



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

Campus Alto Paraopeba

Engenharia de Bioprocessos

**Co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispota* para produção de enzimas
lignocelulolíticas e açúcares redutores**

Priscilla Maria Magri

Orientadora: Dra. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Junho/2016

Co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispora* para produção de enzimas lignocelulolíticas e açúcares redutores

Priscilla Maria Magri

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às
exigências do curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del
Rei.

Orientadora: Dra. Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Junho/2016

RESUMO

Etanol de segunda-geração pode ser produzido a partir de resíduos agrícolas. Para disponibilizar os açúcares fermentáveis da biomassa lignocelulósica para a fermentação alcoólica é necessário o pré-tratamento seguido da hidrólise enzimática da celulose. Os custos envolvidos com a hidrólise enzimática são elevados e muitas vezes inviabilizam a aplicação em escala industrial. O objetivo do trabalho foi avaliar se o co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispora* (em fermentação em estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho) foi eficiente na produção de enzimas lignocelulolíticas e açúcares redutores. O planejamento fatorial 2^2 foi usado e as variáveis analisadas foram o pré-tratamento alcalino e o pré-tratamento microbiológico (co-cultivo), nos níveis máximos (+) e mínimos (-). A metodologia aplicada consistiu na fermentação em estado sólido seguida de determinações das atividades enzimáticas e dos açúcares redutores. Para o bagaço de cana-de-açúcar o co-cultivo não foi favorável para a produção das enzimas FPase (celulases totais) e açúcares redutores, porém foi a condição que mais favoreceu a produção de CMCase (endoglicanases). A melhor condição para a produção de FPase e açúcares redutores foi o mono-cultivo de *Aspergillus niger* em bagaço pré-tratado. Para a palha de milho, a associação do pré-tratamento alcalino com o co-cultivo dos micro-organismos favoreceu a produção de FPase e açúcares redutores. Já a produção de CMCase foi maior nos ensaios nos quais a matéria-prima não foi tratada e ocorreu o co-cultivo.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*; *Ceriporiopsis subvermispora*; co-cultivo; fermentação em estado sólido; enzimas lignocelulolíticas; pré-tratamento.

ABSTRACT

Second-generation ethanol can be produced from agricultural waste. Pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of cellulose is necessary for fermentable sugars from lignocellulosic biomass to become available. The costs involved in the enzymatic hydrolysis are high and can make the process economically unfeasible. The objective of this study was to evaluate if the co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Ceriporiopsis subvermispota* (in solid state fermentation (SSF) using sugarcane bagasse and corn stover) was efficient in producing lignocellulolytic enzymes and reducing sugars. The factorial design 2^2 was used and the variables analyzed were the alkaline pretreatment and microbiological pre-treatment (co-cultivation), in their high (+) and low (-) levels. The methodologies used were SSF and determinations of enzyme activities and reducing sugars. For sugarcane bagasse, co-cultivation was not favorable for the production of FPase (total cellulase) and reducing sugars, but it had favored the production of CMCase (endoglucanases). The best condition for the production of reducing sugars and FPase was pretreatment and mono-cultivation. For corn stover, the association of alkaline pretreatment with the co-cultivation of microorganisms favored the production of FPase and reducing sugars. CMCase production was higher when corn stover was not treated and in co-cultivation.

Keywords: *Aspergillus niger*; *Ceriporiopsis subvermispota*; co-cultivation; solid state fermentation; lignocellulolytic enzymes; pretreatment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Matérias-primas lignocelulósicas.....	4
3.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar	8
3.1.2 Palha de milho	9
3.2 Pré-tratamento	10
3.2.1 Pré-tratamento físico.....	12
3.2.2 Pré-tratamento físico-químico.....	13
3.2.3 Pré-tratamento químico.....	13
3.2.4 Pré-tratamento biológico	13
3.2.4.1 Pré-tratamento biológico com <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	14
3.3 Hidrólise da celulose.....	17
3.4 Fermentação em estado sólido (FES) e a produção de celulases.....	19
3.4.1 <i>Aspergillus niger</i>	20
3.4.2 Co-cultivo (cultivo misto).....	21
3.5 Planejamento Fatorial.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Pré-tratamentos das matérias-primas.....	24
4.1.1 Redução de tamanho e análise granulométrica (Pré-tratamento físico)	24
4.1.2 Pré-tratamento alcalino	25
4.1.3 Secagem	25
4.2 Preparo dos inóculos	25
4.2.1 <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (Pré-tratamento biológico)	25
4.2.2 <i>Aspergillus niger</i>	26
4.3 Fermentação	26
4.4 Extração do caldo enzimático.....	27

4.5	Determinação das atividades enzimáticas.....	27
4.5.1	Celulases totais (Fpase).....	28
4.5.2	Endoglicanases (CMCase)	29
4.5.3	Manganês-peroxidase.....	29
4.5.4	Lacase	29
4.5.5	Lignina-peroxidase.....	30
4.5.6	Fenol-oxidase total.....	30
4.6	Curva Padrão de concentração de glicose.....	30
4.7	Determinação dos açúcares redutores	31
4.8	Quantificação das atividades enzimáticas das celulases e dos açúcares redutores totais	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Bagaço de cana-de-açúcar	33
5.1.1	Produção de FPase	34
5.1.2	Produção de CMCase (endoglicanases).....	36
5.1.3	Produção de açúcares redutores totais.....	38
5.2	Palha de Milho.....	41
5.2.1	Produção de FPase	41
5.2.2	Produção de CMCase (endoglicanases).....	43
5.2.3	Produção de açúcares redutores totais.....	45
6.	CONCLUSÃO	49
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos diferentes componentes da biomassa lignocelulósica (adaptado de LAL et al., 2011).	5
Figura 2. A estrutura da celulose e as ligações intra e intermoleculares entre as unidades de glicose. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio intermoleculares (adaptado de FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007).	6
Figura 3. Componentes da Hemicelulose (SILVA, 2010).	7
Figura 4. Precursores primários da lignina (SILVA, 2010).	7
Figura 5. Efeitos do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado de SANTOS, 2012).	11
Figura 6. Produtos secundários do pré-tratamento que podem inibir a fermentação, mesmo presentes em baixas concentrações (HMF – hidroximetilfurfural) (adaptado de DIEN; BOTHAST, 2009).	12
Figura 7. Fungo da podridão branca (<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>) em material lignocelulósico (LA SOCIEDAD DE CIENCIAS ARANZADI).	14
Figura 8. Ciclos catalíticos da lignina-peroxidase (A) e da manganês-peroxidase (B). C ₀ representa as enzimas nativas; C _I representa o oxocomplexo intermediário deficiente de 2 elétrons formado pela oxidação por H ₂ O ₂ ; C _{II} representa o composto intermediário formado pela oxidação de C _I . (MENDES, 2008).	16
Figura 9. Ciclo catalítico da lacase (MENDES, 2008).	17
Figura 10. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (CASTRO et al., 2010).	18
Figura 11. Morfologia microscópica do fungo <i>Aspergillus niger</i> (MBBS MEDICINE - HUMANITY FIRST).	20
Figura 12. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2 ² para produção de FPase utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: UFP/g].	35
Figura 13. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2 ² para produção de CMCase utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: UCMC/g].	37
Figura 14. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2 ² para produção de açúcares redutores totais utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: mg/mL].	38
Figura 15. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2 ² para produção de FPase utilizando palha de milho [resposta: UFP/g].	42

Figura 16. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de CMCase utilizando palha de milho [resposta: UCMC/g].	44
Figura 17. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de açúcares redutores totais utilizando palha de milho [resposta: mg/mL].	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos resíduos lignocelulósicos.	8
Tabela 2. Rendimento teórico de etanol celulósico a partir de diferentes matérias-primas (litros de etanol por tonelada de matéria-prima seca).	8
Tabela 3. Planejamento fatorial 2 ² para a produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores. Variável 1 é o tratamento microbiológico e a variável 2 é o tratamento químico.	24
Tabela 4. Enzimas lignocelulolíticas determinadas por diferentes autores em cultivos de <i>C. subvermispura</i> em diferentes condições.	32
Tabela 5. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	34
Tabela 6. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção da FPase utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	34
Tabela 7. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de CMCase utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	36
Tabela 8. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de açúcares redutores utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	38
Tabela 9. Comparação das atividades enzimáticas determinadas em diferentes estudos.	40
Tabela 10. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	41
Tabela 11. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção da FPase utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	42
Tabela 12. Resultados do planejamento Fatorial 2 ² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de CMCase utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.	43

Tabela 13. Resultados do planejamento Fatorial 2^2 para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de açúcares redutores utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.....	45
Tabela 14. Comparação das atividades enzimáticas máximas e açúcares redutores totais máximos determinadas para os cultivos em BCA e PM.....	47
Tabela 15. Tempo e Temperatura de fermentação ótimos para a produção de enzimas celulolíticas obtido por diferentes autores em cultivos de <i>Aspergillus niger</i>	47

1. INTRODUÇÃO

A crise energética, causada pela geração de energia insustentável, por pressões demográficas e pelo aumento do mercado de consumo, é considerada um grande problema da sociedade moderna. A maior parte da energia gerada atualmente é proveniente de fontes não renováveis. No mundo, 87% da energia utilizada é obtida através de combustíveis fósseis, no Brasil esse valor cai para 55%, o que pode ser justificado pelo território vasto, áreas agriculturáveis e alto potencial hidráulico. Porém, o uso elevado de combustíveis fósseis vem causando graves impactos ambientais. (FREITAS, 2011).

No Brasil, uma alternativa viável para a substituição dos combustíveis fósseis é o uso de etanol de cana-de-açúcar (BANSAL *et al*, 2016). O etanol é um combustível produzido pela fermentação de matérias-primas agrárias seguida de destilação (AGUIAR, 2004). Um limitante da produção de etanol de primeira geração é a competição com a produção de alimentos (FREITAS, 2011). Portanto, uma alternativa é a utilização de subprodutos agrícolas para produção de etanol de segunda geração (VILELA, 2013).

O etanol de segunda geração é produzido a partir de matéria-prima lignocelulósica. Porém, esses materiais lignocelulósicos precisam ser hidrolisados para disponibilizar açúcares fermentáveis para a fermentação alcoólica. A hidrólise pode ocorrer por meio de pré-tratamentos químicos, tratamentos microbiológicos e enzimáticos. O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e a palha de milho (PM) são materiais promissores para serem empregados na produção de etanol, pois são subprodutos produzidos em grandes quantidades e possuem alta concentração de açúcares fermentáveis (SANTOS, 2012).

O pré-tratamento alcalino utilizando hidróxido de sódio têm se mostrado interessante para o preparo da matéria-prima, pois apresenta alta eficiência na remoção da lignina, ocorre em condições mais brandas que os outros pré-tratamentos e não provoca a degradação de compostos importantes (NASCIMENTO, 2011), porém existe o inconveniente do uso de produtos químicos e a alta geração de efluente.

A hidrólise enzimática também acontece em condições brandas e com alta especificidade. Outras vantagens são a ausência de reações e produtos secundários, que podem diminuir a eficiência da hidrólise e inibir a fermentação. O consórcio de enzimas celulasas é responsável pela hidrólise da celulose e produção de glicose. Um grande problema em relação à hidrólise enzimática

em larga escala é o custo e disponibilidade das celulases (NASCIMENTO, 2011; BANSAL *et al.*, 2012).

Uma alternativa para substituir o uso de enzimas purificadas é o uso de micro-organismos que produzem essas enzimas. Os micro-organismos são os maiores produtores de celulases e de enzimas que degradam a celulose (WILSON, 2011). O fungo *Aspergillus niger* é conhecido por ser um bom produtor de exo e edoglucanases e está entre as espécies de fungos produtores de celulases mais estudadas (BANSAL *et al.*, 2012; RABELO, 2010; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, 2011). Já o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* é conhecido como sendo um fungo degradador de lignina (GUERRA, 2002).

O co-cultivo destes dois micro-organismos para produção de enzimas capazes de degradar e hidrolisar, respectivamente, a lignina e a celulose dos resíduos agrícolas lignocelulósicos, dispensando assim o uso de tratamentos químicos, foi o objeto de estudo deste trabalho de conclusão de curso.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas e açúcares fermentáveis através de fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de açúcar e palha de milho e o co-cultivo dos fungos *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispota*.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar as matérias-primas para a fermentação em estado sólido (bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho) quanto à eficiência na produção das enzimas lignocelulolíticas e liberação de açúcares redutores.
- Verificar se o co-cultivo dos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispota* favoreceu a produção de enzimas lignocelulolíticas, tais como celulasas e lignina-peroxidase.
- Verificar se o tratamento químico utilizando hidróxido de sódio em condições ambientes foi determinante na produção enzimática.
- Comparar a eficiência do pré-tratamento químico com hidróxido de sódio com o tratamento microbiológico utilizando o fungo *Ceriporiopsis subvermispota*.
- Verificar a importância do tratamento químico e do tratamento microbiológico para a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Aspergillus niger*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Matérias-primas lignocelulósicas

Todos os anos são gerados milhares de toneladas de resíduos lignocelulósicos, sendo a lignocelulose a fonte de energia natural e renovável mais abundante e disponível em todo o planeta (FONSECA, 2009; LAL *et al.*, 2011). Devido à abundância e à composição, esse tipo de material têm se mostrado favorável quando usado como fonte de energia para produção de etanol e para outros bioprocessos (KUHAD *et al.*, 2013; GOTTSCHALK *et al.*, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina em diferentes proporções, dependendo da característica do material (SRIARIYANUN *et al.*, 2016). Esses materiais podem conter também constituintes extrativos, tais como graxas, gomas, amidos e não-extrativos, como carbonatos, sílica e oxalatos (FONSECA, 2009). A Figura 1 mostra os componentes básicos da biomassa lignocelulósica e a composição média de cada um dos componentes (LAL *et al.*, 2011).

