

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES - URI CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO USANDO *Trichoderma reesei* NRRL 3652 EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

VIVIANE ASTOLFI

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito final à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

NOVEMBRO DE 2014

**PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASE POR FERMENTAÇÃO EM
ESTADO SÓLIDO USANDO *Trichoderma reesei* NRRL 3652 EM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

Viviane Astolfi

Tese de Doutorado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D. Sc.
(Orientadora)

Elisandra Rigo, D. Sc.
(Orientadora)

Marco Di Luccio, D. Sc.
(Orientador)

Luciane Maria Colla, D. Sc.
(UPF - Passo Fundo)

Leandro Galon, D. Sc.
(UFFS - Erechim)

Rogério Luis Cansian, D. Sc.
(URI - Erechim)

Marcelo Luis Mignoni, D. Sc.
(URI - Erechim)

Erechim, 28 de Novembro de 2014.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

Dedico esta conquista

*a Rubens, uma pessoa especial na minha vida
e a minha família, por acreditar na realização dos meus ideais.*

Obrigada por sempre estarem ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Rubens por todo seu amor, amizade, incentivo e compreensão de cada dia e por todas as alegrias ao longo destes últimos anos.

A Angela, minha irmã do coração. Obrigada pela disponibilidade em me ajudar sempre como irmã, compartilhando os momentos diários ou mesmo como bolsista, no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial meus pais Cezer e Saete e meu irmão Julio.

Aos meus Professores orientadores: Elisandra, Helen e Marco pela oportunidade e por compartilharem de seus conhecimentos, incentivarem e nortearem a realização deste trabalho.

Aos Professores, colegas e amigos do Curso de Mestrado Doutorado em Engenharia de Alimentos da URI Campus de Erechim, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelas experiências compartilhadas em especial, Simone Michelin, Cindy e Cláudia.

Aos funcionários da Central de Materiais, em especial Rose e Vera por me ajudarem sempre que necessário.

A URI – Campus de Erechim e ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

A CAPES, órgão financiador deste projeto, e que possibilitou a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo da Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Produção de celulases e hemicelulase por fermentação em estado sólido usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais

Viviane Astolfi

Orientadores: Helen Treichel; Elisandra Rigo e Marco Di Luccio

Celulases e hemicelulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais lignocelulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis, despertando grande interesse na produção de bioetanol de segunda geração além de serem amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria. Neste trabalho propôs-se como objetivo geral a produção e caracterização de enzimas lignocelulíticas obtidas por fermentação em estado sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais. Inicialmente, caracterizou-se parcialmente a enzima comercial celulase NS 50013, sendo a atividade de FPase máxima obtida em intervalos de temperatura e pH de 40-50 °C e 5,2-5,5, respectivamente. A enzima FPase após 150 horas de reação nas temperaturas de 30-40 °C apresentou somente 15% de perda na atividade e foi estável em pH 5,0 e 5,5. A celulase NS 50013 apresentou resultados satisfatórios quando usada para hidrolisar substratos agroindustriais, uma vez que foi observado desempenho semelhante sobre a hidrólise de papel de filtro e outros substratos. Após, avaliou-se a produção de enzimas lignocelulíticas por FES em diferentes resíduos agroindustriais. Entre os substratos testados, a casca de soja foi o substrato mais adequado para a produção de FPase (6,71 U.g⁻¹) e xilanase (1130,70 U.g⁻¹). Já a maior produção de CMCase (20,77 U.g⁻¹) foi observada usando o substrato misto de casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1). Assim, realizou-se a caracterização parcial do extrato enzimático bruto produzido em casca de soja, sendo o pH e temperatura ótimos obtidos, na faixa de 40-55 °C e 3,0-6,0 para FPase, e 55 °C e 4,6, para CMCase e xilanase, respectivamente. Esta etapa é de extrema importância para estabelecer em quais condições de processo o uso da enzima poderá propiciar melhores resultados técnicos e econômicos para processos biotecnológicos. Neste estudo, foi também investigado a sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais, utilizando-se o extrato bruto enzimático obtido da FES com a finalidade da obtenção de açúcares fermentescíveis. O maior rendimento de açúcares redutores catalisado pelas enzimas presentes no extrato enzimático bruto foi obtido em casca de soja. No entanto, este valor poderá ser melhorado com o estudo de diferentes tipos de pré-tratamentos. A produção de enzimas e o seu consequente uso no processo de produção de etanol de segunda geração a partir de diferentes tipos de resíduos agrícolas são estratégias que agregariam valor a este subproduto, diminuiriam a expansão do uso de terras assim como, consequentes impactos ambientais. Para tanto, novos avanços para estes processos devem ser alcançados para torná-los mais eficazes, além de uma realidade sustentável.

Palavras-chave: Produção de celulases e xilanase, *Trichoderma reesei* NRRL 3652, resíduos agroindustriais.

Abstract of Thesis Presented to the Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor in Food Engineering.

Production of cellulase and hemicellulase by solid state fermentation using *Trichoderma reesei* NRRL 3652 in agro-industrial waste

Viviane Astolfi

Advisors: Helen Treichel; Elisandra Rigo e Marco Di Luccio

Cellulases and hemicellulases are enzymes that form a complex able of acting on lignocellulosic materials, promoting your hydrolysis. These enzymes act in synergy to release fermentable sugars, causing great interest in the production of second generation bioethanol and are widely used in various branches of industry. This work had as main objective the production and characterization of lignocelulíticas enzymes produced by solid state fermentation (SSF) using *Trichoderma reesei* NRRL 3652 in agro-industrial waste. Initially, was partially characterized the commercial enzyme cellulase NS 50013 being the maximum FPase activity obtained at ranges pH and temperature 40-50 °C and 5.2-5.5, respectively. The FPase enzyme after 150 hours of reaction at temperatures of 30-40 °C showed only 15% of loss of activity and was stable in pH 5.0 and 5.5. The cellulase NS 50013 showed satisfactory results when used to hydrolyse agroindustrial substrates, since similar performance was observed on the filter paper and other substrates by hydrolysis. Next, we evaluated the production of enzymes lignocellulolytic by SSF in different agro-industrial residues. Among the substrates tested, the soybean hulls was the most suitable substrate for the production of FPase (6.71 Ug^{-1}) and xylanase (1130.70 Ug^{-1}). Already the largest production of CMCase (20.77 Ug^{-1}) was observed using the mixed substrate soybean hulls and powder toothpick yerba mate (1:1). Then, was studied the partial characterization of crude enzymatic extract produced in soybean hulls. The optimal pH and temperature was obtained in the range of 40-55 °C and 3.0-6.0 to FPase, and 55 °C and 4.6 to CMCase and xylanase respectively. This step is extremely important to establish in which process conditions using the enzyme could provide better technical and economic results for biotechnological processes. This study also investigated the saccharification of different agro-industrial wastes, using the crude enzymatic extract obtained from the SSF for the purpose of obtaining fermentable sugars. The highest yield of reducing sugars catalyzed by enzymes present in the crude enzyme extract was obtained in soybean hulls. However, this value can be improved by studying different types of pre-treatments. The production of enzymes and their subsequent use in the second generation ethanol production process from different kinds of agricultural residues are strategies that add value to this byproduct decrease the expansion of the land usage as well as the consequent environmental impact. Therefore, new developments for this process should be achieved to make it more effective and a sustainable reality.

