



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI

Campus Alto Paraopeba

Engenharia de Bioprocessos

**Estudo comparativo do cultivo de *Ceriporiopsis subvermispora* e
Aspergillus niger para a produção de enzimas lignocelulolíticas**

Arianne Tairyne de Souza

Orientadora: Profa. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco – MG

Dezembro/2016

Estudo comparativo do cultivo de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Aspergillus niger* para a produção de enzimas lignocelulolíticas

Arianne Tairyne de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
São João del-Rei em cumprimento às
exigências parciais para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de
Bioprocessos.

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco – MG
Dezembro/2016

RESUMO

O etanol lignocelulósico, também denominado etanol de segunda geração, pode ser produzido utilizando os resíduos agrícolas lignocelulósicos. Para tanto, açúcares fermentescíveis devem estar disponíveis no meio para que ocorra a fermentação alcoólica dos mesmos. A liberação desses açúcares pode ocorrer, por exemplo, a partir do pré-tratamento, com a hidrólise enzimática, dos resíduos agrícolas. Os custos envolvidos na compra das enzimas torna o processo inviável economicamente. Portanto, são necessários estudos que otimizem as condições de cultivo para que haja um aumento na produção dessas enzimas e consequente viabilização do processo. Esse trabalho de conclusão de curso teve como objetivo estudar a produção de enzimas importantes na degradação dos resíduos lignocelulósicos, chamadas enzimas lignocelulolíticas, a partir do cultivo submerso de dois fungos: *Ceriporiopsis subvermispota* e *Aspergillus niger*. Utilizou-se o planejamento fatorial 2^2 , tendo como variáveis o substrato sólido e a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo, nos níveis máximos (+) e mínimos (-). Foi aplicada a metodologia que consistiu na fermentação submersa dos fungos, em separado, seguida de determinação de açúcares redutores totais (ART), proteínas totais (PT) e atividades enzimáticas. Nos cultivos de ambos os fungos, o substrato sólido, palha de milho foi o que apresentou melhores resultados, tanto para as atividades enzimáticas, quanto na produção de ARTs. Para o fungo *Ceriporiopsis subvermispota*, a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo não foi favorável para a produção de ARTs e CMCases, porém favoreceu a produção FPases e Lacases. Já no cultivo do *Aspergillus niger*, a suplementação favoreceu a produção de todos os produtos analisados. O fungo *C. subvermispota* foi o único produtor de Lacase, nas condições do cultivo. Em geral, o fungo *C. subvermispota* mostrou melhor produção de todos os produtos analisados exceto para a enzima FPase, a qual teve atividade máxima no cultivo do *A. niger*.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*; *Ceriporiopsis subvermispota*; fermentação submersa; enzimas lignocelulolíticas; bagaço de cana-de-açúcar; palha de milho; farelo de trigo.

ABSTRACT

Lignocellulosic ethanol, also called second-generation ethanol can be produced using the lignocellulosic agricultural residues. The fermentable sugars should be available in the medium so alcoholic fermentation can happen. The release of these sugars can occur, for instance, by the pre-treating agricultural residues with enzymatic hydrolysis. The high costs of enzymes make the process impractical. Thereby, researches are needed to optimize growing conditions so that there will be an increase in enzymes production, and consequent viability of the process. This course conclusion work aim to study the production of important enzymes in the degradation of lignocellulosic residues, called lignocellulolytic enzymes by a submerged cultivation of two fungi: *Ceriporiopsis subvermispora* and *Aspergillus niger*. The factorial design 2^2 was used and the variables analyzed were the solid substrate and the supplementation of culture medium with wheat bran, in the high (+) and low (-) levels. The methodology applied consisted of submerged fermentation of fungi separately, followed by determination of total reducing sugars (TRS), total protein (TP), and enzymatic activities. In cultures of both fungi, the solid substrate, corn stover showed the best results for enzymatic activities, as well for production of TRSs and PTs. For the fungus *Ceriporiopsis subvermispora*, supplementation of the medium with wheat bran was not favorable for the production of TRSs, Laccases, and CMCase, however, it had favored the production of total protein and FPases. In the cultivation of *Aspergillus niger*, supplementation favored the production of TPs, TRSs, CMCase, and FPases. The fungus *C. subvermispora* was the only producer of laccase, under the conditions of cultivation. In general, *A. niger* showed improved production of all analyzed products except for the CMCase enzyme, which had higher activity in the *C. subvermispora* cultivation.

Keywords: *Aspergillus niger*; *Ceriporiopsis subvermispora*; submerged fermentation; lignocellulolytic enzymes; bagasse sugarcane; corn stover; wheat bran.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Resíduos agroindustriais	4
3.1.1	Palha de milho	8
3.1.2	Bagaço de cana-de-açúcar	10
3.1.3	Melaço de Cana-de-açúcar	11
3.2	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	12
3.3	<i>Aspergillus niger</i>	13
3.4	Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos	15
3.5	Enzimas envolvidas na degradação dos resíduos lignocelulolíticos	16
3.5.1	Celulases	16
3.5.2	Enzimas oxidativas	21
3.6	Cultivo submerso para a produção de enzimas lignocelulolíticas	27
3.7	Planejamento fatorial	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Preparo dos inóculos	30
4.1.1	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	30
4.1.2	<i>Aspergillus niger</i>	31
4.2	Cultivo	31
4.3	Extração do caldo enzimático	32
4.4	Determinação das atividades enzimáticas	32
4.4.1	Curva Padrão da Concentração de Glicose	32
4.4.2	Lacase	33
4.4.3	Manganês-peroxidase	33
4.4.4	Lignina-peroxidase	34
4.4.5	Celulases totais (Fpase)	34

4.4.6	Endoglicanases (CMCase)	35
4.4.7	Determinação dos Açúcares Redutores Totais	36
4.4.8	Quantificação das Proteínas Totais	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	38
5.1.1	Produção de Açúcares Redutores Totais (ART)	38
5.1.2	Proteína total	40
5.1.3	Produção de Lacase	42
5.1.4	Produção de FPase	44
5.1.5	Produção de CMCase	46
5.2	<i>Aspergillus niger</i>	49
5.2.1	Produção de Açúcares Redutores Totais (ART)	49
5.2.2	Proteína Total	52
5.2.3	Produção de FPase	54
5.2.4	Produção de CMCase	56
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica mostrando as principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina (Adaptada de RUBIN, 2008).....	5
Figura 2: Estrutura linear da celulose, a estrutura dissacarídica está representada como celobiose assim como as ligações de hidrogênio intra e intermolecular (SILVA, 2010).	6
Figura 3: Polissacarídeos que compõem as unidades de hemiceluloses (MORAIS, 2005).	7
Figura 4: Precursores primários na formação da lignina (BUDZIAK, 2004).....	8
Figura 5: Três tipos de topologia apresentadas pelas celulasas que se relacionam com a interação com o substrato: fenda, túnel e bolsão. O sítio ativo está representado em vermelho (STANKOVIC, 2014).	17
Figura 6: Esquema da estrutura modular da celulase. Onde CCD representa o domínio em que ocorre a reação química e CBM o domínio menor responsável por interagir fisicamente com o substrato. Linker é um peptídeo que não possui estrutura terciária definida, responsável pela união dos dois módulos (STANKOVIC, 2014).	18
Figura 7: Modelo endo-exo para a sinergia entre endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases em um sistema celulolítico durante a hidrólise da celulose. (SAINI, SAINI, e TEWARI, 2015).....	19
Figura 8: Representação esquemática da ação hidrolítica do complexo enzimático (celulase) que atua sobre a celulose levando à produção de glicose. (Adaptado de ZHANG, HIMMEL, e MIELENZ, 2006).	21
Figura 9: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (FARIA, 2010).	23
Figura 10: Ciclo catalítico da Manganês peroxidase (adaptado de HOFRICHTER, 2002).	24
Figura 11: Radicais formados pelo sistema catalítico de MnPs quando na presença de diversos substratos (adaptado de HOFRICHTER, 2002).....	25
Figura 12: Ciclo catalítico da lacase (FARIA, 2010).	26

Figura 13: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Açúcares Redutores Totais em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> [resposta: mg/g de substrato].	39
Figura 14: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de proteínas totais em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> [resposta: mg/g de substrato].	41
Figura 15: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Lacase em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> [resposta: ULac/g de substrato].	43
Figura 16: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de FPase em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> [resposta: UFPase/g de substrato].	45
Figura 17: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de CMCase em cultivo submerso do <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> [resposta: UCMCase/g de substrato].	47
Figura 18: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Açúcares Redutores Totais em cultivo submerso do <i>Aspergillus niger</i> [resposta: mg/g de substrato].	51
Figura 19: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de proteínas totais em cultivo submerso do <i>Aspergillus niger</i> [resposta: mg/g de substrato].	53
Figura 20: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de FPase em cultivo submerso do <i>Aspergillus niger</i> [resposta: UFPase/g de substrato].	55
Figura 21: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de CMCase em cultivo submerso do <i>Aspergillus niger</i> [resposta: UCMCase/g de substrato].	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.....	8
Tabela 2: Processos de hidrólise do material lignocelulósico.	15
Tabela 3: Planejamento experimental 2^2 para produzir enzimas lignocelulolíticas e açúcares redutores. Variável A é o tipo de substrato de resíduo agroindustrial e a variável B é a suplementação do meio de cultivo. Foram realizados dois planejamentos utilizando o <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> e o outro o <i>Aspergillus niger</i>	30
Tabela 4: Volumes dos extratos enzimáticos, massa do substrato e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de açúcares redutores totais no cultivo submerso de <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	38
Tabela 5: Volumes dos extratos enzimáticos e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de proteína total no cultivo de <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.....	41
Tabela 6: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de Lacase no cultivo submerso de <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	43
Tabela 7: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de FPase no cultivo submerso de <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B =	

suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	45
Tabela 8: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de CMCase no cultivo submerso de <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	47
Tabela 9: Volumes dos extratos enzimáticos, massa do substrato e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de açúcares redutores totais no cultivo submerso de <i>Aspergillus niger</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	50
Tabela 10: Volumes dos extratos enzimáticos e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de proteína total no cultivo submerso de <i>Aspergillus niger</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.....	52
Tabela 11: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de FPase no cultivo submerso de <i>Aspergillus niger</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	54
Tabela 12: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de CMCase no cultivo submerso de <i>Aspergillus niger</i> . A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.	56

1 INTRODUÇÃO

Desde o começo da civilização moderna até os tempos atuais, os combustíveis fósseis vem sendo utilizados indiscriminadamente pelos seres humanos, e isso tem levado o mundo a uma situação delicada. Uma das consequências desse uso é o aumento das emissões de gás carbônico na atmosfera, que tem sido visto como principal responsável pelas mudanças climáticas (SOCCOL et al., 2010). Nesse cenário, os biocombustíveis surgem como uma solução inteligente, pois contribuem para a redução das emissões de gases do efeito estufa, além de ser uma fonte de energia renovável (FERREIRA, 2015).

Desde 1975, o Brasil tem ganho destaque em relação à produção desses combustíveis renováveis, devido a criação de um programa que visava substituir a gasolina por etanol. Desde então, a cana-de-açúcar é utilizada como matéria-prima para a produção de etanol no país (SOCCOL et al., 2010). O Brasil apresenta grande vantagem na produção de bioetanol em relação a outros países, pois possui um vasto território, grande quantidade de áreas agricultáveis, além de um alto potencial hídrico (FREITAS, 2011).

O etanol é um biocombustível obtido a partir da fermentação da glicose de matérias-primas como a cana-de-açúcar, beterraba, dentre outros, com posterior destilação do caldo fermentado (AGUIAR, 2004). Apesar de suas vantagens, os biocombustíveis, como é o caso do etanol, apresentam certas limitações, como a competição com a indústria de alimentos e as extensas áreas de cultivo exigidas (FERREIRA, 2015; FREITAS, 2011). Uma alternativa para driblar ambos os problemas seria a produção de etanol de segunda geração a partir dos resíduos gerados pela agroindústria (FERREIRA, 2011; VILELA, 2013).

O bioetanol de segunda geração, utiliza como matéria-prima para sua produção a biomassa lignocelulósica. A geração desse biocombustível exige um grande domínio e investimento em tecnologias inovadoras que não estão desenvolvidas completamente. Estudos tem sido feitos a fim de otimizar os processos de pré-tratamentos químicos e enzimáticos para hidrólise e separação da lignina, da celulose e da hemicelulose. Isso levaria a um maior rendimento da produção de açúcares fermentescíveis que são, posteriormente, transformados em etanol a partir da ação de microrganismos. O bagaço de cana-de-açúcar e a palha

de milho estão entre os resíduos lignocelulósicos mais promissores para serem utilizados na produção de etanol de segunda geração, uma vez que esses são produzidos em grandes quantidades (JARDINE, DISPATO e PERES, 2009; SANTOS, 2012; SOCCOL et al., 2010).

A hidrólise do material lignocelulósico visa a redução das macromoléculas de celulose e hemicelulose, a partir da hidrólise química ou enzimática, por exemplo, para obtenção de açúcares fermentescíveis. A hidrólise química utiliza ácidos a diferentes concentrações, já no processo enzimático, a degradação é catalisada por um complexo de enzimas. A hidrólise enzimática é considerada, por especialistas, como a mais promissora para a produção de etanol devido ao seu maior rendimento, além de menor custo de manutenção das instalações. O complexo enzimático responsável pela degradação do material lignocelulósico é composto por enzimas lignocelulolíticas (JARDINE, DISPATO e PERES, 2009; LYND et al., 2005).

A degradação da celulose pode ser realizada por determinados fungos e bactérias que produzem um complexo enzimático, normalmente empregado no processo de hidrólise enzimática (AGUIAR, 2010; WILSON, 2011). Esses microrganismos produzem enzimas que degradam a cadeia polimérica da celulose e dão origem a polímeros de cadeias mais curtas. O *Aspergillus niger* está entre as espécies mais estudadas de fungos que produzem celulase. Ele excreta endo e exoglicanases de alta atividade no meio de cultura (AGUIAR, 2010; RABELO, 2007). Já o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* possui uma boa capacidade de degradação da lignina (BLANCHETTE et al. 1997; FARIA, 2010; CUNHA, 2012).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo comparativo da produção de enzimas lignocelulolíticas a partir do cultivo dos fungos *Ceriporiopsis subvermispota* e *Aspergillus niger* em cultivo submerso utilizando bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho como substrato.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a eficiência de produção de enzimas lignocelulolíticas pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispota* e o *Aspergillus niger*, verificando a presença de, por exemplo, lignina-peroxidases e endoglucanases.
- Comparar a eficiência da suplementação com farelo de trigo do meio de fermentação, para a produção de enzimas lignocelulolíticas.
- Comparar os substratos bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho, utilizados na fermentação submersa, em relação à produção de enzimas lignocelulolíticas e também à liberação de açúcares redutores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resíduos agroindustriais

A crescente busca por fontes renováveis para a produção de combustíveis tem trazido atenção aos resíduos gerados por diversas indústrias (BORTOLAZZO, 2011). Os avanços tecnológicos e as inúmeras pesquisas desenvolvidas mostram a importância, principalmente, dos resíduos agroindustriais. Eles podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de energia renovável, contribuindo para a diminuição dos problemas ambientais relacionados ao seu acúmulo no meio ambiente, assim como um melhor aproveitamento energético. Os resíduos agroindustriais recebem destaque devido à condição natural que o Brasil possui na agroindústria e, como consequência, existe uma geração significativa desses resíduos. Os resíduos produzidos também podem ser chamados de biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de milho (RABELO, 2007; CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Biomassa pode ser definida como qualquer tipo de matéria orgânica proveniente de fontes vegetais e/ou animais, além dos produtos gerados nos processos de transformação das mesmas. Ela pode ser considerada uma fonte renovável pois tem sua origem direta ou indiretamente ligada ao processo de fotossíntese, sendo, portanto, formada periodicamente. Dentre os diferentes tipos de biomassa vegetal, os resíduos lignocelulósicos, recebem destaque, pois apresentam um grande potencial para geração de energia (PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008; ECKERT et al., 2013).

Os materiais lignocelulósicos são os mais abundantes dentre a matéria orgânica, representando cerca de 50% da biomassa terrestre (PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008). Eles são compostos das seguintes frações poliméricas: celulose (~35-50%), hemicelulose (~20-35%), lignina (~10-25%), e outros componentes extrativos (~5-20%) (RABELO, 2007). As três primeiras são unidas entre si por meio de ligações covalentes que são responsáveis por formar uma rede de alta complexidade e resistência, principalmente ao ataque de microrganismos (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010). A Figura 1 ilustra as estruturas da biomassa lignocelulósica.

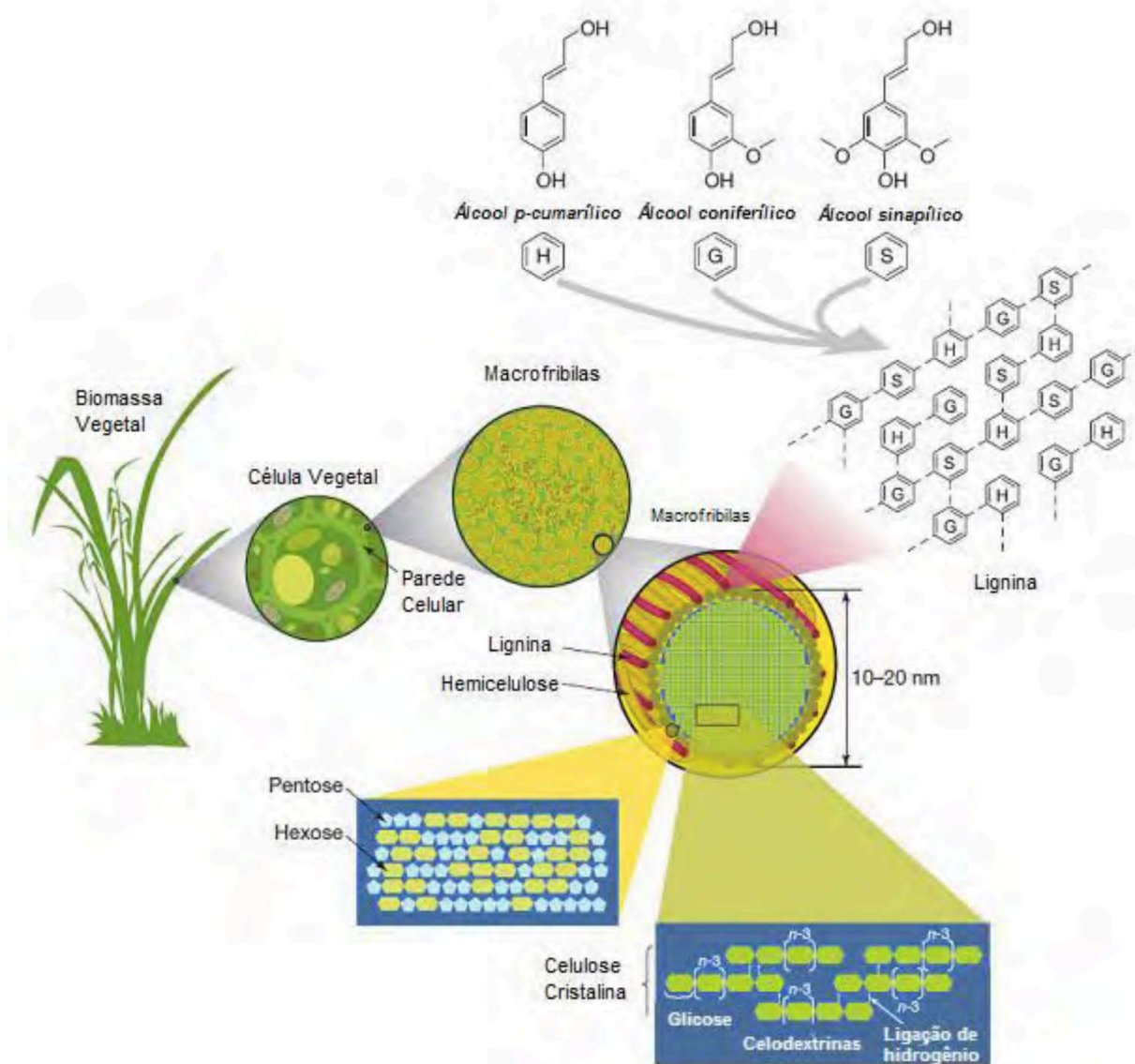


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica mostrando as principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina (Adaptada de RUBIN, 2008).