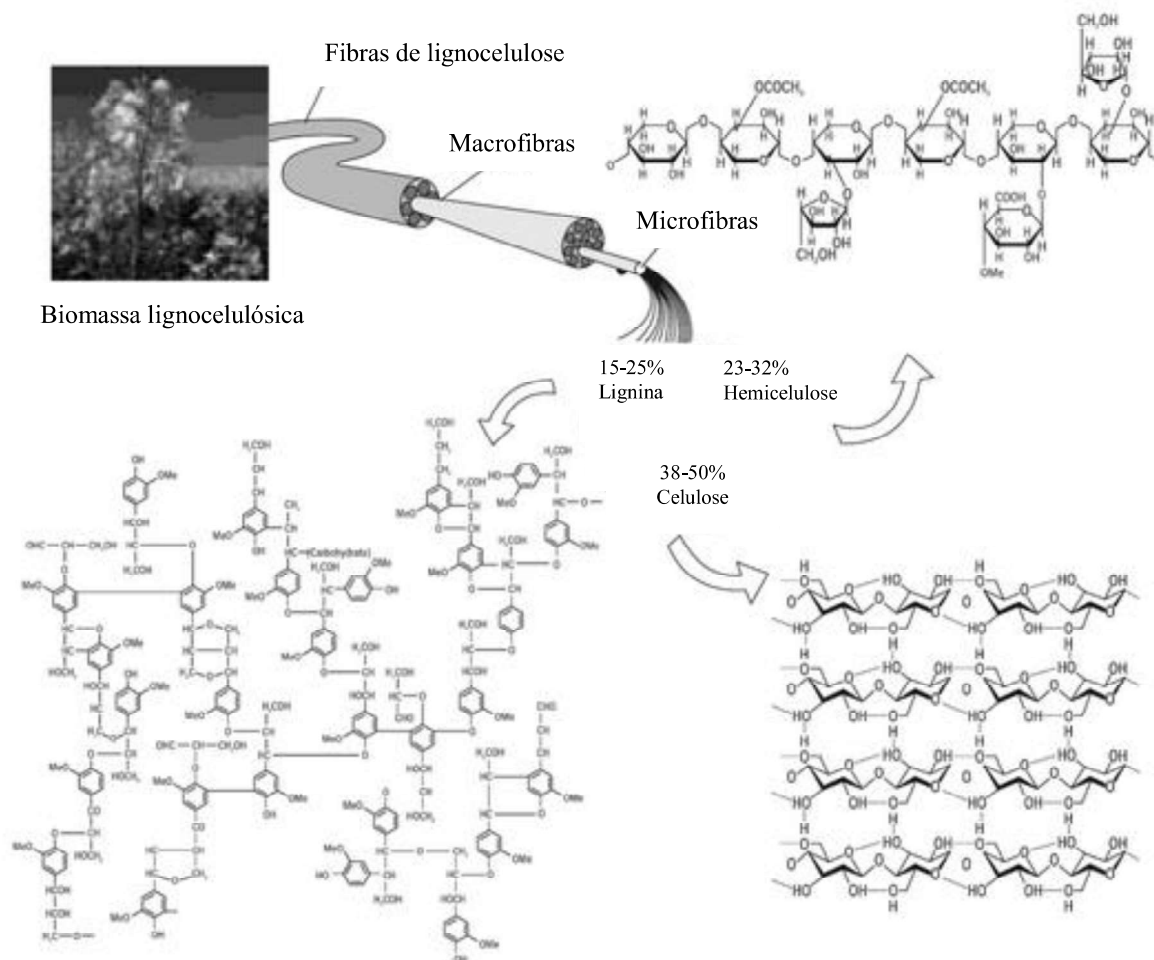


Figura 1. Estrutura dos diferentes componentes da biomassa lignocelulósica (adaptado de LAL *et al.*, 2011).

A celulose, o constituinte mais abundante na biomassa lignocelulósica, é um homopolissacarídeo linear formado por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre unidades de D-glicose (FONSECA, 2009). O grau de polimerização médio é de 9000-10000, podendo chegar a 15000 e a massa molar aproximada é de 10 a 15 kDa (KUHAD *et al.*, 2013; LAL *et al.*, 2011). A celulose é formada por porções cristalinas, formadas por ligações glicosídicas intramoleculares, e pelas porções amorfas, formadas pelas ligações intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio e van der Waals (SANTOS, 2012). A Figura 2 mostra uma representação da estrutura da celulose, e das ligações intra e intermoleculares que dão origem as porções cristalinas e amorfas.

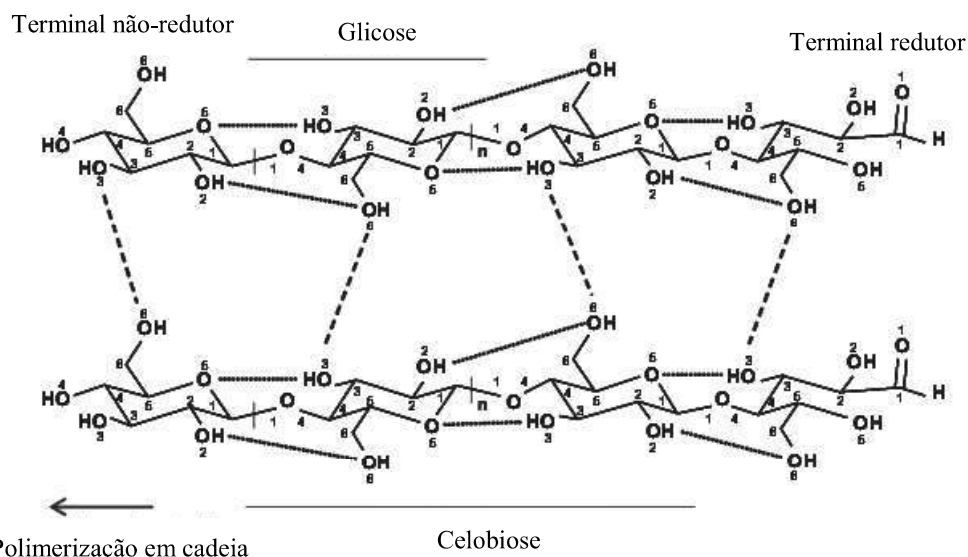


Figura 2. A estrutura da celulose e as ligações intra e intermoleculares entre as unidades de glicose. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio intermoleculares (adaptado de FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2007).

A hemicelulose é um polissacarídeo formado por unidades de pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses (SANTOS, 2012). O grau de polimerização médio é de 100-200. A hemicelulose é geralmente formada por um esqueleto de unidades conectadas por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ e por ramificações $\beta(1 \rightarrow 2)$, $\beta(1 \rightarrow 3)$ e $\beta(1 \rightarrow 6)$ (LAL *et al.*, 2011). A Figura 3 mostra os componentes da hemicelulose.

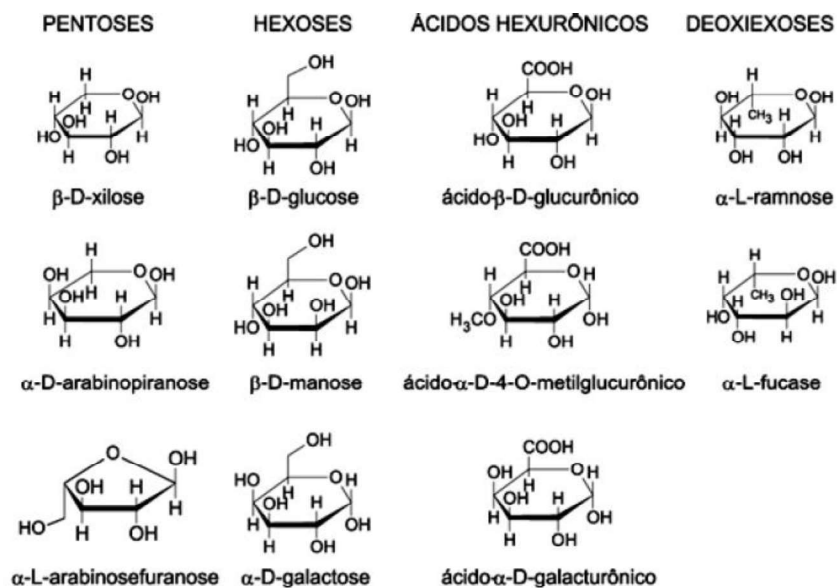


Figura 3. Componentes da Hemicelulose (SILVA, 2010).

A lignina é formada por uma estrutura heterogênea e é responsável pela baixa reatividade dos materiais lignocelulósicos (FONSECA, 2009). Os polímeros de lignina são ramificados, não cristalinos, são formados por unidades fenilpropanóides e a composição química varia de acordo com a fonte de origem (VILELA, 2013). A Figura 4 mostra os precursores primários da lignina.

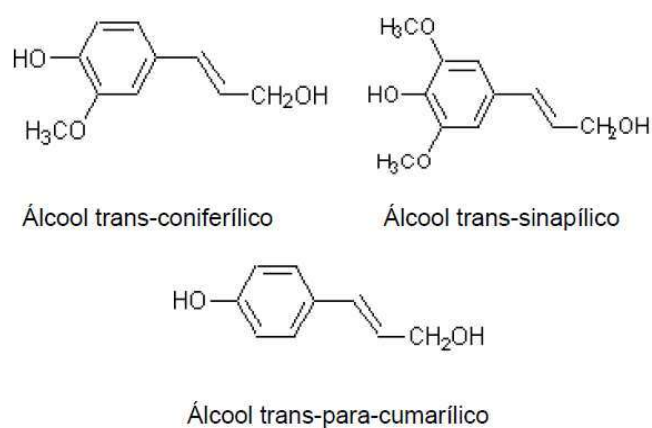


Figura 4. Precursores primários da lignina (SILVA, 2010).

A Tabela 1 mostra a composição média de hexoses, pentoses e lignina de diferentes resíduos lignocelulósicos.

Tabela 1. Composição química dos resíduos lignocelulósicos.

Resíduo	Hexoses (%)	Pentoses (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29
Palha de milho	38	26	19
Palha de trigo	30	24	18
Talos de soja	34	25	20

Fonte: LAL *et al.*, 2011.

O rendimento teórico da produção de etanol de segunda geração depende da biomassa utilizada como matéria-prima (BROWN; BROWN, 2012). A Tabela 2 apresenta o rendimento teórico de etanol para diferentes materiais lignocelulósicos considerando a conversão das hexoses e das pentoses.

Tabela 2. Rendimento teórico de etanol celulósico a partir de diferentes matérias-primas (litros de etanol por tonelada de matéria-prima seca).

Matéria-prima	Rendimento de etanol celulósico (L/ton)
Bagaço de cana-de-açúcar	420,18
Desbastes florestais	310,40
Palha de milho	427,75
Serragem de madeira	382,33

Fonte: adaptado de BROWN; BROWN, 2012.

3.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma herbácea vivaz que pertence ao gênero *Saccharum L.* De acordo com União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) a safra 2014/2015 da região Centro-Sul do Brasil processou 571,34 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Foram produzidos 31,99 milhões de toneladas de açúcar e 26,15 bilhões de litros de etanol. O bagaço de cana-de-açúcar é um dos mais abundantes subprodutos da indústria sucroalcooleira brasileira. Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são produzidos de 250 a 300 kg de bagaço (DUSSAN *et al.*, 2014; BORTOLAZZO, 2011). Ou seja, na safra de 2014/2015 foram gerados aproximadamente 142,84 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar.

Parte do bagaço é convertido em energia térmica pelas caldeiras nas próprias indústrias, porém ainda existe uma grande porção inutilizada (BORTOLAZZO, 2011). O uso deste bagaço hidrolisado para fermentação pode aumentar consideravelmente a produção de bioetanol e diminuir impactos ambientais (REZENDE *et al.*, 2011). Além disso, de acordo com a UNICA, o etanol

celulósico tem grande potencial de crescimento, pois depende apenas do reaproveitamento dos abundantes resíduos produzidos pela indústria sucroalcooleira, não sendo necessárias expansão da área plantada e concorrência com produção de alimentos.

Em 2014, o Brasil inaugurou sua primeira usina de etanol de segunda geração que utiliza palha e bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. A usina, localizada em São Miguel dos Campos, Alagoas, pertence à empresa Granbio (GranBio Investimentos S.A., Maceió, AL., Brasil) que faz parcerias com outras usinas para comprar os resíduos que servem como matéria-prima e já recebeu certificado internacional por geração de etanol limpo e com baixa emissão de carbono. O custo mais elevado do processo está relacionado com as enzimas, por isso existem muitas pesquisas voltadas para esta área (UNICA; VIEIRA, 2014).

Segundo PEREIRA *et al.* (2011), a composição química mássica das fibras do bagaço de cana-de-açúcar é de aproximadamente 28,7% de hemicelulose, 45,4% de celulose, 23,4% de lignina e 2,7% de cinzas. GOMEZ (1985) determinou teores de 22,4% de hemicelulose, 34,4% de celulose e 20,3% de lignina. Já AGUIAR e MENEZES (2010), determinaram 37% de celulose e 24,6% de lignina para o bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento e 60,5% de celulose e 10,7% de lignina para o bagaço tratado com hidróxido de sódio (4% m/v).

3.1.2 Palha de milho

Nos EUA a biomassa lignocelulósica mais disponível para aproveitamento é a palha de milho, de acordo com os departamentos de energia e agricultura dos EUA (2005). De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com produção de 53,2 milhões de toneladas na safra 2009/2010.

De acordo com DE ANDRADE *et al.* (1996), 70,60% do milho em peso seco é composto pelos grãos, 14,64% pelo sabugo e 14,75% pela palha. Então, na safra de 2009/2010, foram produzidos aproximadamente 7,85 milhões de toneladas de palha de milho.

A palha de milho geralmente é descartada, queimada nas áreas rurais ou utilizada como cobertura do solo após colheita mecânica. Esta última prática vêm causando problemas como por exemplo a proliferação de pragas (AGUIAR, 2010). Devido à elevada produção, esta biomassa lignocelulósica é vista como potencial matéria-prima para a produção de combustíveis de segunda geração (BARTEN, 2013).

De acordo com a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), a grande questão para a produção industrial de etanol celulósico, seja de bagaço de cana-de-açúcar, de palha de milho ou de outra biomassa, está na produção das enzimas celulasas. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando o aumento da eficiência na produção em escala industrial e até mesmo o reaproveitamento das enzimas nos processos (através da imobilização das enzimas).

De acordo com SALAZAR *et al.* (2005), a composição química da palha de milho em base seca é de aproximadamente 41,18% de celulose, 16,31% de polioses – hemiceluloses (por diferença) e 14,4% de lignina. PAES *et al.* (2008) determinaram a composição em base seca de aproximadamente 40,92-50,08% de celulose, 49,57-58,71% de hemicelulose e 0,38-0,45% de lignina.

3.2 Pré-tratamento

Para que a matéria-prima lignocelulósica possa ser usada em processos fermentativos é necessário a hidrólise desta, a fim de produzir açúcares simples fermentáveis. Para remover a porção recalcitrante da biomassa, formada pela lignina, e tornar o material mais acessível para as enzimas hidrolíticas, faz-se necessário o pré-tratamento do material (SRIARIYANUN *et al.*, 2016). Os objetivos do pré-tratamento são aumentar a porosidade do material, aumentar a superfície de contato e reduzir a cristalinidade da celulose (SANTOS, 2012). A Figura 5 mostra o efeito do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos.

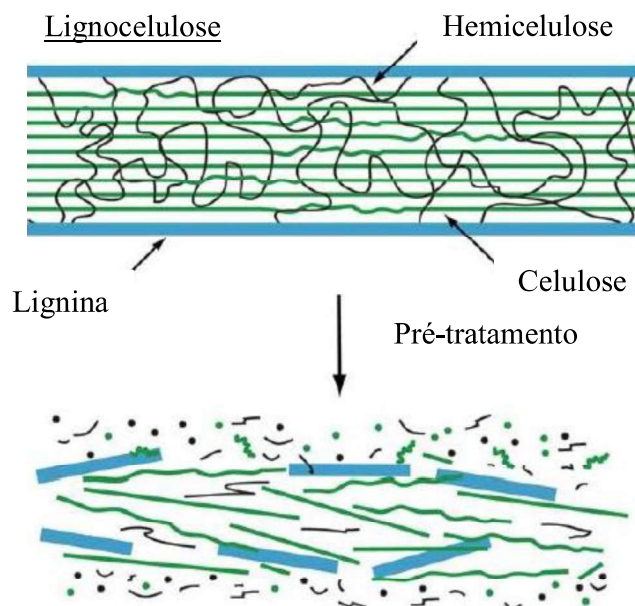


Figura 5. Efeitos do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado de SANTOS, 2012).

O tipo de pré-tratamento deve ser escolhido de maneira a aumentar o rendimento de açúcares fermentáveis na etapa seguinte e reduzir ou impedir a formação de subprodutos capazes de inibir a hidrólise enzimática e a fermentação (figura 6) (GOTTSCHALK *et al.*, 2010). Deve-se considerar se o pré-tratamento irá ocasionar degradação da celulose e da hemicelulose, se irá minimizar o gasto com equipamentos, com produtos químicos, com tratamento de resíduos e o gasto energético (TAHERZADEH *et al.*, 2008). Para redução dos custos, o pré-tratamento deve preferencialmente ocorrer em condições brandas, porém estas condições podem resultar em baixos rendimentos, fazendo-se necessário o uso de diferentes complexos enzimáticos para atingir elevados rendimentos (ALVIRA *et al.*, 2010).