Keywords: Production of cellulase and xylanase, *Trichoderma reesei* NRRL 3652, agro-industrial residues.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE TABELAS..... | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES..... | xvi |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 Estrutura da parede celular vegetal..... | 6 |
| 2.1.1 Celulose | 7 |
| 2.1.2 Hemicelulose | 8 |
| 2.1.3 Lignina..... | 9 |
| 2.2 Modo de ação e sinergismo das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal..... | 9 |
| 2.2.1 Enzimas Celulolíticas | 9 |
| 2.2.2 Enzimas Xilanolíticas | 15 |
| 2.3 Bioprodução de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fermentação em estado sólido (FES) | 17 |
| 2.3.1 Substratos empregados em FES | 18 |
| 2.3.1.1 Bagaço de cana | 19 |
| 2.3.1.2 Casca de arroz..... | 20 |
| 2.3.1.3 Casca de soja | 21 |
| 2.3.2 Bioprodução de celulase e xilanase | 22 |
| 2.4 Aspectos importantes relacionados a enzimas lignocelulíticas..... | 26 |
| 2.5 Bioconversão e aspectos biotecnológicos da degradação de materiais lignocelulósicos | 29 |
| 2.5.1. Pré-tratamento | 30 |
| 2.5.2. Hidrólise | 31 |
| 2.5.3. Fermentação..... | 31 |
| 2.6 Considerações finais | 33 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 Caracterização parcial do complexo celulolítico comercial NS 50013..... | 36 |
| 3.1.1 Temperatura e pH ótimos sobre a atividade da celulase | 36 |
| 3.1.2 Determinação da energia de ativação da enzima..... | 37 |
| 3.1.3 Inativação térmica da celulase | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.4 Efeito do pH na estabilidade da enzima | 38 |
| 3.1.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten..... | 39 |
| 3.1.6 Atividade de hidrólise em papel de filtro (FPase) | 40 |
| 3.2 Produção de celulases e hemicelulases por Fermentação em Estado Sólido (FES) | |
| usando <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 em resíduos agroindustriais | 40 |
| 3.2.1 Micro-organismo e preparo do inóculo | 40 |
| 3.2.2 Obtenção dos substratos | 40 |
| 3.2.3 Análise elementar | 41 |
| 3.2.4 Avaliação cinética para a produção de celulases e hemicelulase em diferentes substratos..... | 42 |
| 3.2.5 Processo de extração das enzimas FPase, carboximetilcelulase (CMCase) e xilanase | 42 |
| 3.2.6 Determinação da atividade de FPase | 42 |
| 3.2.7 Determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase)..... | 44 |
| 3.2.8 Determinação da atividade de xilanase | 45 |
| 3.3 Caracterização parcial de celulases e xilanase obtidas por Fermentação em Estado | |
| Sólido (FES) usando <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 em casca de soja | 46 |
| 3.3.1 Temperatura e pH ótimos sobre a atividade de FPase, CMCase e xilanase de <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 fermentado em casca de soja..... | 46 |
| 3.3.2 Efeito da estabilidade térmica de FPase, CMCase e xilanase de <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 fermentado em casca de soja | 47 |
| 3.3.3 Efeito do pH na estabilidade de FPase, CMCase e xilanase de <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 fermentado em casca de soja | 47 |
| 3.3.4 Efeito da estabilidade a baixas temperaturas de FPase, CMCase e xilanase de <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 fermentado em casca de soja..... | 47 |
| 3.3.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten..... | 48 |
| 3.4 Sacarificação de biomassa..... | 48 |
| 3.4.1 Quantificação dos açúcares redutores (AR) | 49 |
| 3.4.2 Determinação da concentração de glicose..... | 49 |
| 3.5 Análise estatística..... | 50 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4.1 Caracterização parcial da celulase NS 50013..... | 52 |
| 4.1.1 Temperatura e pH ótimo sobre a atividade da celulase | 52 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.1.2 | Determinação da energia de ativação para a celulase NS 50013 | 57 |
| 4.1.3 | Temoestabilidade para a celulase NS 50013 | 58 |
| 4.1.4 | Inflência do pH no estudo da estabilidade da celulase NS 50013 | 60 |
| 4.1.5 | Efeito do substrato sobre os parâmetros de Michaelis-Menten | 61 |
| 4.2 | Produção de celulases e hemicelulases por Fermentação em Estado Sólido (FES) usando <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 em resíduos agroindustriais | 64 |
| 4.2.1 | Atividade para FPase | 65 |
| 4.2.2 | Atividade para CMCCase..... | 67 |
| 4.2.3 | Atividade para xilanase | 68 |
| 4.3 | Caracterização parcial de celulases e hemicelulase obtidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) usando <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652 em casca de soja | 70 |
| 4.3.1 | Efeito da temperatura e do pH na atividade de FPase, CMCCase e xilanase | 70 |
| 4.3.2 | Efeito da estabilidade térmica de FPase, CMCCase e xilanase | 75 |
| 4.3.3 | Efeito do pH na estabilidade de FPase, CMCCase e xilanase | 77 |
| 4.3.4 | Efeito da estabilidade de FPase, CMCCase e xilanase a baixas temperaturas..... | 79 |
| 4.3.5 | Determinação das constantes de Michaelis-Menten..... | 80 |
| 4.4 | Sacarificação de biomassa..... | 83 |
| | CONCLUSÕES..... | 86 |
| | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 89 |
| | REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS | 91 |
| | ANEXOS | 112 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico..... | 6 |
| Figura 2: Disposição das microfibrilas formando as regiões cristalinas e regiões amorfas da fibra celulósica. | 7 |
| Figura 3: Mecanismo de ação das celulases sobre cadeias de celulose. A celulose original possui tanto a parte cristalina quanto a parte amorfa. | 10 |
| Figura 4: Ensaio para celulase: (1) atividade de celulase total, (2) atividade individual, incluindo endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, (3) novos ensaios com facilidade de operação e alta reprodutibilidade. | 12 |
| Figura 5: Estrutura da xilana e os sítios de ataque por enzimas xilanolíticas. | 16 |
| Figura 6: Esquema para a conversão de biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração, incluindo os principais passos..... | 30 |
| Figura 7: Efeitos dos parâmetros do modelo que representa a atividade da celulase NS 50013 obtidos no primeiro DCCR usando tampão acetato de sódio..... | 53 |
| Figura 8: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) indicando a influência da temperatura e pH na atividade enzimática da celulase NS 50013 obtidos no DCCR usando tampão acetato de sódio. | 54 |
| Figura 9: Efeitos dos parâmetros do modelo que representa a atividade da celulase NS 50013 obtida no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio. | 56 |
| Figura 10: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) indicando a influência da temperatura e pH na atividade da celulase NS 50013 obtidos no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio..... | 56 |
| Figura 11: (a) Influência da temperatura sobre a atividade enzimática da celulase NS 50013; (b) Determinação da energia de ativação baseada na linearização da equação de Arrhenius para uma faixa de temperatura de 30 - 50 °C..... | 57 |
| Figura 12: Influência da temperatura sobre a estabilidade da celulase NS 50013. | 58 |
| Figura 13: Determinação da energia de desativação baseada na linearização da equação de Arrhenius para uma faixa de temperatura de 30 a 70 °C. | 60 |
| Figura 14: Influência do pH nos experimentos de avaliação cinética para atividade da celulase NS 50013. | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 15: Influência da concentração de substrato na atividade enzimática. O eixo y da esquerda refere-se à atividade obtida para papel filtro; o eixo y da direita refere-se à atividade obtida para os demais substratos..... | 62 |
| Figura 16: Perfil cinético para a produção de FPase usando bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) como substrato em FES. | 66 |
| Figura 17: Perfil cinético para a produção de CMCCase usando bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) como substrato em FES. | 67 |
| Figura 18: Perfil cinético para a produção de xilanase usando bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) como substrato em FES. | 68 |
| Figura 19: Superfícies de resposta e curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na: a) atividade de FPase; b) atividade de CMCCase; c) atividade de xilanase, obtidas do extrato enzimático da FES em casca de soja. | 74 |
| Figura 20: Influência da temperatura na estabilidade de FPase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja..... | 76 |
| Figura 21: Influência da temperatura na estabilidade de CMCCase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja. | 76 |
| Figura 22: Influência da temperatura na estabilidade de xilanase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja. | 77 |
| Figura 23: Influência do pH na estabilidade de FPase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja. | 78 |
| Figura 24: Influência do pH na estabilidade de CMCCase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja. | 78 |
| Figura 25: Influência do pH na estabilidade de xilanase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja. | 78 |
| Figura 26: Influência de baixas temperaturas sobre a estabilidade de FPase..... | 79 |
| Figura 27: Influência de baixas temperaturas sobre a estabilidade de CMCCase. | 80 |
| Figura 28: Influência de baixas temperaturas sobre a estabilidade de xilanase. | 80 |
| Figura 29: Velocidade da reação de FPase em função de diferentes concentrações de celulose (papel filtro)..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| Figura 30: Velocidade da reação de CMCase em função de diferentes concentrações de carboximetilcelulose..... | 81 |
| Figura 31: Velocidade da reação de xilanase em função de diferentes concentrações de xilana. | 81 |
| Figura 32: Perfil da produção de açúcares redutores na sacarificação de resíduos agroindustriais usando extrato bruto enzimático produzido por <i>T. reesei</i> NRRL 3652 em casca de soja. | 83 |
| Figura 33: Perfil da produção de glicose na sacarificação de resíduos agroindustriais usando extrato bruto enzimático produzido por <i>T. reesei</i> NRRL 3652 em casca de soja..... | 84 |
| Figura 34: Representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de FPase em relação à concentração de celulose (papel filtro) para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ | 113 |
| Figura 35: Representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de CMCase em relação à concentração de carboximetilcelulose para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ | 113 |
| Figura 36: Representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de xilanase em relação à concentração de xilana para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ | 113 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Diferenças entre celulose e hemicelulose..... | 7 |
| Tabela 2: Composição química parcial dos resíduos lignocelulósicos em estudo relatados na literatura..... | 19 |
| Tabela 3: Substrato, forma de cultivo e micro-organismos que produzem diferentes enzimas lignocelulolíticas. | 24 |
| Tabela 4: Quantidade de resíduos agrícolas (milhões de toneladas) com possibilidade de aplicação para produção de bioetanol. | 27 |
| Tabela 5: Celulases comerciais microbianas produzidas por diferentes empresas. | 29 |
| Tabela 6: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização da atividade nos dois delineamentos experimentais (DCCRs). | 36 |
| Tabela 7: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das atividades no delineamento experimental (DCCR). | 47 |
| Tabela 8: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática da celulase NS 50013 em função do pH e temperatura usando tampão acetato de sódio. | 52 |
| Tabela 9: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática da celulase NS 50013 em função do pH e da temperatura usando tampão fosfato de sódio. | 55 |
| Tabela 10: Efeito da temperatura na inativação e tempo de redução constante e decimais obtidos durante a avaliação da termoestabilidade da celulase NS 50013. | 58 |
| Tabela 11: Efeito dos diferentes tipos de substratos para os parâmetros de Michaelis-Menten para celulase NS 50013. | 62 |
| Tabela 12: Caracterização dos resíduos agroindustriais usados na produção de enzimas lignocelulolíticas. | 64 |
| Tabela 13: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos das atividades enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase em função do pH e temperatura obtidas do extrato enzimático da FES em casca de soja. | 71 |
| Tabela 14: Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade de FPase em função da temperatura e pH ótimos. ... | 71 |

