, v.27, p.833–848, 2009.

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei*.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado).

BAUDEL, H. M. **Pré-tratamento e hidrólise.** III Workshop tecnológico sobre Hidrólise para a produção de etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol, São Paulo, dez. 2006.

BÉGUIN, P. e AUBERT, J-P. **The biological degradation of cellulose.** FEMS Microbiology Reviews Vol. 13, p. 25-58. 1994.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBUR, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. **Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes.** *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.37, n.2, p.175-184, 2005.

BESLE, J.M., A. CORNU, JOUANY, J.P., 1994. **Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion.** *J. Sci. Food. Agricul.*, 64: 171-190.

BHAT, M.K., BHAT, S. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications.** *Biotechnology Advances* 15: 583-620.1997.

BHAT, M. K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology.** *Biothechnology Advances*, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIANCHI, V.L.D., MORAES, I.O., CAPALBO, D.M.F. **Fermentação em estado sólido, Biotecnologia Industrial** – Engenharia Bioquímica, 1ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 247-276, 2001.

BIERMANN C.J. **Essentials of Pulping and Papermaking.** Academic Press, San Diego, p. 32-48, 1993.

BOISSET, C.; PETREQUIN, C.; CHANZY, H.; HENRISSAT, B.; SCHULEIN, M. **Optimized Mixtures of Recombinant *Humicola insolens* Cellulases for the Biodegradation of Crystalline Cellulose.** *Biotechnology and Bioengineering*. 72, 339-345, 2001.

BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado.** Ed. Interciência – Rio de Janeiro, RJ. 2008.

BORTOLAZZO, N. G. – **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar** . Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. **Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.** Ciência Agrotecnológica, v.24(edição especial), p.137-152, 2000.

1 BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. Vol. 72, p. 248, 1976.

BRECCIA, J. D., CASTRO, G. R., BAIGARI, M. D., SIÑERIZ, F. **Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method.** J. Appl. Bacteriol. V. 78, p. 469-472. 1995.

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

CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais.** Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CAPUDI, M.; CASTRO, M.C. de; RAMSDORF, W.A.; SILVA, E.R. **Biodegradação de compostos lignocelulósicos pelo fungo *Pleurotus sajor-caju*.** In: Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, p.22. Anais... Joinville : [s.n.], 2003.

CARRASCO, F. **Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit.** Wood Science and Technology, v. 26, p. 413-428, 1992.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; JR, G.L.S. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.** Biochemical Engineering Journal, v.4, p.239-247,2000.

CERQUEIRA, L., R.C. de, LEAL, M.R.L.V., CORTEZ, L.A.B., GRIFFIN, W.M., Scandiffio, M.I.G. (2009). **Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?** Energy 34: 655 - 661.

CHAHAL, D. S. **Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 49, p.205-210, 1985.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. **Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity.** Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 84, 2000.

COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M. de F.; FURTADO, A.A.L.. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde.** Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - Boletim, v.19, n.1, p.3342. Curitiba : [s.n.], jan./jun. 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Levantamento de safra. 2010.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>.

COUGHLAN, M. P.; LJUNGDAHL, G. **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation.** London:Academic Press Limited,1988, p.11-30.

COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. **Carbohydrate-active enzymes:an integrated database approach.** Cambridge: The royal society of Cambridge, 1999.

COWARD-KELLY, G.; AIELLO-MAZZARI, C.; KIM, S.; GRANDA, C.; HOLTZAPLE, M. **Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulose activity.** *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.82, p.745-749, 2003.

CRISPIM, J.E. **Considerações sobre produção de energia no Brasil, 2010.** Disponível em: <http://www.jecrispim.com> acessado em 12/04/12.

DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., QIN, W. – **Fungal bioconversion of lignocellulosic residuos; opportunities & perspectives.** International Journal of Biological Sciences. Vol. 5 (6), p. 578-595. 2009.

DAVIES, G., HENRISSAT, B. **Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure 3: 853-859. 1995.**

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. **Biomass estimation in solid state fermentation.** Applied and Microbiology Biotechnology, v.35, p.200 – 205, 1991.