A Figura 6 mostra alguns exemplos de produtos secundários produzidos durante alguns tipos de pré-tratamento que podem inibir a fermentação.

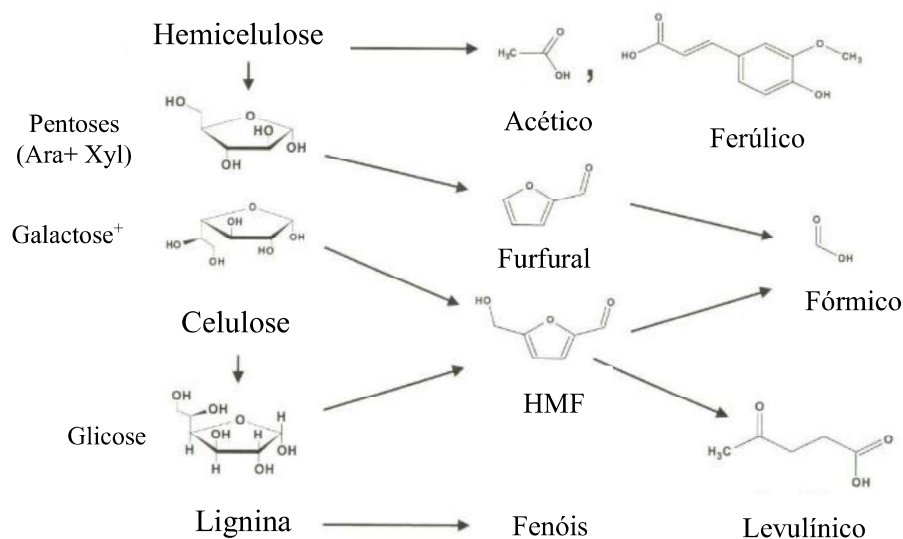


Figura 6. Produtos secundários do pré-tratamento que podem inibir a fermentação, mesmo presentes em baixas concentrações (HMF – hidroximetilfurfural) (adaptado de DIEN; BOTHAST, 2009).

O pré-tratamento da matéria-prima pode ser físico, físico-químico, químico e biológico (TAHERZADEH *et al.*, 2008).

3.2.1 Pré-tratamento físico

Tratamentos físicos podem ser usados para aumentar a superfície acessível e o tamanho dos poros no material lignocelulósico e diminuir a cristalinidade e o grau de polimerização. Processos de moagem, irradiação e que envolvem altas temperaturas podem ser aplicados (TAHERZADEH *et al.*, 2008; HARMSSEN *et al.*, 2010; MTUI, 2009).

A moagem é usada para reduzir a cristalinidade e o tamanho do material por isso melhora o acesso das enzimas, aumentando o rendimento da hidrólise enzimática. O problema da moagem é que não ocorre remoção da lignina, portanto o processo não atinge eficiência máxima. Uma alternativa para aumentar o rendimento é combinar o tratamento físico com outro pré-tratamento (TAHERZADEH *et al.*, 2008).

3.2.2 Pré-tratamento físico-químico

Os pré-tratamentos físico-químicos são os que misturam processos físicos e químicos. Esses processos geralmente utilizam condições extremas de temperatura e pressão e por isso envolvem altos custos. Os pré-tratamentos físico-químicos mais comuns são: explosão à vapor com ou sem adição de SO₂; explosão de fibra de amônia (AFEX); explosão com CO₂; tratamento com água quente e tratamento com micro-ondas associado a um composto químico (TAHERZADEH *et al.*, 2008; HARMSSEN *et al.*, 2010).

3.2.3 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico envolve a adição de algum composto químico para desfazer a estrutura lignocelulósica. Esse tipo de pré-tratamento inclui os tratamentos alcalinos, ácidos (fracos e fortes), peróxidos alcalinos, com solvente orgânico, por oxidação em via úmida e por ozonólise (TAHERZADEH *et al.*, 2008; HARMSSEN *et al.*, 2010; BADIEI *et al.*, 2014).

O pré-tratamento alcalino utilizando hidróxido de sódio é amplamente utilizado pois é eficiente na remoção da lignina e em parte da hemicelulose e é bastante efetivo no aumento da acessibilidade das enzimas à celulose, especialmente em resíduos agrícolas (TAHERZADEH *et al.*, 2008; BADIEI *et al.*, 2014). Para esse tipo de processo, hidróxido de sódio é adicionado ao material e a reação acontece em temperatura ambiente por um período longo de tempo (TAHERZADEH *et al.*, 2008; HARMSSEN *et al.*, 2010; BADIEI *et al.*, 2014). A vantagem do pré-tratamento alcalino é que quando comparado aos demais, apresenta menor degradação da hemicelulose e da celulose e maior degradação da lignina (CARVALHEIRO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009).

3.2.4 Pré-tratamento biológico

Os pré-tratamentos biológicos utilizam micro-organismos que degradam a lignina, a hemicelulose e a celulose em pequenas porções, já que esta é menos acessível devido à estrutura dos materiais lignocelulósicos. Diversas espécies de fungos são utilizadas para este propósito, entre eles estão os fungos das podridões branca e parda. Os fungos da podridão branca são os mais

efetivos para o pré-tratamento da lignocelulose. As espécies geralmente empregadas são *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pleurotus ostreatus* (TAHERZADEH *et al.*, 2008).

As vantagens do tratamento biológico são o baixo custo energético, condições brandas do processo e o fato de não ser necessário o uso de nenhum produto químico. Porém, o rendimento deste tipo de tratamento não é elevado (TAHERZADEH *et al.*, 2008).

3.2.4.1 Pré-tratamento biológico com *Ceriporiopsis subvermispora*

Ceriporiopsis subvermispora, o fungo da podridão branca, é um micro-organismo conhecido por produzir e secretar enzimas envolvidas na degradação da lignina, por isso podem ser aplicados na deslignificação de materiais lignocelulósicos (madeiras e resíduos agrícolas). Apesar de sua importância industrial, o sistema extracelular que este micro-organismo utiliza para degradar madeira ainda não é totalmente conhecido. Sabe-se que dentre as enzimas que o fungo produz estão a lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, lacases, xilanases, endoglicanases, β -glicosidade e enzimas híbridas conhecidas como peroxidases versáteis. Além dessas enzimas, o fungo da podridão branca também secreta diferentes tipos de oxidases que produzem H_2O_2 para a ação das peroxidases e das lacases (FERNÁNDEZ-FUEYO *et al.* 2012; MENDES, 2008; CRUZ, 2005). A Figura 7 mostra o fungo da produção branca crescendo em material lignocelulósico.



Figura 7. Fungo da podridão branca (*Ceriporiopsis subvermispora*) em material lignocelulósico (LA SOCIEDAD DE CIENCIAS ARANZADI).

Este fungo é conhecido pela importância na aplicação industrial em meios líquidos ou em fermentação em estado sólido (MENDES, 2008). FARIA (2010) observou alta produção de lacase por *Ceriporiopsis subvermispora* em cultivos submersos e imobilizado em meio de composição complexa e alta produção de manganês-peroxidase em cultivo imobilizado em meio definido. MENDES (2008) observou produção das enzimas xilanase, endoglicanase, lacase e manganês-peroxidase pelo fungo cultivado em fermentação em estado sólido em madeira.

- **Lignina-peroxidase**

A lignina-peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) pertence à classe II das peroxidases secretadas por fungos e catalisa a oxidação das unidades fenólicas e não fenólicas da lignina (KUNAMNENI *et al.*, 2007; JANUSZ *et al.*, 2013) e utiliza H_2O_2 comoceptor final de elétrons (BACH *et al.*, 2013). A lignina-peroxidase assim como a manganês-peroxidase, possui ferro protoporfirínico como grupo prostético e por isso tem capacidade de oxidar componentes da lignina na presença H_2O_2 (MENDES, 2008). A Figura 8 (A) mostra o ciclo catalítico da lignina-peroxidase.

- **Manganês-peroxidase**

Manganês-peroxidases (MnP, EC 1.11.1.13) são enzimas secretadas por fungos da podridão branca e estão associadas à despolimerização da lignina (UREK; PAZARLIOGLU, 2007). Essas enzimas catalisam a oxidação dos íons Mn^{2+} a íons Mn^{3+} , através de um sítio de ligação muito específico. Os íons Mn^{3+} são mediadores de baixa massa molar e atacam as estruturas fenólicas da lignina. Outra forma de atuação da manganês-peroxidase é pela mediação por ácido graxos insaturados que formam radicais reativos que podem degradar porções não-fenólicas da lignina (JÄRVINEN *et al.*, 2012; FARIA, 2010). A manganês-peroxidase assim como a lignina-peroxidase também utiliza H_2O_2 comoceptor final de elétrons e possui pH ótimo em torno de 4,5 (BACH *et al.*, 2013).

A manganês-peroxidase pode ser aplicada na polpação biomecânica, no clareamento da polpa, na biorremediação e para produção de produtos químicos de alto valor agregado a partir de resíduos de lignina. Porém, as aplicações são limitadas devido à baixa produtividade pelos micro-organismos (JÄRVINEN *et al.*, 2012).

A Figura 8 mostra os ciclos catalíticos simplificados da lignina-peroxidase (A) e da manganês-peroxidase (B). Nos esquemas, S representa estruturas aromáticas não-fenólicas e PhOH as estruturas fenólicas.

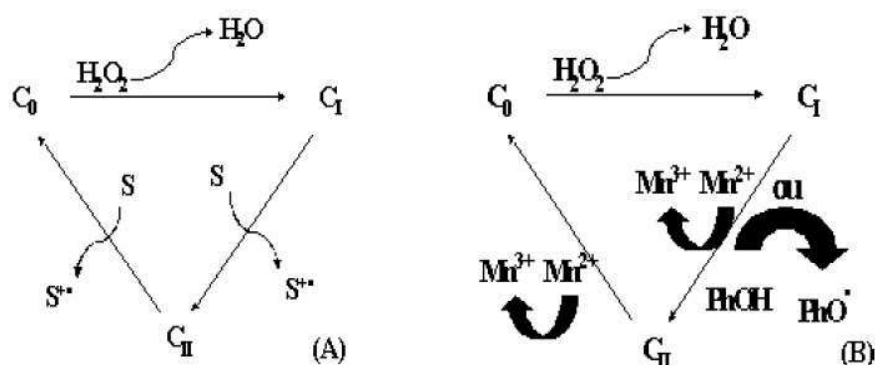


Figura 8. Ciclos catalíticos da lignina-peroxidase (A) e da manganês-peroxidase (B). C_0 representa as enzimas nativas; C_I representa o oxocomplexo intermediário deficiente de 2 elétrons formado pela oxidação por H_2O_2 ; C_{II} representa o composto intermediário formado pela oxidação de C_I . (MENDES, 2008).

- **Lacase**

Fenol oxidase são enzimas que oxidam compostos fenólicos utilizando oxigênio comoceptor final de elétrons. Essas enzimas incluem as lacases dos fungos e as lacases procarióticas (BACH *et al.*, 2013). As lacases (benzenodiol; oxidorreductase de oxigênio, EC 1.10.3.2) são polifenóis oxidases capazes de degradar a lignina e diferentes substratos orgânicos e inorgânicos através da degradação de subunidades fenólicas e não-fenólicas (CHMELOVÁ; ONDREJOVIČ, 2012; KUNAMNENI *et al.*, 2007; THURSTON, 1994). A catálise ocorre por abstração de um elétron (PACHECO; SOARES, 2014).

As lacases de fungos são formadas por glicoproteínas monoméricas, diméricas e tetraméricas e a massa molar média é de 50 a 100 kDa. Essas enzimas podem se apresentar de maneira heterogênea pois a glicosilação e a composição das glicoproteínas podem variar com a composição do meio de crescimento dos micro-organismos produtores. Uma cadeia de carboidrato ligada covalentemente à estrutura da proteína pode contribuir para a estabilidade da enzima (KUNAMNENI *et al.*, 2007).

As lacases são empregadas nas indústrias de alimentos, de papel e polpas, na indústria de cosméticos, na farmacêutica, para biorremediação do solo, biodegradação de compostos fenólicos poluentes do meio ambiente e remoção de disruptores endócrinos (SHEKHER *et al.*, 2011; KUNAMNENI *et al.*, 2008).

A Figura 9 apresenta o ciclo catalítico da lacase, na qual PhOH é representação de uma estrutura fenólica.

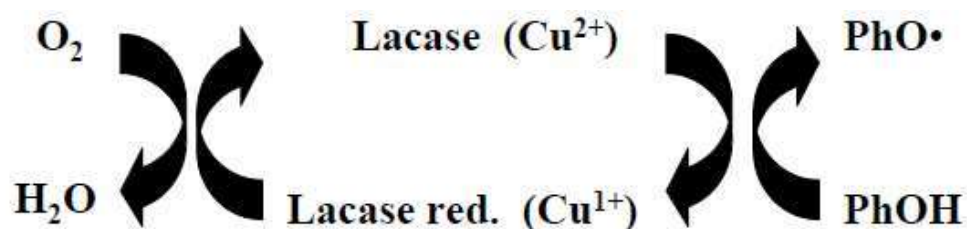


Figura 9. Ciclo catalítico da lacase (MENDES, 2008).

3.3 Hidrólise da celulose

Após o pré-tratamento, a celulose está disponível para a hidrólise. A hidrólise da celulose pode acontecer por métodos químicos e enzimáticos. Os métodos químicos geralmente envolvem altas concentrações dos reagentes, condições extremas de temperatura e pH, formação de inibidores da fermentação, formação de compostos poluentes e alto investimento em equipamentos resistentes à corrosão (SINGH *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática é realizada pelo consórcio de enzimas denominado celulasas. As celulasas são formadas pelas enzimas endoglicanases, exoglicanases (celobiohidrolases e glucanohidrolases) e β -glicosidases (LIU *et al.*, 2011; AGUIAR, 2010).

- **Endoglicanases (CMCases)**

Endoglicanases ou Carboximetilcelulasas (EC 3.2.1.4), são as enzimas responsáveis pelo início da hidrólise e clivam randomicamente ligações β (1-4) no meio das cadeias de celulose, gerando novos terminais, um redutor e outro não redutor. Existem diferentes endoglicanases que

são produzidas por bactérias, fungos, animais e plantas (AGUIAR, 2010; ZHANG; ZHANG, 2013).

- **Exoglicanases**

As enzimas classificadas como exoglicanases (EC 3.2.1.91) podem ser celobiohidrolases e glucanohidrolases. As glucanohidrolases são capazes de liberar glicose e as celobiohidrolases liberam dímeros de glicose (celobiose). As enzimas exoglicanases atuam nos terminais redutores (Celobiohidrolase I) e não redutores (Celobiohidrolase II) da celulose conforme mostrado na Figura 9 (AGUIAR, 2010; ZHANG; ZHANG, 2013; CASTRO *et al.*, 2010).

- **β -glicosidases**

As enzimas β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são as que hidrolisam a celobiose e outros oligossacarídeos a monômeros de glicose. Essas enzimas são produzidas por diferentes organismos sendo que a maior parte dos fungos aeróbios produzem β -glicosidases extracelulares, e as bactérias anaeróbias produzem enzimas intracelulares (AGUIAR, 2010; ZHANG; ZHANG, 2013).

A Figura 10 ilustra o modo de ação das enzimas celulolíticas.