| | |
|---|----|
| Tabela 15: Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade de CMCase em função da temperatura e pH ótimos. | 71 |
| Tabela 16: Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade de xilanase em função da temperatura e pH ótimos. | 72 |
| Tabela 17: Análise de variância para a atividade de FPase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos..... | 73 |
| Tabela 18: Análise de variância para a atividade de CMCase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos..... | 73 |
| Tabela 19: Análise de variância para a atividade de xilanase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos..... | 73 |
| Tabela 20: Valores de temperatura e pH ótimos para celulases e xilanase obtidas por diferentes micro-organismos, substratos e formas de cultivo referentes a trabalhos publicados na literatura nos últimos anos..... | 75 |
| Tabela 21: Valores de K_m e $V_{máx}$ obtidos para FPase, CMCase e xilanase em comparação com os publicados em trabalhos nos últimos anos..... | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | | | |
|-----------------|--|-------------------|---|
| DNS | Ácido dinitrosalicílico | °C | Graus Celsius |
| AR | Açúcar Redutor | HPLC | High Performance/Pressure Liquide Chromatography |
| ARS | Agricultural Research Service | IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| α | Alfa | L | Litro |
| BC | Bagaço de Cana | m/v | Massa por Volume |
| β | Beta | μ | Micro |
| BioPC | Bioprocessamento Consolidado | mg | Miligramas |
| CMCase | Carboximetilcelulase | mL | Mililitro |
| CMC | Carboximetilcelulose | mm | Milímetro |
| CA | Casca de Arroz | mmol | Milimol |
| CS | Casca de Soja | min | Minutos |
| cm | Centímetro | NRRL | Northern Regional Research Laboratory |
| cm ³ | Centímetro cúbico | <i>p</i> NPG | <i>p</i> -nitrofenil- β -glicosídeo |
| R ² | Coefficiente de correlação | ppm | Partes por milhão |
| K _m | Constante de Michaelis-Menten | % | Percentual |
| EG | Endoglucanase | PPE | Pó do Palito de Erva mate |
| E.C. | Enzyme Comission | pH | Potencial Hidrogeniônico |
| FES | Fermentação em Estado Sólido | rpm | Rotações por minuto |
| FS | Fermentação Submersa | SFS | Sacarificação e fermentação simultaneamente |
| FPase | Filter Paper Activity | T | Temperatura |
| FPU | Filter Paper Units | U | Unidades de atividade enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) |
| GOD- POD | Glicose Oxidase/Peroxidase | F _{tab.} | Valor de F |
| HFS | Hidrólise e fermentação em separado | V _{máx} | Velocidade máxima |
| g | Gramas | v/v | Volume por volume |

O processo de produção de etanol de primeira geração é baseado na fermentação de açúcares simples ou amido. As usinas de etanol à base de açúcares simples obtido do caldo de cana são predominantes do Brasil. O etanol à base de amido é obtido geralmente a partir do milho, e é dominado pelos Estados Unidos da América, seguido por outros grandes países produtores de etanol, como a China, Canadá, França, Alemanha e Suécia. No mercado global, cerca de 21 milhões m³ de etanol são produzidos a partir da cana-de-açúcar, enquanto que cerca de 60 milhões m³ de etanol são produzidos a partir de milho (REN21, 2012).

No entanto, o etanol produzido a partir de vegetais utilizados para alimentação humana e animal não teria como responder positivamente à crescente demanda por biocombustíveis considerando as questões de sustentabilidade (PERLACK et al., 2005). Desta forma, existe um grande interesse na disseminação de tecnologias que utilizam recursos renováveis como matérias primas para produção de combustíveis e outros compostos de interesse econômico. Assim, estão sendo cada vez mais pesquisados métodos que utilizam resíduos agrícolas, ou seja, biomassa lignocelulósica como fonte de baixo valor agregado para utilização na bioprodução de combustíveis e produtos químicos, com vantagens econômicas, ambientais e estratégicas (WYK, 2001).

A hidrólise total dos polissacarídeos lignocelulósicos (celulose e hemicelulose) com ácidos diluídos é uma alternativa existente, contudo considerada problemática em termos de degradação de açúcares. Já a hidrólise com ácidos concentrados, permite a obtenção de rendimentos de sacarificação próximos ao teórico, no entanto implica em custos e riscos elevados (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Assim, a proposta da utilização de processos de hidrólise enzimática surge como uma estratégia promissora para facilitar a sacarificação de resíduos lignocelulósicos, como uma rota concorrente, ou seja, aplicação de biocatalisadores específicos e biodegradáveis que operam sob condições amenas de pH, temperatura e pressão (ZHANG et al., 2006; LIU et al., 2011a).

Neste sentido, alguns micro-organismos são indicados como possíveis sintetizadores de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, as quais seriam utilizadas na produção de monossacarídeos a partir de diferentes resíduos agroindustriais, aumentando assim as expectativas de responder as necessidades do mercado em termos de produção de biocombustíveis. Alguns fungos tais como, *Trichoderma reesei* (KNOB et al., 2010; GUOWEIA et al., 2011; ZHANG et al., 2012), *Trichoderma harzianum* (DELABONA et

al., 2012), *Trichoderma asperellum* (RAGHUWANSHI et al., 2014); *Aspergillus niger* (NCUBE et al., 2012), *Aspergillus terreus* (NARRA et al., 2014), *Termitomyces clypeatus* (PAL et al., 2013), *Sporotrichum thermophile* (SADAF e KHARE, 2014) entre outros são avaliados como promissores para produção destas enzimas.

As celulasas e hemicelulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais lignocelulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares fermentescíveis, despertando interesse industrial para produção de bioetanol de segunda geração em larga escala (LYND et al., 2002; TOLAN, 2002; YOO et al., 2011; BOLUDA-AGUILAR e LÓPEZ-GÓMEZ 2013).

Além disso, as celulasas e hemicelulasas são enzimas amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria. Na indústria de alimentos, celulasas são utilizadas em processos de maceração, geralmente em conjunto com hemicelulasas e pectinases, como na extração de suco de frutas e óleo de sementes; já na indústria têxtil e lavanderia, as celulasas são utilizadas para a remoção do excesso de corantes em tecidos *jeans*, processo denominado bioestonagem; na indústria de polpa de celulose e papel, é realizado o refino da mesma, melhorando a qualidade da polpa (ORBERG, 1981; CAVACO-PAULO et al., 1998; BHAT, 2000). Na área de alimentação animal, são comercializadas como componentes aceleradores do processo de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose (BHAT, 2000; MOREIRA et al., 2009).

Assim, os avanços das pesquisas a respeito da produção de celulasas e hemicelulasas ocorrem em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos, e até os dias de hoje, contribuições científicas vêm sendo geradas continuamente, no que tange ao isolamento de micro-organismos e produção de enzimas lignocelulíticas, ao aumento da expressão destas enzimas por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes destes complexos enzimáticos, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose e a hemicelulose, e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (BHAT e BHAT, 1997). Neste sentido, a produção de celulasas e hemicelulasas podem vir a contribuir para o desenvolvimento de rotas auxiliares de obtenção dos açúcares fermentescíveis com uso de enzimas obtidas por bioprodução em resíduos agrícolas, em condições que resultem em biocatalisador de alto rendimento, estabilidade,

especificidade e de baixo custo de produção, para aplicação na hidrólise dos compostos lignocelulósicos.

Com base nestes aspectos, o principal objetivo deste trabalho foi a produção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais, pelo desenvolvimento das seguintes etapas:

1. Caracterizar parcialmente a celulase comercial NS 50013 usando a metodologia de dosagem da atividade de celulase total em papel de filtro (FPA – Filter Paper Activity), bem como determinar os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten;
2. Avaliar a produção de FPase, carboximetilcelulase e xilanase através da FES utilizando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 entre diferentes resíduos agroindustriais;
3. Caracterizar parcialmente o extrato enzimático bruto obtido do substrato selecionado com maior potencialidade produtiva de FPase, carboximetilcelulase e xilanase analisando as variáveis investigadas para a enzima comercial;
4. Avaliar o processo de hidrólise enzimática de diferentes resíduos agroindustriais utilizando o extrato bruto celulolítico otimizado obtido da FES.

Como forma de apresentação, o presente trabalho está dividido em capítulos. O Capítulo 1 apresenta a introdução do trabalho, os objetivos e as etapas envolvidas no desenvolvimento desta tese. O Capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura sobre os principais assuntos abordados. O Capítulo 3 apresenta os materiais e metodologias empregadas para o desenvolvimento de todas as etapas do trabalho. No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados para a caracterização parcial da celulase comercial NS 50013, produção de celulases e hemicelulase por FES usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais, a caracterização parcial de celulases e xilanase obtidas por FES em casca de soja e por último a sacarificação de biomassa. Os Capítulos 5, 6, 7 e 8 apresentam as conclusões obtidas com a realização deste trabalho juntamente com as sugestões para trabalhos futuros, referências bibliográficas e anexos, respectivamente.