A celulose é a fonte de carbono mais abundante na natureza, correspondendo a aproximadamente 40% de toda a reserva. Ela é componente essencial de todas as plantas, desde as mais primitivas até as mais evoluídas, tendo sua composição variando de 20-99% (RABELO, 2007). Trata-se de um polímero linear composto por subunidades de D-glicose unidas a partir de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 que formam uma cadeia linear. A união de duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica, essa estrutura dissacarídica passa a ser

chamada de celobiose, sendo essa a unidade conformacional mínima da celulose (SANCHEZ, 2009). A celulose apresenta um alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose) e uma elevada massa molecular. Na estrutura do polímero, existem ligações intermoleculares que conferem rigidez e ligações intramoleculares que formam as fibrilas, essas são altamente ordenadas e se associam para formar as fibras de celulose (VÁSQUEZ et al., 2007). A Figura 2 mostra a estrutura linear da celulose. As ligações do tipo β -1,4 assim como as fibras formadas por ligações de hidrogênio, conferem a essa estrutura, alta resistência à hidrólise, sendo que, apenas alguns fungos e bactérias são capazes de fazê-la. Esse fato caracteriza um dos grandes desafios para utilização dos resíduos lignocelulósicos em bioprocessos, como a produção de etanol lignocelulósico (AGUIAR, 2010; SILVA, 2010).

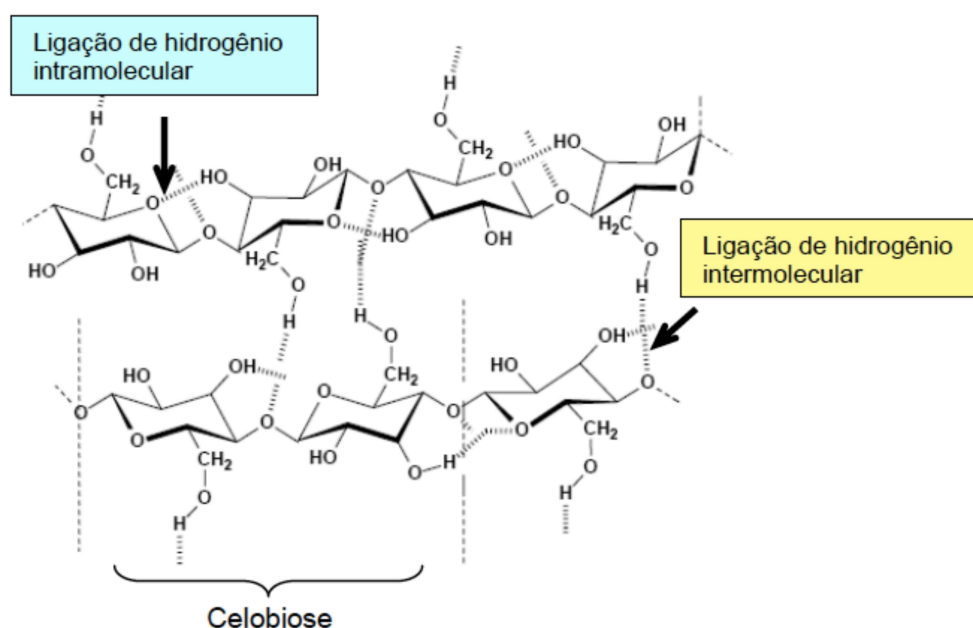


Figura 2: Estrutura linear da celulose, a estrutura dissacarídica está representada como celobiose, assim como as ligações de hidrogênio intra e intermolecular (SILVA, 2010).

A hemicelulose é outro componente essencial da parede celular dos vegetais e está estreitamente relacionada às celulosas. É composta por uma mistura de grupos distintos de polissacarídeos formados por pentoses e/ou hexoses, ácidos urônicos e grupos acetila (Figura 3). A presença dessas diferentes unidades monoméricas, a diversidade de ligações formadas, bem como de ramificações, conferem uma alta complexidade à estrutura da hemicelulose. Porém,

diferentemente da celulose, ela apresenta um baixo grau de polimerização (50 a 300 unidades de açúcares). Os diferentes tipos de vegetais possuem variados teores dessa estrutura, o valor médio de hemicelulose é de 20% (RABELO, 2007; PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

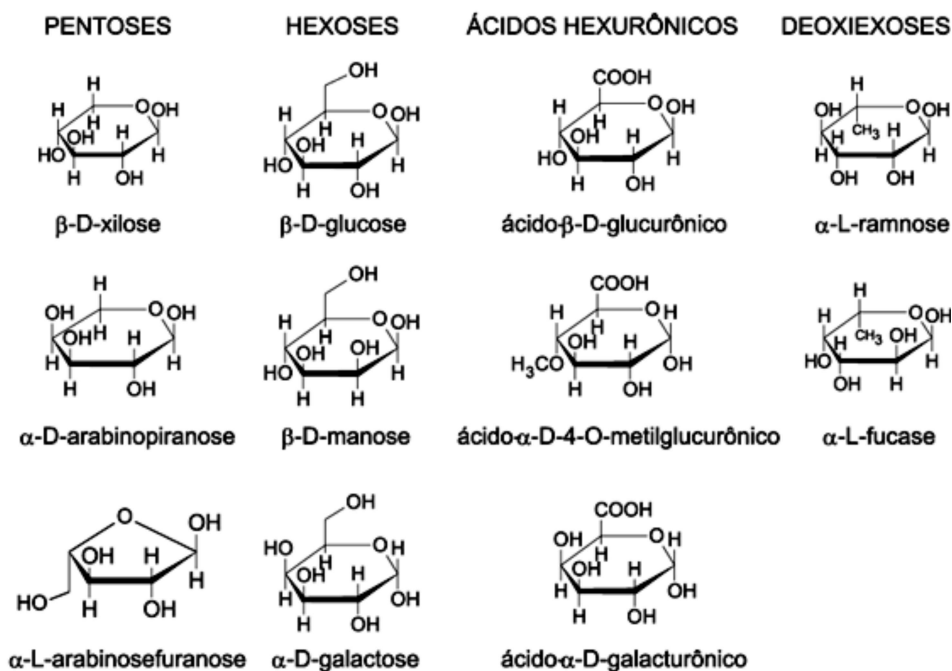


Figura 3: Polissacarídeos que compõem as unidades de hemiceluloses (MORAIS, 2005).

A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais abundante na natureza, ocupando cerca de 30% da biosfera. Sua estrutura tridimensional é formada por uma rede de unidades de fenilpropano unidas por ligações do tipo éter que são capazes de realizar ligações cruzadas entre si (PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008). As ligninas tem sua origem a partir de três precursores primários, são eles: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 4). Dessa forma, ela é apresentada como sendo um composto heterogêneo, com estrutura irregular, de alta massa molar, altamente insolúvel e recalcitrante (FASANELLA, 2008). Durante a formação da parede celular dos vegetais, esse polímero é o último componente a ser intercalado, ele se liga à celulose e hemicelulose formando uma barreira impenetrável, conferindo, dessa forma, impermeabilidade, rigidez, assim como resistência ao ataque de microrganismos (SANCHEZ, 2009)

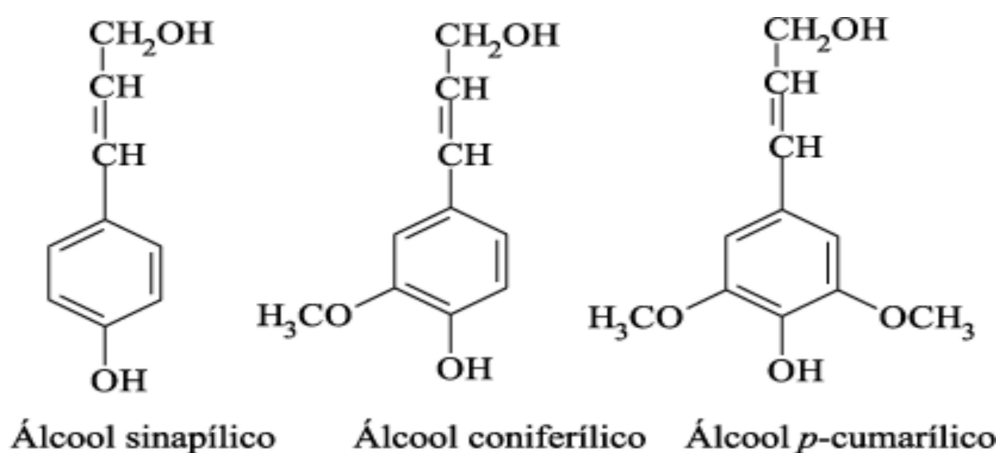


Figura 4: Precursores primários na formação da lignina (BUDZIAK, 2004).

A Tabela 1 mostra a composição química em relação à proporção de celulose, hemicelulose e lignina, de alguns resíduos lignocelulósicos.

Tabela 1: Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.

Resíduo Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3	CRUZ et al., 2000
Palha de milho	25 - 41,2	34,5	14,1	SALAZAR, 2005; TAMANINI e DE OLIVEIRA HAULY, 2004
Bagaço de cana	47	27,5	20,3 - 26,3	RABELO, 2007
Palha de trigo	33 - 42	25 - 32	16 - 23	CÂNDIDO; CANILHA; SILVA, 2002
Palha de sorgo	34	44	20	HERRERA et al., 2004

3.1.1 Palha de milho

Plantações de milho podem ser encontradas em quase todos os países, sob diferentes climas e formas de manejo. A produção da safra mundial de 2014/2015 chegou a 1 bilhões de toneladas de milho (ABIMILHO, 2016). Os Estados Unidos são pioneiros mundiais na produção do grão, tendo uma produtividade média de cerca de 9 mil a 10 mil kg/ha, em áreas de plantações superiores a 35 milhões de hectares. Dessa produção, grande parte é escoada como grãos para consumo tanto

humano, quanto animal, e quase 1/3 é destinada à produção de etanol (ABRAMILHO, 2016).

O Brasil ocupa terceira posição na produção mundial de milho, alcançando uma produção de 85 milhões de toneladas na safra de 2014/2015 (ABIMILHO, 2016). O grão pode ser transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose, dentre outros, porém, o principal destino dessa produção no Brasil são as indústrias de rações para animais. As regiões que mais produzem o grão, no país, são o Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MAPA, 2016).

Com toda essa produção, é de se esperar que o processamento desse material gere uma grande quantidade de resíduos. A palha de milho está entre um dos resíduos obtidos após a colheita do milho; o caule, a casca e o sabugo também são resíduos dessa produção. Apesar do baixo valor nutritivo, esses são normalmente utilizados na alimentação animal. A palha porém, pode possuir outras aplicações como incineração, artesanato ou a disposição sobre o solo após a colheita mecanizada. Esse último pode representar um problema, pois em grandes quantidades atrai pragas e prejudica as próximas plantações (ERENO e CESAR, 2007).

A palha de milho é o resíduo agrícola de maior abundância produzido nos Estados Unidos. Um estudo realizado em 2005, pelo Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) juntamente com o Departamento de Energia dos EUA (USDOE), estimou que 75 milhões de toneladas de palha de milho seca poderiam ter sido colhidas de maneira sustentável (ou seja, ser recolhida do solo, porém deixar quantidade suficiente para não comprometer a fertilidade do mesmo), de aproximadamente, 36,8 milhões de hectares plantados de milho. O estudo prevê ainda que, com um aumento moderado a elevado da produção, esse número pode subir para 170 a 256 milhões de toneladas secas por ano, até 2030. Considerando-se que cada tonelada de biomassa seca tenha capacidade de produzir 85 litros de etanol, e levando-se em conta o aumento previsto em 2030, o país teria a capacidade de produzir 14,5 a 21,8 bilhões de galão deste combustível por ano, que corresponde de 9 a 14% do uso atual de gasolina (MARSHALL E SUGG, 2009; PERLACK et al., 2005).

Na busca por agregar valor a esse produto e gerar renda, diversos estudos são realizados para que esse resíduo agrícola seja melhor aproveitado. Nos Estados Unidos, existem programas realizados por empresas e incentivados pelo governo

que coletam esses resíduos nas fazendas produtoras e os encaminham para uma indústria de produção de etanol celulósico, tornando assim, a produção de milho e de etanol mais sustentável (DUPONT, 2016; MARSHALL E SUGG, 2009; PERLACK et al., 2005).

A composição química da palha de milho é constituída basicamente por lignina, celulose e hemicelulose, nas proporções apresentadas na Tabela 1, dentre outros componentes.

3.1.2 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das culturas principais no cenário agrícola mundial. Ela é cultivada em mais de 100 países, onde gera renda e mão de obra. O Brasil ocupa posição de destaque entre esses países, e se configura como o maior produtor mundial. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção brasileira de cana-de-açúcar em 2015 chegou a 740 milhões de toneladas. A produção dessa cultura está concentrada em oito estados brasileiros, são eles: São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas, Pernambuco e Mato Grosso, os quais são responsáveis por 94,9% da produção nacional (CONAB, 2016). Apenas uma parte dessa produção é destinada à produção de bioenergia; cerca de um terço da cana-de-açúcar é destinada à produção de açúcar, outro um terço é queimado para produzir eletricidade em indústrias sucroalcooleiras e a outra fração é deixada no solo e sofre decomposição pelos microrganismos (SOCCOL et al., 2010).

O bagaço da cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico proveniente do processamento da cana-de-açúcar, caracterizado pelo caule macerado e não inclui a palha (PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de cana-de-açúcar 2011/2012, foram gerados cerca de 163 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, que representa uma proporção de quase 30% em relação à cana-de-açúcar moída. Uma tonelada de cana de açúcar produz cerca de 280 Kg de bagaço com 50% de umidade, possuindo um potencial de aproveitamento energético de 598.000 kcal, o que corresponde a 34,8% do total do potencial energético da cana-de-açúcar (SOARES, 2007). Esse enorme potencial

não é completamente aproveitado, o bagaço é utilizado, na maioria das vezes, em fornalhas das indústrias sucroalcooleiras (SANTOS, 2012).

Esse resíduo lignocelulósico pode ter diversas aplicações como: a produção de papel/celulose, forragem, alimentação animal e, nas últimas décadas, a utilização como matéria prima para a geração de etanol de segunda geração a partir da hidrólise e fermentação desse resíduo (PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar varia de acordo com a espécie da planta da qual ele é proveniente. Porém, em geral, esse resíduo lignocelulósico é constituído principalmente de celulose, lignina, hemicelulose e cinzas, nas proporções apresentadas na Tabela 1, o restante são pequenas quantidades de minerais, ceras e outros compostos (SOCCOL et. al, 2010).

Devido à grande oferta desse resíduo, e também à sua composição química, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser considerado um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial de obtenção de muitos produtos de interesse industrial. A produção de etanol lignocelulósico a partir desse resíduo é possível através de reações químicas e/ou biológicas e leva a um aumento na produtividade da indústria sucroalcooleira, devido a um aumento na produção de bioetanol. Assim, a quantidade de etanol gerado, pode dobrar a produção de etanol no Brasil sem a necessidade de expandir as áreas de cultivo da cana-de-açúcar (PEREIRA Jr; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

3.1.3 Melaço de Cana-de-açúcar

Outro exemplo de resíduo proveniente do processamento da cana-de-açúcar é o melaço de cana-de-açúcar, que é um subproduto conhecido como lodo. Ele é proveniente do processo de decantação do caldo de cana-de-açúcar e é fonte rica em carboidratos. O melaço é um importante resíduo, composto por aproximadamente 50% (m/m) de açúcares (em sua maioria sacarose, glicose e frutose), água, proteína grosseira, lipídeos, metais pesados, vitaminas e outros nutrientes (SILVA; CÉSAR e SILVA, 2003).

Esse resíduo é de grande importância pois possui uma relação custo benefício efetiva quando usada como fonte de carbono. Assim, ele pode ser utilizado como nutriente para a produção de enzimas industriais a partir do cultivo de

microrganismos, especialmente fungos filamentosos. O melaço pode ser uma fonte apropriada de nutrientes, porém a mistura de enzimas produzidas no meio ainda não estão bem caracterizadas quanto à identificação e quantificação de proteínas produzidas (HE et al., 2014).

Alguns estudos relataram a indução da produção de endonucleases (carboximetil celulasas-CMCases) pela adição de melaço de cana-de-açúcar ao meio (ALLCOCK e WOODS, 1981; GORI et al., 2010; GHORI et al., 2011). Em suas pesquisas, ALLCOCK e WOODS (1981) encontraram que a substância presente no melaço que é responsável por induzir a produção de CMCases, é uma molécula pequena, pois o cultivo com certa quantidade de melaço dialisada não apresentou atividade de CMCase. GORI et al. (2010) afirmam o potencial que o melaço, juntamente com o lodo de levedura e a palha de trigo, têm de produzir tanto a CMCase quanto outras celulasas.

3.2 *Ceriporiopsis subvermispora*

O gênero *Ceriporiopsis* Dom. abrange os fungos causadores da decomposição branca da madeira (*White-rot fungi*). A espécie *Ceriporiopsis subvermispora* é um fungo lignocelulolítico e é descrito como um dos fungos mais seletivos para a degradação da lignina. Este fungo produz determinados compostos de baixa massa molar que atuam na parede celular e na lamela média das plantas, provocando alterações nas mesmas (BLANCHETTE et al. 1997; FARIA, 2010; CUNHA, 2012).

É crescente a importância desse fungo nas aplicações industriais, porém seu uso é restrito, pois o seu sistema enzimático extracelular não é completamente claro. Este sistema comporta-se de maneira diferente, de acordo com o tipo de substrato. Diversos estudos mostram que o crescimento fúngico apresenta diferentes padrões em substrato sólido e meio líquido, o que leva à produção de enzimas e isoenzimas diferentes (MACHUCA e FERRAZ, 2001; SOUZA-CRUZ, 2005). Além disso, o tipo de fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo também influencia a produção de enzimas por *Ceriporiopsis subvermispora*. Segundo CHMELOVÁ e ONDREJOVIC (2012), fontes orgânicas de nitrogênio como peptona e albumina, são melhores que sais inorgânicos.

As enzimas extracelulares já descritas produzidas pelo *Ceriporiopsis subvermispota* compreendem manganês-peroxidases (MnP), lacases (Lac), xilanases, mananases e ainda as endoglicanases e β -glicosidases que pertencem ao complexo celulolítico (RÜTTIMANN-JOHNSON et al., 1993; SOUZA-CRUZ, 2005; MENDES, 2008). Apesar de identificadas cópias dos genes *lip* em seu genoma, a atividade de Lignina-peroxidase (LiP) não foi, ainda, detectada em diversos meios e formas de cultivo (LOBOS et al., 1994; RAJAKUMAR et al., 1996; RÜTTIMANN-JOHNSON et al., 1993).

Alguns estudos demonstraram que a produção de lacase pelo *C. subvermispota* só é detectada em curtos períodos de cultivo e/ou quando na presença de co-substratos de fácil assimilação, como por exemplo glicose. Por esse motivo, a degradação da lignina deveria ser atribuída apenas à ação das MnPs (FERRAZ; CÓRDOVA, MACHUCA, 2003; LOBOS et al., 1994; MASARIN, 2006; VICUÑA et al., 1996).

CHMELOVÁ e ONDREJOVIC (2012) testaram diferentes resíduos lignocelulósicos (casca de trigo, madeira de álamo e pinho) em cultivos submersos do fungo da podridão branca *Ceriporiopsis subvermispota*, durante 7 dias a 30°C, e concluíram que a composição desses materiais afeta a produção de enzimas lignocelulolíticas. Eles encontraram melhores atividades para as enzimas xilanase, celulase e lacase. FARIA (2010) testou diferentes condições de cultivo para a maximização da produção de manganês-peroxidases (MnP) e lacases (Lac) pelo mesmo fungo, e obteve melhor produção de Lac em cultivos submersos e imobilizados em meios de composição complexa, já em cultivo imobilizado em meio definido houve uma maior produção de MnP.

3.3 *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* agrupa os fungos filamentosos que produzem esporos assexuais em uma estrutura chamada aspergillum (parte superior da estrutura - plural *Aspergilla*: em latim significa globo perfurado provido de um pincel ou esponja utilizado na aspersão de água benta), parte que caracteriza esse gênero (FASANELLA, 2008; KAAIJ, 1976; SERRA, 2005). As espécies desse gênero que apresentam aplicações industriais mais importantes são as do grupo dos *Aspergillus*

pretos que incluem o *A. niger* e o *A. tubingensis*, por exemplo. O *Aspergillus niger* é de grande interesse devido à boa capacidade de fermentação e aos altos níveis de produção de enzimas, além de produzir diversos produtos que possuem o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), que permitem que eles sejam usados, com segurança, na indústria alimentícia (DE VRIES e VISSER, 2001).