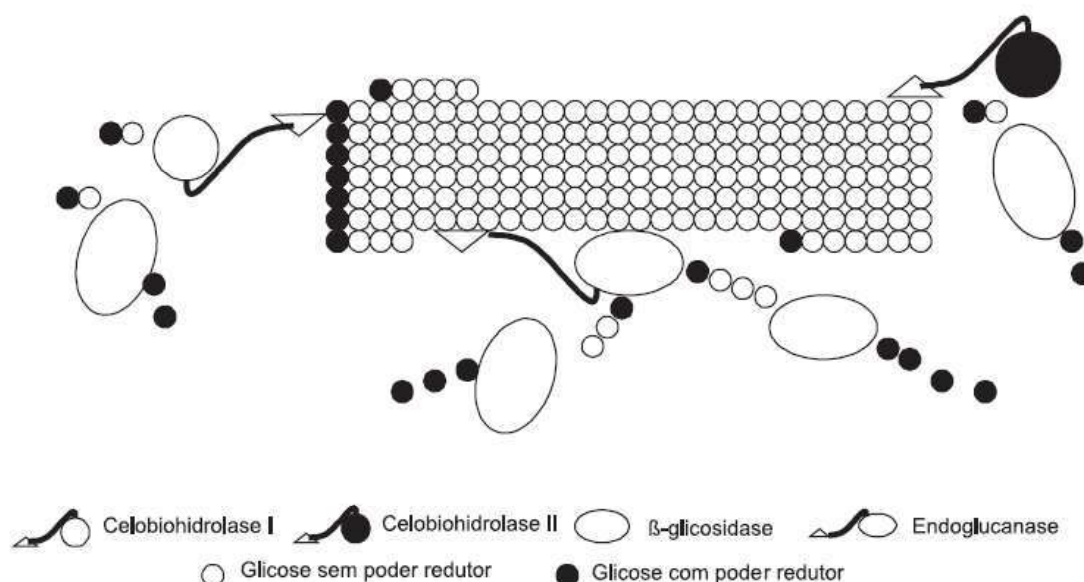


Figura 10. Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (CASTRO *et al.*, 2010).

Embora a hidrólise enzimática seja conduzida em condições brandas de pH (~4,8) e temperatura (45-50°C), sendo o custo das enzimas baixo quando comparado à hidrólises ácidas e alcalinas, o custo das enzimas ainda é um fator que restringe o uso em aplicações em larga escala (SINGH *et al.*, 2009; GOTTSCHALK *et al.*, 2010). Para tornar os processos fermentativos com biomassa lignocelulósica viáveis em escala industrial, o pré-tratamento e a hidrólise devem ser otimizados para minimizar os custos, recursos e o consumo energético (SRIARIYANUN *et al.*, 2016). Para minimizar estes custos muitas pesquisas têm sido realizadas buscando micro-organismos capazes de produzir e secretar essas enzimas (LIU *et al.*, 2011).

3.4 Fermentação em estado sólido (FES) e a produção de celulasas

Muitas espécies de fungos e bactérias são conhecidas por produzirem celulasas extracelulares. Diversas espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* são empregadas na produção comercial destas enzimas devido à capacidade de crescerem em meios sólidos e produzirem diferentes tipos destas enzimas (SINGH *et al.*, 2009).

As celulasas podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES) e por fermentação submersa (FS). Na fermentação em estado sólido o teor de água livre é minimizado ou quase inexistente. O baixo teor de água na fermentação pode apresentar diversas vantagens, tais como a baixa diluição das enzimas produzidas e em alguns casos não é necessária esterilização prévia (CASTRO *et al.*, 2010).

Neste tipo de fermentação apenas micro-organismos capazes de crescer em ambientes com baixo teor de umidade podem ser utilizados, tais como os fungos. Os resíduos ricos em nutrientes, principalmente os agroindustriais, podem ser facilmente utilizados e servem como nutrientes e suporte de crescimento por longos períodos de fermentação (SUBRAMANIAM; VIMALA, 2012; SINDHU *et al.*, 2015).

Na fermentação em estado sólido em escala laboratorial os cultivos podem ser desenvolvidos em vidrarias, como placas de Petri e erlenmeyers e em biorreatores, tais quais os biorreatores de coluna. Na escala industrial biorreatores mais elaborados são usados, com controle de temperatura, agitação e aeração. Alguns exemplos são reatores de leito empacotado e leito fluidizado, reatores de tambores rotativos e biorreatores de bandejas (BHARGAV, 2008).

Usualmente, resíduos agrícolas são usados como fonte de carbono para este tipo de fermentação, que têm como objetivo disponibilizar os açúcares fermentáveis através da ação de complexos de enzimas lignocelulolíticas. Esses complexos são eficientes e economicamente viáveis e podem ser produzidos por fungos da espécie *Aspergillus niger* (NEE'NIGAM; PANDEY, 2009).

3.4.1 *Aspergillus niger*

Os fungos do gênero *Aspergillus* produzem enzimas termoestáveis (SINGH *et al.*, 2009) e diversas enzimas de importância industrial, como por exemplo celulases, proteases e lipases (FALONY *et al.*, 2006; CHUTMANOP *et al.*, 2008). Os micro-organismos da espécie *Aspergillus niger* são considerados os principais fungos produtores de enzimas (SUBRAMANIYAM, VIMALA, 2012). A Figura 11 mostra a morfologia microscópica deste fungo.

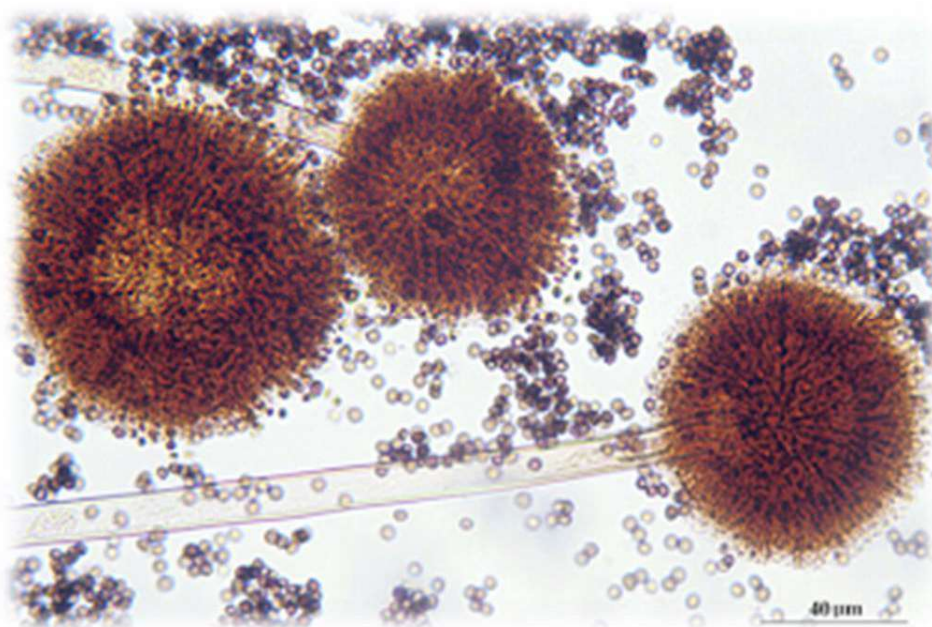


Figura 11. Morfologia microscópica do fungo *Aspergillus niger* (MBBS MEDICINE - HUMANITY FIRST).

Quando esse micro-organismo (*Aspergillus niger*) cresce em biomassa lignocelulósica bruta em fermentação em estado sólido são produzidas endoglicanases e β -glicosidases (LIU *et al.*,

2011). Uma das alternativas para aumentar a produção de celulases é o uso de substratos alternativos. RODRIGUEZ (2011) obteve os melhores resultados utilizando bagaço de cana-de-açúcar (*in natura* e pré-tratado) como substrato, extrato de soja como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. ROCHA (2010) analisou as variáveis temperatura e tempo de cultivo para otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em FES utilizando resíduos da agricultura e para a produção de celulases os maiores valores foram obtidos a 45°C no 12º dia de fermentação.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.* (2011) observaram produção de endoglicanases e celulases por *Aspergillus niger* cultivados por fermentação em estado sólido com diferentes substratos. A maior atividade enzimática foi observada em 72 horas de fermentação, com umidade entre 70 e 80% e com maior quantidade de farelos em relação a bagaços. Já BANSAL *et al.* (2012) obtiveram os melhores resultados para produção de celulases em 96 horas de fermentação, 28-30° C e 60% de umidade. SHARMA *et al.* (2012) demonstraram que a produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* em FES em diferentes biomassas pode ser melhorada através do pré-tratamento com NaOH 1% em temperatura ambiente e da suplementação de nutrientes com BSM (basal salt medium) modificado.

3.4.2 Co-cultivo (cultivo misto)

O co-cultivo consiste no cultivo simultâneo de dois micro-organismos que tenham semelhantes necessidades nutricionais e condições de cultivo. A vantagem econômica do co-cultivo está na redução do custo geral de produção (MARQUES, 2013). O co-cultivo de fungos em FES, por exemplo, pode ser usado para aumentar a capacidade de produção de diferentes enzimas em escala industrial (HU *et al.*, 2011; MARQUES, 2013).

KAUSHAL *et al.* (2012) co-cultivaram *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* para produção de celulases e xilanases extracelulares em FES utilizando madeira (*Celtris australis*), e obtiveram aumento considerado na produção, quando comparado com o mono-cultivo. GUPTE e MADAMWAR (1997) co-cultivaram *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* por FES em resíduos lignocelulósicos, visando produção de celulase e β -glicosidase. HU *et al.* (2011) obtiveram aumento na produção de enzimas extracelulares por co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. DEI *et al.* (2008) co-cultivaram *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis*

subvermispora em castanha de carité para avaliar o efeito da fermentação no valor nutricional da castanha. VERMA e MADAMWAR (2002) co-cultivaram os fungos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* em FES para produção de enzimas lignolíticas.

3.5 Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial é utilizado para fornecer relações entre as variáveis de um sistema, analisar os efeitos causados pelos diferentes níveis das variáveis e os efeitos causados pela interação dos diferentes níveis das variáveis (CUNICO *et al.*, 2008). Para execução de um planejamento fatorial é preciso especificar os níveis do fator de estudo. Um planejamento fatorial completo inclui todas as combinações dos níveis do fator e a partir das respostas registradas é possível avaliar o efeito destas combinações. Os fatores são as variáveis controladas do sistema e o um planejamento fatorial 2^2 é aquele que apresenta duas variáveis controladas (NETO *et al.*, 2010).

Para o planejamento fatorial 2^2 , o nível superior da variável é identificado pelo sinal (+) e o nível inferior pelo sinal (-) (NETO *et al.*, 2010). O efeito principal de uma variável é dado pela diferença média da resposta para uma variação do nível (CUNICO *et al.*, 2008). A equação 1 é usada para o cálculo do efeito principal.

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

Onde, y: média dos efeitos individuais da medida;

b: número de experimentos do planejamento (CUNICO *et al.*, 2008).

Então, para o planejamento fatorial 2^2 , a equação 1 pode ser escrita da seguinte forma.

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

O efeito de interação entre as variáveis é calculado como sendo a metade da diferença entre os efeitos principais de uma variável nos níveis da outra variável (CUNICO *et al.*, 2008). Para

melhor interpretação dos efeitos calculados é comum o uso de representações geométricas das respostas em função das variáveis (CUNICO *et al.*, 2008; NETO *et al.*, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção de açúcares redutores, utilizando material lignocelulósico, foram realizados dois planejamentos experimentais 2², um para o bagaço de cana-de-açúcar e outro para a palha de milho. Os ensaios foram realizados em duplicatas. As variáveis analisadas foram o tratamento químico e o tratamento biológico recebido pelas duas diferentes matérias-primas, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento fatorial 2² para a produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores. Variável 1 é o tratamento microbiológico e a variável 2 é o tratamento químico.

Ensaio	Variável 1	Nível	Variável 2	Nível
1	<i>A. niger</i> e <i>C. subvermispora</i>	+	Tratamento químico básico	+
2	<i>A. niger</i>	-	Tratamento químico básico	+
3	<i>A. niger</i> e <i>C. subvermispora</i>	+	Sem tratamento químico básico	-
4	<i>A. niger</i>	-	Sem tratamento químico básico	-

4.1 Pré-tratamentos das matérias-primas

4.1.1 Redução de tamanho e análise granulométrica (Pré-tratamento físico)

O bagaço de cana-de-açúcar e a palha de milho foram triturados com o auxílio de um liquidificador, em seguida foram levados para análise em peneira granulométrica. De acordo com a análise granulométrica, preparou-se uma mistura de cada material com diferentes tamanhos e esta mistura foi usada para a fermentação em estado sólido.

A proporção da mistura para a palha de milho foi, 42% (m/m) com tamanho médio de 1,4 mm, 33% (m/m) com tamanho médio 3,35 mm e 25% (m/m) com tamanho médio 500 µm. Para o bagaço de cana-de-açúcar a proporção da mistura foi, 34% (m/m) com 150 µm, 33% (m/m) com tamanho inferior a 100 µm e 33% (m/m) com tamanho médio de 300 µm.

4.1.2 Pré-tratamento alcalino

O tratamento químico básico foi realizado adicionando-se 30 mL de solução de hidróxido de sódio 1% (m/v) a 3 g do material triturado (palha de milho ou bagaço de cana-de-açúcar). A mistura foi mantida em repouso a temperatura ambiente durante duas horas. Após este tempo, lavou-se repetidamente até a retirada completa do hidróxido de sódio. Verificou-se a retirada completa do hidróxido de sódio com auxílio do pHmetro, até que o pH neutro fosse alcançado.

4.1.3 Secagem

Após a lavagem do material pré-tratado, este foi levado para estufa de secagem a 80°C, até obter massa constante. O material que não foi submetido ao tratamento básico também foi levado para secagem em estufa, com o objetivo de remover todo seu conteúdo de umidade.

4.2 Preparo dos inóculos

4.2.1 *Ceriporiopsis subvermispora* (Pré-tratamento biológico)

O fungo basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora*, cepa L1487-SS3, foi gentilmente cedido pelo Prof. André Aguiar Mendes (Universidade Federal de Itajubá). O micro-organismo foi plaqueado em meio contendo 2% (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de ágar. As placas foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias. Para a produção de esporos de *C. subvermispora*, 4 círculos de 1,6 cm de diâmetro de meio de cultivo com o micro-organismo foram adicionadas a um erlenmeyer de 1 L de volume contendo 100 mL do meio. O meio foi preparado com 2 % (m/v) de extrato de malte, 0,2 % (m/v) de extrato de levedura e $0,96 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose. O meio foi autoclavado a 121°C por 30 minutos. Os erlenmeyers foram mantidos estáticos em estufa bacteriológica a 28°C durante 12 dias. Este método foi adaptado de MENDES (2008).

A suspensão de *C. subvermispora* foi obtida a partir da camada sólida de micro-organismos, aplicando-se uma adaptação da metodologia descrita em MENDES (2008). As células foram recuperadas utilizando um funil de Buchner e lavadas com água destilada estéril. Em seguida as

células foram trituradas com água destilada em liquidificador, ambos estéreis, por 3 vezes durante 20 segundos cada.

A determinação da massa seca de hifas e esporos foi obtida filtrando-se 10 mL da suspensão em filtro de papel qualitativo (unifil) previamente pesado e seco em estufa a 105°C. O papel de filtro contendo as células foi seco a 105°C até obtenção de massa constante. A massa de células obtida foi de 75,9 mg, a partir deste valor têm-se que a concentração na suspensão foi de 7,59 mg/mL.