DILLON, A.J.P., Celulases, In: **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Editado por SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Editora Legis Summa, p. 243-249, 2004.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation.** Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. **Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review.** Bioresource Technology, v.55, p.1–33, 1996.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. *Biotechnology Advances*, V.11, p.591-597, 1993.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 113-125 , 2003.

EMBRAPA **Informação Tecnológica. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. 2. ed. rev. - Brasília, DF:, 110p. 2006.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. (Ed) *Fungos: Introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.* Caxias do Sul, Educs.2004.510 p.

FAGERSTAM, L.G., PETTERSSON, L.G., **Proc. Bioconversion Symp.** New Delhi, 165-178, 1980.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. *Cellulose hydrolysis.* Springer -Verlag. New York, v. 3, 1987.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑINGA, U.F.; NETO, V.B.; COURI, S.; **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida.** -- São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008. 13 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN; 22).

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; COTRIM, A.R.; SILVA, F.T. **The use of white-rot decaying as a pretreatment for organosolv delignification of Eucalyptus grandis wood.** Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems, Anais,1994, Ottawa, Canadá.

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

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, K. **Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme.** Applied and Environmental Microbiology, v.70, p. 1207 – 1212, 2004.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Enzyme technology.** New York : Open University Press: Taylor & Francis, New York, 185 p., 1987, (Biotechnology Series).

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

GARCIA-KIRCHNER, O., SEGURA-GRANADOS, M., RODRIGUES-PASCUAL, P. **Effect of media composition and growth conditions on production of β -glucosidase by aspergillus niger c-6.** Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 121-124, p. 347-360. 2005.

GERMANO, S. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium* sp, por fermentação no estado sólido.** Curitiba: 2000. Tese de Doutorado. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

GERVAIS, P., MOLIN, P. **The role of water in solid-state fermentation.** *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 85-101, 2003.

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

GOES, C. G. F. S. **Análise da estrutura produtiva da cadeia de etanol no Brasil.** São Bernardo do Campo, SP: Centro Universitário da FEI, 2008. (Projeto de Iniciação Científica).

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

GONÇALVES, A.R. Fracionamento do bagaço e palha da cana visando aos novos desafios para obtenção de etanol, 2011. Disponível em: http://www.apta.sp.gov.br/cana/ver_work.php?work_id=59 acessado em: maio de 2012.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. **Bioethanol: Current Opinion in Chemical Biology.**v. 10, p. 141-146, 2006.

GUIMARÃES, B.G.; SOUCHON, H.; LYTTLE, B.L.; WU, J.H.D.; ALZARI, P.M. 2002. **The structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolases CelS, the major enzymatic component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome.** *Journal of Molecular Biology*.230, 587 –596, 2002.

GUSAKOV, A.V.; SAHOVICK, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.M.; BAEZ, M.; SINITSYNI, A.P. **Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hidrolisis of cellulose.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.97,p.1028-1038, 2007.

HASAN, S.D.M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monóceras* obtida por fermentação em estado sólido.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado).

HIRA, A., OLIVEIRA, L. G., **No substitute for oil? How Brazil developed its ethanolindustry.** *Energy Police* 37: 2450 – 2456, 2009.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, Issue 2, p.175-186, Dordrecht : EBSCO, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. (2005) **Solid-State fermentation – Are there any biotechnological advantages?** *Current opinion in Microbiology* v.8 p.301-6, 2005.

HONG, K.; TANNER, R.D.; CROOKE, P.S.; MALANEY, G.W. **Semisolid state fermentation of baker's yeast in an air-fluidized bed fermentor.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.18, p.3-17. Dordrecht : EBSCO, 1988.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; van RENSBURG J. E. L.; HOWARD, S.; **Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production.** *Afr J Biotechnol*,v.2, p.602–619, 2003.

JEFFRIES, T.W..**Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes.** *Biodegradation*. Vol. 1, p.163-176, 1990.

JUHA'SZ, T.; SZENGYEL, Z.; RE'CEZY, SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L.; **Characterization of cellulases and hemicellulases produce by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochemistry*, Londres, v.40, p.3519-3525,2005.