O *A. niger* é um fungo ubíquo, estando presente na água, no ar, no solo e na superfície de tecidos vegetais e animais. Ao ser cultivado em meios artificiais, esse microrganismo apresenta um crescimento acelerado (SANTOS, 2014). A morfologia de crescimento apresentada por esse fungo varia de acordo com a linhagem utilizada, fatores como a composição do meio de cultivo, pH, quantidade e tipo de inóculo, dentre outros. Normalmente, quando o inóculo possui uma alta concentração de esporos, o crescimento do fungo na forma filamentosa é favorecida, enquanto um inóculo de menor concentração tende a dar origem a um crescimento na forma de *pellets* (EL-ENSHASY et al., 2006).

A ANVISA em seu Regulamento Técnico Sobre o Uso de Enzimas e Preparações Enzimáticas na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano (ANVISA - D.O.U. de 08/10/2014) lista quase 30 enzimas que podem ser produzidas a partir do *Aspergillus niger*, dentre elas estão β -glicosidase, celulase, hemicelulase, lipase, pectinase e xilanase. Esse fungo é fonte de celulasas que podem ser utilizadas na área alimentícia ou não. Ele é considerado por alguns pesquisadores como sendo superior aos outros fungos devido à grande produção de enzimas (AGUIAR e MENEZES, 2000).

Ao ser cultivado em fermentação submersa em meio contendo resíduos lignocelulósicos, o *A. niger* produziu exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidase. Além disso, a produção foi maior quando o meio foi suplementado com melaço de cana-de-açúcar e lodo de levedura (GHORI et al., 2011). Outra opção de suplementação citada na literatura é o farelo de soja ou trigo para aumentar a produção de celulasas (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011; COURI et al., 2000).

Em seu estudo GHORI et al. (2011) detectaram que as melhores condições de cultivo do *A. niger* foi meio contendo palha de milho, 30°C, pH de 3,5 e tempo de cultivo de 96 horas para uma maior produção de celulasas.

3.4 Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos

Uma das aplicações mais importantes das enzimas do complexo celulolítico é a hidrólise da biomassa lignocelulósica, onde essas enzimas convertem a celulose em açúcares fermentescíveis. Esse processo pode ser precedido de um pré-tratamento químico ou utilizado como etapa única. O pré-tratamento químico envolve a utilização de ácidos, alcalinos e/ou oxidativos para a desconstrução parcial da lignocelulose e outros componentes, facilitando o acesso das enzimas. A vantagem de utilizar o pré-tratamento enzimático como etapa única é a redução de custos como um todo, já que o pré-tratamento químico é um gargalo no processo por ser uma das etapas mais caras. Devido ao uso de produtos químicos altamente corrosivos, existe a constante necessidade de manutenção e troca de equipamentos. Porém, o pré-tratamento químico apresenta a vantagem de ser um processo rápido e eficiente na degradação prévia dos materiais lignocelulósicos (FACUNDES, 2014; GALBE e ZACCHI, 2012; MENDES, 2008). A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os diversos processos de hidrólise em relação aos insumos, condições de operação e rendimentos na sacarificação (hidrólise). A hidrólise enzimática tem sido considerada por especialistas como a mais promissora para a produção de etanol devido ao seu enorme potencial de evolução, além de menor custo de manutenção das instalações (JARDINE, DISPATO e PERES, 2009; LYND et al., 2005).

Tabela 2: Processos de hidrólise do material lignocelulósico.

Processo	Insumo	Temperatura	Tempo	Sacarificação
Ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215°C	3 min	50 - 70%
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40°C	2 - 6h	90%
Enzimático	Enzimas lignocelulolíticas	50°C	Depende do microrganismo	75 - 95%

Fonte: Adaptado de JARDINE, DISPATO e PERES, 2009.

Dentre os microrganismos que possuem ação de degradação de materiais lignocelulósicos, os fungos são os mais eficientes. Eles produzem e secretam diversas enzimas que agem sobre esse material, causando uma despolimerização inicial, o que resulta na geração de compostos de menor massa molar que podem

ser transportados pela membrana celular e utilizados no metabolismo interno das células (FERRAZ, 2004; SANTOS, 2014).

3.5 Enzimas envolvidas na degradação dos resíduos lignocelulolíticos

Os primeiros estudos que relataram as enzimas envolvidas na degradação da parede celular dos vegetais datam de 1950, e tiveram como objetivo obter açúcares utilizados industrialmente. Existem três tipos de enzimas que realizam a degradação dessa parede: as celulasas, que formam um sistema sinérgico de três tipos de enzimas - endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases - que realizam a degradação completa da celulose; as hemicelulasas que compreendem diferentes enzimas que agem na degradação da hemicelulose e, por fim, as peroxidases - manganês-peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e as lacases (Lac) que juntamente com alguns mediadores de baixa massa molar realizam a oxidação da lignina (SANTOS, 2014; CARVALHO et al., 2009). Existem diversos tipos de fungos e bactérias que são capazes de realizar a degradação do material lignocelulósico fazendo uso dessas enzimas. Essas podem ser classificadas também como enzimas hidrolíticas e enzimas oxidativas. As oxidativas englobam as lacases e as peroxidases, e elas atuam na degradação da lignina, além de livrar o meio de metabólitos indesejáveis que são produzidos durante a hidrólise. A degradação dessa estrutura permite a atuação do outro grupo de enzimas, as hidrolíticas que englobam as celulasas, hemicelulasas dentre outras (ALBANO, 2012).

3.5.1 Celulasas

Celulasas são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose. Elas apresentam diferentes modos de atuação que variam de acordo com o formato da enzima e as interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre enzima e substrato. Celulasas que apresentam estruturas tridimensionais similares, vão exibir modos de ligações similares. Existem três classes gerais que definem a atuação dessas enzimas: fenda, túnel e bolsão (Figura 5). As endoglicanases apresentam uma estrutura tridimensional na forma de fenda aberta, que forma uma ligação da enzima à cadeia celulósica. As exoglicanases tem seu sítio ativo em forma de túnel

ou bolsão. O primeiro permite que a enzima permaneça firmemente ligada à cadeia de celulose mesmo quando ocorre a liberação de produto. O número de subsítios na enzima que interagem com o substrato, define o tamanho do bolsão, que também é influenciado pelo comprimento da cadeia polimérica (STANKOVIC, 2014; VASELLA, DAVIES e BÖHM, 1994).

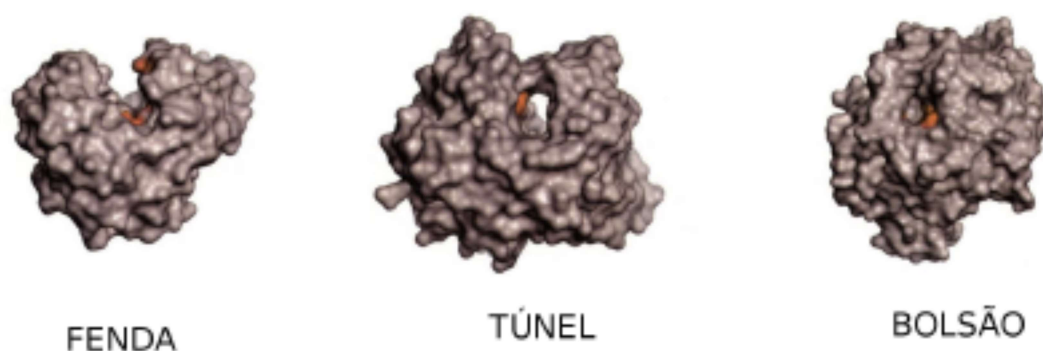


Figura 5: Três tipos de topologia apresentadas pelas celulasas que se relacionam com a interação com o substrato: fenda, túnel e bolsão. O sítio ativo está representado em vermelho (STANKOVIC, 2014).

As celulasas apresentam uma estrutura bastante complexa e uma das suas características é a estrutura modular, que engloba o módulo catalítico (*CCD - catalytic core domain*) e o módulo de ligação ao carboidrato (*CBM - carbohydrate binding module*), como mostra o esquema da Figura 6. Embora a função e o mecanismo dos CBMs ainda sejam pouco conhecidos, acredita-se que eles desempenham um papel importante na afinidade da enzima pela cadeia de celulose (STANKOVIC, 2014; VASELLA, DAVIES e BÖHM, 1994; ZHANG e ZHANG, 2013).

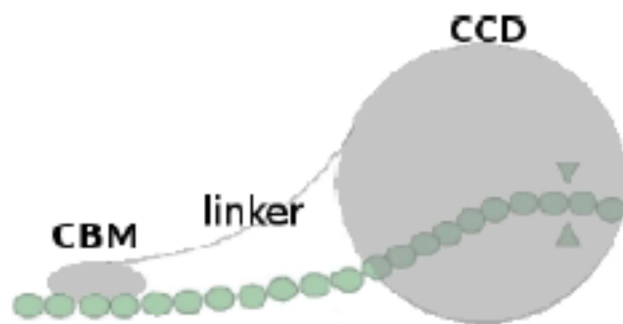


Figura 6: Esquema da estrutura modular da celulase. Onde CCD representa o domínio em que ocorre a reação química e CBM o domínio menor responsável por interagir fisicamente com o substrato. Linker é um peptídeo que não possui estrutura terciária definida, responsável pela união dos dois módulos (STANKOVIC, 2014).

Quando a combinação de duas ou mais enzimas torna o processo mais eficiente que a atuação de apenas uma individualmente, diz-se que essas formam um sistema sinérgico. A hidrólise da celulose a glicose envolve uma combinação de enzimas, que trabalham de uma maneira sinérgica para que a hidrólise ocorra. Dessa forma, as endoglicanases fazem cortes internos na cadeia de celulose e proporciona novos terminais. Esses se tornarão acessíveis à clivagem pelas celobiohidrolases/exoglucanases e β -glicosidases, que aumentarão as atividades hidrolíticas. Devido a esse efeito sinérgico, cada enzima aumenta a ação da outra, o que resulta num aumento do rendimento da hidrólise. Esse modelo sinérgico das celulasas é chamado de modelo exo-endo. A Figura 7 apresenta esse modelo e mostra o mecanismo de ação sinérgico de cada uma das celulasas em uma cadeia de celulose (BÉGUIN e AUBERT, 1994; SAINI, SAINI, e TEWARI, 2015).

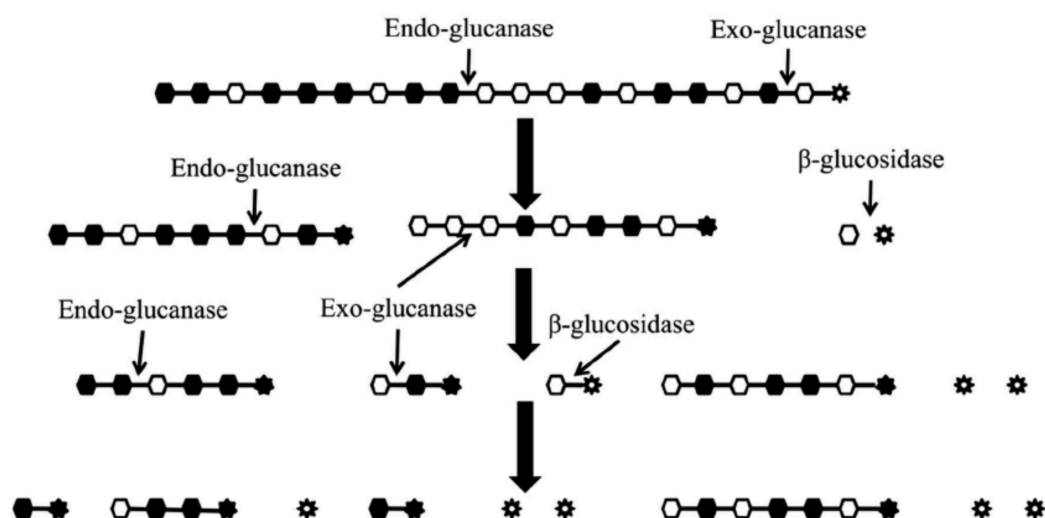


Figura 7: Modelo endo-exo para a sinergia entre endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases em um sistema celulolítico durante a hidrólise da celulose. * = terminação redutora modificada; — = ligação $\beta(1,4)$; ● = glicose modificada; ○ = glicose não modificada (SAINI, SAINI, e TEWARI, 2015).

3.5.1.1 Endo-1,4- β -glicanases (CMCases)

As endoglicanases (EC 3.2.1.4) são responsáveis por iniciar a hidrólise e também pela rápida solubilização do polímero de celulose. Elas hidrolisam randomicamente as ligações β -1,4 das porções internas da região amorfa e liberam oligossacarídeos que possuem diferentes graus de polimerização e com cadeias de terminação redutora e não redutora (AGUIAR, 2010; CUNHA, 2011; ZHANG e ZHANG, 2013).

Bactérias, fungos, plantas e animais produzem variadas endoglicanases que possuem diferentes atividades catalíticas. As CMCases produzidas por fungos normalmente possuem o módulo catalítico com ou sem CBM, já as bacterianas podem apresentar módulos catalíticos múltiplos, CBMs, e outros tipos de módulos que não possuem função conhecida (ZHANG e ZHANG, 2013).

A estrutura tridimensional na forma de fenda das endoglicanases (Figura 5), permite que elas se liguem e clivem a cadeia de celulose e leve à formação de glicose, celodextrinas solúveis ou fragmentos insolúveis de celulose. Porém, baseado na sua habilidade de hidrolisar celulose microcristalina (CMC), as CMCases

podem agir ativamente e gerar produtos como a celobiose ou longas cadeias de celodextrinas. Contudo, esta estrutura sofre menor hidrólise devido ao seu alto grau de organização molecular (COHEN et al., 2005; SANTOS, 2011; ZHANG e ZHANG, 2013).

3.5.1.2 Exoglicanases

As exoglicanases (EC 3.2.1.91) atuam ativamente nos terminais redutores ou não redutores presentes nas cadeias polissacarídicas da celulose, e podem liberar celobiose ou glicose. Exoglicanases são divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glicanohidrolases (GHs). As primeiras são as mais estudadas e produzidas por diversas bactérias e fungos, atuam na liberação de celobiose a partir das extremidades da celulose. Já as GHs são mais raras, elas atuam de maneira diferente na fibra celulósica e são capazes de liberar glicose diretamente do polímero de celulose (ZHANG e ZHANG, 2013; AGUIAR, 2010; ALBANO, 2012).

3.5.1.3 β -glicosidases (BGs)

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) atuam na hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 das moléculas de celobioses e também de outros pequenos oligossacarídeos, ocorrendo assim, a liberação de glicose (CUNHA, 2011; ZHANG e ZHANG, 2013; SANTOS, 2011).

Diferentes β -glicosidases são encontradas em diversos organismos, como fungos, bactérias, plantas e animais, com diferentes módulos catalíticos. Na maioria das vezes, a produção dessa enzima por fungos aeróbicos é extracelular, enquanto em bactérias anaeróbicas, as enzimas são mantidas no citoplasma (ZHANG e ZHANG, 2013). Existem muitos estudos que avaliaram a produção de BGs por fungos filamentosos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *A. oryzae*, vários utilizaram leveduras e alguns, bactérias, como fonte dessas enzimas (SINGHANIA et al., 2013).

Com um maior número de pesquisas a respeito do etanol lignocelulósico, as β -glicosidases tem sido vistas como a chave para uma completa hidrólise da celulose. A hidrólise enzimática da celulose envolve um processo complexo com

muitas etapas, sendo a última, a reação de catálise que envolve a ação da BG na celobiose. Esse composto é um forte inibidor de celobiohidrolases e endocelulases, e devido à atividade da celobiose, as BGs podem reduzir esse efeito. Além disso, a alta concentração de glicose no meio, inibe a hidrólise da celulose pelas BGs, exercendo inibição pelo produto (ZHANG e ZHANG, 2013; SINGHANIA et al., 2013). A Figura 8 resume os mecanismos de atuação das celulases.

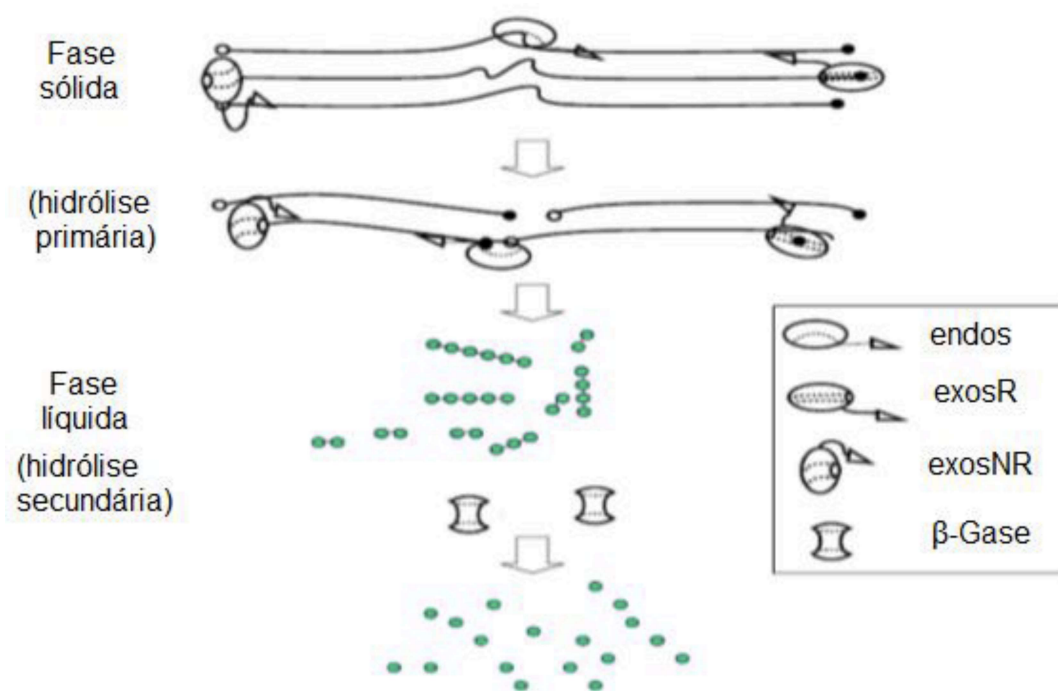


Figura 8: Representação esquemática da ação hidrolítica do complexo enzimático (celulase) que atua sobre a celulose levando à produção de glicose. Endos representam as endoglicanases; exosR representam as exoglicanases de terminais redutores; exosNR representam as exoglicanases de terminais não redutores e β-Gase representa as β-glicosidases (Adaptado de ZHANG, HIMMEL, e MIELENZ, 2006).

3.5.2 Enzimas oxidativas

As enzimas oxidativas, responsáveis pela degradação da lignina são, basicamente, as fenoloxidas, que são metaloproteínas e atuam de duas formas: as dependentes de peróxido ou peroxidases, como as manganês peroxidases (MnPs) e as ligninas peroxidases (LiPs) e as que não dependem de peróxidos, que são as lacases (Lacs) (KIRK e CULLEN, 1998; CORREIA et al., 2011). Essas enzimas, ao agirem sobre a lignina, levam à reações de oxidação que decompõem a

macromolécula gradativamente, até resultar em compostos de baixa massa molar (SOUZA-CRUZ, 2005). As enzimas do complexo ligninolítico, podem ser ordenadas, de acordo com suas capacidades de oxidação: LiPs>MnPs>Lacases (MASARIN, 2006).

Os fungos de degradação branca, tais como *Phanerochaete chrysosporium*, *Cyathus stercoreus*, *Phlebia sp.*, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora*, produzem, comumente, enzimas ligninolíticas durante seu metabolismo secundário (CUNHA, 2012; FACUNDES, 2014; FARIA, 2010; SOUZA-CRUZ, 2005). A secreção dessas enzimas pode sofrer influência de alguns compostos presentes no meio de cultivo. Na presença de compostos aromáticos, há uma maior produção de lacases, que pode ter sua produção prejudicada quando da adição de cobre e ferro (CUNHA, 2011). Além disso, alguns parâmetros de cultivo podem afetar a produção e atividade dessas enzimas, como: a disponibilidade de oxigênio, pH, temperatura e fonte e concentração de carbono e nitrogênio (FASANELLA, 2008).

3.5.2.1 Lignina peroxidase (LiP)

A lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) foi a primeira enzima lignocelulolítica a ser identificada. Ela é uma hemoproteína, com massa molar em torno de 40 kDa, apresenta uma estrutura globular e é relativamente não específica, responsável pela oxidação de compostos aromáticos fenólicos. Além disso, na presença de peróxido de hidrogênio, realiza a clivagem oxidativa de ligações C-C e C-O-C de estruturas aromáticas não fenólicas como a lignina, assim como de muitos outros compostos orgânicos com potencial de oxirredução acima de 1,4 V (WONG, 2009; HAMMEL e CULLEN, 2008). Essa enzima é comumente produzida por basidiomicetos, fungos de degradação branca, como por exemplo, o *Phanerochaete chrysosporium*. Porém, existem vários fungos degradadores de lignina que não produzem LiP, como *Ceriporiopsis subvermispora*, *Panus tigrinus*, *Rigidoporus lignosus*, *Picnoporus cinnabarinus* e *Dichomitus squalens* (FARIA, 2010; GUERRA, 2002; KUHAD et al., 1997). A Figura 9 ilustra o ciclo catalítico da lignina peroxidase.