4.2.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger (ATCC® 9642™ – Lote T19/3/E), gentilmente cedido pelo professor Ênio Nazaré de Oliveira Júnior (Universidade Federal de São João Del Rei), foi plaqueado em Meio Riviere's Medium adaptado, com composição de NaNO₃ (1 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,62 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,9 g.L⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (0,5 g.L⁻¹), KCl (0,5 g.L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹), celulose microcristalina (10 g.L⁻¹), ágar (20 g.L⁻¹) (SHARMA *et al.*, 2012). As placas foram mantidas estáticas em estufa bacteriológica a 28 ± 2°C durante 7 dias.

Para o preparo da suspensão de *A. niger*, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril em cada placa contendo o micro-organismo crescido. As placas foram agitadas e as células retiradas com o auxílio de uma alça de platina. A determinação da massa seca de hifas e esporos foi obtida a partir da mesma metodologia utilizada para *C. subvermispora* (ver 4.2.1). A massa de esporos obtida foi de 16,5 mg e portanto a concentração da suspensão foi de 1,65 mg/mL.

4.3 Fermentação

Os erlenmeyers de 250 mL contendo 1,65 g (base seca) de BCA ou PM, tratados ou não tratados quimicamente, foram autoclavados a 121°C durante 30 minutos.

O meio BSM (basal salt medium) adaptado, foi preparado com a seguinte composição: 6 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 3 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g.L⁻¹ de NaCl, 2% (m/v) de ureia, 1% (m/v) de extrato de levedura, 0,1% (m/v) de peptona, 0,1% (m/v) de NaNO₃, 0,2 mL.L⁻¹ de CoCl₂ (1 M), 2 mL.L⁻¹ de MgSO₄ · 7 H₂O (1 M) e 0,1 mL.L⁻¹ de CaCl₂ · 2 H₂O (1 M). Para o preparo do meio as soluções de MgSO₄ e CaCl₂ foram autoclavadas separadamente e após autoclavadas foram adicionadas aos

outros constituintes do meio BSM (SHARMA *et al.*, 2012). Aos erlenmeyers contendo BCA e PM foram adicionados 3 mL de meio BSM (basal salt medium) adaptado.

Todas as amostras foram inoculadas com 1 mL da suspensão de *A. niger*. Os ensaios com nível de tratamento biológico (+) (ensaios 1 e 3, tabela 3) também foram inoculados com 1 mL da suspensão de *C. subvermispora*. Então, a fermentação teve início quando 1,65 mg de *A. niger* foi adicionado em todos os erlenmeyers e 7,59 mg de *C. subvermispora* foi adicionado aos cultivos dos ensaios 1 e 3. Todos os procedimentos foram realizados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar. Os erlenmeyers contendo os cultivos foram mantidos estáticos em estufa bacteriológica a 28°C durante 15 dias.

4.4 Extração do caldo enzimático

Após o término do cultivo, para a extração das enzimas, utilizou-se uma adaptação do método descrito em MENDES (2008). Adicionou-se aos cultivos contendo palha de milho 10 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5) acrescido de 0,01% (v/v) de Tween 20. Às amostras contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente, foram adicionados 20 mL de tampão, e às amostras com bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento químico 30 mL do tampão. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação (120 rpm) durante 5 horas a temperatura ambiente.

Os caldos enzimáticos foram recuperados por filtração em papel filtro qualitativo 80g (unifil), e usados para as determinações das atividades enzimáticas.

4.5 Determinação das atividades enzimáticas

O reagente DNS usado nas determinações enzimáticas foi preparado de acordo com a metodologia seguida em MENDES (2008). Dissolveu-se 1,06 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) e/ 1,00 g de NaOH em 1040 mL de água destilada. Dissolveu-se também nesta solução 18,2 g de tartarato de sódio e potássio, 0,2 mL de fenol levemente aquecido e 0,05 g de NaHSO₃.

4.5.1 Celulases totais (Fpase)

A determinação das celulases totais foi realizada como uma adaptação dos métodos descritos em VILELA (2013), CARVALHO (2008), MARTINS (2005), WOOD e BHA (1988) e VALADARES (2013), que utilizam a hidrólise de papel filtro nº1. Em tubos de ensaio homogeneizou-se um tira de papel filtro quantitativo nº1 (Fusion - ~ 50 mg - 1x6 cm²) com 500 µL do extrato enzimático e 500 µL de tampão citrato pH 4,8. Essa mistura foi mantida a 50°C durante 1 hora. Em seguida, os tubos contendo as misturas foram resfriados em água fria. Adicionou-se 250 µL de DNS à 250 µL de cada amostra e essas foram mantidas a 100 ± 2°C por 7 minutos. A cada tubo, adicionou-se 2 mL de água destilada e então a absorbância foi medida a 540 nm. O branco foi preparado substituindo o caldo enzimático por tampão.

Para o cálculo da atividade enzimática baseou-se em GHOSE (1987), no qual a atividade enzimática (U) é dada por $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, ou seja, uma unidade de atividade enzimática é a quantidade necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por mL de extrato enzimático por minuto de reação. A equação 3 pode ser utilizada para o calcular da atividade enzimática (AGUIAR, 2010).

$$\frac{U}{mL} = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad Eq. 3$$

Onde, ART: açúcares redutores totais produzidos na reação de hidrólise (mg/mL);

V_T: volume total na hidrólise (volume de tampão + volume de extrato enzimático) (mL);

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

V_C: volume de extrato enzimático na hidrólise (mL);

T_H: Tempo da reação de hidrólise (min).

A partir da equação 3 para o cálculo da atividade enzimática de FPase (UFP), têm-se a equação 4.

$$\frac{UFP}{mL} = ART \left(\frac{mg}{mL} \right) \times \frac{1 (mL)}{0,18 \left(\frac{mg}{\mu mol} \right) \times 0,5 (mL) \times 60 (min)} = ART \times 0,185 \quad Eq. 4$$

4.5.2 Endoglicanases (CMCase)

Para quantificar a atividade da carboximetilcelulase (CMCase) utilizou-se o método adaptado de Reese e Mandel descrito em SHARMA *et al.* (2012). Para tal, 200 µL do sobrenadante obtido da fermentação foi adicionado a 4,8 mL de tampão citrato (0,055 M, pH 5) adicionado de 1,1% (m/v) CMC e a mistura foi incubada a 50°C durante 1 hora. Em seguida, 250 µL desta mistura foi adicionado de 250 µL da solução de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS). A mistura foi levada para aquecimento a 100 ± 2°C durante 7 minutos e em seguida adicionou-se 2 mL de água destilada à cada amostra. Fez-se a leitura espectrofotométrica da absorbância a 540 nm. Para o branco, utilizou-se tampão citrato (0,055 M, pH 5) no lugar do extrato enzimático.

Para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se a equação 5, baseada em AGUIAR (2010), na qual UCMC é a unidade de atividade enzimática de CMCase.

$$\frac{UCMC}{mL} = ART \left(\frac{mg}{mL} \right) \times \frac{5 (mL)}{0,18 \left(\frac{mg}{\mu mol} \right) \times 0,2 (mL) \times 60 (min)} = ART \times 2,315 \quad Eq. 5$$

4.5.3 Manganês-peroxidase

Na determinação da atividade da manganês-peroxidase utilizou-se a oxidação por vermelho de fenol. Para tal, 500 µL do extrato enzimático foi adicionado de 1,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 500 µL de MnSO₄ 1 mM, 500 µL de vermelho de fenol 0,1% (m/v), 250 µL de albumina 1% (m/v), 250 µL de H₂O₂ 2 mM. Em intervalos de 2 minutos, 1 mL desta mistura foi acrescida de 30 µL de NaOH 6,5 M e a absorbância foi medida a 610 nm. O branco foi feito substituindo-se o extrato enzimático por água destilada (MENDES, 2008).

4.5.4 Lacase

A oxidação de ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6)-sulfônico) descrita em MENDES (2008) foi usada para a determinação da Lacase. Então, 300 µL de tampão citrato-fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0), 100 µL de água destilada e 100 µL de ABTS 1 mM foram adicionados

a 500 μ L do extrato enzimático. Acompanhou-se a cinética enzimática a 420 nm em intervalos de 10 segundos durante 5 minutos. Para o branco, substituiu-se o extrato enzimático por água destilada.

4.5.5 Lignina-peroxidase

Utilizou-se o corante azul de metileno para a determinação da atividade da lignina-peroxidase, de acordo com uma adaptação do método descrito em MENDES (2008). Para essa determinação adicionou-se 625 μ L de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 125 μ L de corante azul de metileno 300 mM, 250 μ L de H₂O₂ 2mM e 250 μ L de extrato enzimático. Monitorou-se a degradação do corante a 651 nm durante 10 minutos. O branco foi preparado substituindo-se o extrato enzimático por água destilada.

4.5.6 Fenol-oxidase total

Para a dosagem de fenol-oxidase total uma adaptação das metodologias descritas em GALLO *et al.* (2004), CHANTON (2014) e FLOCH *et al.* (2007) foi utilizada. Nesta determinação adicionou-se a 500 μ L do extrato enzimático, 300 μ L de tampão citrato 0,055 M (pH 5,0), 50 μ L de sulfato de manganês 10 mM, 100 μ L de ABTS 1 mM e 50 μ L de H₂O₂ 2 mM. As amostras foram homogeneizadas e a absorbância medida a 420 nm durante 5 minutos a intervalos de 10 segundos. No branco substituiu-se o extrato enzimático por água.

4.6 Curva Padrão de concentração de glicose

Para a construção da curva de glicose baseou-se na metodologia descrita em VILELA (2013). A curva padrão de concentração de glicose foi preparada a partir de uma solução estoque de glicose 1 mg/mL. Amostras com concentrações entre 0,1 e 0,8 mg/mL foram preparadas e a 250 μ L do padrão foi adicionado 250 μ L do reagente DNS. Essa mistura foi mantida a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 minutos. Em seguida as amostras foram resfriadas e adicionadas de 2,0 mL de água destilada. A densidade óptica foi medida a 540 nm. Os valores de absorbância medidos e as concentrações das soluções foram usados para a construção da curva padrão.

4.7 Determinação dos açúcares redutores

Para a quantificação dos açúcares redutores presentes no caldo enzimático, 250 µL de amostra foi adicionado de 250 µL do reagente DNS. A mistura reacional foi mantida em banho-maria a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 minutos e em seguida resfriada em banho de água fria. Adicionou-se 2 mL de água destilada e mediu-se a densidade óptica a 540 nm. Ao branco substituiu-se o extrato enzimático por 250 µL de tampão citrato pH 4,8. Este método foi baseado na metodologia estabelecida pela Embrapa Agroindústria Tropical em VASCONCELOS *et al.* (2013).

4.8 Quantificação das atividades enzimáticas das celulasas e dos açúcares redutores totais

Para a quantificação das celulasas e dos açúcares redutores totais utilizou-se a equação da curva padrão (seção 4.6) e os devidos fatores de diluição. As atividades enzimáticas foram obtidas em UI/mL a partir das equações 4 e 5. A partir dos valores de atividade enzimática por mL de extrato é possível calcular a atividade enzimática total por grama de biomassa (BCA e PM), através da equação 6:

$$\frac{UI}{g} = \frac{\frac{UI}{mL} * V_E}{M} \quad Eq. 6$$

Onde, UI/mL: valor das atividades enzimáticas (tabelas 4 e 8);

V_E: Volume de extrato enzimático recuperado na extração;

M: Massa da biomassa utilizada na FES.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das determinações das atividades enzimáticas descritas na seção 4.5, as celulases foram as principais enzimas presentes em todos os cultivos (tabelas 5 e 9). Não foi possível detectar, em nenhuma condição dos planejamentos fatoriais, a presença das enzimas relacionadas à atividade lignolítica produzidas por *C. subvermispota* (manganês-peroxidase, lignina-peroxidase, fenol-oxidases e lacase). Porém, era esperada a produção destas enzimas devido a relatos da literatura de diferentes autores que determinaram estas enzimas em cultivo deste micro-organismo. A Tabela 4 mostra alguns destes autores e as condições de cultivo aplicadas em cada estudo.

Tabela 4. Enzimas lignocelulolíticas determinadas por diferentes autores em cultivos de *C. subvermispota* em diferentes condições.

Autores	Substrato	Temperatura (°C)	Suplementação	Tempo de cultivo	Enzimas determinadas
BABIČ <i>et al.</i> (2012)	Madeira	30	Glicose + tartarato de amônio + polisorbato 80	≈ 2 e 3 semanas	Lacase e manganês-peroxidase
TANAKA <i>et al.</i> (2009)	Madeira	28	Meio ágar basal + glicose	≈ 3 a 10 semanas	Lacase, manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e endoglicanases
MENDES (2008)	Madeira	27±2	-	≈ 4 semanas	Endoglicanases, xilanases, manganês-peroxidase e lacase

Conforme mostrado na Tabela 4, BABIČ *et al.* (2012) observaram a produção de lacases e manganês-peroxidase por *C. subvermispota* em cultivos em meios submersos utilizando suporte para imobilização (madeira). TANAKA *et al.* (2009) analisaram a produção de enzimas e a degradação de madeira por *C. subvermispota*. Neste estudo, detectaram o pico de atividade enzimática de endoglicanases e lignina-peroxidase depois de 3 semanas de cultivo. Lacase foi detectada no início do cultivo e os picos de manganês-peroxidase em 6 e 10 semanas. Portanto, o tempo de cultivo pode ter sido um fator limitante na produção destas enzimas, já que no presente estudo foi de apenas 15 dias.

A ausência de lignina-peroxidase em cultivo de *C. subvermispota* foi observada por MENDES (2008) em estudo da biodegradação de madeira. MENDES (2008) detectou a presença

de endoglicanases, xilanase, manganês-peroxidase e lacase em baixas concentrações. Como as duas últimas não foram detectadas no presente estudo, pode-se inferir que não ocorreu produção de enzimas lignolíticas por parte deste micro-organismo.

O fungo *C. subvermispora* pode ter produzido endoglicanases e xilanases, já que foi observada atividade de CMCase (endoglicanases) e açúcares redutores. As xilanases catalisam a hidrólise das ligações entre as unidades monoméricas de xilose – presentes na hemicelulose (MENDES, 2008), liberando monômeros de xilose detectáveis pela determinação de açúcares redutores (seção 4.7).

Através de observação visual foi possível perceber que o crescimento do fungo *C. subvermispora* não foi relevante quando comparado com o do *A. niger*. Então, pode ter ocorrido uma inibição do crescimento do *C. subvermispora* pelo fungo *A. niger*. Este fato pode explicar a ausência das enzimas peroxidases e lacase, pois como não ocorreu crescimento considerável do micro-organismo, não houve produção mensurável destas enzimas pelo mesmo.

Portanto, as condições do co-cultivo não foram favoráveis para o desenvolvimento e produção de enzimas lignolíticas pelo fungo *C. subvermispora*. Uma das causas pode ter sido o tempo de fermentação, que foi inferior ao descrito em TANAKA *et al.* (2009) para a detecção dos picos de atividade enzimática. O uso de resíduos agrícolas como substrato da fermentação também pode ter desfavorecido a produção destas enzimas, já que na literatura *C. subvermispora* é mais empregado na biodegradação de madeiras. A umidade relativa do meio também pode ter sido um fator limitante, pois em FES teores altos e baixos de umidade podem interferir na produtividade (BANSAL *et al.*, 2012).