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

KANSOH, A.L.; ESSAM, S.A.; ZEINAT, A.N.; Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. Journal of Polymer Science, New York, v. 62, p.273-278, 1999.

KHANDEPARKER, R. e NUMAN, M.T. 2008. **Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 35:635-644

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. **Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors.** Bioresource Technology, Essex, v.59, p. 63-67, 1997.

KIM, T. H.; NGHIEM, N. P.; HICKS, K. B. **Pretreatment and fractionation of corn stover by soaking in ethanol and aqueous ammonia.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 153, p. 171-179, jan. 2009

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. **Microorganisms and enzymes involved in degradation of plants fiber cell wall.** Advances and biochemical engineering/biotechnology, BERlin v.57, p.45-126, 1997.

KUMAR, R.; SINGH,S.; SINGH,O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass:biochemical and molecular perpectives. **J. Ind. Microbial Biotechnol.,v.35,p.377-391,2008.**

LABAT, G.A.A.; GONÇALVES, A.R. **Oxidation in Acidic Medium of Lignins from Agricultural Residues.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 148, n. 1-3, p. 151-161, 2008.

LEE, K.; MOON, S.H. **Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase.** Journal of Biotechnology, Amsterdam v.102, p. 261-268, 2003.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. **Comparative titers, location and properties of tannin-acyl-hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations.** Proc Biochem. v.29 p.497-503, 1994

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial – vol.3**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. **Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa**. Revista de Ciências Ambientais, v.1, p. 5-18, 2007.

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. **Review: Scale-up strategies for solid state fermentation systems**. Process Biochemistry. 1992. v. 27, p. 259-273.

LYND, LR.; WEIMER, PJ; ZYL, WH; PRETORIUS, IS. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology**. Microbiology And Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 506–577. 2002.

MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Curitiba: Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2006. Dissertação (Mestrado).

MAIJALA, P. **Heterobasidion annosum and wood decay: Enzymology of cellulose, hemicellulose, and lignin degradation**. Helsinki: 2000. Dissertação de Mestrado: Department of Biosciences, Division of Plant Physiology, University of Helsinki.

MALHERBE, S.; CLOETE, T.E. **Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications- a review**. Enviroment Sciece Biotechnology, Frankfurt, v.1, p.105-114, 2003.

MANDELS, M. e WEBER, J. **Production of cellulases**. Adv. Chem. Ser. Vol. 95, p. 391-414. 1969.

MANDELS, M. **Microbial sources of cellulose**. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 5, p. 81-105, 1975.

MARQUES, M. P., **Estudo da hidrólise do bagaço por fungos filamentosos.** Dissertação de mestrado da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MARTÍN, C., ALMAZÁN, O., MARCET, M., JONSSON, L.J. **A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production.** International Sugar Journal, Glamorgan, v.109, n.1267, p. 33-39, 2007.

MARTINS, Leonardo F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica).

McMILLAN, J. D. **Pretreatment of lignocellulosic biomass.** In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; Overend, R. P. (Eds), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production.* American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324, 1994

MENEZES, T. J. B. **Os fungos na indústria.** Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; VICENTE, A.A.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F. & TEIXEIRA, J.A. 2008. **A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate.** In: Ferreira, E.C. & Mota, M. (eds.) *Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2008.* Braga, Portugal, p.9.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.68, p.61-138, 2000a.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M. ; KRIEGER, N. **Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing.** *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v.68, p.61-138, 2000b.

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

MITCHELL, D. A.; Von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N., **Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D. A.; MEIEN O. VON F.; KRIEGER, N.; FARAH D. H. **A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, p. 15–26, 2004.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., **Solid-state fermentation bioreactors.** Springer-Verlag, Berlin, 2006.

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

MOSIER, N.S.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v.96, n.2005, p.673-686. [S.I.], 2004.

MOO-YOUNG M.; MOREIRA A.R.; TENGGERDY R.P. **Principles of solid state fermentation.** In: *The Filamentous Fungi*. Smith J. E.; Berry D. R.; Kristiansen B.; Edward Arnold: London, p. 117-144., 1983.