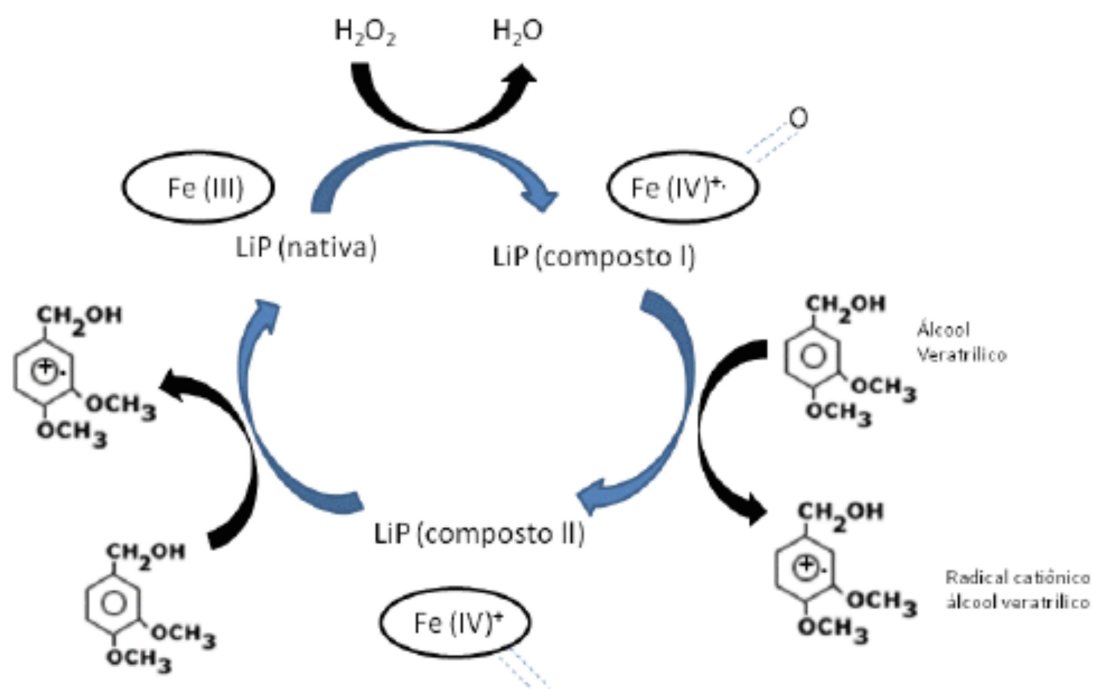


Figura 9: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (FARIA, 2010).

Na primeira etapa do ciclo (Figura 9), ocorre a oxidação do Fe³⁺ proveniente da enzima nativa para Fe⁴⁺, isso ocorre pela ação do aceptor natural de elétrons, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), este atua como substrato na reação e gera o composto I oxidado, que é um radical catiônico da LiP deficiente em dois elétrons. Na segunda etapa, ocorre a formação do composto II a partir da redução do composto anterior, por um agente redutor que pode ser um substrato como o álcool veratrílico. Nesse novo composto, o ferro ainda está como Fe⁴⁺, porém não é mais um radical livre. Na terceira, e última etapa, a redução é realizada por um elétron proveniente de um segundo substrato, que também pode ser o álcool veratrílico, isso retorna a enzima à sua forma nativa, e completa-se o ciclo catalítico (CORREIA et al., 2011; WONG, 2009).

3.5.2.2 Manganês peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) é uma hemoproteína glicosilada com massa molar entre 45 e 47 kDa, é produzida extracelularmente e expressa como

múltiplas isoenzimas. São produzidas por fungos causadores da podridão branca (FARIA, 2010). A MnP é dependente de certos compostos que quando presentes no meio, estabilizam a sua atividade, são eles: peróxido de hidrogênio, o íon Mn^{2+} e α -cetoácidos como o lactato (AGUIAR FILHO, 2008).

O ciclo catalítico das MnPs, inicia-se a partir da oxidação do H_2O_2 ou outro peróxido orgânico, Figura 10. Isso faz com que a enzima nativa perca dois elétrons e passe a ser chamada de composto I. A partir daí, para retornar à conformação de enzima nativa, são necessários mais dois passos sucessivos que tem o composto II como intermediário. A formação deste, requer a presença de um doador de elétrons que tenha potencial redox apropriado, podendo ser o Mn^{2+} ou outro. Porém, para a conversão do composto II à enzima nativa, é indispensável a presença do Mn^{2+} (CARVALHO et al., 2009; HOFRICHTER, 2002).

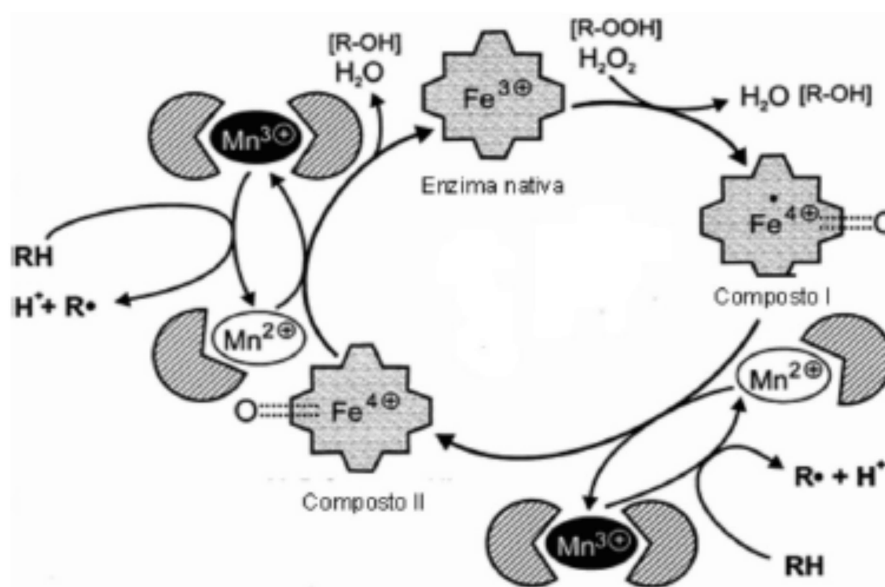


Figura 10: Ciclo catalítico da Manganês peroxidase (adaptado de HOFRICHTER, 2002).

A degradação da lignina realizada pelas MnPs está relacionada diretamente à ação de alguns mediadores de baixa massa molar, como por exemplo o Mn^{3+} que atua sobre estruturas de fenóis. Além disso, há um sistema baseado na medição por ácidos graxos insaturados, ao gerar radicais intermediários reativos (radicais peroxil) podem ser relacionados à degradação de estruturas não fenólicas (HOFRICHTER, 2002; JENSEN et al., 1996).

O íon Mn^{3+} , que é gerado durante a catálise, é de fundamental importância no meio, uma vez que, ao ser estabilizado por diferentes ácidos orgânicos produzidos pelo próprio fungo, ele pode abstrair elétrons de outros compostos orgânicos de forma inespecífica. Esse fenômeno leva à formação de radicais muito reativos que são capazes de atacar estruturas recalcitrantes com um poder de redução elevado (FARIA, 2010; AGUIAR FILHO, 2008; HOFRICHTER, 2002). A Figura 11 mostra os diferentes radicais que podem ser produzidos.

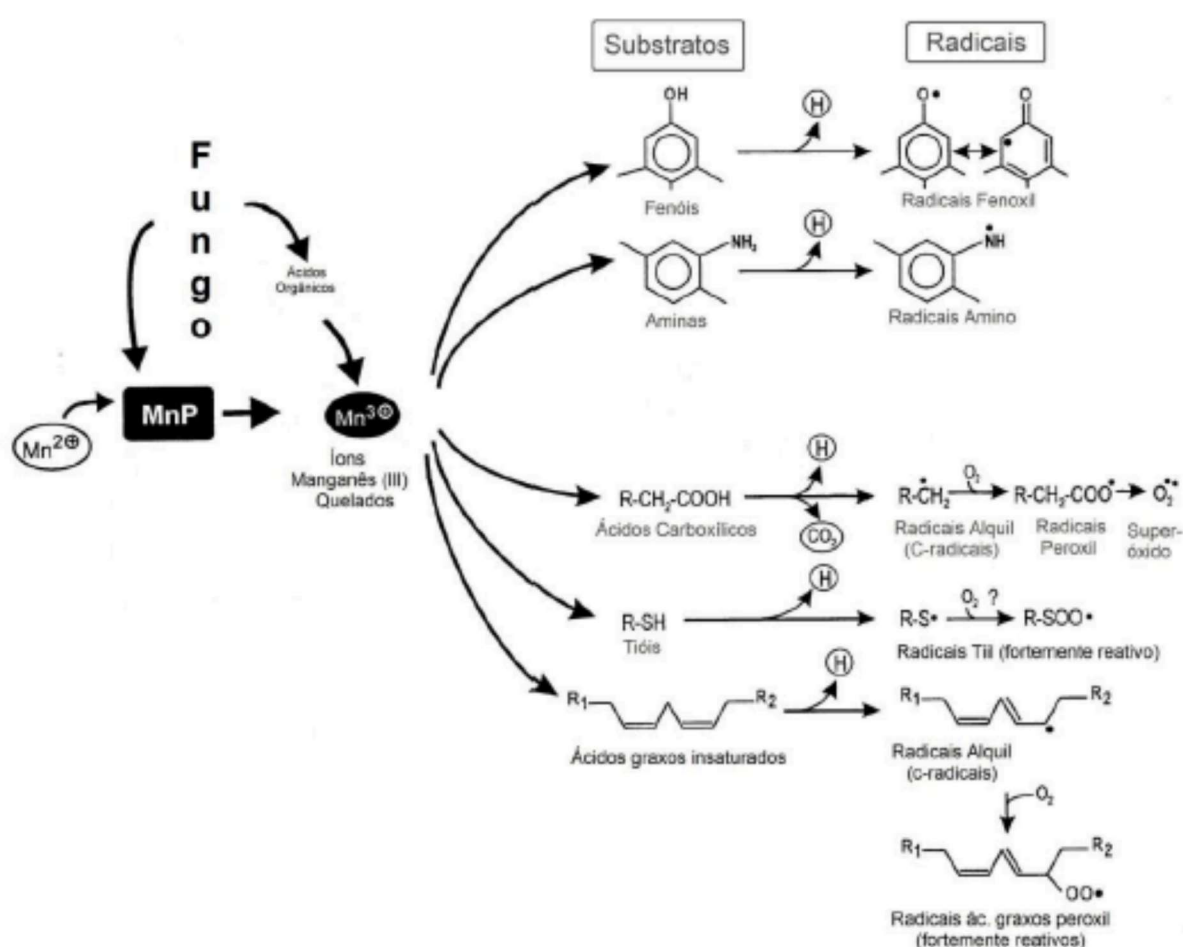


Figura 11: Radicais formados pelo sistema catalítico de MnPs quando na presença de diversos substratos (adaptado de HOFRICHTER, 2002).

3.5.2.3 Lacase (Lac)

As lacases (EC 1.10.3.2) são polifenóis oxidases (fenoloxidases) e uma das enzimas mais antigas já descritas. Essas oxidases extracelulares apresentam massa

molar entre 60 e 80 kDa e são produzidas por quase todos os basidiomicetos que degradam lignina e também por algumas espécies de bactérias e plantas (AGUIAR FILHO, 2008; CORREIA et al., 2011; SOUZA-CRUZ, 2005; WONG, 2009). A lacase tem sua estrutura diferente de acordo com a espécie que a origina, normalmente, as Lacs provenientes de fungos contém 4 átomos de cobre que se distribuem em 3 sítios de ligação diferentes. Uma cisteína e duas histidinas coordenam o cobre, formando um arranjo triangular (TAVARES, 2006).

As lacases, assim como as MnPs, possuem um baixo potencial de oxidação, por isso abstraem elétrons apenas de estruturas fenólicas e não de anéis aromáticos que possuem oxigênios da posição 4 esterificados (não fenólica). Esse fator limita a ação dessas enzimas a uma mínima fração da lignina, uma vez que, este polímero apresenta apenas 10% dos oxigênios da posição 4 na forma de estruturas fenólicas livres (CARVALHO, 2009; FARIA, 2010; SOUZA-CRUZ, 2005).

Elas atuam em substratos fenólicos, abstraindo um elétron dos fenóis, sendo, portanto, uma oxidação que é mediada por íons Cu^{2+} a Cu^{1+} , este, então, reduz O_2 a H_2O , garantindo assim o ciclo da enzima. Quando na presença de determinados mediadores como o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzeno-tiazol-6-sulfônico) e o ácido 3-hidróxiantranílico, é capaz de catalisar a oxidação de compostos que possuem elevados potenciais redox (Figura 12) (AGUIAR FILHO, 2008; FARIA, 2010; SOUZA-CRUZ, 2005; WONG, 2009)..

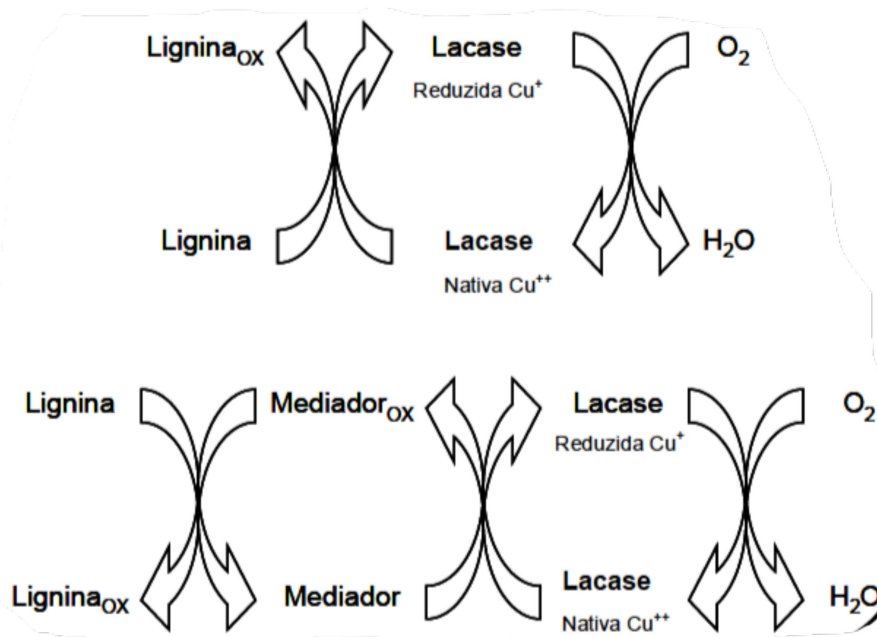


Figura 12: Ciclo catalítico da lacase (FARIA, 2010).

A composição do meio de cultivo influencia a produção de Lacs, nele devem ser adequados a relação carbono e nitrogênio, a temperatura, a taxa de aeração, o pH e a presença de metais (CORREIA et al., 2011).

3.6 Cultivo submerso para a produção de enzimas lignocelulolíticas

As duas principais técnicas de cultivo para a produção de celulasas por microrganismos são o cultivo em estado sólido (CES) e o cultivo submerso (CS) (TAVARES, 2006; ALBANO, 2012). O parâmetro mais destacado que diferencia estes processos é o teor de água presente no meio reacional. No CES, a água livre está presente em pouca ou em nenhuma quantidade. Nesses sistemas, a água apresenta-se complexada à matriz sólida de substrato (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010). Essa técnica, utiliza de compostos insolúveis no meio, que atuam como fontes de nutrientes e suporte fisiológico (MESSIAS et al., 2011).

A técnica de cultivo submerso envolve o crescimento do microrganismo em um meio rico em nutrientes e com elevadas concentrações de oxigênio. Nesse sistema, as transferências de massa e calor são facilitadas, conferindo um caráter homogêneo ao sistema (CUNHA, 2011; MESSIAS et al., 2011). O alto teor de água contribui, ainda, para o controle da temperatura, do pH, e reduz a degradação do produto, principalmente as enzimas que possuem baixa estabilidade térmica (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Os cultivos em meio líquido são, normalmente, divididos em várias fases que incluem a preparação do inóculo, a formulação do meio de cultivo e a definição das condições de cultivo (TAVARES, 2006). O CS permite um melhor controle do processo, além disso, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação da biomassa são mais fáceis, através de filtração ou centrifugação (ALBANO, 2012).

Os fungos filamentosos ao serem cultivados em culturas submersas apresentam diferentes formas morfológicas, e se apresentam como filamentos micelares dispersos ou ainda massas miceliares agregadas que são chamadas de “*pellets*” (PARMAGIANNI, 2004).

O cultivo submerso é o processo mais utilizado para a produção industrial de enzimas, visto que possuem melhores formas de controle, maiores rendimentos e menores custos e riscos de contaminação. Porém, a quantidade e as propriedades

apresentadas pelas celulasas produzidas por microrganismos no CS, variam de acordo com as condições de cultivo estabelecidas. Além disso, os fatores ambientais exercem grande influência na produção de celulasas e xilanase por diversos fungos, tanto em CS quanto em CES (AGUIAR e MENEZES, 2000).

3.7 Planejamento fatorial

O planejamento de um experimento visa definir uma sequência de coletas de determinados dados experimentais para que se possa atingir objetivos definidos previamente. Um dos métodos de planejamento experimental disponível na literatura é o planejamento fatorial. Ele é o mais indicado para avaliar os efeitos de duas ou mais variáveis que influenciam o processo. Esse método visa um estudo do efeito conjunto de diversos fatores sobre uma determinada variável de interesse, e isso é feito de maneira eficiente e econômica (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010; CUNICO et al., 2008).

Para sua execução é necessário que todos os níveis do fator de estudo sejam especificados. Para que o mesmo seja completo, deve-se determinar e incluir todas as combinações dos níveis do fator e com base nas respostas obtidas, pode-se avaliar qual foi o efeito proveniente dessas combinações. Fatores podem ser definidos como cada variável que pode ser controlada no sistema de estudo. Esse tipo de planejamento pode ser representado por b^k em que “ k ” representa o número de fatores e “ b ” o número de níveis escolhidos. Por exemplo, um planejamento fatorial 2^2 , apresenta 2 variáveis avaliadas em dois níveis. Neste caso, apenas 4 ensaios são necessários para que se possa avaliar todas as combinações possíveis (CUNICO et al., 2008).

No planejamento fatorial 2^2 , pode-se identificar o nível superior da variável com o sinal (+) e o nível inferior com o sinal (-) (BARROS NETO; BRUNS; SCARMINIO, 2010). O efeito principal é definido como a diferença média obtida na resposta quando o nível do fator de controle investigado é alterado, ele pode ser dado pela equação 1 (CUNICO et al., 2008).

$$Efeito\ principal = 2 \times \left(\frac{\sum y^+ - \sum y^-}{b} \right) \quad Eq. 1$$

em que:

y = média dos efeitos individuais da medida;

b = número total de experimentos no planejamento (CUNICO et al., 2008).

Para o experimento fatorial 2^2 , a equação do efeito principal pode ser dada como na equação 2.

$$Efeito\ principal = 2 \times \left(\frac{\sum y^+ - \sum y^-}{2} \right) \quad Eq. 2$$

Pode-se definir, ainda, os efeitos de interação como sendo a metade da diferença entre os efeitos principais de uma variável nos níveis de outra variável. O erro padrão para os efeitos que é definido como o erro na determinação dos efeitos é dado pela equação 3.

$$Erro\ Padrão\ do\ Efeito = \frac{s}{\sqrt{2^{k-1}}} \quad Eq. 3$$

Em que:

s = erro na medida (desvio padrão);

k = número de fatores experimentais no planejamento experimental (CUNICO et al., 2008).

No caso do planejamento fatorial 2^2 , a equação 3 pode ser simplificada como na equação 4.

$$Erro\ Padrão\ do\ Efeito = \frac{s}{\sqrt{2}} \quad Eq. 4$$

Os resultados podem ser melhor visualizados e interpretados se forem representados graficamente, nesse caso, as respostas obtidas para os experimentos são mostradas como função das variáveis estudadas (CUNICO et al., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados dois planejamentos experimentais 2^2 para verificar a produção de enzimas lignocelulolíticas e açúcares redutores, um planejamento para o cultivo de *Ceriporiopsis subvermispota* e outro para o *Aspergillus niger*. Os ensaios foram feitos em triplicatas. As variáveis analisadas foram dois resíduos agroindustriais, bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e palha de milho (PM), como substratos para a produção das enzimas, e a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo. A Tabela 3 mostra essas variáveis.