5.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Os valores de atividade enzimática (UI/mL) e concentração de açúcares redutores médios determinados no planejamento fatorial para o bagaço de cana-de-açúcar estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados do planejamento Fatorial 2² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	FPase (UFP/mL)	CMCase (UCMC/mL)	Açúcares redutores totais (mg/mL)
1	-	+	-	0,144±0,006	0,412±0,051	1,134±0,107
2	+	+	+	0,119±0,002	0,304±0,096	1,037±0,004
3	-	-	+	0,068±0,016	0,517±0,089	0,359±0,009
4	+	-	-	0,060±0,004	0,718±0,130	0,536±0,015

No tratamento microbiológico (-) significa que apenas o micro-organismo *Aspergillus niger* foi utilizado e (+) que se utilizou a associação dos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispora*. Para o tratamento químico (+) significa tratado e (-) significa não tratado.

As atividades enzimáticas (UI/mL) apresentadas na Tabela 5 foram utilizadas para calcular os valores de atividade enzimática total por grama de biomassa (utilizando a equação 6). Os valores calculados foram apresentados nas Tabelas 6 e 7.

5.1.1 Produção de FPase

A Tabela 6 apresenta os valores de atividade enzimática para FPase (UFP/g).

Tabela 6. Resultados do planejamento Fatorial 2² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção da FPase utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	FPase/g (UFP/g)
1	-	+	-	0,873± 0,037
2	+	+	+	0,770±0,015
3	-	-	+	0,449±0,107
4	+	-	-	0,385±0,024

Efeitos principais: Tratamento microbiológico: $[(-0,873+0,770-0,449+0,385) / 2] = -0,084$

Tratamento Químico: $[(+0,873+0,770-0,449-0,385) / 2] = 0,405$

Efeitos de segunda ordem: Trat. Micr. X Trat. Quím.: $[(-0,873+0,770+0,449-0,385) / 2] = -0,020$

A resposta FPase/g foi representada num sistema cartesiano, com um eixo para cada variável (Figura 12).

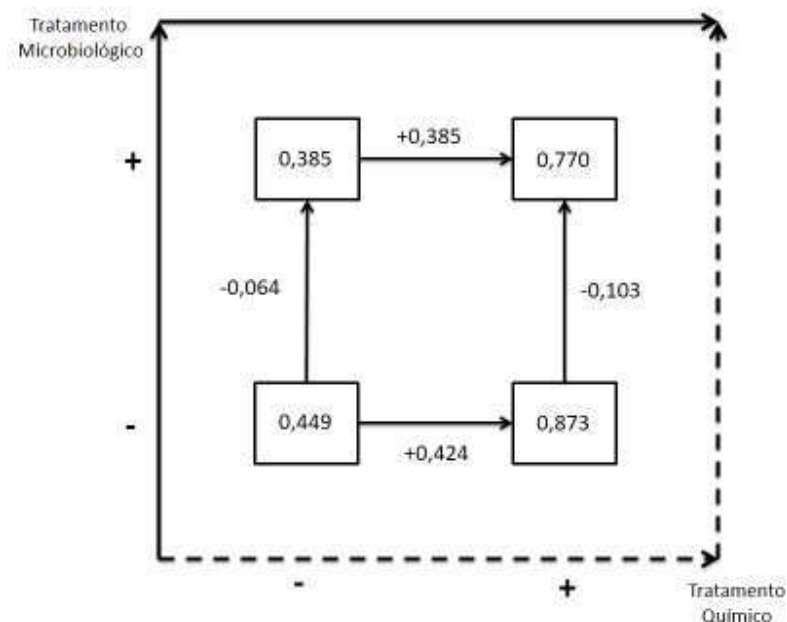


Figura 12. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de FPase utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: UFP/g].

A partir das informações contidas na Tabela 6 e na Figura 12 é possível observar que nos ensaios em que ocorreu o tratamento químico (1 e 2), o tratamento microbiológico fez com que a produção de enzimas Fpase diminuísse em 0,103 UFP/g (+0,873-0,770). Nos ensaios nos quais o tratamento químico não foi aplicado (3 e 4), o tratamento microbiológico fez com que a produção de enzimas Fpase diminuísse em 0,064 UFP/g (+0,985-1,796). O efeito global apresentado pela variável tratamento microbiológico pôde ser obtido pela média dos efeitos citados $[(-0,103-0,064)/2] = -0,084$.

Observa-se que para os ensaios em que o tratamento microbiológico foi aplicado (2 e 4), o tratamento químico proporcionou aumento na produção de FPase de 0,385 UFP/g (+0,770-0,385). Já nos ensaios nos quais não ocorreu o tratamento microbiológico (1 e 3), o tratamento químico proporcionou aumento na produção de FPase de 0,424 UFP/g (-0,449+0,873). Para a variável tratamento químico o efeito global calculado foi de 0,405 $[(+0,385+0,424)/2]$.

O efeito de segunda ordem para a associação entre as variáveis tratamento químico e tratamento microbiológico (-0,020) mostra que a associação do micro-organismo com o tratamento químico não foi favorável para a produção de FPase. Analisando os efeitos globais

para as duas variáveis nota-se que as duas variáveis influenciaram na produção de enzimas FPase, porém o efeito da variável tratamento químico foi maior e positivo. Para a produção de FPase o ensaio que apresentou melhores resultados foi o ensaio 1, no qual apenas ocorreu tratamento químico.

5.1.2 Produção de CMCase (endoglicanases)

A Tabela 7 e a Figura 13 apresentam os resultados para atividade enzimática de CMCase (UCMC/g).

Tabela 7. Resultados do planejamento Fatorial 2² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de CMCase utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	CMCase/g (UCMC/g)
1	-	+	-	2,497±0,309
2	+	+	+	1,956±0,617
3	-	-	+	3,387±0,583
4	+	-	-	4,567±0,825

Efeitos principais: Tratamento microbiológico: $[(-2,497+1,956-3,387+4,567) / 2] = 0,320$

Tratamento Químico: $[(+2,497+1,956-3,387-4,567) / 2] = -1,751$

Efeitos de segunda ordem: Trat. Micr. X Trat. Quím.: $[(-2,497+1,956+3,387-4,567) / 2] = -0,861$

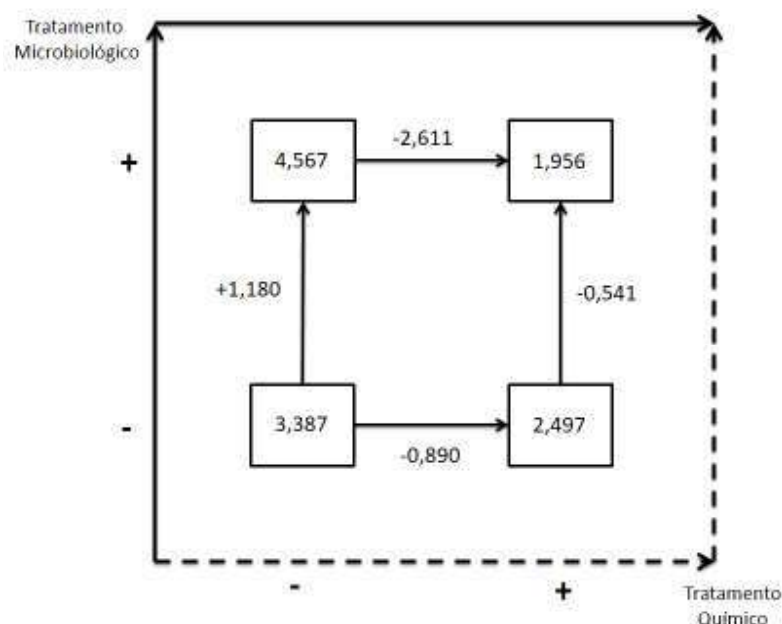


Figura 13. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de CMCase utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: UCMC/g].

Para a análise da produção de CMCase, observa-se que para os ensaios 1 e 2, nos quais o tratamento químico foi realizado, o tratamento microbiológico proporcionou uma queda de 0,541 UCMC/g $(-2,497+1,956)$. Nos ensaios 3 e 4 não ocorreu tratamento químico, o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 1,180 UCMC/g $(-3,387+4,567)$. Sendo assim o efeito global da variável tratamento microbiológico na produção de CMCase foi de 0,320 $[(-0,541+1,180)/2]$.

Nos ensaios 2 e 4, nos quais ocorreu tratamento microbiológico, o tratamento químico fez com que ocorresse uma diminuição de 2,611 UCMC/mL $(-4,567+1,956)$. Nos ensaios 1 e 3, o tratamento químico causou uma diminuição de 0,890 UCMC/mL $(+2,497-3,387)$. O efeito global do tratamento químico foi de -1,751 $[(-2,611-0,890)/2]$.

Analisando o efeito de segunda ordem para a associação dos dois tratamentos $(-0,861)$, conclui-se que a associação não foi favorável para a produção de CMCase. Pela análise dos efeitos globais das duas variáveis, têm-se que o tratamento microbiológico apresentou efeito positivo na produção destas enzimas, e que o tratamento químico apresentou efeito negativo. A melhor condição para a produção de CMCase foi a do ensaio 4, na qual apenas o tratamento microbiológico foi aplicado.

5.1.3 Produção de açúcares redutores totais

A Tabela 8 e a Figura 14 apresentam as respostas e os efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de açúcares redutores totais.

Tabela 8. Resultados do planejamento Fatorial 2^2 para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de açúcares redutores utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	Açúcares redutores totais (mg/mL)
1	-	+	-	1,134±0,107
2	+	+	+	1,037±0,004
3	-	-	+	0,359±0,009
4	+	-	-	0,536±0,015

Efeitos principais: Tratamento microbiológico: $[(-1,134+1,037-0,359+0,536)/2] = 0,040$

Tratamento Químico: $[(+1,134+1,037-0,359-0,536)/2] = 0,638$

Efeitos de segunda ordem: Trat. Micr. X Trat. Quím.: $[(-1,134+1,037+0,359-0,536)/2] = -0,137$

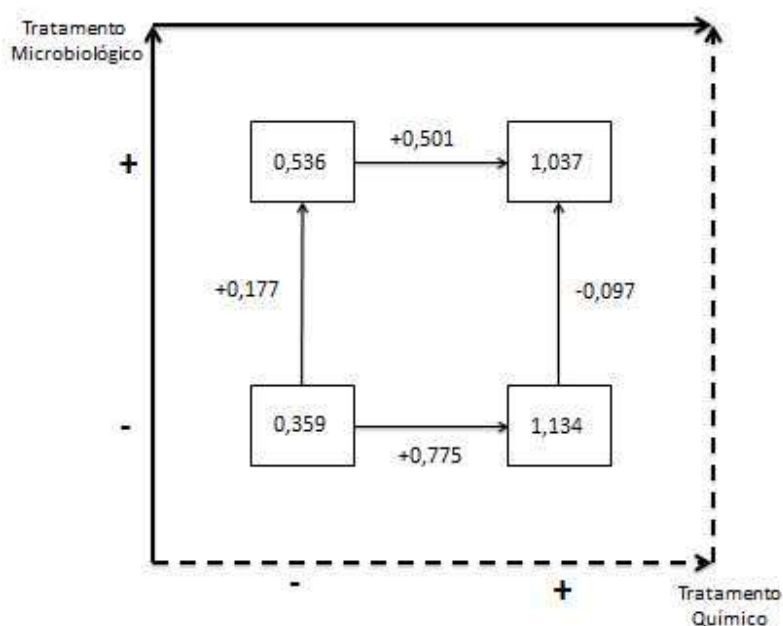


Figura 14. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de açúcares redutores totais utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: mg/mL].

Nos ensaios em que ocorreu tratamento químico (1 e 2), o tratamento microbiológico ocasionou uma diminuição de 0,097 mg/mL na concentração total de açúcares redutores (+1,037-

1,134). Nos ensaios 3 e 4, nos quais não ocorreu o tratamento químico, o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 0,177 mg/mL (-0,359+0,536).

Nos ensaios em que não ocorreu tratamento microbiológico (1 e 3), o tratamento químico proporcionou um aumento de 0,775 mg/mL (-0,359+1,134). Nos ensaios 2 e 4 em ocorreu o tratamento microbiológico, o tratamento químico aumentou em 0,501 mg/mL a produção de açúcares redutores totais (-0,536+1,037).

Analisando os efeitos das variáveis na produção de açúcares redutores totais observa-se um efeito global da variável tratamento microbiológico igual a 0,040 $[(-0,097+0,177)/2]$ e um efeito global da variável tratamento químico de 0,638 $[(+0,775+0,501)/2]$. Sendo assim as duas variáveis tiveram efeito positivo na produção de açúcares, porém o tratamento químico apresentou maior efeito.

O efeito de segunda ordem mostra que a associação entre os dois tratamentos também não foi favorável para a produção de açúcares redutores totais, sendo a melhor condição a do ensaio 1.

Então, de modo geral, o ensaio 1 foi o que apresentou os melhores resultados para a fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Ou seja, a associação dos micro-organismos não foi favorável para a produção de enzimas (FPase) e açúcares redutores, tendo a variável tratamento químico se mostrado mais eficiente neste caso. Este fato mostra que apenas o fungo *A. niger* foi determinante na produção de FPase e açúcares redutores e que o pré-tratamento alcalino foi eficiente na disponibilização de celulose.

Porém para a produção de CMCase o co-cultivo sem o tratamento químico foi a melhor condição, provavelmente devido ao fato de que os dois micro-organismos utilizados são conhecidos por produzirem CMCase em FES. Portanto, neste caso, o co-cultivo se mostrou eficiente na redução dos custos de produção, já que o uso do pré-tratamento foi dispensado.

Comparando os valores determinados com os valores da literatura observa-se que as condições empregadas não foram vantajosas para a produção das enzimas celulolíticas, pois as atividades enzimáticas obtidas foram inferiores às descritas para mono-cultivo de *A. niger*, como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação das atividades enzimáticas determinadas em diferentes estudos.

Autores	Substrato	Micro-organismo	Atividade de endoglicanases	Atividade de celulases totais
RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA <i>et al.</i> (2011) [13]	Bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>	21 UI g ⁻¹	0,4 UI g ⁻¹
BANSAL <i>et al.</i> (2012) [14]	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Aspergillus niger</i>	5 UI g ⁻¹	1,5 UI g ⁻¹
MENDES (2008) [12]	Madeira	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	0,046 UI g ⁻¹	0,0124 UI g ⁻¹
Neste trabalho	Bagaço de cana-de-açúcar (tratado)	<i>Aspergillus niger</i>	2,497 UI g ⁻¹	0,873 UI g ⁻¹
Neste trabalho	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Aspergillus niger</i> + <i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	4,567 UI g ⁻¹	0,385 UI g ⁻¹

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.* (2011) determinaram atividade máxima de celulases totais igual a 0,4 UI g⁻¹ e de endoglicanases igual a 21 UI g⁻¹ para cultivo em estado sólido de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar adicionado de farelo de trigo após 72 horas. A atividade máxima de celulases totais obtidas no presente trabalho foi 218% maior que a determinada em RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.* (2011), porém, no presente trabalho o tempo de fermentação foi muito superior (15 dias). A atividade máxima de endoglicanases obtida por RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.* (2011) foi 460% maior, este valor pode ser explicado pela suplementação com farelo de trigo.

BANSAL *et al.* (2012) determinaram atividade de celulases totais igual a 1,5 UI g⁻¹ e endoglucanases igual a 5,0 UI g⁻¹ para fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento. Estes valores foram respectivamente 172 e 110% maiores que os valores máximos determinados no presente trabalho.