MUÑOZ, I. G.; UBHAYASEKERA, W.; HENRIKSSON, H.; SZABO, I.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.; MOWBRAY, S. L.; STAHLBERG, J. **Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporim*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lysozymes.** *Journal of Molecular Biology*, v. 314, p. 1097–1111, 2001.

NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M., CLAEYSSENS, M. **Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergism interaction.** *The Biochem Journal*, Londres v. 298, p. 705-710, 1994.

OGEL, J.M.; BRODERSEN, D.E.; CLEMONS, W.M.; TARRY, M.J.; RAMAKRISHNAN, V. **Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit.** *Science*, Champaign, v. 4, p.897-902, 2001.

OLIVEIRA, M. de; VASCONCELOS, Y. **Revolução no canavial: novas usinas, variedades mais produtivas e pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool.** Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo, n. 122, 2006. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?ed=155&lg=>. Acesso em: 18 maio. 2012.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 84-86, p.1137-1145, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HARGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulose hydrolysates, inhibition and mechanism of inhibition.** *Bioresource Technology*, Essex, v.74, p.25-33, 2000.

PALONEN, H., **Role in the lignin enzymatic hydrolysis of lignocellulose.** VTT: Espoo, 2004, 80p.

PANDEY, A. **Recent process developments in solid-state fermentation.** *Process Biochemistry*, v.27, p.109-117, 1992.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., MITCHELL, D.A. **New developments in solid-state fermentation: I. Bioprocess and products.** *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse.** *Bioresource Technology*, v. 74, p. 81-87. Amsterdam, 2000.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R. **Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications.** Londres, Asiatec Publishers, 2001, 221p.

PANDEY, A. **Solid-state fermentation.** *Biochemistry Engineering Journal*. v..13, 81-84, 2003.

PARSIEGLA, G.; JUY, M.; REVERBEL-LEROY, C.; TARDIF, C.; BELAÏCH, J.P.; DRIGUEZ, H.; HASER, R. **The crystal structure of the processive endocellulase CelF of *Clostridium cellulolyticum* in complex with a thiooligosaccharide inhibitor at 2.0 Å resolution.** The EMBO Journal, 17, 5551-5562, 1998.

PARIS, L.D; **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólidos das sojas orgânica, transgênicas e convencional.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Departamento de Engenharia Química, Toledo – PR, 2008.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. **Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, casual agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*.** Mycological Research, v.104, n.6, p.671-675, 2000.

PEREIRA Jr., N. **Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria.** 2007

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba – PR, 2007.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. **Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues.** *Resources, Conservation and Recycling*, v.50, p.1–39, 2007.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

RAMOS, L.P. **The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.** *Química Nova*, v.26, n.6, p.863-871. [S.l.], 2003.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. **Some engineering aspects of solid-state fermentation.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 127-135, 2003.

REYES, J.; ZAMORA, P.P.; DURAN, N. **Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases: efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos.** *Química Nova*. v. 21(2), p. 140-143. 1998.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. **Bioreactor design for a protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation.** *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 197-203, 2003.

RODRIGUES, A.M.; SANT'ANNA, E.S. **Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol.21, n.1, pp. 57-62. ISSN 0101-2061. [S.l.], 2001.

ROUSSOS, S.; OLMOS, A.; RAIMBAULT, M.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B. K. **Strategies for Large Scale Inoculum Development for Solid State Fermentation System: Conidiospores of *Trichoderma harzianum*.** *Biotechnology Techniques*. 1991. v. 5, n. 6, p. 415-420.

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

SAAD, M.B.W.; OLIVEIRA, L.R.M.; CÂNDIDO, R.G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R. **Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, n. 2, p. 220-225, 2008.

SAAD, M.B.W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

SÁNCHEZ C. **Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.** *Biotechnology Advances*, v.27, p.185–194, 2009.

SANT'ANNA JR., G.L. **Produção de enzimas microbianas.** In: BORZANI, W., SCHIMEDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Ed.) *Biocologia Industrial*, São Paulo. Ed. Edgar Blucher, 2001. p.351-362.