Tabela 3: Planejamento experimental 2^2 para produzir enzimas lignocelulolíticas e açúcares redutores. Variável A é o tipo de substrato de resíduo agroindustrial e a variável B é a suplementação do meio de cultivo. Foram realizados dois planejamentos utilizando o *Ceriporiopsis subvermispota* e o outro o *Aspergillus niger*.

Ensaio	Variável A	Nível	Variável B	Nível
1	Bagaço de cana-de-açúcar	-	Com Suplementação Farelo de trigo	+
2	Palha de milho	+	Com Suplementação Farelo de trigo	+
3	Bagaço de cana-de-açúcar	-	Sem Suplementação	-
4	Palha de milho	+	Sem Suplementação	-

4.1 Preparo dos inóculos

4.1.1 *Ceriporiopsis subvermispota*

O fungo basidiomiceto causador de podridão branca, *Ceriporiopsis subvermispota*, cepa L1487-SS3, foi gentilmente cedido pelo professor André Aguiar Mendes (Universidade Federal de Itajubá). O microrganismo foi inicialmente repicado em placas de Petri com meio constituído de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de malte; $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar. As placas contendo o microrganismo foram incubadas em estufa bacteriológica a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 7 dias. Passado esse tempo, 3 círculos de 1,6 cm de diâmetro foram extraídos das placas de Petri, e inseridos em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de inóculo. O meio era constituído de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato (palha de milho ou bagaço de cana-de-açúcar); $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 ; $1,5 \text{ g.L}^{-1}$

¹ de KH_2PO_4 ; 2,0 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o pH foi ajustado para 3,5. Os inóculos foram preparados em duplicata, sendo 4 erlenmeyers, 2 contendo palha de milho e os outros 2, bagaço de cana-de-açúcar. Os erlenmeyers foram incubados em mesa rotativa a 120 rpm, 30°C durante 15 dias. Esse método foi adaptado de GHORI et al. (2011). Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

4.1.2 *Aspergillus niger*

O fungo filamentoso *Aspergillus niger* cepa ATCC® 9642TM - Lote T19/3/E foi gentilmente cedido, em suspensão, pela professora Isabel Cristina Braga Rodrigues (Universidade Federal de São João Del-Rei).

O preparo do inóculo foi feito transferindo-se 2 mL da suspensão de fungos para erlenmeyers de 500 mL contendo 48 mL do mesmo meio inóculo preparado para o *Ceriporiopsis subvermisporea*. Os dois erlenmeyers foram incubados em mesa rotativa a 120 rpm, 30°C durante 48 horas.

4.2 Cultivo

O meio de cultura utilizado foi adaptado de GHORI et al., 2011 e teve como composição: 4,0 g.L⁻¹ de substrato sólido (Bagaço de cana-de-açúcar ou Palha de milho); 0,05 g.L⁻¹ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g.L⁻¹ de MgSO_4 ; 1,5 g.L⁻¹ de KH_2PO_4 ; 2,0 g.L⁻¹ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01 g.L⁻¹ de melaço de cana-de-açúcar e 5,0 g.L⁻¹ de peptona. O meio de cultivo teve seu pH ajustado para 3,5. A composição e concentração dos substratos sólidos variou de acordo com o planejamento experimental (Tabela 3). Nas amostras que continham suplementação, a proporção foi de 90% do substrato sólido (3,6 g.L⁻¹) (bagaço de cana-de-açúcar ou palha de milho) e 10% de farelo de trigo (0,4 g.L⁻¹) (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. A solução de melaço de cana-de-açúcar foi preparada e esterilizada separadamente a fim de se evitar a reação de Maillard, e só depois ela foi adicionada aos erlenmeyers.

Após o tempo de incubação de cada um dos inóculos, 2 mL de inóculo foram transferidos para frascos de erlenmeyers de 125 mL contendo 18 mL do meio de cultivo com composição citada anteriormente. Os 12 erlenmeyers foram então

incubados a 30°C a 120 rpm. O tempo de cultivo foi de 14 dias para o fungo *Ceriporiopsis subvermispota* e de 96 horas para o *Aspergillus niger*.

Todos esses procedimentos de manipulação de microrganismos foram realizados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar.

4.3 Extração do caldo enzimático

A extração das enzimas do meio fermentado, foi realizada a partir do método adaptado de MENDES (2008). Ao término de cada cultivo, adicionou-se, a cada uma das amostras, 20 mL do tampão de extração, composto por: tampão acetato de sódio 50mM (pH 5,5) acrescido de 0,01 % (v/v) de Tween 20. Os erlenmeyers foram então levados para mesa rotativa à 120 rpm e 28 ± 2 °C durante 3 horas.

Após esse tempo, os caldos enzimáticos foram recuperados por filtração em papel filtro qualitativo 80 g (unifil) e mantidos sob refrigeração.

4.4 Determinação das atividades enzimáticas

Para determinação de algumas atividades enzimáticas utilizou-se o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), que foi preparado segundo metodologia descrita por CARVALHO (2008). Inicialmente, dissolveu-se $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido 3,5-dinitrosalicílico e $14,0 \text{ g.L}^{-1}$ de NaOH em água destilada. Posteriormente, adicionou-se a esta solução, $216,1 \text{ g.L}^{-1}$ de tartarato de sódio e potássio, $5,4 \text{ mL.L}^{-1}$ de fenol levemente aquecido e $5,8 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHSO_3 . A solução de DNS foi armazenada em frasco de polipropileno etiquetado e datado, ao abrigo da luz.

4.4.1 Curva Padrão da Concentração de Glicose

Para realizar as dosagens de FPase, CMCase e açúcares redutores totais foi necessário a construção de uma curva padrão de glicose, essa foi preparada utilizando uma solução padrão de glicose 1 mg.mL^{-1} . Realizou-se diluições em triplicata nas concentrações de 0,1 a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. A cada 250 μL da amostra da solução estoque diluída, adicionou-se 250 μL do reagente DNS. A mistura foi

incubada a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Em seguida, resfriou-se as mesmas em banho de água fria e adicionou-se 2 mL de água destilada em cada uma delas. Mediu-se, então, a densidade óptica de cada uma à 540 nm. Os valores de absorbância encontrados foram utilizados na construção da curva padrão.

4.4.2 Lacase

A atividade da Lacase foi determinada a partir da adaptação da metodologia descrita por MENDES (2008) que realiza a oxidação do ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6)-sulfônico (ABTS). Para isso, 250 μL do extrato enzimático foram acrescidos de 100 μL de água destilada, 550 μL de tampão citrato-fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 100 μL de ABTS 1 mM. Em espectrofotômetro, realizou-se a cinética enzimática à 420 nm durante 2,5 minutos com intervalos de 5 segundos. O branco foi preparado substituindo-se o extrato enzimático por água destilada.

Para o cálculo da atividade enzimática da Lac utilizou-se a equação 5, descrita por AGUIAR FILHO (2008).

$$\frac{UI}{mL} = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon \times R \times t} \times 10^3 \quad \text{Eq. 5}$$

ΔAbs = variação da absorbância ($Abs_{final} - Abs_{inicial}$);

ε = coeficiente de absorção molar ($\varepsilon_{420\text{ nm}} = 36000\text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$);

R = quantidade de solução da amostra;

t = tempo de reação em minutos;

UI/mL = Unidade internacional, onde internacional significa $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$.

4.4.3 Manganês-peroxidase

Para a determinação da atividade enzimática da manganês-peroxidase, realizou-se a oxidação do vermelho de fenol seguindo a metodologia descrita por AGUIAR FILHO (2008). Para isso, preparou-se dois tubos de cada amostra sendo que 50 μL de MnSO_4 1,5 mM foram adicionadas a 50 μL de H_2O_2 0,03 M (preparado em tampão succinato 50 mM pH 4,5), 100 μL de lactato de sódio 2,4% (m/v), 200 μL de albumina bovina 0,5% (m/v) e 600 μL do extrato enzimático. Para o controle, um

dos tubos de cada amostra foi fervido por 10 minutos e depois retirado e resfriado. Tendo todas as amostras preparadas, adicionou-se vermelho de fenol 0,1% (m/v) ao branco (preparado substituindo-se o extrato enzimático por água destilada), e a partir de então, deu-se início a contagem do tempo (tempo zero). Leu-se a absorbância de cada amostra em espectrofotômetro a 610 nm. Passados 10 minutos, as misturas foram acrescidas de 40 µL de NaOH 2M, com a finalidade de interromper a reação, e tiveram suas absorbâncias medidas novamente.

4.4.4 Lignina-peroxidase

A partir de uma adaptação do método descrito por MENDES (2008) realizou-se a determinação da atividade da lignina-peroxidase, utilizando para tanto, o corante azul de metileno. As reações foram conduzidas em tubos onde foram adicionados 250 µL de extrato enzimático, 250 µL de H₂O₂ 2 mM (preparado em tampão succinato 50 mM pH 4,5), 125 µL de corante azul de metileno 300 mM e 625 µL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5). O branco foi preparado a partir da substituição do extrato enzimático por água destilada. A degradação do corante foi monitorada em espectrofotômetro a 651 nm durante 10 minutos com intervalos de 20 segundos.

4.4.5 Celulases totais (Fpase)

A dosagem de celulases totais (FPases) foi realizada utilizando-se uma tira de papel de filtro quantitativo Fusion nº 1, tendo como base a metodologia adaptada de CARVALHO (2008), AGUIAR FILHO (2008) e VILELA (2013). Homogeneizou-se, em um tubo de ensaio, 500 µL do caldo enzimático com 1000 µL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 e uma tira de papel de filtro 1 x 6 cm - 50 mg. A solução reacional foi incubada a 50° C durante 1 hora, em seguida, os tubos foram levados para um banho contendo água fria para que a reação fosse interrompida. Os açúcares redutores produzidos foram quantificadas pelo método DNS. Para tanto, adicionou-se 250 µL de DNS à 250 µL da solução anterior, os tubos foram incubados em banho a 100 ± 2°C durante 5 minutos. Passado esse tempo, os tubos foram resfriados em banho de água fria e, posteriormente, 2mL de água destilada foram

adicionados em cada um dos tubos. Por fim, realizou-se a leitura de cada amostra em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi preparado substituindo o caldo enzimático por tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8.

Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por mL de extrato enzimático por minuto de reação ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da equação 6 (AGUIAR, 2010).

$$\frac{U}{\text{mL}} = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde:

ART = Quantidade de açúcares redutores totais produzidos na reação de hidrólise (mg/mL);

V_T = Volume total da hidrólise (volume de tampão + volume do extrato enzimático) (mL);

0,18 = massa de 1 μmol de glicose (mg);

V_C = Volume de extrato enzimático utilizado na hidrólise (mL);

T_H = Tempo para a reação de hidrólise (min).

4.4.6 Endoglicanases (CMCase)

A dosagem da enzima endoglicanase (CMC) foi realizada pelo método do carboximetilcelulose (CMC) adaptado de CARVALHO (2008) e AGUIAR FILHO (2008). Assim, à 500 μL de tampão citrato de sódio (50 mM pH 5,0) adicionado de CMC 2% (m/v) foram acrescentados 500 μL do extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 50°C por 1 hora e, posteriormente, a fim de interromper a reação, foram resfriados em banho de água fria. Em seguida, a 250 μL dessa mistura reacional foram adicionados 250 μL da solução de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS). Os tubos foram incubados em banho à $100 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 minutos. Passado esse tempo, os tubos foram resfriados em banho de água fria, e adicionou-se 2 mL de água destilada em cada um dos tubos. Por fim, a absorbância das amostras foram registradas à 540 nm. Para o branco, o extrato enzimático foi substituído por tampão citrato de sódio (50 mM pH 5,0).

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a equação 6. Uma simplificação dessa equação para a CMCase está mostrada na equação 7. Nesse caso, UCMC é a unidade de atividade enzimática da endoglicanase (CMCase).

$$\frac{UCMC}{mL} = ART \left(\frac{mg}{mL} \right) \times \frac{1 (mL)}{0,18 \left(\frac{mg}{\mu mol} \right) \times 0,5 (mL) \times 60 (min)} = 0,185 \times ART \quad \text{Eq. 7}$$

4.4.7 Determinação dos Açúcares Redutores Totais

A metodologia utilizada para quantificação de açúcares redutores totais foi a de VASCONCELOS, PINTO e ARAGÃO (2013). Adicionou-se, então, 250 µL de caldo enzimático e 250 µL de DNS em um tubo de ensaio. Essa mistura reacional foi levada à banho-maria a 100° ± 2°C durante 5 minutos. Em seguida, resfriou-se os tubos em um banho de água fria e adicionou-se 2 mL de água destilada a cada um dos tubos. Realizou-se a medida da densidade óptica à 540 nm. O branco foi preparado substituindo-se o caldo enzimático por tampão citrato de sódio (50 mM pH 4,8).

4.4.8 Quantificação das Proteínas Totais

Para quantificação das proteínas totais utilizou-se o método adaptado de Lowry descrito por SANTOS (2012). Primeiramente, preparou-se o reagente E nas proporções de 1:1:49:49 (v/v) das soluções A (sulfato de cobre 1%); B (tartarato de sódio e potássio 2%); C (2% de carbonato de sódio) e D (0,1 M de hidróxido de sódio), respectivamente. Em seguida, adicionou-se 250 µL do extrato enzimático à 1250 µL deste reagente E, e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, adicionou-se 250 µL do reagente de Folin, diluído em uma proporção de 1:1 em água destilada. Terminada a adição, agitou-se os tubos em vórtex e deixou-os em repouso por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Realizou-se a leitura da absorbância à 750 nm. O branco foi preparado substituindo-se o extrato enzimático por tampão citrato de sódio (50 mM pH 4,8).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos cultivos realizados tanto com o *C. subvermispota* quanto com o *Aspergillus niger*, as principais enzimas produzidas foram as celulasas. Não foi possível detectar, em nenhum dos ensaios, a presença das enzimas peroxidases (Manganês-peroxidase e lignina peroxidase). Já no cultivo com *C. subvermispota*, foi possível detectar a atividade da lacase.

FARIA (2010) detectou e comparou a produção de MnP e Lac em 3 tipos de cultivos de *C. subvermispota*, em superfície, submerso e imobilizado, utilizando meio complexo e meio definido. Neste estudo, ele observou que, em cultivo submerso e imobilizado, em meio de composição complexa, a produção de Lac foi maior que de MnP, enquanto que no cultivo imobilizado em meio definido, houve uma maior produção de MnP. Portanto, baseado nesse autor, como o presente estudo trata-se de um cultivo submerso com meio complexo, o esperado era que a *C. subvermispota* produzisse certa quantidade de MnP, mesmo essa sendo menor que de Lac, mas isso não foi detectado. Dong et al. (2012) analisou a produção dessas enzimas por diferentes fungos, incluindo o *C. subvermispota*, e utilizou diferentes resíduos agroindustriais (caule de milho, sabugo de milho, palha de trigo e caule de arroz) como substrato. Para este fungo, não foi observada atividade de Lacase em nenhum dos tempos e para nenhum dos substratos, porém, a atividade da MnP foi detectada, por exemplo, para o sabugo de milho, nos tempos de 3, 6 e 12 dias (as análises foram feitas para os tempo de 3, 6, 9 e 12 dias). A partir desse estudo, pode-se sugerir, então, que, a não detecção da manganês-peroxidase pode ter sido consequência de um tempo superior de cultivo, já que o presente estudo foi realizado durante 14 dias.

O estudo realizado por FASANELLA (2008) mostra a produção de manganês-peroxidase e lacase pelo fungo *A. niger*, em estado sólido, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Para o cultivo com BCA não tratado, ela detectou a atividade de Lacase a partir do quinto dia de cultivo e MnP a partir do quarto dia. Então, certamente, o tempo de cultivo foi um fator limitante na produção dessas enzimas para o *A. niger*, uma vez que ele foi realizado por 96 horas.

Diversos autores relataram a ausência de lignina-peroxidase em cultivos de *C. subvermispota* (SOUZA-CRUZ, 2004; LOBOS et al., 1994; FARIA, 2010). Não foi

encontrado nenhum estudo na literatura que avaliou a produção de LiP pelo fungo *Aspergillus niger*. Como não foram encontradas atividades enzimáticas da manganês-peroxidase, Lacase e Lignina-peroxidase no cultivo de *A. niger*, pode-se inferir que não houve a produção de enzimas ligninolíticas por esse microrganismo.

A presença da atividade de CMCase (endoglicanases) e de açúcares redutores nos cultivos com ambos os fungos, indicam que os mesmos produziram endoglicanases e xilanases. As xilanases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações entre unidades monoméricas de xilose, que estão presentes na celulose, esses então são detectáveis pela determinação de açúcares redutores (MENDES, 2008).

5.1 *Ceriporiopsis subvermispora*

5.1.1 Produção de Açúcares Redutores Totais (ART)

Na Tabela 4 são apresentados os volumes dos extratos enzimáticos contidos em cada ensaio após a filtração, as massas de substrato sólido utilizadas e também as respostas e seus respectivos efeitos na produção de Açúcares Redutores Totais em cada um dos ensaios.

Tabela 4: Volumes dos extratos enzimáticos, massa de substrato e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de açúcares redutores totais no cultivo submerso de *Ceriporiopsis subvermispora*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas				
	A	B	A x B	Volume do extrato enzimático (mL)*	ART (mg/mL)*	ART (mg)*	Massa de substrato (g)	ART por massa de substrato (mg/g)*
1	-	+	-	26,83±0,58	2,674 ±0,395	71,613 ± 7,991x10 ⁻¹	0,72	99,463 ±6,192x10 ⁻³
2	+	+	+	27,50±0,00	5,349 ±0,305	147,106 ± 2,387x10 ⁻¹	0,72	204,314 ±2,690x10 ⁻⁴
3	-	-	+	25,17±0,29	1,795 ±0,098	45,198 ± 7,021x10 ⁻²	0,80	56,497 ±6,816x10 ⁻⁵

4	+	-	-	27,67±0,29	7,008 ±0,094	193,897 ± 2,804x10 ⁻²	0,80	242,371 ±2,534x10 ⁻⁶
---	---	---	---	------------	-----------------	-------------------------------------	------	------------------------------------

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

A variável A representa o tipo de substrato sólido utilizado no experimento, em que (+) representa a palha de milho e (-) representa o bagaço da cana-de-açúcar. A variável B representa a suplementação do meio de cultivo, onde (+) apresenta suplementação com farelo de trigo e (-) não apresenta suplementação.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-99,463+204,314-56,497+242,371)/2] = 145,363$.

Suplementação (B): $[(+99,463+204,314-56,497-242,371)/2] = 2,455$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-99,463+204,314+56,497-242,371)/2] = -40,512$.

A resposta Açúcares Redutores Totais por massa de substrato sólido (mg/g de substrato) pode ser apresentada em um sistema cartesiano, em que cada eixo representa uma variável (Figura 13).