MENDES (2008) determinou atividade de endoglucanases igual 0,046 UI g⁻¹ e de celulases totais igual a 0,0124 UI g⁻¹ em duas semanas de cultivo de *C. subvermispota* em madeira. As atividades determinadas por MENDES (2008) foram respectivamente 100 e 70 vezes menores que as atividades máximas determinadas neste trabalho, porém, MENDES (2008) considerou a produção destas enzimas apenas pelo micro-organismo *C. subvermispota*.

5.2 Palha de Milho

Para o planejamento fatorial da palha de milho, os valores de atividade enzimática (UI/mL) e concentração de açúcares redutores médios estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados do planejamento Fatorial 2² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	FPase (UFP/mL)	CMCase (UCMC/mL)	Açúcares redutores totais (mg/mL)
1	-	+	-	0,151±0,017	1,533±0,051	0,880±0,043
2	+	+	+	0,191±0,020	1,380±0,005	1,127±0,146
3	-	-	+	0,158±0,006	1,764±0,095	0,801±0,074
4	+	-	-	0,171±0,002	1,528±0,188	0,669±0,003

No tratamento microbiológico (–) significa que apenas o micro-organismo *Aspergillus niger* foi utilizado e (+) que se utilizou a associação dos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispora*. Para o tratamento químico (+) significa tratado e (–) significa não tratado.

Os valores de atividade enzimática (UI/g) para os ensaios da palha de milho foram obtidos a partir das atividades enzimáticas (UI/mL) apresentadas na Tabela 10 e da Equação 6, e apresentados nas Tabelas 11 e 12 e nas Figuras 15 e 16. A Tabela 11 e a Figura 17 apresentam os valores para açúcares redutores totais.

5.2.1 Produção de FPase

A Tabela 11 e a Figura 15 apresentam as respostas e os efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de FPase utilizando a palha de milho.

Tabela 11. Resultados do planejamento Fatorial 2^2 para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção da FPase utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	FPase/g (UFP/g)
1	-	+	-	0,735±0,081
2	+	+	+	1,043±0,111
3	-	-	+	0,668±0,024
4	+	-	-	0,880±0,011

Efeitos principais: Tratamento microbiológico: $[(-0,735+1,043-0,668+0,880)/2] = 0,260$

Tratamento Químico: $[(+0,735+1,043-0,668-0,880)/2] = 0,115$

Efeitos de segunda ordem: Trat. Micr. X Trat. Quím.: $[(-0,735+1,043+0,668-0,880)/2] = 0,048$

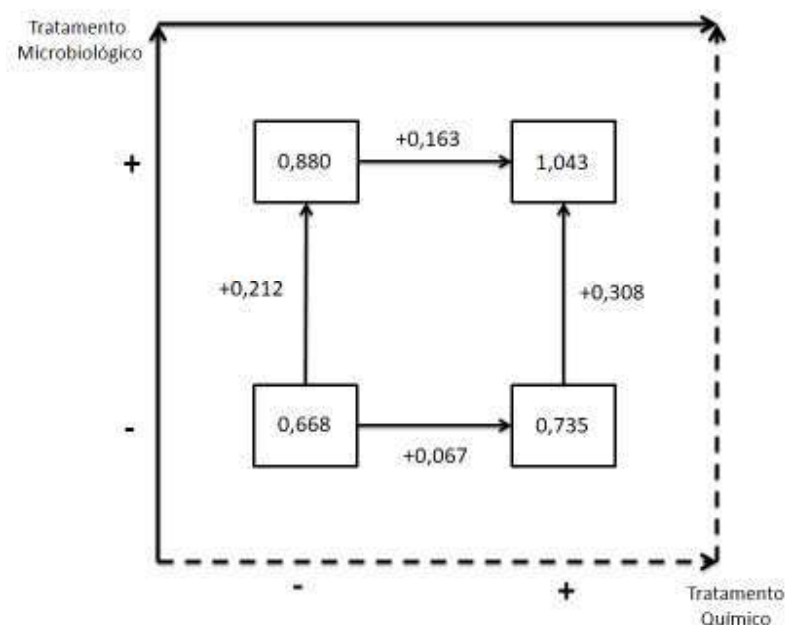


Figura 15. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de FPase utilizando palha de milho [resposta: UFP/g].

Analisando a Tabela 11 e a Figura 15, é possível observar que nos ensaios em que ocorreu o tratamento químico (1 e 2), o tratamento microbiológico provocou um aumento na produção de Fpase de 0,308 UFP/g $(-0,735+1,043)$. Para os ensaios 3 e 4, nos quais o tratamento químico não foi aplicado, o tratamento microbiológico fez com que a produção de enzimas Fpase aumentasse em 0,212 UFP/g $(+0,880-0,668)$. O efeito global apresentado pela variável tratamento microbiológico foi igual a $0,260 = [(+0,308+0,212)/2]$.

Nos ensaios 2 e 4, nos quais o tratamento microbiológico foi aplicado, o tratamento químico ocasionou aumento na produção de FPase de 0,163 UFP/g (+1,043-0,880). Para os ensaios 1 e 3, nos quais não ocorreu o tratamento microbiológico, o tratamento químico proporcionou aumento na produção de FPase de 0,067 UFP/g (+0,735-0,668). Então, o efeito global calculado para a variável tratamento químico foi de 0,115 $[(+0,163+0,067)/2]$.

De acordo com o efeito de segunda ordem para a associação entre as variáveis (0,048), a associação dos micro-organismos com o tratamento químico foi favorável para a produção de FPase. As duas variáveis influenciaram positivamente na produção de FPase, porém a influência do tratamento biológico foi maior. Portanto, a melhor condição para produção de FPase foi o ensaio 2, no qual ocorreu associação entre os microrganismos e o tratamento químico.

5.2.2 Produção de CMCase (endoglicanases)

A Tabela 12 e a Figura 16 apresentam as respostas e os efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de CMCase/g utilizando a palha de milho.

Tabela 12. Resultados do planejamento Fatorial 2^2 para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de CMCase utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	CMCase/g (UCMC/g)
1	-	+	-	7,430±0,247
2	+	+	+	7,526±0,025
3	-	-	+	7,484±0,403
4	+	-	-	7,871±0,966

Efeitos principais: Tratamento microbiológico: $[(-7,430+7,526-7,484+7,871)/2] = +0,242$

Tratamento Químico: $[(+7,430+7,526-7,484-7,871)/2] = -0,200$

Efeitos de segunda ordem: Trat. Micr. X Trat. Quím.: $[(-7,430+7,526+7,484-7,871)/2] = -0,146$

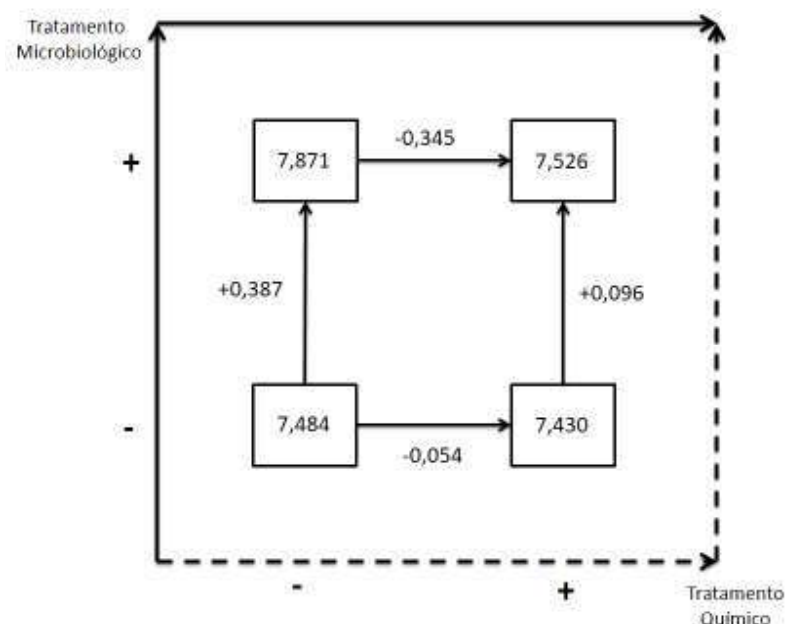


Figura 16. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de CMCase utilizando palha de milho [resposta: UCMC/g].

Analisando a produção de CMCase através da Tabela 12 e da representação geométrica da Figura 16, observa-se que para os ensaios nos quais o tratamento químico foi realizado (1 e 2), o tratamento microbiológico fez com que a produção de CMCase aumentasse em 0,096 UCMC/g (+7,526-7,430). Nos ensaios 3 e 4, nos quais não ocorreu tratamento químico, o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 0,387 UCMC/g (+7,871-7,484). Então, o efeito global da variável tratamento microbiológico na produção de CMCase foi de 0,242 $[(+0,096+0,387) / 2]$.

Nos ensaios nos quais ocorreu tratamento microbiológico, 2 e 4, o tratamento químico proporcionou uma diminuição de 0,345 UCMC/g (-7,871+7,526). Nos ensaios 1 e 3, o tratamento químico causou uma diminuição de 0,054 UCMC/g (-7,484+7,430). O efeito global do tratamento químico foi de -0,200 $[(-0,345-0,054) / 2]$.

O efeito de segunda ordem para a associação dos micro-organismos e do tratamento químico (-0,146) indica que a associação não foi favorável para a produção de CMCase. Através dos efeitos globais, conclui-se que o tratamento microbiológico foi mais favorável e portanto a melhor condição para a produção de CMCase foi a do ensaio 4, na qual apenas o tratamento microbiológico foi aplicado.

5.2.3 Produção de açúcares redutores totais

A Tabela 13 e a Figura 17 apresentam as respostas e os efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de CMCase/g utilizando a palha de milho.

Tabela 13. Resultados do planejamento Fatorial 2^2 para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de açúcares redutores utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Experimento	Variáveis			Resposta
	Tratamento Microbiológico	Tratamento químico	Trat. M. X Trat. Q.	Açúcares redutores totais (mg/mL)
1	-	+	-	0,880±0,043
2	+	+	+	1,127±0,146
3	-	-	+	0,801±0,074
4	+	-	-	0,669±0,003

Efeitos principais: Tratamento microbiológico: $[(-0,880+1,127-0,801+0,669) / 2] = 0,058$

Tratamento Químico: $[(+0,880+1,127-0,801-0,669) / 2] = 0,269$

Efeitos de segunda ordem: Trat. Micr. X Trat. Quím.: $[(-0,880+1,127+0,801-0,669) / 2] = 0,189$

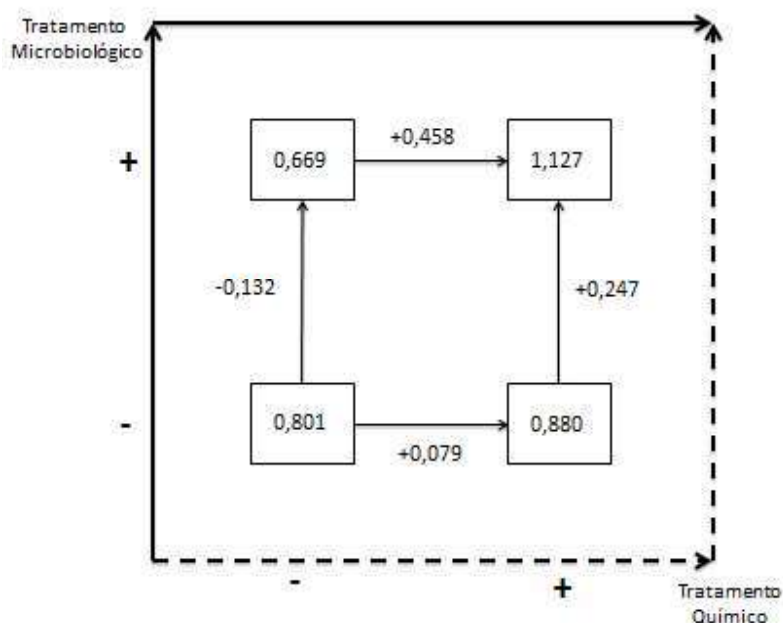


Figura 17. Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de açúcares redutores totais utilizando palha de milho [resposta: mg/mL].

Analisando os ensaios 1 e 2, observa-se que o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 0,247 mg/mL na concentração total de açúcares redutores $(-0,880+1,127)$. Já nos ensaios 3 e 4, o tratamento microbiológico ocasionou uma diminuição de 0,132 mg/mL $(+0,669-0,801)$. Então, o efeito global da variável tratamento microbiológico foi igual a 0,058 $[(+0,247-0,137)/2]$.

Nos ensaios 1 e 3, o tratamento químico proporcionou um aumento de 0,079 mg/mL $(-0,801+0,880)$. Nos ensaios 2 e 4, o tratamento químico aumentou em 0,458 mg/mL a produção de açúcares redutores totais $(-0,669+1,127)$. O efeito global da variável tratamento químico foi de 0,269 $[(+0,079+0,458)/2]$.

Portanto, as duas variáveis tiveram efeito positivo na produção de açúcares, porém o tratamento químico apresentou maior efeito. O efeito de segunda ordem mostra que a associação entre os dois tratamentos também foi favorável para a produção de açúcares redutores totais, sendo a melhor condição a do ensaio 2, no qual os tratamentos foram empregados.

Analisando todos os efeitos das diferentes respostas, o ensaio 2 foi o que apresentou os melhores resultados para a fermentação em estado sólido utilizando palha de milho como matéria-prima, pois foi a associação dos micro-organismos com o tratamento químico que proporcionou maior produção de FPase e açúcares redutores. SHARMA et al. (2012) também observou que o pré-tratamento de biomassa com hidróxido de sódio 1% em condições ambientes aumentou a acessibilidade para as enzimas celulolíticas. Como *C. subvermispota* produz xilanases, a produção destas enzimas pode ter influenciado na concentração de açúcares redutores totais no co-cultivo. A associação dos micro-organismos foi vantajosa para a produção das enzimas, e no caso da CMCase o uso do pré-tratamento alcalino pode ser dispensado. Este resultado foi obtido para as duas matérias-primas, bagaço de cana e palha de milho, mostrando que o custo da produção de CMCase pode ser reduzido com o cultivo misto de *C. subvermispota* e *A. niger*.

A Tabela 14 apresenta os valores máximos de atividade enzimática e de concentração de açúcares redutores determinados para os cultivos com bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho.

Tabela 14. Comparação das atividades enzimáticas máximas e açúcares redutores totais máximos determinadas para os cultivos em BCA e PM.

Biomassa	FPase (UFP/g)	CMCase (UCMC/g)	Açúcares redutores totais (mg/mL)
Bagaço de cana-de-açúcar	0,873±0,037	4,567±0,825	1,134±0,107
Palha de milho	1,043±0,111	7,871±0,988	1,127±0,146

Comparando as duas biomassas utilizadas tem-se que a palha de milho apresentou melhores resultados para a produção das enzimas celulolíticas. O mesmo resultado foi observado por AGUIAR (2010), que comparou bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e palha de milho como fonte de carbono (na fermentação utilizando *A. niger*) e como substrato na hidrólise enzimática e obteve os melhores resultados para a palha de milho. Este resultado pode ser explicado pela composição química do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de milho apresentada na Tabela 1 (seção 3.1). Como a palha de milho apresenta menor percentual de lignina em sua composição quando comparada ao bagaço de cana-de-açúcar, a sua recalcitrância é menor e portanto a celulose está mais disponível para os micro-organismos. Da mesma forma, como o percentual de hexoses e pentoses da palha (tabela 1 – seção 3.1) é superior ao do bagaço de cana-de-açúcar, de forma geral ocorreu maior produção de açúcares redutores nos cultivos nos quais a palha de milho foi utilizada.