SANTOS,D.T.;BOUTROS,F.S.;SANTOS,J.C.;PÉREZ.V.H.;SILVA,S.;
Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. Janus,Lorena, ano 3, nº 4, 2º semestre de 2006.

SANTOS, E. dos, **Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais.** Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

SANTOS, A. da S., **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante.** UFRRJ, 2011.

SATO K., SUDO S. **Small scale solid state fermentations.** In: **Manual os industrial Microbiology and Biotechnology**, 2nd Edn; Demain, A. L, Davies. J. E., Eds.: ASM Press: Washington, DC,p. 61-79,1999.

SCHMIDELL, W e FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e processos fermentativos.** In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica.** Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001. p.179-192.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial – vol.2.** São Paulo. Edgard Blücher LTDA, 2001b.

SCHWARZ, W. **The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria.** Apply Microbiology and Biotechnology, Berlim, v. 56, p.634-649, 2001.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production.** 2005. Master of Science - Department of Chemical Engineering, Lund University. Sweden, 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnol. Adv., v.19, p.627-662, 2001.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.** Viçosa: Impr. Univ. UFV, 1998. 166p.

SILVA, V.F.N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** 2009. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.

SILVA, A. S., **Pré-tratamento por moagem do bagaço e da palha de cana-de-açúcar para hidrólise enzimática e produção de bioetanol.** Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2010. Dissertação (mestrado) – UFRJ/ IQ/ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2010.

SILVA, G. M. da. **Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol.** São Carlos : UFSCar, 2011.104 f.

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

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; 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 and Microbial Technology*, v.46, p.541–549, 2010.

SILVERSTEIN, R.A. **A Comparison of Chemical Pre-treatment Methods for Converting Cotton Stalks to Ethanol.** Biological and agricultural engineering, p.19. Raleigh, 2004.

SIPOS, B. **Conversion of lignocelluloses to fermentable sugars production for ethanol.** Budapest: Department of Applied Biotechnology and Food Science, Budapest University of Technology and Economics, 2010. 201 p. (PhD Thesis).

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

SOUZA, M.L.G., **Prospecção e caracterização de linhagens fúngicas produtoras de complexos enzimáticos lignocelulolíticos provenientes de resíduos de ambiente canavieiros**. 2011. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Montes Claros- Unimontes, Montes Claros, Minas Gerais, 2011.

STICKLEN, M. B. – **Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol**. Nature Reviews. Vol. 9, p. 433 – 443. 2008.

SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R., PANDEY, A. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. Journal of Scientific & Industrial Research. Vol. 64, p. 832-844. 2005.

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

SUN, Y. e CHENG, J.J., **Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production**. Bioresource Technology, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. **Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**. Biomass and Bioenergy, v. 10, p. 367-375, 1996.

TANAKA, M.; NAKAMURA, H.; TANIGUCHI, M.; MORITA, T.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. **Elucidation of adsorption processes of cellulases during hydrolysis of crystalline cellulose**. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v.23, p. 263–268, 2006.

TENGERDY, R.P. **Cellulase production by solid substrate fermentation**. Journal of Scientific & Industrial Research, v.55, p.313-316. 1996.

THIEMANN, J. E. **Construção de equipamentos de fermentação**. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.), Biotecnologia Industrial, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, SP, v.2, p.179-190, 2001.

TOLAN, J. S.; *Clean Technol. Environ. Policy*, 3, 339. 2003.

TOMME P, WARREN R.A, GILKES, N.R. **Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi**. Adv. Microb. Physiol. 37: 1-81, 1995.

UNICA–UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. DADOS E COTAÇÕES. 2010. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>.

VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. 2006. **Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus***. Research in Microbiology, 157(2):119-124.

VARGAS, L.H.M.; PIÃO, A.C.S.; DOMINGOS, R.N.; CARMONA, E.C. **Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger***. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.20, p.137-142, 2004.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; RÓMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems**. Biochemical Engineering Journal v.13 p.157–67, 2003.

WYMAN, C. E. **Ethanol from lignocellulosic biomass — technology, economics, and opportunities**. Biores Technol. Vol. 50(1), p.16. 1994.