CAPÍTULO 2

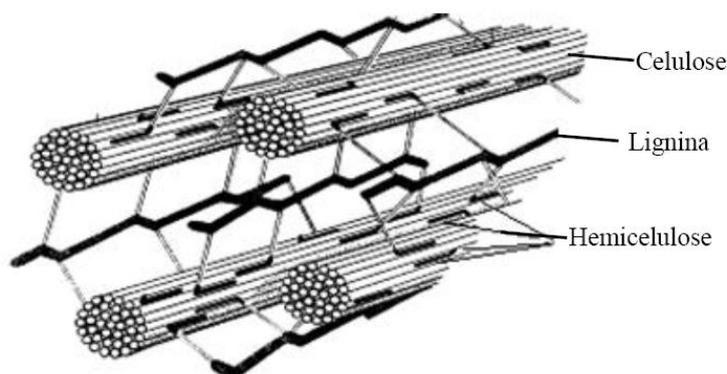
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo serão apresentados temas como o modo de ação, a importância e aplicação das celulases e hemicelulases, principalmente na área energética, pela bioconversão de resíduos lignocelulósicos para produção de biocombustíveis de segunda geração. Também se descreve brevemente os principais métodos e algumas abordagens inovadoras para a determinação de celulases. Além disso, são apresentados aspectos importantes de fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como substratos lignocelulósicos, já que estes são considerados recursos renováveis e/ou produtos secundários.

2.1 Estrutura da parede celular vegetal

Em média, anualmente são produzidos 200 bilhões de toneladas de biomassa, através do fenômeno da fotossíntese, dos quais somente 3 a 4% são usados pelo homem, para fins alimentares ou não alimentares (BOTELLA et al., 2009). A parede de células vegetais é uma fonte de materiais lignocelulósicos (biomassa), cuja estrutura é representada principalmente pela interação físico-química de celulose (um polímero de glicose linear) com hemicelulose (um heteropolímero altamente ramificado de xilose, manose, galactose, arabinose, glucose e vários tipos de ácidos urônicos) e lignina (com uma elevada massa molar, formada pela polimerização dos alcoóis cumarílico) (Figura 1). Dependendo da classificação do açúcar que predomina, as hemiceluloses são referidas como xilanas, mananas ou galactanas (ANDREAUS et al., 2008).

Figura 1: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.



Fonte: Kvien et al. (2005).

A Tabela 1 apresenta as principais características dos polissacarídeos, componentes de materiais lignocelulósicos dos vegetais. O entendimento destas características é de importância fundamental para a definição das estratégias de aproveitamento das referidas biomassas como matéria-prima para a produção de etanol e outras substâncias químicas.

Tabela 1: Diferenças entre celulose e hemicelulose.

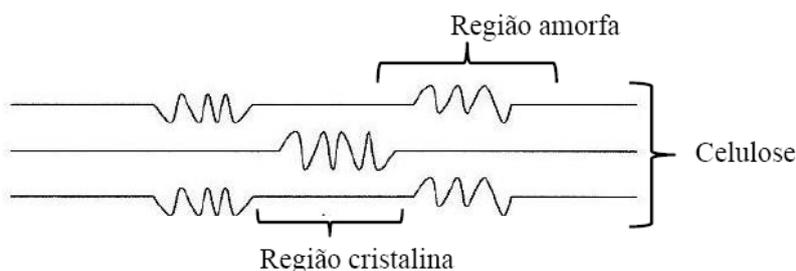
| Celulose | Hemicelulose |
|--|--|
| - Consiste em unidades de glicose ligadas entre si | - Consiste em várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si |
| - Alto grau de polimerização (1000 a 15000) | - Baixo grau de polimerização (50 a 300) |
| - Forma arranjo fibroso | - Não forma arranjo fibroso |
| - Apresenta regiões cristalinas e amorfas | - Apresentam somente regiões amorfas |
| - É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente | - São atacadas rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente |
| - É insolúvel em álcalis | - São solúveis em álcalis |

Fonte: Bon et al. (2008).

2.1.1 Celulose

A celulose é um homo-polissacarídeo linear composto por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo o principal componente da parede celular vegetal. Apresenta mais de 10.000 resíduos de β -glicose anidra. As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões distintas, a cristalina, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por pontes de hidrogênio e força de van der Waals, e a amorfa, menos ordenada e mais susceptível à hidrólise, mecanismo apresentado na Figura 2 (GRAY et al., 2006).

Figura 2: Disposição das microfibrilas formando as regiões cristalinas e regiões amorfas da fibra celulósica.



Fonte: Kvien et al. (2005).

A celulose é resistente ao processo de hidrólise devido às longas cadeias de glicose, com mais de 7 μm , unidas por lignina formando micelas, combinadas de modo a formar microfibrilas com diâmetro entre 4-10 nm, visíveis em eletromicrografias. O conjunto de microfibrilas é denominado de macrofibrilas, aos quais são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina, formando os materiais lignocelulósicos (CARLILE et al., 2002).

A decomposição da celulose a princípio depende da habilidade das enzimas, responsáveis em penetrar entre as cadeias adjacentes da fibra. O ataque às fibras de celulose é realizado pelos micro-organismos celulolíticos por intermédio das celulases, que agem em sítios onde a estrutura do substrato é mais acessível, ou seja, onde a fibra perdeu seu aspecto reticulado (cristalino), em proveito de um aspecto mais frouxo e amorfo (BAYER e LAMED, 1992).

2.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos não celulósicos que são encontrados em tecidos vegetais, compostos de polímeros complexos de carboidrato, onde as xilanas e as glucomananas são os principais componentes. Em paredes celulares de plantas terrestres, a xilana é o polissacarídeo hemicelulósico mais comum, representando de 20-40% da massa seca do vegetal, sendo depois da celulose, o polissacarídeo renovável mais abundante na natureza com um alto potencial para a degradação em produto final utilizável (BÉGUIN e AUBERT, 1994; SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

Segundo Shallom e Shoham (2003), os polímeros constituintes das hemiceluloses são de alta massa molar, alguns insolúveis ou mesmo associados à celulose e lignina. As hemiceluloses são também altamente variáveis em suas estruturas, e, embora o número de ligações químicas diferentes seja limitado, elas podem apresentar uma grande variabilidade em arranjos moleculares, podendo ser classificadas como xilanas, arabinoxilanas, arabinanas, galactomananas, mananas, arabinogalactana, entre outras. A degradação eficiente do polímero requer uma ação concernida de muitas enzimas que trabalham sinergicamente.

A xilana é um polissacarídeo formado por unidades residuais de β -D-xilopiranosil conectadas entre si por ligações β -1,4, sendo o principal componente hemicelulósico

depositado durante a fase de diferenciação do xilema (NASCIMENTO et al., 2002). Os constituintes mais comuns encontrados na cadeia principal da xilana são resíduos de acetil, arabinofuranosil e glucuronil (DAS et al., 1984).

Existem vários tipos de hemiceluloses disponíveis no mercado, como por exemplo, xilana de madeira dura (*hardwood*), xilana de madeira macia (*softwood*), xilana de bétula (*birchwood*), xilana de farelo de aveia (*oat spelts*), xilana de lariço (*larchwood*) e xilana de gramíneas (*grass*), entre outras, sendo todas extraídas de diferentes vegetais. As ligações glicosídicas encontradas em hemiceluloses são facilmente hidrolisadas por ácidos diluídos a elevadas temperaturas, rendendo um xarope contendo xilose e arabinose, no caso de resíduos agrícolas e madeira dura, ou manose, xilose e glucose no caso de madeiras macias (INGRAM e DORAN, 1995).

2.1.3 Lignina

A lignina é covalentemente ligada à hemicelulose, principalmente às xilanas, por ligações éster, formando uma matriz complexa que circunda as microfibrilas de celulose. O principal propósito da lignina é conferir a rigidez, impermeabilização e resistência a ataques mecânicos e microbianos (SANDGREN et al., 2005; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

A estrutura predominante durante as ligações da molécula de lignina são as β -O-4 éter, as quais não são hidrolisáveis sob condições biológicas. Já foi claramente demonstrado que a lignina é racêmica e, conseqüentemente, mesmo um simples dímero com ligação β -O-4, com dois carbonos assimétricos, possui quatro estereoisômeros. Como o número de isômeros aumenta geometricamente com o número de subunidades, a lignina forma uma estrutura bem complexa e sem unidades repetitivas definidas (HAMMEL, CULLEN, 2008).

2.2 Modo de ação e sinergismo das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal

2.2.1 Enzimas Celulolíticas

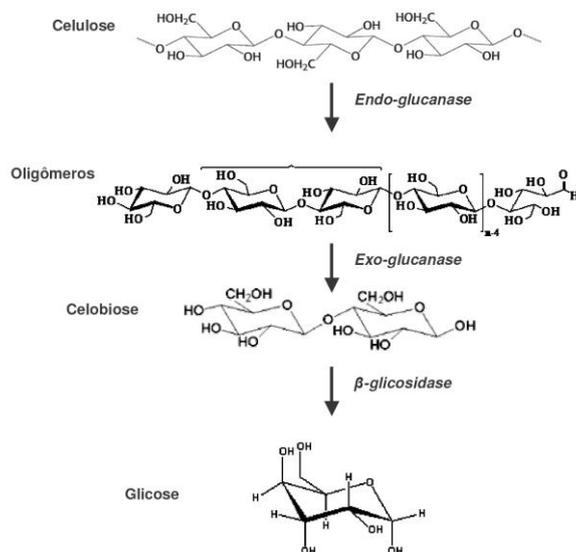
Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos, envolvendo reações com substratos. Estas são geralmente de natureza protéica, altamente específica e apresentam grande poder catalítico (BEST et al., 1994).