A Tabela 15 mostra o tempo de fermentação e a temperatura ótimos utilizados em cultivos de *A. niger* em diferentes estudos.

Tabela 15. Tempo e Temperatura de fermentação ótimos para a produção de enzimas celulolíticas obtido por diferentes autores em cultivos de *Aspergillus niger*.

Autores	Substrato	Tempo de fermentação	Temperatura de Fermentação
AGUIAR (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar	7 dias	30
BANSAL <i>et al.</i> (2012)	Bagaço de cana-de-açúcar	96 horas	30
GHORI (2008)	Palha de milho	96 horas	30
RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA <i>et al.</i> (2011)	Bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo	72 horas	32

Conforme apresentado na Tabela 15, AGUIAR (2010) determinou que o melhor tempo para a produção enzimática por *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar foi de aproximadamente sete dias de fermentação. Já BANSAL *et al.* (2012) observou que em 96 horas de cultivo foram determinadas as maiores atividades enzimáticas para as enzimas celulolíticas em cultivos de *A. niger* em diferentes materiais lignocelulósicos, incluindo bagaço de cana-de-açúcar. GHORI *et al.* (2013) obtiveram os melhores resultados para a produção de endoglicanases (0,61 UI mL⁻¹) e exoglicanases (1,094 UI mL⁻¹) em cultivo submerso de *A. niger* em palha de milho a 30°C e 96 horas. Portanto, o elevado tempo de fermentação (15 dias) do presente trabalho pode ter influenciado na baixa produção enzimática por parte do fungo *A. niger*.

O tempo de fermentação ideal deve ser o que satisfaça o crescimento dos dois micro-organismos do co-cultivo. Como estes micro-organismos produzem as enzimas de interesse em tempos diferentes de fermentação, o equilíbrio entre o tempo de inoculação e o de cultivo deve ser estudado.

Sugestões para o aumento da produção das enzimas em trabalhos futuros incluem a variação da temperatura, do tempo de fermentação, do conteúdo de umidade e da quantidade de micro-organismo inoculada (BANSAL *et al.*, 2012). A complementação do material lignocelulósico com farelos também pode aumentar a produção enzimática (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011). Para diminuir ainda mais os custos com a produção das enzimas, pode-se testar também a influência da troca do meio BSM por água ou outros meios no rendimento do processo. Diferentes granulometrias das matérias-primas podem ser testadas assim como o controle do pH, pois este é um fator determinante no crescimento e produção de enzimas pelos micro-organismos (BANSAL *et al.*, 2012). O uso das matérias-primas sem a secagem prévia em estufa também pode ser uma condição que favoreça a produção enzimática, pois segundo SANTI JUNIOR (2011) a secagem reduz o número total de poros do material e um baixo conteúdo de umidade pode ser desfavorável para o crescimento microbiano (BANSAL *et al.*, 2012).

6. CONCLUSÃO

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 1% em condições ambientes foi determinante na produção de FPases e açúcares redutores utilizando o bagaço de cana de açúcar como biomassa, sendo desfavorável o tratamento com *C. subvermispora*. Porém, para a produção de CMCase o co-cultivo apresentou os melhores resultados, dispensando o uso do pré-tratamento alcalino e assim reduzindo os custos de produção desta enzima. Já para o uso de palha de milho como biomassa, o pré-tratamento alcalino com posterior co-cultivo dos micro-organismos foi a condição que mais favoreceu a produção de FPase e de açúcares redutores. A condição que mais favoreceu a produção de CMCase também foi a ausência do pré-tratamento químico e o co-cultivo. De modo geral, a palha de milho mostrou-se como melhor substrato para a produção de celulasas e açúcares redutores quando comparado com o bagaço de cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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**. Boletim Centro de Pesquisa de Alimentos 1, vol. 8, p. 57-70, 2000.

AGUIAR, W. M. **O uso de fontes alternativas de energia como fator de desenvolvimento social para segmentos marginalizados da sociedade**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review**. Bioresource Technology, vol. 101, p. 4851–4861, 2010.

BABIČ, J.; LIKOZAR, B.; & PAVKO, A. **Optimization of ligninolytic enzyme activity and production rate with *Ceriporiopsis subvermispota* for application in bioremediation by varying submerged media composition and growth immobilization support**. International journal of molecular sciences, vol. 13, n. 9, p. 11365-11384, 2012.

BACH, C. E.; WARNOCK, D. D.; HORN, D. J. V.; WEINTRAUB, M. N.; SINSABAUGH, R. L.; ALLISON, S. D.; GERMAN, D. P. **Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: Effect of assay conditions and soil type**. Soil Biology & Biochemistry, vol. 67, p. 183-191, 2013.

BADIEI, M.; ASIM, N.; JAHIM, J. M.; SOPIAN, K. **Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass**. APCBEE Procedia, vol. 9, p. 170 – 174, 2014.

BANSAL, A.; ILLUKPITIYA, P.; TEGEGNE, F.; SINGH, S. P. **Energy efficiency of ethanol production from cellulosic feedstock**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, vol. 58, p. 141–146, 2016.

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

BARTEN, T. J. **Evaluation and prediction of corn stover biomass and composition from commercially available corn hybrids**. (Ph. D. thesis). Graduate Theses and Dissertations. Paper 13347. Iowa State University, Ames, Iowa – USA, 2013.

BHARGAV, S.; PANDA, P.; ALI, M.; JAVED, S. **Solid-state Fermentation: An Overview**. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, vol. 22, p. 49-70, 2008.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BROWN, R. C.; BROWN, T. R. **Why are we producing biofuels**. Brownia LLC, Ames, 2012.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; & GÍRIO, F. M. **Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments**. Journal of Scientific & Industrial Research, p. 849-864, 2008.

CARVALHO, W. R. **Caracterização bioquímica de endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Quim. Nova, vol. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHANTON, P. **Calibration of phenol oxidase measurement in acidic wetland environments**. Thesis (Master degree), Georgia Institute of Technology, 2014.

CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. **Determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during pretreatment of different biomass sources**. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences, p. 1168-1178, 2012.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; & SRINOPHAKUN, P. **Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 83, n. 7, p.1012-1018, 2008.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. **Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica**. Visão Acadêmica, Curitiba, vol. 9, n. 1, Jan. - Jun./2008.

CRUZ

, P. B. S. **Morfo-fisiologia da biodegradação de madeiras por *Ceriporiopsis subvermispota* (Pil.) Gilbn. & Ryv. e *Phlebia tremellosa* (Schras.:Fr.) Nakas & Burds. (Fungi, Basidiomycetes)**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

DE ANDRADE, J. B.; JUNIOR, E. F.; HENRIQUE, W.; & NOGUEIRA, J. R. **Porcentagem de grão, palha e sabugo na espiga de 20 cultivares de milho**. Boletim de Indústria Animal, Nova Odessa, vol. 53, p. 87-90, 1996.

DEI, H. K.; ROSE, S. P.; & MACKENZIE, A. M. **Effects of fungal (*Aspergillus niger* or *Ceriporiopsis subvermispota*) fermentation on the nutritive value of shea nut (*Vitellaria paradoxa*) meal for broiler chicks**. British poultry science, vol. 49, n. 3, p. 360-367, 2008.

DIEN, B. S.; BOTHAST, R. J. **A primer for lignocellulose biochemical conversion to fuel ethanol**. Industrially robust enzymes and microorganisms for production of sugars and ethanol from agricultural biomass. National Center for Agricultural Utilization Research, p. 73-93, 2009.

DUSSAN, K.J.; SILVA, D.D.V.; MORAES, E.J.C.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. **Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse**. Chemical Engineering Transactions, vol. 38, p. 433-438, 2014.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Etanol 2G depende do aprimoramento de enzimas**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1917538/etanol-2g-depender-do-aprimoramento-de-enzimas>> Acesso em 18 de maio de 2016.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; & HERNÁNDEZ, J. L. M. **Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation**. Food Technology and Biotechnology, vol. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, M. J.; HAMMEL, K. E.; MARTÍNEZ, A.T. **Lignin-degrading Peroxidases from Genome of Selective Ligninolytic Fungus *Ceriporiopsis subvermispora***. The journal of biological chemistry, vol. 287, n. 20, p. 16903–16916, 2012.

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

FLOCH, C.; ALARCON-GUTIÉRREZ, E.; CRIQUET, S. **ABTS assay of phenol oxidase activity in soil**. Journal of Microbiological Methods, vol. 71, n. 3, p. 319-324, 2007.

FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

FREITAS, G. S. **As modificações na matriz energética brasileira e as implicações para o desenvolvimento sócio-econômico e ambiental**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GALLO, M. E.; AMONETTE, R.; LAUBER, C.; SINSABAUGH, R. L.; & ZAK, D. R. **Short-term changes in oxidative enzyme activity and microbial community structure in nitrogen-amended north temperate forest soils**. Microbial Ecology, vol. 48, p. 218-229, 2004.

- GHORI, M. I.; AHMED, S.; MALANA, M. A.; JAMIL, A. **Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567**. African Journal of Biotechnology, vol. 10, n. 31, p. 5878-5886, 2013.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. Pure and applied Chemistry, vol. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GOMEZ, R. J. H. C. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. **Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse**. Biochemical Engineering Journal, vol. 51, p. 72-78, 2010.
- GUERRA, A. A. **Biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*: caracterização dos polímeros**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; MACEDO, G. R. **Evaluation of composition characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol. 32, n. 1, p. 23-33, 2015.
- GUPTE, A.; & MADAMWAR, D. **Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and β -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus***. Biotechnology progress, vol. 13, n. 2, p. 166-169, 1997.
- HARMSSEN, P. F. H.; HUIJGEN, W. J. J.; BERMÚDEZ LÓPEZ, L. M.; BAKKER, R. R. C. **Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass**. Energy research centre of the Netherlands, 2010.
- HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WÖSTEN, H. A. B.; GU, J. D.; & DE VRIES, R. P. **Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi**. International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 65, n. 1, p. 248-252, 2011.
- JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; & PASZCZYNSKI, A. J. **Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation**. Enzyme and Microbial technology, vol. 52, n. 1, p. 1-12, 2013.
- JÄRVINEN, J.; TASKILA, S.; ISOMÄKI, R.; OJAMO, H. **Screening of white-rot fungi manganese peroxidases: a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers**. AMB Express, 2012.

KAUSHAL, R.; SHARMA, N.; & TANDON, D. **Cellulase and xylanase production by co-culture of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* utilizing forest waste**. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, vol. 37, n. 1, p. 35–41, 2012.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. **Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery**. India: SPRINGER, 2013.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; & STROEVE, P. **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production**. Industrial & Engineering Chemistry Research, vol. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; & ALCALDE, M. **Laccases and their applications: a patent review**. Recent patents on biotechnology, vol. 2, n. 1, p. 10-24, 2008.

KUNAMNENI, A.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J.; & ALCALDE, M. **Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications**. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.), 2007.

LA SOCIEDAD DE CIENCIAS ARANZADI. **Galería fotográfica – *Ceriporiopsis subvermispora***. Disponível em: Disponível: <http://www.aranzadi.eus/fileadmin/images/micologia/Eskaneatuak/11_digital/Ceriporiopsis_subvermispora_jmr_110315.jpg>. Acesso em 2 de junho de 2016.

LAL B.; SARMA P. M. **Wealth from Waste Trends and Technologies**. Third edition. India: The Energy and Resources Institute, 2011.

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

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Milho**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>> Acesso em 18 de maio de 2016

MARQUES, N. P. **Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MBBS MEDICINE - HUMANITY FIRST. **Microscopic morphology of *Aspergillus***. Disponível em: <<http://medicinembbs.blogspot.com.br/2013/02/microscopic-morphology-of-aspergillus.html>>. Acesso em 2 de junho de 2016.

- MENDES, A. A. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora***. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.
- MENKES, M. **Eficiência energética, políticas públicas e sustentabilidade**. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- MTUI, G. Y. **Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products**. African Journal of Biotechnology, vol. 8, n. 8, 2009.
- NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- NEE'NIGAM, P. S.; & PANDEY, A. **Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues**. In Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Springer Netherland. p. 197-221, 2009.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; & BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª Edição. Bookman, 2010.
- PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. **Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras**. Quím. Nova, vol. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.
- PAES, M. C. D.; TEIXEIRA, F. F.; MARTINS, I. S. **Composição química da palha de milho com qualidade para artesanato**. Embrapa Milho e Sorgo, 2008.
- PEREIRA, P. H. F.; VOORWALD, H. C. J.; CIOFFI, M. O. H.; MULINARI, D. R.; LUZ, S. M.; SILVA, M. L. C. P. **Sugarcane bagasse Pulping and Bleaching: Thermal and Chemical characterization**. BioResources, vol. 6, n. 3, p. 2471-2482, 2011.
- PERLACK, R. D.; WRIGHT, L. L.; TURHOLLOW, A. F.; GRAHAM, R. L. **Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply**. U.S. Department of Energy e U.S. Department of Agriculture, 2005. Disponível em: <https://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/final_billionton_vision_report2.pdf> Acesso em 25 de abril de 2016.
- RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- RABELO, S. C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. **Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept**. Bioresource Technology, vol. 102, p. 7887-7895, 2011.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. **Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility**. *Biotechnology for Biofuels* 2011, p. 4-54, 2011.

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

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, vol. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

RODRIGUEZ, O. M. D. **Otimização da produção de celulases a partir de substratos alternativos**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

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: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Unicamp, 2005.

SANTI JUNIOR, C. **Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

SHARMA, N.; KAUSHAL, R.; GUPTA, R., KUMAR, S. **A biodegradation study of forest biomass by *Aspergillus niger* F7: Correlation between enzymatic activity, hydrolytic percentage and biodegradation index**. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 467-475, 2012.

SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. **Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications**. *Enzyme Research*, 2011.

SHRESTHA, U. T. **Microbial Association – Microbial Interaction**. 2009. Disponível em: <<http://upendrats.blogspot.com.br/2009/08/microbial-association-microbial.html>> Acesso em: 09 de maio de 2016.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. **Soli-state Fermentation for the production of Poly(hydroxyalkanoates)**. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol. 29, p. 173-181, 2015.

SINGH, R.; KUMAR, R. BISHNOI, K.; BISHNOI, N. R. **Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology.** Biochemical Engineering Journal, vol. 48, p. 28–35, 2009.

SRIARIYANUN, M.; TANTAYOTAI, P.; YASURINC, P.; PORNWONGTHONG, P.; CHEENKACHORN, K. **Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus sp.* isolated from rice paddy field soil.** Electronic Journal of Biotechnology, vol. 19, p. 23–28, 2016.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. **Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study.** International Journal of Science and Nature. vol. 3. p. 480-486, 2012.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review.** International Journal of Molecular Sciences, vol. 9, p. 1621-1651, 2008.

TANAKA, H.; KOIKE, K.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. **Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*.** Enzyme and Microbial Technology, vol. 45, n. 5, p. 384-390, 2009.

THURSTON, C. F. **The structure and function of fungal laccases.** Microbiology, vol. 140, p. 19-26, 1994.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar). **Números finais da safra 2014/2015 e iniciais da nova safra 2015/2016.** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/27460993920325965467/numeros-finais-da-safra-2014-por-cento2F2015-e-iniciais-da-novasafr-a-2015-por-cento2F2016/>>. Acesso em 17 de maio de 2016.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar). **Usina pioneira de etanol celulósico coloca Brasil entre líderes globais no uso da nova tecnologias.** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/>>. Acesso em 17 de maio de 2016.

UREK, R. O.; PAZARLIOGLU, N. K. **Enhanced Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*.** Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 50, n. 6, p. 913-920, 2007.

VALADARES, F. L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico.** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e**