WOOD, T.M.; MCCRAE, S.I **Sinergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose**. Advances in Chemistry Series, Washington, v.181, p. 181-209, 1979.

WOODWARD, J. **Sinergism in cellulose systems**. Bioresource Technology, Essex, v. 36, p. 67-75, 1991.

ZADRAZIL, F.; PUNIYA, A. K. **Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi**. Bioresource Technology, v. 54, n. 1, p. 85-87, 1995.

ZAMBOM, M. A.; DOS SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; DA SILVA, D. C.; DA SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. **Valor nutricional da casca do grão**

de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.23, n.4, p.937-943, 2001.

ZANIN, G. M., SANTANA, C., BON, E. P. S., GIORDANO, R. L. C., MORAES, F. F., ANDRIETA, S. R., COSTA NETO, C. C., MACEDO, I. C., FO, D. L., RAMOS, L. P., FONTANA, J. D. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 84-86: 1147 – 1161, 2000.

ZHANG, Y-H. P.; LYND, L.R. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.88, p.797-824. [S.l.], 2006.

ZHU, J.Y.; PAN, X. J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. **Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine.** *Bioresource technology*, p.2411-2418, 2009.

ANEXOS

ANEXO A: Curva padrão de glicose e xilose realizada para obter o Fator para cálculo da atividade enzimática.

Glicose (mg)	Glicose (ml)	Água (ml)	mmol/ml	abs1	abs2	Média Abs
0	0	500	0	0	0	0
0,09	50	450	1	0,02	0,023	0,022
0,18	100	400	2	0,056	0,059	0,058
0,27	150	350	3	0,098	0,095	0,097
0,36	200	300	4	0,13	0,132	0,131
0,45	250	250	5	0,181	0,176	0,179
0,54	300	200	6	0,221	0,223	0,222
0,63	350	150	7	0,261	0,268	0,265
0,72	400	100	8	0,308	0,308	0,308
0,81	450	50	9	0,332	0,342	0,337
0,9	500	0	10	0,388	0,386	0,387
Xilose (mg)	Xilose (ml)	Água (ml)	mmol/ml	abs1	abs2	Média ABS
0,000	0	150	0	0	0	0
0,023	15	135	1	0,039	0,038	0,0385
0,045	30	120	2	0,128	0,122	0,125
0,068	45	105	3	0,239	0,229	0,234
0,090	60	90	4	0,279	0,265	0,272
0,113	75	75	5	0,399	0,367	0,383
0,135	90	60	6	0,458	0,460	0,459
0,158	105	45	7	0,538	0,536	0,537
0,180	120	30	8	0,649	0,625	0,637
0,203	135	15	9	0,679	0,702	0,6905
0,225	150	0	10	0,784	0,799	0,7915

ANEXO B: Atividade enzimática de CMCase, FPase, β -Glicosidase e xilanase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido em diferentes substratos indutores, durante 7, 14, 21 e 28 dias, em UI/g substrato.

CMCase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	68,092	24,654	48,486	46,021	88,754
14	131,018	44,025	64,100	65,157	197,819
21	205,911	97,194	60,746	45,466	140,155
28	175,851	14,679	76,152	51,854	165,330
FPase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	3,017	0,689	2,125	2,101	2,887
14	3,870	1,127	2,298	1,234	5,636
21	6,087	1,879	2,042	1,641	5,361
28	5,235	0,369	2,756	1,703	5,085
B-sidase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	0,162	2,455	0,432	1,084	0,098
14	0,401	0,076	0,409	1,197	0,127
21	0,323	0,086	0,511	0,877	0,409
28	0,118	0,205	1,442	1,211	0,462
xilanase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	33,322	41,265	70,442	434,802	33,512
14	22,538	21,546	28,578	130,838	39,683
21	19,653	24,160	28,578	83,719	22,357
28	19,593	6,220	38,133	57,215	18,691

ANEXO C: Atividade enzimática de CMCase, FPase, β -glicosidase e xilanase do extrato obtido de *T. reesei* RUT C-30, em cultivo em estado sólido, em meio com mistura de diferentes substratos indutores, durante 7, 14, 21 e 28 dias em UI/g substrato.