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. Porém, as celulases, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (LYND et al., 2002).

As moléculas de celulose são lineares e associam-se umas as outras formando feixes fibrosos. Estes feixes apresentam duas regiões bastante distintas: uma região bastante organizada apresentando grandes quantidades de ligações por pontes de hidrogênio, chamada de região cristalina, dificultando bastante o processo de hidrólise, e outra completamente desorganizada, chamada de amorfa (Figura 2). Cada tipo de celulase acaba atacando preferencialmente uma região específica da celulose (LYND et al., 2002)..

A Figura 3 apresenta o conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose também chamado de Complexo Celulase, o qual é composto de endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (CE3.2.1.91) e β -glicosidase (CE3.2.1.21), atuando de forma sinérgica para realizar a completa hidrólise da celulose (WITHER, 2001; LYND et al., 2002).

Figura 3: Mecanismo de ação das celulases sobre cadeias de celulose. A celulose original possui tanto a parte cristalina quanto a parte amorfa.



Fonte: Peixoto (2006).

A endo- β (1-4) glucanase ou β (1-4)-D-glucano 4-glucanohidrolase ou Cx celulase ou também referidas como CMCCase (E.C.3.2.1.4): hidrolisa ligações β (1-4), ao acaso, da

cadeia de celulose liberando glicose, celobiose e celodextrinas. Atua na região amorfa. A degradação da celulose insolúvel ou microcristalina até celulose solúvel ainda é pouco entendida. Considera-se que a endo- β (1-4) glucanase modifica a parte amorfa da celulose e produz celodextrinas de variadas massas molares. Ocorre redução rápida da viscosidade e aumento do poder redutor (WOOD, 1989).

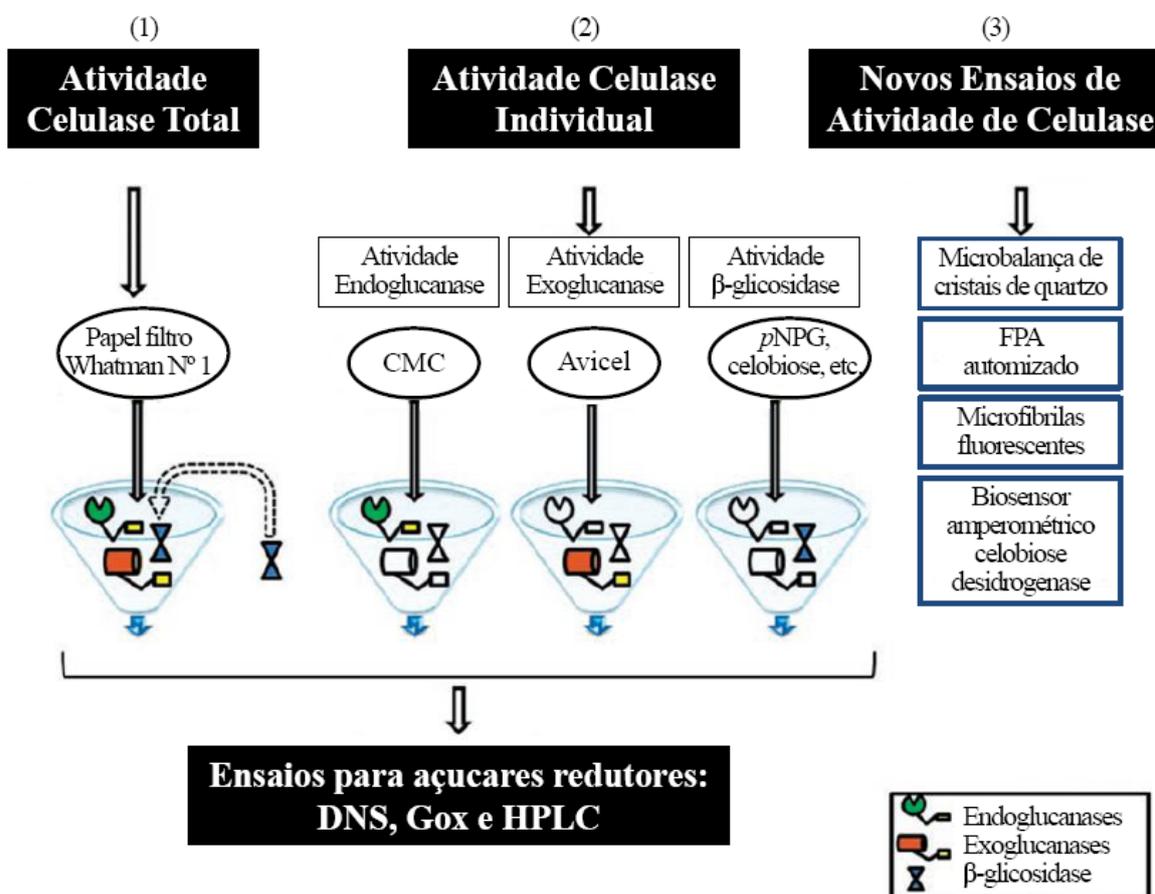
A exo- β (1-4) glucanase hidrolisa as ligações glicosídicas da celulose a partir da extremidade não redutora liberando celobiose. Esta enzima também é conhecida como ou avicelase ou exo glucana-4-glucano hidrolase ou C1 celulase ou celulase microcristalina ou celobio hidrolase (E.C.3.2.1.91). A celobiase ou β (1-4) glicosidase (E.C.3.2.1.21) hidrolisa as ligações do tipo β (1-4) (celobiose, trealose, gentiobiose) e libera glicose. (IRWIN et al., 1993).

A biotecnologia de celulase começou no início de 1980, primeiramente com o foco na alimentação animal seguido por aplicações em alimentos. Durante as últimas duas décadas, o uso de celulase tem aumentado consideravelmente, na indústria de papel e celulose e, especialmente, na indústria têxtil como agente para modificações de fibras e tecidos (CAVACO-PAULO et al., 1998). Além disso, celulases e também pectinases e hemicelulases são amplamente utilizados na indústria de bebidas, indústria têxtil e na agricultura. Alguns desses aplicativos preferem um ou dois componentes selecionados de celulase, hemicelulase e pectinase, enquanto outros exigem misturas de celulases, pectinases e hemicelulases para melhor rendimento (BHAT, 2000).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBERG, 1981).

Alguns métodos de atividade utilizando diferentes substratos para reação enzimática são apresentados na Figura 4, pela medida de atividade de celulase total usando-se papel filtro (FPA– Filter Paper Activity), atividades de celulase incluindo endoglucanase (Egs), exoglucanases e β -glicosidases, além de algumas abordagens inovadoras tais como microbalança de cristais de quartzo, FPA automatizado, microfibrilas fluorescentes e biossensor amperométrico celobiose desidrogenase. Em seguida serão descritos brevemente alguns destes métodos.

Figura 4: Ensaios para celulase: (1) atividade de celulase total, (2) atividade individual, incluindo endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, (3) novos ensaios com facilidade de operação e alta reprodutibilidade.



Fonte: Dashtban et al. (2010).

Método do papel de filtro (FPase)

Técnicas para medir a atividade de celulase total são necessárias para comparar a eficácia da atividade da celulase entre micro-organismos ou suas enzimas secretadas. O FPA é o método-chave para análise da atividade celulase total. Em 1976, o FPA foi desenvolvido por Mandels et al. (1976) e se tornou amplamente utilizado desde 1984, quando a Comissão de Biotecnologia da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) propôs uma série de procedimentos padrão para a medida da atividade da celulase. Tradicionalmente, o FPA usa uma fita de 1 × 6 cm de papel de filtro Whatman nº 1 como substrato padrão, pois é barato e de fácil disponibilidade (COWARD-KELLY et al., 2003).

A Unidade Internacional (UI) de atividade de papel de filtro (FPase) (FPU) é definida como um micromol de glicose equivalente liberada por minuto, em filtrado de

cultura em condições de ensaio. As condições de ensaio referem-se às condições como pH e temperatura do ensaio e dependem em grande parte sobre as propriedades da enzima, variando muito entre celulasas e micro-organismos. Em seguida, a liberação de açúcares redutores (AR) é medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

No entanto, existem várias preocupações associadas ao uso do FPA para quantificar a atividade celulase total. Embora o FPA seja comumente usado, também é conhecido por ser não reprodutível. Ou seja, fatores que afetam a sensibilidade e reprodutibilidade, muitas vezes resultam do fato de que os complexos de celulose mais natural tendem a ter uma falta de atividade de β -glicosidase. Assim, este método poderia ser melhorado pela adição suplementar de β -glicosidase, ou seja, se um organismo complexo ou enzima tem baixa atividade de β -glicosidase, uma elevada quantidade de celobiose será produzida, resultando em uma baixa ou falsa leitura de absorvância para o ensaio DNS, considerando que este não é um açúcar redutor (COWARD-KELLY et al., 2003).