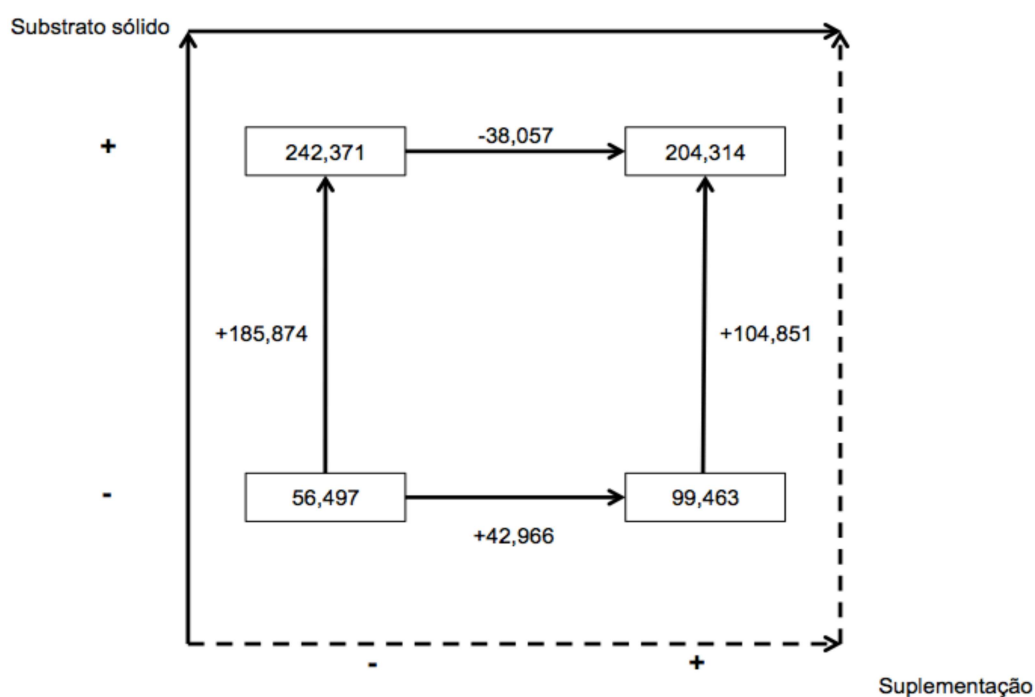


Figura 13: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Açúcares Redutores Totais em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispota* [resposta: mg/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Analisando a Tabela 4 e a Figura 13, pode-se observar que nos cultivos contendo a palha do milho como substrato sólido (2 e 4), a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo ocasionou uma redução de 38,057 mg/g de açúcares redutores no meio. Porém, para aqueles que utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato, a suplementação do meio foi positiva, levando a um aumento de 42,966 mg/g de açúcares redutores. Assim, o efeito global da variável suplementação do meio com farelo de trigo é dado pela média dos efeitos citados $[(42,966-38,057)/2]$, sendo positivo e igual a 2,455.

Nos ensaios em que houve suplementação do meio (1 e 2), ao comparar a produção de açúcares redutores totais entre os dois substratos, nota-se um aumento de 104,851 mg/g do bagaço de cana-de-açúcar para a palha de milho. Da mesma forma, nos ensaios em que não houve a suplementação do meio (3 e 4), a palha de milho apresentou uma maior produção (aumento de 185,874 mg/g) de açúcares redutores totais em relação ao bagaço de cana-de-açúcar. Então, efeito global da variável substrato sólido foi positivo e igual a 145,363, ou seja, a palha de milho aumenta a produção de açúcares redutores em 145,363 mg/g.

O efeito de segunda ordem (-40,512) indica que a associação das duas variáveis não foi favorável para a produção de açúcares redutores totais. Com base nos efeitos globais, pode-se afirmar que a influência do substrato sólido foi muito mais favorável à produção de açúcares. Portanto, a melhor condição para a produção de açúcares foi a do ensaio 4, o qual utilizou a palha de milho como substrato sólido sem suplementação.

5.1.2 Proteína total

A Tabela 5 e a Figura 14 mostram os resultados obtidos para a produção de proteína total em cada um dos ensaios.

Tabela 5: Volumes dos extratos enzimáticos e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de proteína total no cultivo de *Ceriporiopsis subvermispota*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas			
	A	B	A x B	Volume do extrato enzimático (mL)*	Proteína total (mg)*	Massa de substrato (g)	Proteína total por massa de substrato (mg/g)*
1	-	+	-	26,83±0,58	7,656 ± 0,016	0,72	10,633 ± 2,230x10 ⁻⁵
2	+	+	+	27,50±0,00	11,347 ± 0,017	0,72	15,759 ± 1,865x10 ⁻⁵
3	-	-	+	25,17±0,29	6,332 ± 0,020	0,80	7,914 ± 4,027x10 ⁻⁵
4	+	-	-	27,67±0,29	10,680 ± 0,018	0,80	13,350 ± 1,980x10 ⁻⁵

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais: Substrato sólido (A): $[(-10,633+15,759-7,914+13,350)/2] = 5,281$.

Suplementação (B): $[(+10,633+15,759-7,914-13,350)/2] = 2,564$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-10,633+15,759+7,914-13,350)/2] = -0,155$.

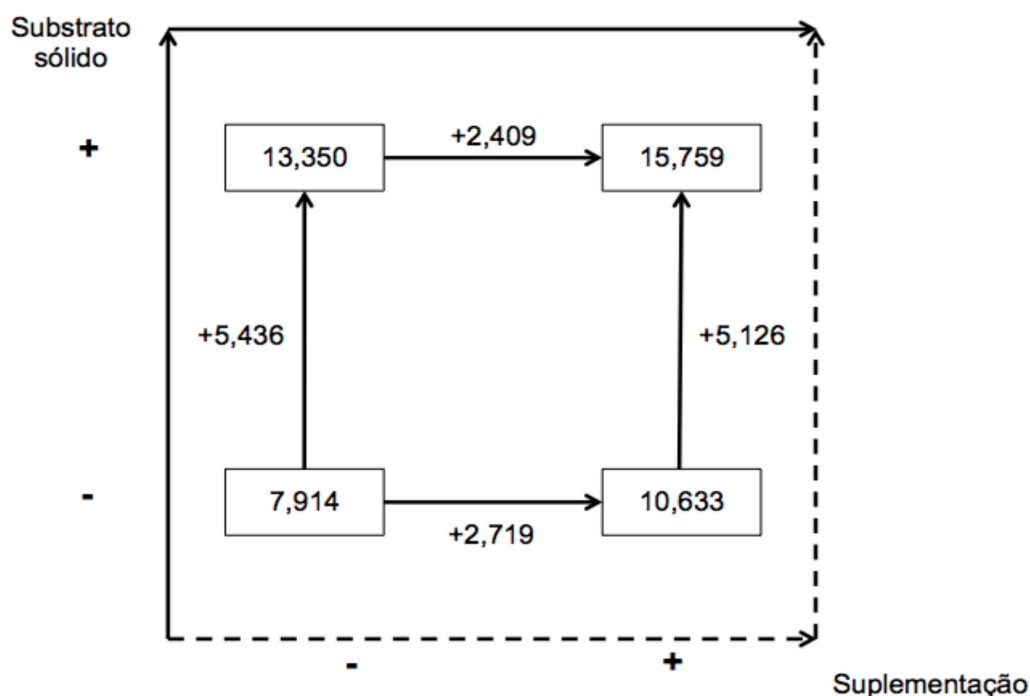


Figura 14: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de proteínas totais em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispota* [resposta: mg/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Com base nos dados apresentados na tabela 5 e na Figura 14, pode-se observar que nos ensaios que continham o bagaço de cana-de-açúcar como substrato sólido (1 e 3), a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo, fez com que a quantidade de proteínas totais aumentasse em 2,719 mg/g. Nos ensaios que teve como substrato sólido a palha de milho (2 e 4), a suplementação do meio com farelo de trigo também aumentou a quantidade de proteínas totais em 2,409 mg/g. Nesse caso, o efeito global proveniente da suplementação do meio com farelo de trigo pôde ser obtido a partir da média dos efeitos citados $[(2,719 + 2,409)/2]$ que é igual a 2,564.

Para os ensaios em que não houve a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo (3 e 4), observa-se um aumento de 5,436 mg/g na produção de proteínas totais quando o substrato sólido utilizado foi a palha de milho (em relação ao bagaço da cana-de-açúcar). Também nos ensaios com suplementação do meio (1 e 2), houve um aumento de 5,126 mg/g de proteínas totais quando o substrato sólido foi a palha de milho. O efeito global da variável substrato sólido calculado foi de 5,281 mg/g.

A partir da análise dos efeitos globais das duas variáveis, é possível notar que, tanto o substrato sólido, quanto a suplementação com farelo de trigo influenciaram a produção de proteínas totais e ambos positivamente. Porém, o efeito da variável substrato sólido foi mais significativo. O efeito de segunda ordem (-0,155) indica que a associação entre essas duas variáveis não foi favorável para a produção dessas proteínas. A maior quantidade de proteínas totais foi obtida no ensaio 2, que continha palha de milho como substrato sólido e suplementação com farelo de trigo.

5.1.3 Produção de Lacase

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para as atividades específicas e relação atividade total/massa de substrato da Lacase (ULac/mL de meio de cultivo, ULac/mg de proteína total e ULac/g de substrato). A Figura 15 apresenta a resposta da relação atividade da Lacase/massa de substrato (ULac/g de substrato).

Tabela 6: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de Lacase no cultivo submerso de *Ceriporiopsis subvermispura*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (-) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (-) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	Atividade enzimática específica (ULac/mL)*	Atividade enzimática específica (ULac/mg)*	Lacase por massa de substrato (ULac/g)*
1	-	+	-	$0,043 \pm 4,642 \times 10^{-3}$	$0,152 \pm 3,313 \times 10^{-7}$	$1,603 \pm 4,300 \times 10^{-11}$
2	+	+	+	$0,044 \pm 9,416 \times 10^{-2}$	$0,108 \pm 1,283 \times 10^{-7}$	$1,688 \pm 5,527 \times 10^{-12}$
3	-	-	+	$0,040 \pm 3,539 \times 10^{-3}$	$0,161 \pm 8,174 \times 10^{-7}$	$1,264 \pm 2,751 \times 10^{-9}$
4	+	-	-	$0,047 \pm 1,023 \times 10^{-1}$	$0,121 \pm 1,797 \times 10^{-7}$	$1,612 \pm 2,605 \times 10^{-9}$

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-1,603+1,688-1,264+1,612)/2] = 0,217$.

Suplementação (B): $[(+1,603+1,688-1,264-1,612)/2] = 0,208$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-1,603+1,688+1,264-1,612)/2] = -0,132$.

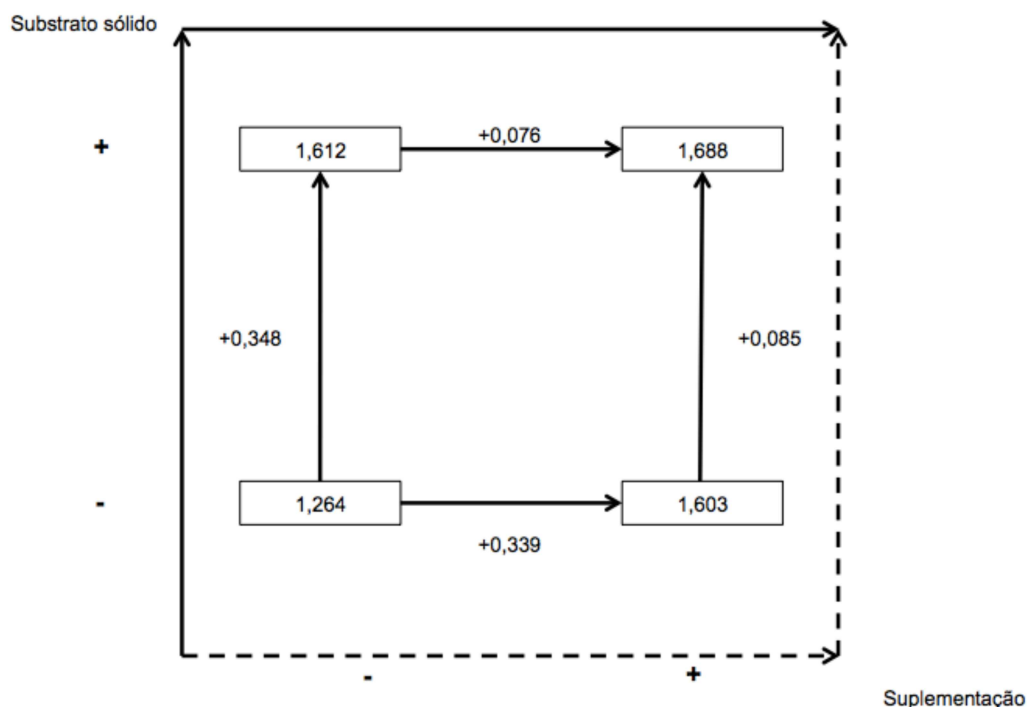


Figura 15: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Lacase em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispura* [resposta: ULac/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Analisando-se a Tabela 6 e a Figura 15, pode-se observar que para os ensaios 1 e 3, nos quais o substrato sólido utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar, a suplementação do meio de cultivo com farelo de trigo proporcionou um aumento de 0,339 ULac/g. Da mesma forma, nos ensaios 2 e 4, em que a palha de milho foi o substrato sólido, a suplementação ocasionou um aumento da ordem de 0,076 ULac/g. Pode-se dizer, então, que o efeito global da variável suplementação do meio de cultivo na produção de Lacase foi positivo e igual a 0,208.

Ao analisar os ensaios 1 e 2, nos quais ocorreu suplementação, nota-se que o ensaio contendo palha de milho (2), apresentou maior atividade de Lacase quando comparado ao ensaio com bagaço de cana-de-açúcar (1), com um pequeno aumento na atividade enzimática da Lacase de 0,085 ULac/g. Já nos ensaios 3 e 4, nos quais não houve suplementação com farelo de trigo, o experimento que teve a palha de milho como substrato sólido (4) apresentou maior atividade enzimática da Lacase (aumento de 0,348 ULac/g) do que o ensaio com bagaço de cana-de-açúcar. Assim, o efeito global da variável substrato sólido na produção de Lacase foi de 0,217.

A partir da análise dos efeitos globais das duas variáveis, pode-se dizer que ambas as mudanças apresentaram efeito positivo na produção de Lacase. Analisando o efeito de segunda ordem (-0,132), conclui-se que a associação das duas variáveis não foi favorável para a produção de lacase. Ainda assim, a melhor condição de cultivo para a atividade de Lacase foi a do ensaio 2, que teve a palha de milho como substrato sólido e no qual houve a suplementação do meio de cultivo pelo farelo de trigo.

5.1.4 Produção de FPase

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para as atividades específicas e relação atividade total/massa de substrato da FPase (UFPase/mL de meio de cultura, UFPase/mg de proteína total e UFPase/g de substrato). A Figura 16 mostra a representação geométrica da resposta da relação atividade da FPase/massa de substrato (UFPase/g de substrato).

Tabela 7: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de FPase no cultivo submerso de *Ceriporiopsis subvermispota*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (-) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (-) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	Atividade enzimática específica (UFPase/mL)*	Atividade enzimática específica (UFPase/mg)*	FPase por massa de substrato (UFPase/g)*
1	-	+	-	$0,266 \pm 0,003$	$0,934 \pm 2,302 \times 10^{-5}$	$9,907 \pm 3,010 \times 10^{-9}$
2	+	+	+	$0,533 \pm 0,113$	$1,285 \pm 3,256 \times 10^{-4}$	$20,371 \pm 6,537 \times 10^{-7}$
3	-	-	+	$0,207 \pm 0,032$	$0,827 \pm 6,401 \times 10^{-5}$	$6,508 \pm 1,947 \times 10^{-8}$
4	+	-	-	$0,474 \pm 0,083$	$1,228 \pm 1,455 \times 10^{-4}$	$16,408 \pm 1,152 \times 10^{-7}$

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-9,907+20,371-6,508+16,408)/2] = 10,182$.

Suplementação (B): $[(9,907+20,371-6,508-16,408)/2] = 3,681$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-9,907+20,371+6,508-16,408)/2] = 0,282$.

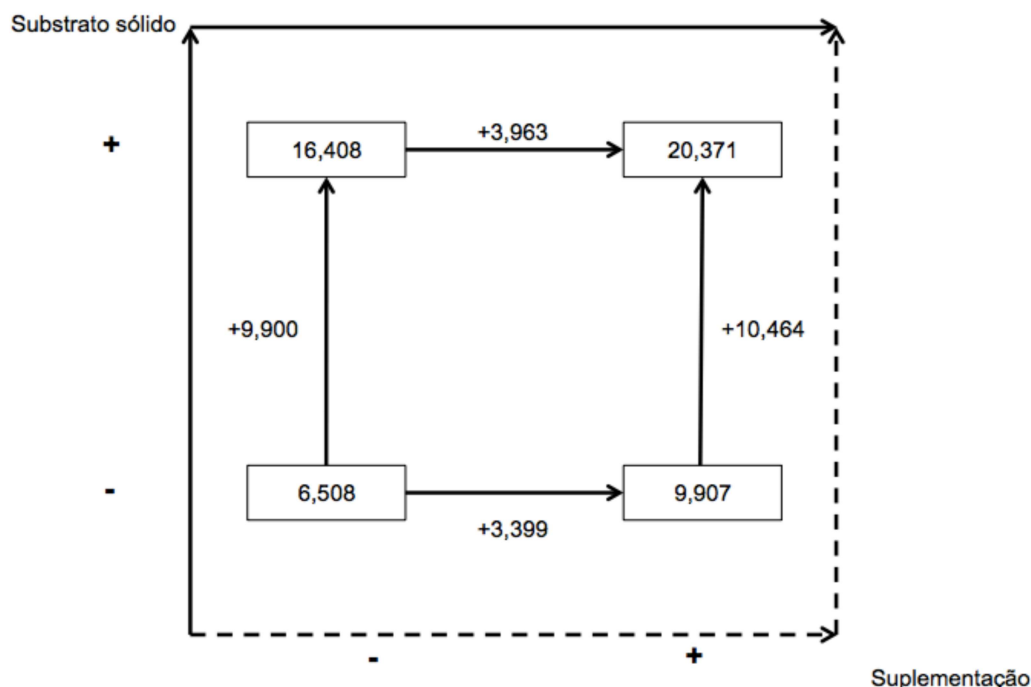


Figura 16: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de FPase em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispota* [resposta: UFPase/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

A partir dos dados apresentados na Tabela 7 e na Figura 16, é possível observar que nos ensaios 1 e 3, que continham o bagaço de cana-de-açúcar como substrato sólido, houve um aumento de 3,399 UFPase/g da produção de FPase quando o meio foi suplementado com farelo de trigo. Da mesma forma, nos cultivos que tinham a palha de milho como substrato sólido (2 e 4), o aumento da produção de FPase foi de 3,963 UFPase/g, quando suplementado. O efeito global apresentado pela variável suplementação com farelo de trigo, nesse caso, foi de 3,681, valor obtido a partir da média dos efeitos citados.

No caso dos cultivos 1 e 2, que foram suplementados com farelo de trigo, nota-se uma maior produção de FPase no cultivo com palha de milho (2) quando comparado àquele com bagaço de cana-de-açúcar (1), mostrando um aumento de 10,464 UFPase/g. Para os meios sem suplementação (3 e 4), o que teve a palha de milho (4) como substrato sólido, também apresentou uma maior atividade enzimática, quando comparado com o ensaio contendo bagaço de cana-de-açúcar (3), apresentando aumento de 9,900 UFPase/g de um substrato para o outro. No caso da variável substrato sólido, o efeito global calculado foi igual a 10,182.

A análise dos efeitos globais obtidos para as duas variáveis nos permite concluir que ambos foram positivos para o cultivo, sendo que o efeito da variável substrato sólido foi mais significativo que o efeito da suplementação com farelo de trigo. Da mesma forma, o efeito de segunda ordem (0,282) mostra que a associação das duas variáveis foi favorável à produção de FPase, assim, foi obtida maior atividade enzimática no ensaio 2, que teve como substrato a palha de milho e com suplementação de farelo de trigo.

5.1.5 Produção de CMCase

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para as atividades específicas e relação atividade total/massa de substrato da CMCase (UCMCase /mL de meio de cultivo, UCMCase/mg de proteína total e UCMCase/g de substrato). A Figura 17 mostra a representação geométrica da resposta da atividade da CMCase por massa de substrato (CMCase/g de substrato).

Tabela 8: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de CMCase no cultivo submerso de *Ceriporiopsis subvermispura*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (-) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (-) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	Atividade enzimática específica (UCMCase/mL)*	Atividade enzimática específica (UCMCase/mg)*	CMCase por massa de substrato (UCMCase/g)*
1	-	+	-	$1,077 \times 10^2 \pm 2,458 \times 10^{-2}$	$3,789 \times 10^2 \pm 8,288 \times 10^{-4}$	$4,011 \times 10^3 \pm 9,597 \times 10^{-9}$
2	+	+	+	$1,784 \times 10^2 \pm 2,137 \times 10^{-3}$	$4,329 \times 10^2 \pm 5,124 \times 10^{-4}$	$6,815 \times 10^3 \pm 4,774 \times 10^{-9}$
3	-	-	+	$0,622 \times 10^2 \pm 1,350 \times 10^{-4}$	$2,481 \times 10^2 \pm 1,263 \times 10^{-3}$	$1,959 \times 10^3 \pm 2,538 \times 10^{-8}$
4	+	-	-	$1,985 \times 10^2 \pm 4,652 \times 10^{-2}$	$5,181 \times 10^2 \pm 7,694 \times 10^{-4}$	$6,858 \times 10^3 \pm 7,561 \times 10^{-9}$

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-4,011 + 6,815 - 1,959 + 6,858) \times 10^3 / 2] = 3,852 \times 10^3$.