CMCase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	26,975	13,075	70,191	33,306	46,021	88,754
14	21,195	30,279	26,700	58,630	65,157	197,819
21	93,726	25,186	26,907	67,163	45,466	140,155
28	11,323	14,658	14,038	31,104	51,854	165,330
FPase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	1,342	1,307	3,510	1,665	2,101	2,887
14	0,791	1,610	0,740	3,716	1,234	5,636
21	3,551	0,922	0,874	2,278	1,641	5,361
28	0,492	0,616	0,575	0,812	1,703	5,085
B-sidase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	1,011	2,055	3,437	1,585	1,084	0,098
14	0,516	0,724	1,319	2,043	1,197	0,127
21	4,178	1,075	1,481	3,793	0,877	0,409
28	0,222	0,732	0,348	1,401	1,211	0,462
xilanase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	378,029	659,77	498,59	519,024	434,802	33,512
14	24,401	66,831	69,716	83,239	130,838	39,683
21	62,865	62,504	93,606	316,126	83,719	22,357
28	4,099	29,149	31,553	25,422	57,215	18,691

ANEXO D: Atividade enzimática de CMCase, FPase, β -Glicosidase e xilanase do extrato obtido de *P. variable*, em cultivo em estado sólido nos diferentes substratos indutores, durante 7, 14, 21 e 28 dias, em UI/g substrato.

CMCase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	27,595	12,304	8,313	49,753	20,300
14	27,320	8,863	6,661	57,805	23,053
21	19,956	7,542	2,987	75,972	15,621
28	15,552	4,294	3,922	74,320	12,056
FPase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	0,643	0,365	0,224	1,077	0,681
14	0,399	0,017	0,096	1,060	0,444
21	0,406	0,286	0,041	0,939	0,275
28	0,533	0,193	0,127	1,032	0,516
B-sidase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	1,751	0,310	0,061	43,167	1,578
14	1,542	0,080	0,100	42,808	1,486
21	1,311	0,973	0,103	36,889	0,459
28	1,111	0,275	0,673	42,810	0,994
xilanase	Bagaço moído trat. Térmico e casca de arroz	Bagaço moído NaOH e casca de arroz	Bagaço moído NH ₄ OH e casca de arroz	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	73,731	22,945	19,288	95,261	28,136
14	72,670	16,339	18,757	76,091	17,106
21	48,486	14,776	8,022	61,344	12,623
28	42,941	6,252	8,759	52,379	20,114

ANEXO E: Atividade enzimática de CMCase, FPase, β -glicosidase e xilanase do extrato obtido de *P. variable*, em cultivo em estado sólido, em meio com mistura de diferentes substratos indutores, durante 7, 14, 21 e 28 dias em UI/g substrato.

CMCase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	51,474	49,960	42,115	35,096	49,753	20,300
14	91,042	71,224	52,575	63,792	57,805	23,053
21	72,462	75,972	59,663	68,953	75,972	15,621
28	58,837	33,719	47,482	44,592	74,320	12,056
FPase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	1,077	0,984	1,424	1,043	1,077	0,681
14	1,270	0,950	0,950	1,063	1,060	0,444
21	1,046	1,025	0,950	1,132	0,939	0,275
28	1,669	1,087	1,500	1,469	1,032	0,516
B-sidase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	32,979	24,735	27,330	24,964	43,167	1,578
14	55,450	51,945	22,831	29,540	42,808	1,486
21	35,663	36,037	31,700	28,890	36,889	0,459
28	56,995	26,501	31,700	30,589	42,810	0,994
xilanase	BC <i>in natura</i> + FT	BC Tratado NaOH + FT	BC tratado NH ₄ OH + FT	BC tratamento térmico + FT	Farelo de trigo e casca de arroz	Bagaço moído <i>in natura</i> e casca de arroz
7	59,221	51,317	58,159	81,399	95,261	28,136
14	68,423	56,626	54,502	69,366	76,091	17,106
21	59,280	72,552	37,279	74,026	61,344	12,623
28	40,228	20,055	34,447	36,807	52,379	20,114