Xiao et al. (2004) desenvolveram melhorias para o método do papel de filtro, permitindo que o ensaio tivesse um grande número de amostras simultaneamente. Isto foi conseguido pela redução do volume dos reagentes e substrato, de modo que o ensaio pode ser feito em uma placa de microtitulação de 96 poços. O volume total de reação enzimática foi reduzido a partir do padrão da IUPAC de 1,5 mL para 60 μ L. Um perfurador de escritório foi usado para criar pequenos discos do substrato papel filtro para se encaixar perfeitamente nos poços. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as medidas de atividade utilizando o FPA IUPAC em comparação com as reações minimizadas na placa de microtitulação.

Endoglucanase (EGs): atividade da carboximetilcelulase

As endoglucanases (EGs) podem hidrolisar aleatoriamente a cadeia de celulose atacando as ligações internas da cadeia da celulose na região amorfa, aumentando o número de terminais não redutores. A atividade da EGs pode ser medida usando um derivado de celulose solúvel com alto grau de polimerização (GP), como a carboximetilcelulose (CMC). A carboximetilcelulase (CMCase) é principalmente avaliada com base no procedimento descrito por Mandels et al. (1976). Uma unidade (UI) de EG é definida como a quantidade de enzima que libera 1 mol de glicose por minuto nas condições do ensaio. Os açúcares redutores podem ser estimados pela aplicação de

métodos diferentes, tais como cromatografia líquida (HPLC) (FUJITA et al., 2002); glicoseoxidase (GOD), (TRINDER, 1969) ou pelo método colorimétrico que usa cobre alcalino como oxidante inorgânico (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952). Além disso, a atividade da endoglucanase pode ser medida usando alguns outros corantes, adicionando-se derivados de celulose insolúvel ou a substituição de derivados de celulose insolúvel quimicamente para produzir CMC cromogênico. Exemplos destes são Azul Cibacron 3GA (TEN et al., 2004) e trinitrofenil CMC cromogênico (TNP-CMC) (HUANG e TANG, 1976), respectivamente.

Exoglucanases: atividade da avicelase

Avicel comercial (também chamado de celulose microcristalina) é usado para medir a atividade da exoglucanase porque tem baixo grau de polimerização da celulose e é relativamente inacessível ao ataque de EGs, apesar de algumas regiões amorfas. Enzimas que mostram atividade relativamente alta em Avicel e pouca atividade sobre CMC são identificados como exoglucanases (MAKI et al., 2009). No entanto, Avicel pode conter celulose amorfa e celodextrinas solúveis, que podem agir como substratos para ambas as exo e endo-glucanases. Não existe substrato altamente específico para testar a atividade exoglucanase em misturas de celulase (WOOD e BHAT, 1988). Outros substratos menos comumente usados para medida ou detecção de atividade de exoglucanase produzidas por bactérias e fungos incluem: PNP-*p*-D-celobiosídeo (KOHRLING et al., 1990), celulose microcristalina bacteriana (BMCC) (CASPI et al., 2008) e MU- β -D-celobiosídeo (MU-C) (COURTY et al., 2005), sendo que as limitações destes substratos não são claramente conhecidas.

*β -Glicosidase: atividade do *p*-nitrofenil- β -glicosídeo*

A atividade de β -glicosidase pode ser medida usando vários substratos cromogênicos e não cromogênicos, e são principalmente avaliadas com base no procedimento de Kubicek (1982). Em um método cromogênico, *p*-nitrofenil- β -glicosídeo (*p*NPG) é usado com substrato. O *p*-nitrofenil liberado será medido, a fim de determinar a taxa de hidrólise em temperatura e pH ideal. O composto *p*NPG na concentração ótima (geralmente 1-5mM), é adicionado a um tampão apropriado, com pH ideal, contendo a

enzima e em seguida incubado a temperatura ideal. Após 10 min de incubação, a reação é interrompida pela adição de três volumes de solução saturada de tetraborato de sódio, e em seguida a absorbância é lida em 405 nm. Uma unidade de β -glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenil por minuto (CHANDRA et al., 2009). No entanto, no caso de métodos não cromogênicos, diferentes substratos podem ser utilizados. Por exemplo, quando oligo ou dissacarídeos (como celobiose) são utilizados como substratos, a glicose liberada pode ser avaliada pelo método de glicose oxidase (GOD) com um kit comercial. Quando o substrato é um polissacarídeo, açúcares redutores podem ser medidos pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS).

2.2.2 Enzimas Xilanolíticas

Além de celulases agindo em celulose, enzimas auxiliares, especialmente hemicelulases, são necessárias para expor a fibras de celulose, tornando o substrato mais acessível à hidrólise (BERLIN et al., 2007; KUMAR e WYMAN, 2009; BANERJEE et al., 2010).

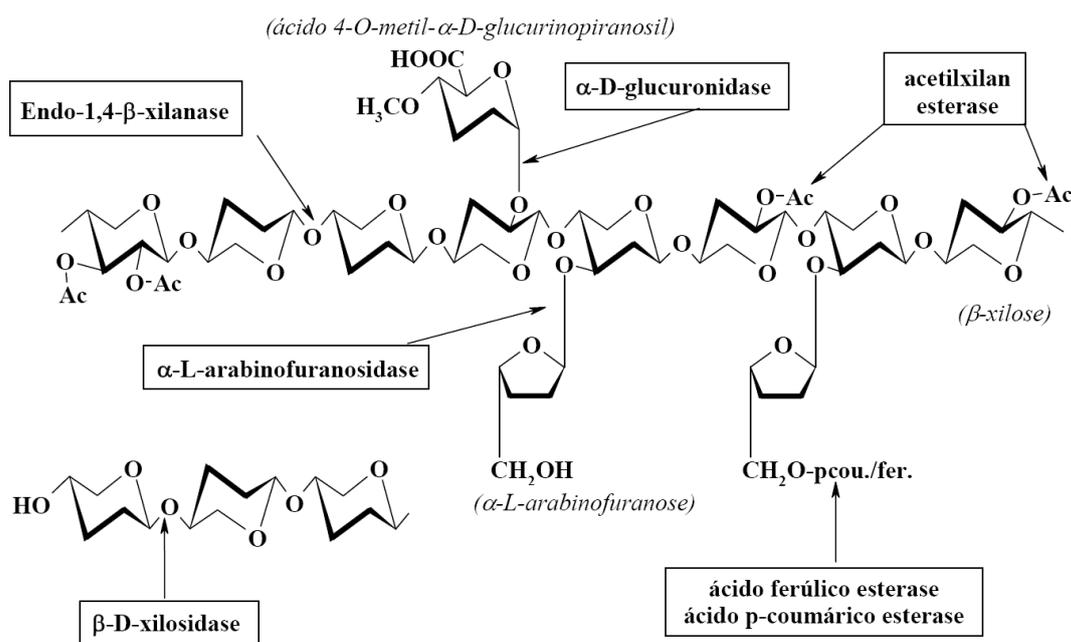
O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, o qual está presente em todas as camadas da parede celular vegetal na interface entre a celulose e a lignina. Depois da celulose, a xilana é a fonte renovável de carbono mais abundante, presente na madeira e resíduos agrícolas (ZANOELO et al., 2004). Na natureza, o interesse pela hidrólise da xilana se dá pela ação de várias enzimas do complexo xilanolítico, dos quais, principalmente as xilanases é que fazem parte desse complexo e são responsáveis pela hidrólise da xilana (LEE et al., 2009).

A heterogeneidade e complexidade estrutural das xilanas resultam numa abundância de enzimas xilanolíticas com variações na especificidade, nas sequências primárias e tamanho (COLLINS et al., 2005).

Devido à sua heterogeneidade e complexidade, a completa hidrólise de xilana requer uma grande variedade de enzimas agindo cooperativamente (Figura 5) (BIELY, 1985; PULS et al., 1987; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002). As endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) despolimerizam a xilana pela hidrólise aleatória do esqueleto principal, enquanto as β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que clivam pequenos xilo-oligossacarídeos e xilobiose, a partir da extremidade não redutora, liberando xilose.

Outras enzimas agem na conversão da xilana, ocorrendo um sinergismo entre elas, estas apresentam as seguintes atividades: α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55) removem os resíduos de L-arabinose substituídos no carbono três (C3) das unidades de xilose (KANEKO et al., 1993); α -D-glucuronidas (EC 3.2.1.131) hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,2 entre o ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico e resíduos de xilose em glucuronoxilano; acetilxilana esterase (EC3.1.1.72) removem grupos O-acetil a partir dos carbonos dois e/ou três (C2 e/ou C3) dos resíduos de xilose na acetilxilana; e as ácidos fenólicos esterases também podem estar presentes: ácido ferrúlico esterase (3.1.1.73) e o ácido *p*-coumárico esterase (EC 3.1.1.-) clivam na xilana as ligações éster entre resíduos de cadeia lateral de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido *p*-coumárico, respectivamente (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009).

Figura 5: Estrutura da xilana e os sítios de ataque por enzimas xilanolíticas.



Fonte: Sunna e Antranikian, (1997).