Suplementação (B): $[(+4,011 + 6,815 - 1,959 - 6,858) \times 10^3 / 2] = 1,005 \times 10^3$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-4,011 + 6,815 + 1,959 - 6,858) \times 10^3 / 2] = -1,048 \times 10^3$.

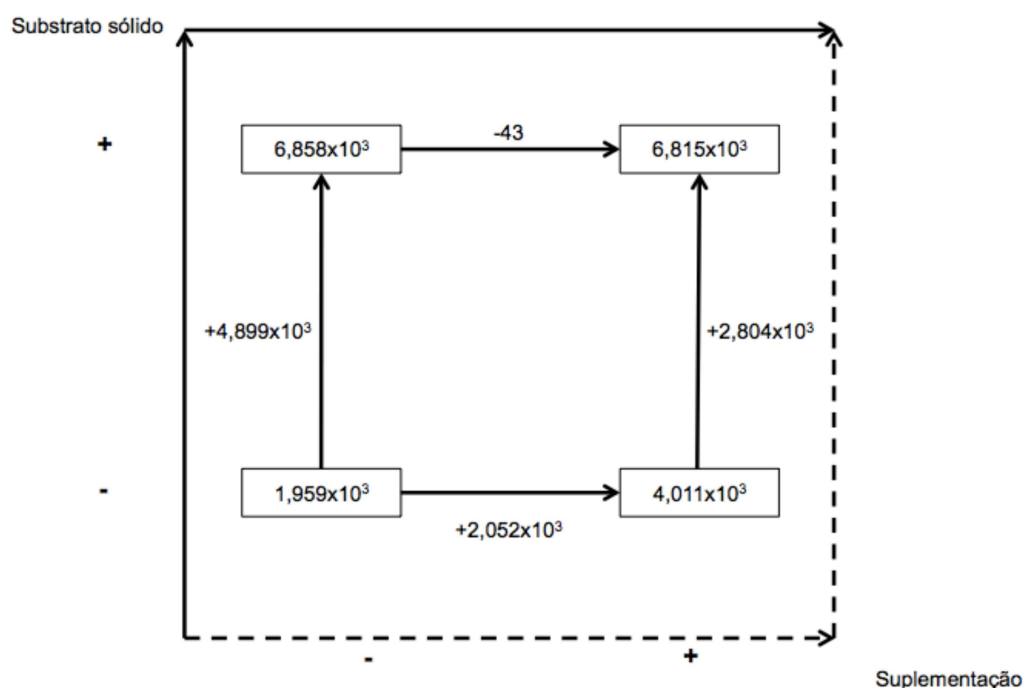


Figura 17: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de CMCase em cultivo submerso do *Ceriporiopsis subvermispura* [resposta: UCMCase/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Tendo como base a Tabela 8 e a Figura 17, pode-se observar que nos experimentos 1 e 3, que utilizaram o bagaço da cana-de-açúcar como substrato sólido, ocorreu um aumento de $2,052 \times 10^3$ UCMCase/g na atividade das CMCases quando houve a suplementação do meio. No entanto, quando a variável A foi a palha de milho, a suplementação causou um efeito negativo na produção de CMCase, com queda da atividade enzimática da ordem de 43 UCMCase/g. Neste caso, o efeito da suplementação do meio com farelo de trigo foi positivo e igual a $1,005 \times 10^3$.

Ao comparar os cultivos 1 e 2, nos quais houve a suplementação, nota-se um aumento da produção de CMCase da ordem de $2,804 \times 10^3$ UCMCase/g quando o substrato sólido utilizado é a palha de milho. Da mesma forma, nos ensaios 3 e 4, em que não houve suplementação pelo farelo de trigo, o meio que continha palha de milho apresentou uma maior atividade enzimática do que aquele com bagaço de cana-de-açúcar (aumento de $4,899 \times 10^3$ UCMCase/g). Assim sendo, observa-se um efeito global positivo, igual a $3,852 \times 10^3$, da variável substrato sólido.

O efeito de segunda ordem ($-1,048 \times 10^3$) mostra que a associação das variáveis foi desfavorável à produção de endoglicanases. Diferentemente das duas variáveis isoladas, que apresentaram um efeito positivo na produção dessas enzimas. Pelos valores encontrados, pode-se dizer que a mudança de substrato sólido foi mais significativa na produção dessas enzimas. O ensaio que apresentou maior produção em relação à atividade/g de substrato foi o 4, que utilizou palha de milho como substrato e não houve a suplementação com farelo de trigo.

Então, de um modo geral, o ensaio 2 foi o que apresentou os melhores resultados para o cultivo submerso do fungo *Ceriporiopsis subvermispota*, seguido pelo ensaio 4. Isto mostra que, a palha de milho foi o melhor substrato sólido na produção de todos os produtos e enzimas analisadas. A suplementação do meio de cultivo pelo farelo de trigo não foi favorável para a produção de açúcares redutores totais e endoglicanases, tendo a variável substrato sólido se mostrado mais eficiente nesse caso. Porém, para a produção de proteínas totais, celulasas totais e lacases, a suplementação do meio pelo farelo de trigo foi positiva.

FARIA (2010) determinou a atividade máxima da lacase igual a $69,0 \text{ UI.L}^{-1}$ no 6º dia de cultivo submerso de *C. subvermispota* em meio complexo, composto por extrato de batata/dextrose e extrato de levedura. A atividade máxima de lacase

obtida no presente trabalho foi 0,676 vezes menor que a encontrada por FARIA (2010), porém, no presente trabalho, o tempo de cultivo foi maior (14 dias). Esta atividade máxima, também é 0,042 vezes menor que aquela encontrada por CHMELOVÁ e ONDREJOVIČ (2012). Eles encontraram uma máxima atividade de lacase igual a $1,1 \text{ U.mL}^{-1}$ no 16º dia de cultivo para o CS do fungo *C. subvermispora*, em meio contendo a palha de trigo como substrato.

Em seu estudo para verificar o metabolismo extracelular dos fungos *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phlebia tremellosa*, SOUZA-CRUZ (2005) determinou as atividades máximas de celulases totais e endoglicanases, respectivamente, iguais a $0,054 \text{ UI.g}^{-1}$ e $0,275 \text{ UI.g}^{-1}$ para a biodegradação em estado sólido da madeira da espécie *Eucalyptus grandis* na presença de milhocina por *C. subvermispora*. As atividades máximas para essas enzimas encontradas no presente trabalho foram, respectivamente, 377,249 e $2,494 \times 10^4$ vezes maiores que as descritas por esse autor.

MENDES (2008) determinou a atividade de endoglicanases e celulases totais para duas semanas de cultivo em estado sólido do *C. subvermispora* em madeira e obteve valores iguais a $0,046 \text{ UI.g}^{-1}$ e $0,012 \text{ UI.g}^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram, respectivamente, $1,491 \times 10^5$ e $1,697 \times 10^3$ vezes menores que as atividades máximas encontradas no presente estudo.

A comparação entre os valores obtidos a partir da realização desses ensaios, com os valores da literatura, mostra que as condições empregadas foram muito vantajosas para a produção de enzimas lignocelulolíticas, pois no caso das celulases totais e endoglucanases suas atividades enzimáticas obtidas foram muito maiores que aquelas apresentadas na literatura. Isso pode ter acontecido devido à adição de melaço da cana-de-açúcar aos meios de cultivo, que pode ter agido como um indutor para a produção das mesmas.

5.2 *Aspergillus niger*

5.2.1 Produção de Açúcares Redutores Totais (ART)

A Tabela 9 apresenta os volumes dos extratos enzimáticos obtidos em cada ensaio após a filtração, as massas de substrato sólido utilizadas e também as

respostas e seus respectivos efeitos na produção de Açúcares Redutores Totais em cada um dos ensaios.

Tabela 9: Volumes dos extratos enzimáticos, massa de substrato e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de açúcares redutores totais no cultivo submerso de *Aspergillus niger*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas				
	A	B	A x B	Volume do extrato enzimático (mL)*	ART (mg/mL)*	ART (mg)*	Massa de substrato (g)	ART/substrato (mg/g)*
1	-	+	-	15,00±0,00	0,699 ±0,031	41,956 ±0,041	0,72	58,272 ± 1,512x10 ⁻³
2	+	+	+	20,00±0,00	1,709 ±0,072	136,734 ±0,121	0,72	189,908 ± 7,459x10 ⁻⁵
3	-	-	+	15,00±0,00	4,886 ±0,223	73,286 ±0,077	0,80	91,611 ± 5,007x10 ⁻⁵
4	+	-	-	20,00±0,00	0,866 ±0,094	69,236 ±0,409	0,80	86,545 ± 1,512x10 ⁻³

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-58,272+189,908-91,611+86,545)/2] = 63,285$.

Suplementação (B): $[(+58,272+189,908-91,611-86,545)/2] = 35,012$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-58,272+189,908+91,611-86,545)/2] = 68,351$.

A resposta para a produção de Açúcares Redutores Totais pela massa de substrato sólido (mg/g de substrato) foi representada em um sistema cartesiano em que cada eixo representa uma variável (Figura 18).

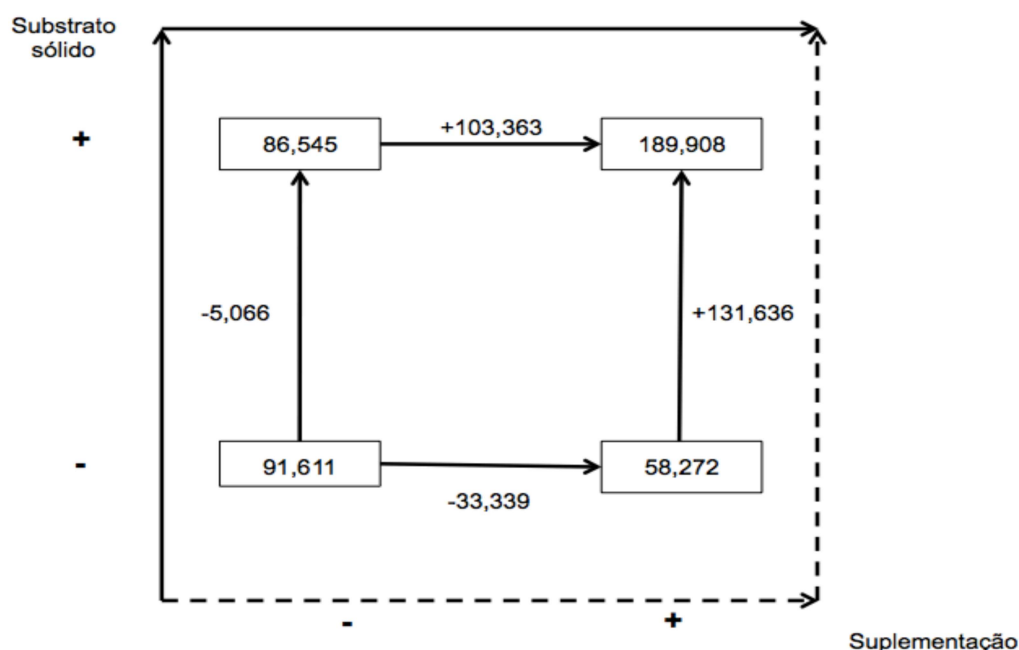


Figura 18: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de Açúcares Redutores Totais em cultivo submerso do *Aspergillus niger* [resposta: mg/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Com base nas informações apresentadas na Tabela 9 e na Figura 18, pode-se inferir que os ensaios em que foram utilizados o bagaço de cana-de-açúcar como substrato sólido (1 e 3), a suplementação do meio com farelo de trigo levou a uma redução na produção de açúcares redutores no meio da ordem de 33,339 mg/g. Porém, nos cultivos em que o substrato sólido foi a palha de milho (2 e 4), a suplementação levou a um aumento na produção de açúcares redutores (103,363 mg/g). O efeito global observado para a variável suplementação do meio de cultura com farelo de trigo pode ser dado pela média dos efeitos citados, sendo positivo e igual a 35,012.

Para os cultivos em que não houve suplementação (3 e 4), nota-se uma redução de 5,066 mg/g de açúcares redutores no meio quando o substrato sólido utilizado foi a palha de milho. Já nos cultivos com suplementação do meio (1 e 2), aquele que utilizou a palha de milho como substrato, mostrou uma maior produção de açúcares redutores totais (131,636 mg/g) quando comparado ao que continha bagaço de cana-de-açúcar. O efeito global calculado para a variável substrato sólido é positivo e igual a 63,285.

As duas variáveis influenciaram positivamente a produção de açúcares redutores no meio, porém a influência do substrato sólido foi maior. O efeito de segunda ordem (68,351) também mostrou que a associação entre as duas variáveis foi favorável, portanto, a maior produção de açúcares foi observada no ensaio 2, o qual utilizou palha de milho como substrato sólido e no qual ocorreu a suplementação pelo farelo de trigo.

5.2.2 Proteína Total

Na Tabela 10 estão apresentados os volumes dos extratos enzimáticos contidos em cada ensaio após a filtração, as massas de substrato sólido utilizadas e também os resultados obtidos e seus respectivos efeitos na produção de proteína total em cada um dos ensaios. A Figura 19 mostra o sistema cartesiano com a resposta Proteína total pela massa de substrato sólido (mg/g de substrato).

Tabela 10: Volumes dos extratos enzimáticos e resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de proteína total no cultivo submerso de *Aspergillus niger*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas			
	A	B	A x B	Volume do extrato enzimático (mL)*	Proteína total (mg)*	Massa de substrato (g)	Proteína / substrato (mg/g)*
1	-	+	-	15,00±0,00	9,647 ±0,029	0,72	13,398±6,167x10 ⁻⁵
2	+	+	+	20,00±0,00	29,139 ±0,003	0,72	40,471±1,680x10 ⁻⁷
3	-	-	+	15,00±0,00	7,309 ±0,003	0,80	9,136±7,229x10 ⁻⁷
4	+	-	-	20,00±0,00	17,815 ±0,108	0,80	22,268±4,112x10 ⁻⁴

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-13,398+40,471-9,136 +22,268)/2] = 20,103$.

Suplementação (B): $[(+13,398+40,471-9,136 -22,268)/2] = 11,233$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-13,398+40,471+9,136-22,268)/2] = 6,971$.

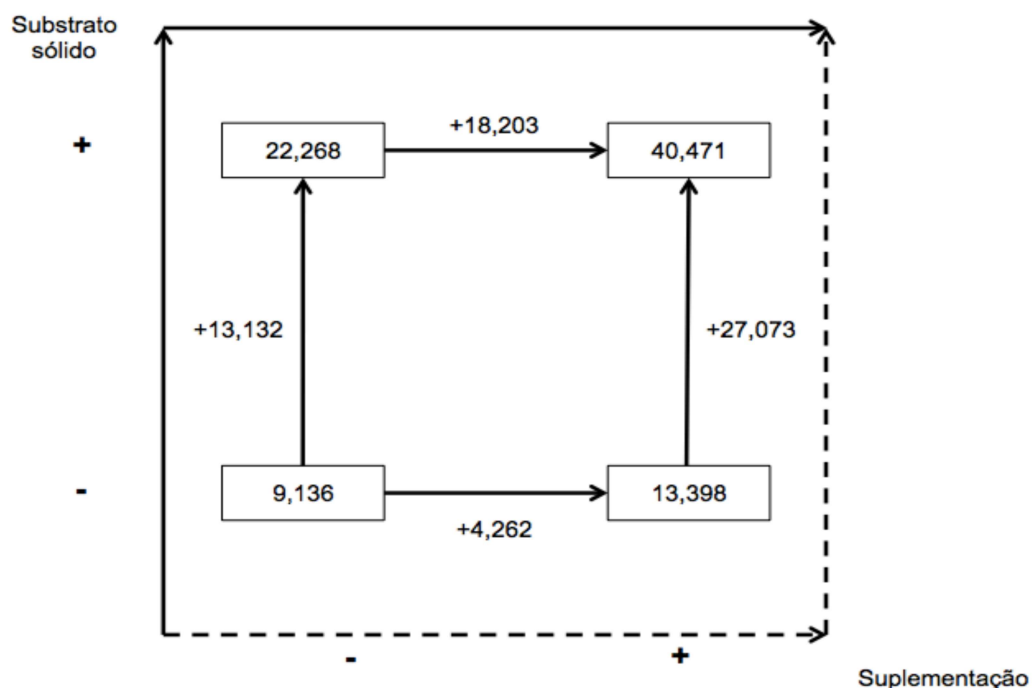


Figura 19: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de proteínas totais em cultivo submerso do *Aspergillus niger* [resposta: mg/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

A partir das informações contidas na Tabela 10 e na Figura 19, é possível observar que nos ensaios que utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato sólido (1 e 3), aquele que apresentou maior produção de proteínas totais foi o suplementado com farelo de trigo, que levou a um aumento de 4,262 mg/g. Nos ensaios em que foram utilizados a palha de milho como substrato sólido (2 e 4), a suplementação levou a um aumento maior na produção de proteínas totais, sendo igual a 18,203 mg/g. Assim, o efeito global apresentado pela variável suplementação, na produção de proteínas totais foi positivo e igual a 11,233.

Nos ensaios 3 e 4, nos quais não ocorreu a suplementação, o substrato sólido que apresentou maior produção de proteínas totais foi a palha de milho, o qual teve um aumento de 13,132 mg/g de proteínas totais quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar. Da mesma forma, nos cultivos em que houve a suplementação do meio (1 e 2), aquele que utilizou a palha de milho teve um aumento na produção de 27,073 mg/g de proteínas totais em relação ao que continha o bagaço de cana de açúcar. O efeito global do substrato sólido na produção de proteínas totais foi igual a 20,103.

O efeito de segunda ordem (6,971) indica que a associação das duas variáveis foi positiva para a produção de proteínas totais. A partir dos resultados obtidos para os efeitos globais, conclui-se que a palha de milho foi mais favorável à produção de proteína total. Sendo assim, a melhor condição para a produção de proteínas totais foi o ensaio 2, no qual houve a suplementação com farelo de trigo e o substrato sólido foi a palha de milho.

5.2.3 Produção de FPase

Os resultados obtidos para as atividades específicas e relação atividade total/massa de substrato da FPase (UFPase/mL de meio de cultura, UFPase/mg de proteína total e UFPase/g de substrato) estão apresentados na Tabela 11. Na Figura 20 está a representação geométrica da resposta da atividade da FPase por massa de substrato (UFPase/g de substrato).

Tabela 11: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de FPase no cultivo submerso de *Aspergillus niger*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	Atividade enzimática específica (UFPase/mL)*	Atividade enzimática específica (UFPase/mg)*	FPase por massa de substrato (UFPase/g)*
1	-	+	-	$0,277 \pm 3,374 \times 10^{-4}$	$0,432 \pm 2,310 \times 10^{-6}$	$5,767 \pm 8,239 \times 10^{-11}$
2	+	+	+	$0,792 \pm 1,641 \times 10^{-3}$	$0,543 \pm 1,169 \times 10^{-6}$	$21,992 \pm 5,094 \times 10^{-11}$
3	-	-	+	$0,149 \pm 5,555 \times 10^{-5}$	$0,306 \pm 4,547 \times 10^{-8}$	$2,793 \pm 3,086 \times 10^{-14}$
4	+	-	-	$0,361 \pm 4,665 \times 10^{-3}$	$0,404 \pm 4,116 \times 10^{-5}$	$9,028 \pm 4,686 \times 10^{-8}$

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-5,767+21,992-2,793+9,028)/2] = 11,230$.

Suplementação (B): $[(+5,767+21,992-2,793-9,028)/2] = 7,969$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-5,767+21,992+2,793-9,028)/2] = 4,995$.