As enzimas xilanolíticas possuem ampla aplicação na bioconversão de lignocelulose devido a seu potencial biotecnológico industrial em vários processos, tais como na indústria de alimentos (LOPEZ et al., 2007) e etanol (VIDMANTIENE et al., 2006; KO et al., 2009), na clarificação de sucos e vinhos e na extração de óleos vegetais (PASSOS et al., 2009), café e amido (FREDERIX et al., 2003), na panificação (JIANGA et al., 2008), além de agentes branqueadores de polpa e na indústria de papel

(KIDDINAMOORTHY et al., 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009; VALLS e RONCERO, 2009).

A maior aplicação industrial da xilanase, livre de celulase, está relacionada às indústrias de celulose e papel. Nesta aplicação, as xilanases podem auxiliar consideravelmente na redução da poluição ambiental, causada pela utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas, o que resulta na formação de compostos residuais denominados organoclorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente. A utilização da xilanase, no biobranqueamento das polpas, leva à diminuição do consumo de branqueadores químicos, sem comprometer, entretanto, o resultado final, em termos da alvura do papel (WONG et al., 2001).

A potencial aplicação de xilanase na indústria de celulose e papel busca a produção de xilanases termofílicas e alcalófilas de ocorrência natural. Alternativamente, as xilanases de extremófilos foram geneticamente modificadas para melhorar a estabilidade em altas temperaturas e condições de pH (STEPHENS et al., 2009).

2.3 Bioprodução de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fermentação em estado sólido (FES)

É muito difícil precisar o início da prática da fermentação em estado sólido (FES) pela atividade humana. Sabe-se, contudo, que várias formas de alimentos produzidos utilizando esse processo fazem parte da dieta de diversos povos há muitos séculos. Os processos de FES têm sido utilizados extensivamente desde tempos antigos nos países orientais, asiáticos e africanos para produção de alimentos fermentados, e vêm sendo muito estudados nos últimos anos, por pesquisadores do mundo todo, devido às suas peculiaridades, sendo de especial interesse econômico em países com abundante biomassa e resíduos agroindustriais, como o Brasil (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

A FES é definida como a fermentação envolvendo sólidos em ausência ou quase ausência de água livre, sendo que o substrato deve possuir umidade suficiente para proporcionar o desenvolvimento do metabolismo dos micro-organismos. O desenvolvimento deste sistema envolve aspectos de Engenharia Bioquímica, incluindo a cinética, modelagem matemática, *design* de biorreatores e sistemas de controle avançado (PANDEY, 2003; HÖLKER e LENZ, 2005; COUTO e SANROMÁN, 2006).

Existem vários fatores no processo de FES que produzem impactos sobre o sucesso desta tecnologia. Por exemplo, a seleção de micro-organismos e substratos, otimização dos parâmetros de processo e também a purificação do produto final têm sido um desafio para esta tecnologia. Outros aspectos importantes em FES são a seleção das variáveis que possuem efeito sobre o processo, bem como a sua otimização. Nisso incluem-se os parâmetros físico-químicos e bioquímicos, tais como tamanho de partícula, umidade inicial, pH, pré-tratamento dos substratos, umidade relativa, temperatura de incubação, agitação, aeração, idade e quantidade de inóculo, suplementação de nutrientes, extração e purificação do produto, entre outros (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009).

2.3.1 Substratos empregados em FES

Segundo relatam Sarkar et al. (2012), é constante o esforço para utilizar resíduos em bioprocessos, seja na forma de suporte e/ou de substrato, entretanto, a seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso da FES em especial, os substratos sólidos devem ser constituídos basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água, e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares (COSTA, 1996; SPIER, 2005).

O substrato lignocelulósico ideal precisa ser barato, bem processado, avaliado em grandes quantidades e, para que ocorra sua hidrólise e produção enzimática, a composição também precisa ser ajustada (JUHÁSZ et al., 2005).

A opção por materiais agroindustriais deve-se ao fato de possuírem as seguintes características: são recursos renováveis: sua produção depende de outra atividade produtiva; muitas vezes é um subproduto ou produto secundário, sendo produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (SINGHANIA et al., 2008).

Desde que esta biomassa seja constituída majoritariamente por celulose e hemicelulose, existem inúmeras possibilidades de aproveitamento destes resíduos. No entanto, a composição e proporção dos constituintes dos resíduos lignocelulósicos variam não apenas de acordo com o tipo do resíduo, mas também com fatores relacionados à origem, safra, condições e tempo de armazenamento do resíduo (Tabela 2).

Tabela 2: Composição química parcial dos resíduos lignocelulósicos em estudo relatados na literatura.

| Substrato lignocelulósico | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) | Referências |
|---------------------------|--------------|------------------|-------------|-------------------------|
| Bagaço de cana | 33,6 | 33,6 | 18,5 | Nassar et al. (1996) |
| | 40,1 | 26,4 | 25,1 | Neureiter et al. (2002) |
| | 38,9 | 26,2 | 23,9 | Laser et al. (2002) |
| | 54,3 | 24,4 | 29,7 | Rosa e Garcia (2009) |
| | 42,3 | 28,6 | 21,7 | Agnihotri et al. (2010) |
| | 45,5 | 27,0 | 21,1 | Rocha et al. (2011) |
| | 43,1 | 25,2 | 22,9 | Rocha et al. (2012) |
| | 41,0 | 30,1 | 21,2 | Yoon et al. (2012) |
| Casca de Arroz | 38,0 | n.a. | 22,0 | Nakata et al. (1989) |
| | 31,3 | 24,3 | 14,3 | Zanzi (2001) |
| | 34,4 | 29,3 | 19,2 | Williams (2000) |
| | 35,0 | 25,0 | 20,0 | Krishnani et al. (2008) |
| | 30,9 | n.a. | 16,2 | Adel et al. (2011) |
| | 35,0 | 33,0 | 23,0 | Johar et al. (2012) |
| Casca de soja | 36,4 | 12,5 | 1,75 | Corredor et al. (2008) |
| | 38,4 | 10,2 | 2,8 | Mielenz et al. (2009) |
| | 33,4 | 17,1 | 9,8 | Brijwani et al. (2010) |
| | 39,7 | 25,5 | 9,1 | Cassales et al. (2011) |
| | 35,3 | 17,2 | 2,3 | Yoo et al. (2011) |

n.a.= Não Avaliado

2.3.1.1 Bagaço de cana

A cana é uma gramínea, cultivada em regiões tropicais e subtropicais, apresentando a propriedade de sintetizar e armazenar significativa quantidade de sacarose em seus tecidos de reserva. Possui um sistema com duas fases, a fase sólida, também chamada de fibra, constituída de celulose, hemicelulose e lignina e, a fase líquida cujo caldo contém substâncias orgânicas e 90% de sacarose (NOGUEIRA e VENTURINI FILHO, 2005).

O bagaço de cana-de-açúcar é, sem dúvida, o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil. Estima-se que as indústrias de açúcar e álcool gerem 195 milhões de toneladas desse material. A partir de cada tonelada de cana-de-açúcar moída na indústria obtêm-se 700 litros de caldo e 300 kg de bagaço (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010; BORTOLAZZO, 2011).

O bagaço resultante após a extração pode ser queimado para o processo de produção de calor nas caldeiras, mas não substitui na totalidade a lenha, resultando num

excedente de 12%. Além da queima é comercializado para a fabricação de conglomerados, (em grandes destilarias), na produção de ração animal, na indústria química, na fabricação de papel. Estas são alternativas de aproveitamento, porém não se consegue esgotar o excesso deste resíduo (BORTOLAZZO, 2011). Segundo Hassuani et al. (2005), tem se investido muito em tecnologias para o aproveitamento total da cana-de-açúcar, para também utilizar o bagaço na produção de combustível. A utilização deste bagaço excedente poderia suprir o abastecimento da usina sucroalcooleira, proporcionando vantagens sócioambientais e elevação do rendimento econômico do processo.

A constituição química do bagaço (Tabela 2) depende de diversos fatores entre eles: o tipo de solo, tipo de cana, as técnicas de colheita e o manuseio empregado (RODRIGUES e CAMARGO, 2008).

2.3.1.2 Casca de arroz

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população (EMBRAPA, 2012).

Com o beneficiamento do grão de arroz resultam, em média, 72% de grãos limpos, 8% de farelo e 20% correspondem à casca. Entre os resíduos gerados pelo beneficiamento de arroz, a casca é sem dúvida o mais preocupante, uma vez que o farelo e os fragmentos de grãos são aproveitados na fabricação de farinhas, alimentação animal e na fermentação da cerveja (devido ao seu alto valor nutritivo), enquanto que o principal destino da casca de arroz é a queima ou, simplesmente, o seu acúmulo (LUDWIG, 2004).

O grande volume de casca de arroz, a baixa densidade desta ($0,08-0,16 \text{ g cm}^{-3}$), a necessidade de espaço para armazenamento, o problemático manuseio e o elevado custo de transporte são os principais problemas na indústria arroseira (ARMESTO et al., 2002). Além disso, a casca de arroz permanece em sua forma original por longos períodos de tempo (aproximadamente 5 anos), contribuindo para a geração de solo arenoso e de pouca produtividade (ZUCCO, 1999).