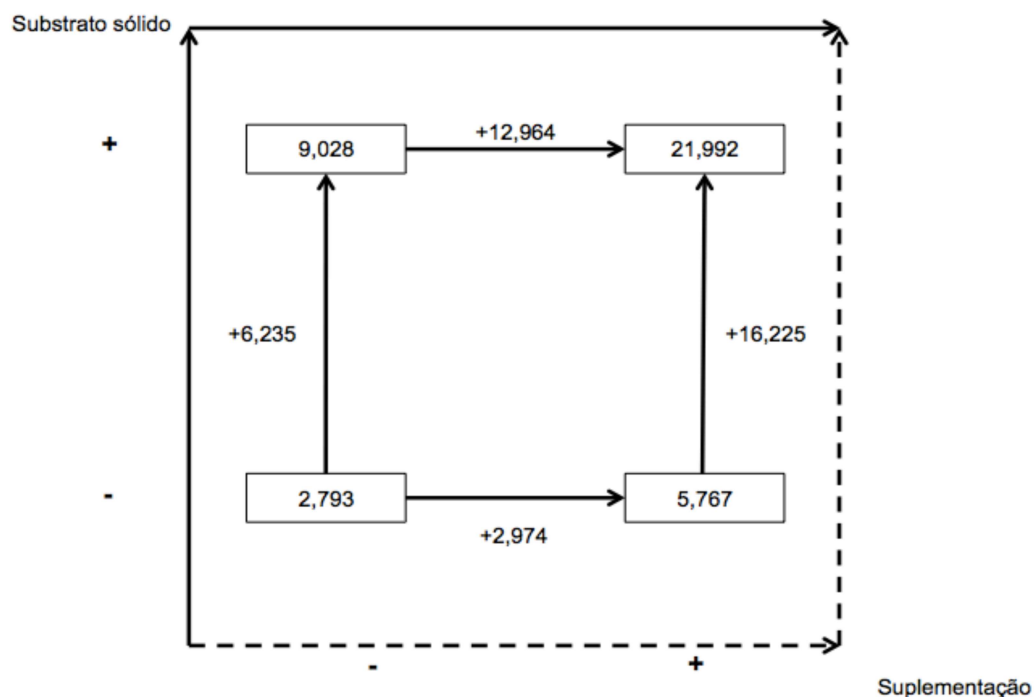


Figura 20: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de FPase em cultivo submerso do *Aspergillus niger* [resposta: UFPase/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Para a análise da produção de FPase, observa-se que, para os ensaios 1 e 3, os quais utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato sólido, a suplementação do meio proporcionou um aumento de 2,974 UFPase/g. Nos ensaios 2 e 4, que tiveram como substrato sólido a palha de milho, a suplementação do meio de cultura levou a um aumento de 12,964 UFPase/g. Assim sendo, o efeito global da variável suplementação do meio de cultura na produção de FPase foi de 7,969.

Nos ensaios em que houve a suplementação do meio com farelo de trigo (1 e 2), nota-se um aumento de 16,225 UFPase/g na atividade de FPases naquele que utilizou a palha de milho como substrato sólido. Da mesma maneira, nos ensaios em que não ocorreu suplementação (3 e 4), a palha de milho apresentou uma atividade enzimática de 6,235 UFPase/g maior que o bagaço de cana-de-açúcar. Assim, efeito global do substrato sólido foi de 11,230.

Portanto, as duas variáveis apresentaram um efeito positivo na produção de FPases, porém o substrato sólido mostrou-se mais significativo. O efeito de segunda ordem (4,995) mostra que a associação entre as duas variáveis também foi favorável para a produção de celulases totais (FPases), sendo a melhor condição a

do ensaio 2, que utilizou a palha de milho como substrato sólido e que foi suplementado com o farelo de trigo.

5.2.4 Produção de CMCase

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para as atividades específicas e relação atividade total/massa de substrato da CMCase (UCMCase /mL de meio de cultivo, UCMCase/mg de proteína total e UCMCase/g de substrato). Na Figura 21 está a representação geométrica da resposta da atividade da CMCase por massa de substrato (CMCase/g de substrato).

Tabela 12: Resultados do planejamento fatorial 2^2 para o estudo dos efeitos do tipo de substrato sólido e da suplementação com farelo de trigo na produção de CMCase no cultivo submerso de *Aspergillus niger*. A = substrato sólido, (+) representa a palha de milho e (–) o bagaço de cana-de-açúcar, e B = suplementação com farelo de trigo, (+) o meio foi suplementado e (–) o meio não foi suplementado.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	A	B	A x B	Atividade enzimática específica (UCMCase/mL)*	Atividade enzimática específica (UCMCase/mg)*	CMCase por massa de substrato (UCMCase/g)*
1	-	+	-	$0,617 \pm 4,309 \times 10^{-2}$	$9,614 \pm 5,774 \times 10^{-6}$	$12,858 \pm 1,805 \times 10^{-5}$
2	+	+	+	$2,192 \pm 6,663 \times 10^{-2}$	$1,504 \pm 1,131 \times 10^{-8}$	$60,893 \pm 2,051 \times 10^{-7}$
3	-	-	+	$0,153 \pm 4,468 \times 10^{-3}$	$13,134 \pm 1,022 \times 10^{-7}$	$2,861 \pm 7,066 \times 10^{-7}$
4	+	-	-	$0,727 \pm 1,284 \times 10^{-1}$	$8,133 \pm 1,511 \times 10^{-5}$	$18,184 \pm 2,067 \times 10^{-6}$

*As incertezas indicadas são correspondentes ao desvio padrão da média para as determinações em triplicata.

Efeitos principais:

Substrato sólido (A): $[(-12,858+60,893-2,861+18,184)/2] = 31,679$.

Suplementação (B): $[(+12,858+60,893-2,861-18,184)/2] = 26,353$.

Efeitos de segunda ordem: Substrato sólido (A) x Suplementação (B): $[(-12,858+60,893+2,861-18,184)/2] = 16,356$.

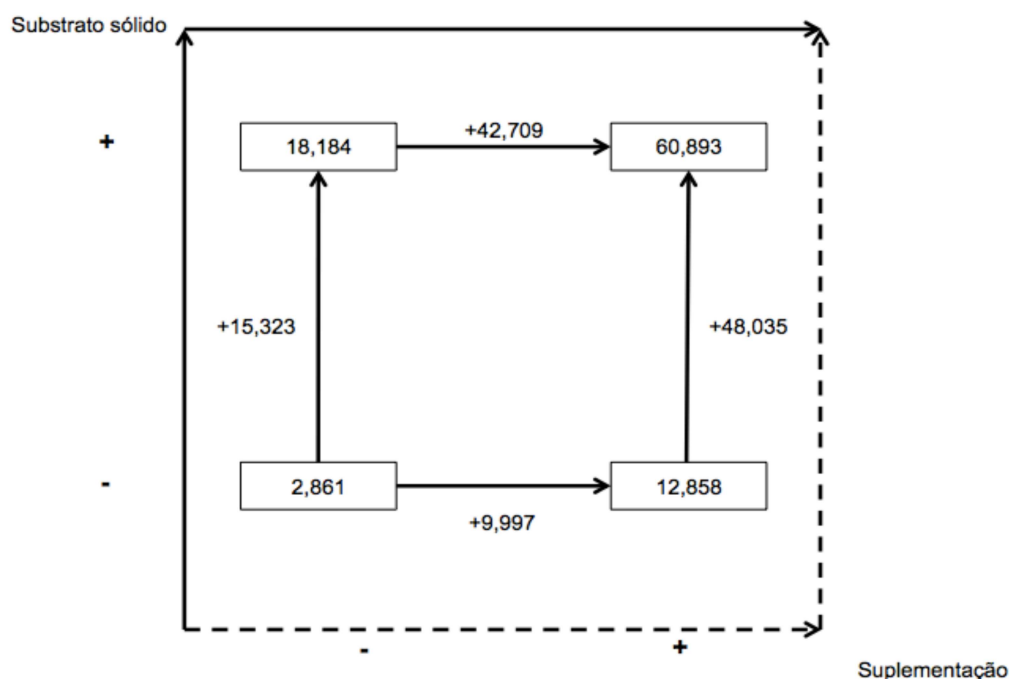


Figura 21: Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para a produção de CMCase em cultivo submerso do *Aspergillus niger* [resposta: UCMCase/g de substrato]. Substrato sólido: bagaço de cana-de-açúcar (-) e palha de milho (+), suplementação com farelo de trigo: sem suplementação (-), com suplementação (+).

Os ensaios que utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato sólido, a suplementação do meio proporcionou aumento de 9,997 UCMCase/g. Da mesma forma, quando a palha de milho foi utilizada, a suplementação do meio ocasionou aumento de 42,709 UCMCase/g. Então, o efeito global da variável suplementação do meio com farelo de trigo foi de 26,353.

A análise dos ensaios sem suplementação (3 e 4) nos permite dizer que a utilização da palha de milho como substrato sólido leva a um aumento de 15,323 UCMCase/g na atividade da CMCase. Nos ensaios que apresentavam suplementação (1 e 2), aquele que continha a palha de milho como substrato também mostrou maior atividade de CMCase (aumento de 48,035 UCMCase/g) em relação àquele com bagaço de cana-de-açúcar. O efeito global para essa variável foi de 31,679.

O efeito de segunda ordem (16,356) foi positivo, indicando que a interação entre as duas variáveis foi favorável para a produção de endoglicanases. A partir dos efeitos globais, conclui-se que a variável substrato sólido foi mais favorável e, portanto, a melhor condição de cultivo para a produção de CMCases foi a do ensaio

2, que foi suplementado pelo farelo de trigo e utilizou palha de milho como substrato sólido.

Analisando todos os efeitos das diferentes respostas, o ensaio que apresentou os melhores resultados para a fermentação submersa do *Aspergillus niger* foi o de número 2 (palha de milho suplementado com farelo de trigo). Assim, pode-se dizer que a associação, entre o substrato sólido palha de milho e a suplementação do meio por farelo de trigo, foi muito favorável à produção de açúcares redutores totais, proteínas totais, celulasas totais (FPases) e endoglicanases (CMCases).

Em um estudo realizado por AGUIAR (2010), no qual cultivou-se *Aspergillus niger* em estado sólido, utilizando diversos substratos sólidos (entre eles o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de milho pré-tratados), determinou-se as atividades máximas de celulasas totais e endoglicanases iguais a 0,527 UF/mL e 0,338 UCMC/mL, respectivamente. No presente estudo, as atividades encontradas para essas enzimas foram, respectivamente, 150% e 648% maiores que as determinadas por AGUIAR (2010).

GHORI et al. (2011) determinaram a atividade máxima de endoglicanases igual a $1,150 \text{ U.mL}^{-1}$ no cultivo submerso de *Aspergillus niger* com a palha de milho como substrato sólido, e adicionado de melaço de cana-de-açúcar. O ensaio 4 (palha de milho sem suplementação), teve condições idênticas à estas e apresentou atividade enzimática 63% menor. Porém, a atividade máxima (ensaio 2) obtida para essa enzima no presente estudo, foi de 90% maior que a encontrada por GHORI et al. (2011). Isso indica, que a suplementação do meio de cultivo com o farelo de trigo foi favorável à produção de endoglicanases. Nesse mesmo estudo, GHORI et al. (2011) também estudaram o efeito da adição de melaço de cana-de-açúcar ao meio, obtendo um aumento de 88% quando comparado ao cultivo sem o melaço. Isso mostra que todos os cultivos realizados neste estudo, foram favorecidos pela adição desse componente ao meio.

Procurando determinar as atividades enzimáticas de celulasas totais e endoglicanases, RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al. (2011) cultivaram *Aspergillus niger* em estado sólido utilizando o bagaço de cana-de-açúcar (90%) e farelo de trigo (10%) como substratos e obtiveram valores iguais a $0,14 \text{ U.g}^{-1}$ para FPases e $2,2 \text{ U.g}^{-1}$ para CMCases. No presente estudo, no ensaio contendo a mesma composição (condição 1), as atividades enzimáticas encontradas foram respectivamente, 41,191

e 5,844 vezes maiores que as determinadas por RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al. (2011). As atividades enzimáticas máximas das celulasas totais e endoglicanases, encontradas nos cultivos submersos do *A. niger* no presente estudo, foram respectivamente 157,083 e 27,679 vezes maiores que aquelas encontradas por RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al. (2011). Uma possível justificativa para explicar essas atividades enzimáticas superiores, pode ter sido a adição de melaço de cana-de-açúcar aos meios de cultivo (GHORI et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

A produção de enzimas lignocelulolíticas sofre influência do microrganismo que está sendo cultivado, assim como das condições de cultivo, por exemplo, a composição do meio, pH, temperatura e agitação. No presente estudo, o cultivo utilizando o *Ceriporiopsis subvermispota* mostrou maior produção de açúcares redutores totais e maior atividade de endoglicanases, e foi o único que produziu lacases. Em geral, as atividades das celulases totais foram maiores nos cultivos da *C. subvermispota*, porém a atividade enzimática máxima foi obtida para condição que tinha a palha de milho como substrato suplementado com farelo de trigo do *Aspergillus niger*.

O melhor substrato sólido para a produção de quaisquer dos produtos analisados, tanto no cultivo de *C. subvermispota* quanto de *A. niger*, foi a palha de milho quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar. A suplementação do meio de cultivo com o farelo de trigo foi favorável à produção de todos os produtos no cultivo de *A. niger*. Porém, para o *C. subvermispota* apenas a produção de Lacases e FPases foram favorecidas por essa suplementação. O melaço pode ter sido um importante indutor da produção de CMCases, uma vez que os valores das suas atividades encontradas no estudo foram muito superiores quando comparadas às outras pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO digital. Associação Brasileira da Indústria do Milho. *Oferta e Demanda do Milho do Brasil*. São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>>. Acesso em 04 set. 2016.

ABRAMILHO digital. Associação Brasileira dos Produtores de Milho. *A dimensão do milho no mundo*. Porto Alegre, RS. Disponível em: <<http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=975>>. Acesso em 04 set. 2016.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment**, v. 16, n. 1, p. 57-70, 2000.

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

AGUIAR, W. M. **O uso de fontes alternativas de energia como fator de desenvolvimento social para segmentos marginalizados da sociedade**. 2004. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, São Paulo. 2008.

ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. 64 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São Paulo. 2012.

ALLCOCK, E. R.; WOODS, D. R. Carboxymethyl cellulase and cellobiase production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation medium. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 2, p. 539-541, 1981.

BARROS NETO B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos- Aplicações na ciência e na indústria**. 2010.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. The biological degradation of cellulose. **FEMS microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

BLANCHETTE, Robert A. et al. Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 203-213, 1997.

BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências com área de concentração em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.

CÂNDIDO, E. J.; CANILHA, L.; SILVA, JBA. Determinação da composição química da palha de trigo. **Seminário De Hidrólise Enzimática De Biomassas**, v. 7, p. 108, 2002.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

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

CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIC, M. Determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during pretreatment of different biomass sources. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 1, n. 4, p. 1168, 2012.

COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2412-2417, 2005.

CONAB digital. Companhia Nacional de Abastecimento. *Perfil do Setor do Açúcar e do Alcool no Brasil*. V.5, p. 1-88. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2016.

CONAB digital. Companhia Nacional de Abastecimento. *Acomp. safra bras. cana*, v. 2 - *Safra 2015/16, n. 4 - Quarto levantamento*, Brasília, p. 1-76, abril 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf>. Acesso em: 10 set. 2016.

CORREIA, D. S., SANTOS, F. H. R.; SOARES, L. H. B.; CORREIA, M. E. F. Enzimas oxidativas microbianas envolvidas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica. Documentos, 284. **Embrapa Agrobiologia**, 2011.

COURI, S. et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

CRUZ, Simério CS et al. Adubação nitrogenada para o milho cultivado em sistema plantio direto, no Estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 62-68, 2008.

CUNHA, F. M. **Desenvolvimento de processo não-convencional para produção de celulasas por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2011.

CUNHA, G. G. S. **Biopolpação a partir de cultivos mistos de basidiomicetos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis***. 2012. 111 p. Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2012.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento Fatorial: Uma Ferramenta Estatística Valiosa Para A Definição De Parâmetros Experimentais Empregados Na Pesquisa Científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, 2008.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DUPONT digital. Disponível em: <<http://www.dupont.com/products-and-services/industrial-biotechnology/advanced-biofuels/articles/nevada-corn-stover-harvest-program.html>>. Acesso em 05 set. 2016.

EL-ENSHASY, H.; KLEINE, J.; RINAS, U.. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2103-2112, 2006.

ECKERT, C. T. et al. Biomassa residual vegetal. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, n. 3, 2013.

ERENO, D.; CESAR, E. Álcool de celulose. **Revista FAPESP**, v. 133, p. p9, 2007.

FACUNDES, B. C. **Fungos filamentosos produtores de holocelulases prospectados em Mata de Galeria do Cerrado tocantinense**. 2014. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins, Tocantins. 2014.

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispota***. 2010. 102 p. Dissertação (Mestre em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2010.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia/Orgs. Elisa Espósito e João Lúcio de Azevedo. Caxias do Sul: EducS, 2004.**

FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A. M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 59-65, 2003.

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. **Rev. Conexão Eletrônica. Três Lagoas, MS**, v. 12. 2015.

FREITAS, G. S. **As modificações na matriz energética brasileira e as implicações para o desenvolvimento sócio-econômico e ambiental**. 2011. 232

p. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Economia) - Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2011.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv Biochem Eng Biotechnol**.v.108, p.41-65, 2007.

GHORI, M. I. et al. Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 31, p. 5878-5886, 2011.

GORI, M. I. et al. Production of carboxymethyl cellulase from local isolate of *Aspergillus* species. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2010.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 349-355, 2008.

HE, J. et al. Cost-effective lignocellulolytic enzyme production by *Trichoderma reesei* on a cane molasses medium. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.

HERRERA, A. et al. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 63, n. 1, p. 103-109, 2004.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.

JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações Sobre o Bioetanol Lignocelulósico para Subsidiar a Elaboração de Conteúdo da Árvore do Conhecimento Agroenergia. **Embrapa Informática Agropecuária. Documentos**, 2009.

JENSEN, K. A. et al. Manganese-Dependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the Absence of Lignin Peroxidase. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3679-3686, 1996.

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities end functions**. 2007. 168 p. Tese (Doutorado - Matemática e Ciências Naturais) - Universidade de Groningen, Holanda, 2007.

KIRK, T. Kent; CULLEN, Dan. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. Wiley, New York, p. 273-307, 1998.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: **Biotechnology in the pulp and paper industry**. Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 45-125.

LOBOS, S. et al. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Microbiology**, v. 140, n. 10, p. 2691-2698, 1994.

LYND, L. R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current opinion in biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577-583, 2005.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 29, 2001, no. 6-7, p. 386-391.

MAPA digital. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Milho*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em 04 set. 2016.

MARSHALL, L.; SUGG, Z. Corn stover for ethanol production: Potential and pitfalls. **WRI policy note. Energy: Biofuels**, v. 4, 2009.

MASARIN, F. **Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispota* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada**. 2006. 93 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia da Universidade de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

MENDES, A. A. **Importância dos medidores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispota***. 2008. 121 p. Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. (2005). Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. (2008). **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

RAJAKUMAR, S. et al. Lip-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispota*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2660-2663, 1996.

RITTER, S. K. Calling All Chemists. **Chem. Eng. News**, v. 86, p. 10-17, 2008.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

RÜTTIMANN-JOHNSON, C. et al. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1792-1797, 1993.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, A. P. A. **Desenvolvimento de um método para a determinação da atividade de esterases usando material lignocelulósico como substrato**. 2014. 87 p. Dissertação (Mestre em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2014.

SANTOS, A. S. **Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante**. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. 218 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro. 2012.

SANTOS, F. R. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza**. 2012. 65 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição – Área de Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2012.

SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. In: **Congresso Brasileiro De Engenharia Química Em Iniciação Científica**. 2005.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 212 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia do Minho de Portugal, Portugal. 2005.

SHARMA, N. et al. A biodegradation study of forest biomass by *Aspergillus niger* F7: correlation between enzymatic activity, hydrolytic percentage and biodegradation index. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 467-475, 2012.

SILVA, FC; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. Pequenas Indústrias rurais de cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2003.

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

SINGHANIA, R. R. et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico. São Paulo: NAIPPE USP; 2007. Disponível em: <https://www.novacana.com/pdf/estudos/Livro_Naippe_Vol2.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2016.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOUZA-CRUZ, P. B. **Morfo-fisiologia da biodegradação de madeiras por *Ceriporiopsis subvermispota* (Pil.) Gilbn. & Ryv. e *Phlebia tremellosa* (Schrad.: Fr.) Nakas & Burds.(Fungi, Basidiomycetes)**. 2005. 95 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena, São Paulo. 2005.

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

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. 2006. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Aveiro. Portugal, 2006.

USDA/USDOE digital. United States Department of Agriculture/ United States Department of Energy. 2005. "*Biomass as a Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply.*" Report No. DOE/GO-102995-2135. Available online at <http://www.osti.gov/bridge>.

VASELLA, A.; DAVIES, G. J.; BÖHM, M. Glycosidase mechanisms. **Current opinion in chemical biology**, v. 6, n. 5, p. 619-629, 2002.

VÁSQUEZ, M. P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. In: **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Humana Press, 2007. p. 141-153.

VICUÑA, R. et al. Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispota* determine the pattern of MnP isoenzymes. **Biotechnology in the pulp and paper industry**.

Recent advances in applied and fundamental research. Facultas-Universitätsverlag, Vienna, p. 345-350, 1996.

VILELA, E.D.S. **Análise da produção de celulases e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** 2013. 89 p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiás. 2013.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259-263, 2011.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, v. 1, p. 131-146, 2013.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.