A casca de arroz é o revestimento protetor formado durante o crescimento do grão de arroz, composta por quatro camadas estruturais: 1) epiderme externa, coberta com uma espessa cutícula de células silificadas; 2) esclerênquima ou fibra hipoderme, com parede lignificada; 3) célula parênquima esponjosa; 4) epiderme interna. Nestas camadas encontram-se componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que a composição química da casca de arroz varia de acordo com o tipo de solo e condições de cultura. Os principais componentes da casca são celulose e hemicelulose, além de lignina (Tabela 2) e componentes orgânicos e inorgânicos (ANGEL e VÁSQUEZ 2009).

Estudos apresentam a utilização de casca de arroz na obtenção de combustível gasoso e álcool, e a utilização das suas cinzas como adsorvente de óleos, aditivo em concreto e materiais poliméricos (REYES et al., 1998).

2.3.1.3 Casca de soja

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto, do qual, neste processo também é produzida a lecitina. A soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja vem sendo testado por instituições de pesquisa, como a Embrapa, além de estar sendo testado em diferentes cidades brasileiras (EMBRAPA, 2012).

No processamento para extração do óleo, têm-se como principais subprodutos o farelo de soja, de elevado teor proteico e de baixa concentração de fibra, e a casca de soja, película que reveste o grão. Obtém-se ainda o resíduo da limpeza da soja, que pode, em determinadas situações, ser incorporado à casca de soja (MOREIRA et al., 2009).

A casca de soja consiste da primeira camada que cobre o grão de soja e é um dos subprodutos/resíduos obtidos no processo de extração de óleo do grão. Para cada tonelada de soja processada, até 2% de cascas são geradas. A composição química da casca de soja varia, dependendo da tecnologia de processamento, da genética da planta, do solo, e das condições de crescimento, entre outros fatores. Com relação às características nutricionais a casca de soja possui alto teor de fibras, porém baixa quantidade de lignina (2%), obtendo-se digestibilidade em torno de 90% (ZAMBOM et al., 2001).

Devido à sua disponibilidade energética, a casca de soja é basicamente utilizada na substituição total e parcial do milho, do feno e de fontes proteicas na alimentação de ruminantes (LUDDEN et al., 1995; MOREIRA et al., 2009; GENTIL et al., 2011).

2.3.2 Bioprodução de celulase e xilanase

Existe uma grande variedade de micro-organismos envolvidos na produção de celulase, incluindo bactérias aeróbicas e anaeróbicas (WANG et al., 2009); fungos da podridão branca e podridão mole (TANAKA et al., 2009; LO et al., 2010) e fungos anaeróbios (DASHTBAN et al., 2009; LJUNGDAHL, 2008). Em fungos filamentosos, actinomicetos e bactérias aeróbicas as celulases são secretadas principalmente como moléculas livres. A maioria das celulases exploradas para aplicações industriais são de fungos filamentosos, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, etc, onde um grande número de celulases é encontrado (BAK et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010).

A maioria dos relatos sobre a produção de celulases microbianas utilizam a tecnologia de Fermentação Submersa (FS) e o micro-organismo amplamente estudado em produção de celulase é o *Trichoderma reesei*. No entanto, na natureza, o crescimento e a utilização de celulose por micro-organismos aeróbicos para a produção de celulases provavelmente se assemelha à Fermentação em Estado Sólido (FES) (HÖLKER et al., 2004; ZHU et al., 2009). Embora a forma de crescimento filamentoso cause dificuldades na transferência de massa em comparação com a fermentação ou crescimento bacteriano, tecnologias eficientes foram desenvolvidas para o ácido, antibiótico orgânico e produção de enzimas nativas de fungos filamentosos (WIEBE, 2003). Estes fungos filamentosos produzem celulases complexas com todas as três classes de enzimas em proporções diferentes necessárias para a completa hidrólise da celulose.

O *Trichoderma reesei* é o fungo celulolítico melhor caracterizado e o mais utilizado industrialmente para a produção de celulases. Ele produz duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e duas endo-glucanases (GE1 e GE2), numa proporção aproximada de 60:20:10:10, que, juntos, podem fazer até 90% do *pool* de enzimas, enquanto sete β -glicosidases-BGLI-BGLVII secretadas por este fungo geralmente representam menos de 1% (LYND et al., 2002; HERPOËL-GIMBERT et al., 2008).

As xilanases são produzidas por diferentes bactérias e fungos, como exemplo, *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Aureobasidium* sp. e *Talaromyces* sp. (LI et al., 2000).

Porém, a produção de xilanase comercial se concentra principalmente nos fungos *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. A procura por cepas fúngicas é maior pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular (HALTRICH et al., 1996).

Em FES várias fontes de carbono (substrato principal) podem ser utilizadas para produção de celulases, entre elas cita-se: palha de trigo (YANG et al., 2006); fibra de palmeira (LAKSHMI et al., 2009); casca de soja (BRIJWANI et al., 2010); farelo de trigo e torta de soja (PAL e KHANUM, 2010); casca de arroz (KAPILAN e ARASARATNAM, 2011); casca de banana (YANG et al., 2011); farelo de trigo (NAGAR et al., 2011; FALKOSKI et al., 2013; RAGHUWANSHI et al., 2014); bagaço de cana-de-açúcar (CUNHA et al., 2012); torta da semente de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) (NCUBE et al., 2012); bagaço de maçã (DHILLON et al., 2012); casca de batata (SANTOS et al., 2012); tronco de palmeira moído (ANG et al., 2013); palha de arroz (NARRA et al., 2014).

Os bioprocessos usados atualmente e o tipo de substrato para a produção de celulase e xilanase com base na literatura são apresentados na Tabela 3. Não é possível fazer uma comparação entre os rendimentos e as atividades de celulase e xilanase nos trabalhos citados devido a diferenças nos métodos de ensaio e a forma de como as atividades estão sendo expressas.

Tabela 3: Substrato, forma de cultivo e micro-organismos que produzem diferentes enzimas lignocelulolíticas.

| Micro-organismos | Substratos | Formas de Cultivo | Enzimas | Referências |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------|---|------------------------------|
| <i>T. viridae</i> | Bagaço de cana | FS | FPase 0,88 U.mL ⁻¹ CMCase 33,8 U.mL ⁻¹ β -glicosidase 0,33 U.mL ⁻¹ | Adsul et al. (2004) |
| <i>T. reesei</i> RUT C30 | Farelo de trigo | FES | 3,8 U.gds ⁻¹ FPU | Singhania et al. (2007) |
| <i>P. citrinum</i> | Farelo de trigo | FES | FPase 1,72 IU.mL ⁻¹ EG 1,89 IU.mL ⁻¹ | Dutta et al. (2008) |
| <i>Aspergillus ellipticus</i> | Palha de trigo | FES | FPase 13,38 U.g ⁻¹ c 26,68 U.g ⁻¹ EG 130,92 U.g ⁻¹ | Acharya et al. (2010) |
| <i>Penicillium citrinum</i> YS40-5 | Farelo de arroz | FES | β -glicosidase 159,1 U.g ⁻¹ | Ng et al. (2010) |
| <i>Aspergillus niger</i> DFR-5 | Farelo de trigo+torta de soja | FES | Xilanase 2596 IU.gds ⁻¹ | Pal e Khanum (2010) |
| <i>A. niger</i> + <i>T. reesei</i> | Palha de arroz + farelo de trigo | FES | FPase 35,8 IU.g ⁻¹ β -glicosidase 33,71 IU.g ⁻¹ CMCase 131,34 IU.g ⁻¹ Xilanase 3106,34 IU.g ⁻¹ | Dhillon et al. (2011) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Farelo de trigo | FES | EG 56,1 U.g ⁻¹ | Farinas et al. (2011) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> MTCC344 | Bagaço de cana | FES | EG 28,96 U.g ⁻¹ | Jabasingh e Nachiyar (2011) |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Casca de arroz | FES | Xilanase 142,0 U.g ⁻¹ DM | Kapilan e Arasaratnam (2011) |
| <i>Promicromonospora</i> sp MARS | Palha de arroz | FES | Xilanase 85,0 IU.g ⁻¹ | Kumar et al. (2011) |

Tabela 3: Continuação

| Micro-organismos | Substratos | Formas de Cultivo | Enzimas | Referências |
|--|--------------------------|-------------------|--|------------------------|
| <i>Penicillium decumbens</i> L-06 | Farelo de arroz | FES | FPase 5,76 U.g ⁻¹ | Long et al. (2009) |
| <i>A. fumigatus</i> Z5 | Palha de milho | FES | CMCase 523,6 U.g ⁻¹ FPase 144,6 U.g ⁻¹ | Liu et al. (2011a) |
| <i>Bacillus pumilus</i> SV-85S | Farelo de trigo | FES | Xilanase 73 ± 1 IU.g ⁻¹ | Nagar et al. (2011) |
| <i>Coprinopsis cinerea</i> | Casca de banana | FS | EG 0,48 U.mL ⁻¹ FPase 0,26 U.mL ⁻¹ EX 38,10 U.mL ⁻¹ | Yang et al. (2011) |
| <i>Chrysosporthe cubensis</i> | Farelo de trigo | FES | FPase 2,5 U.g ⁻¹ CMCase 33,8 U.g ⁻¹ Xilanase 362,3 U.g ⁻¹ | Falkoski et al.(2013) |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> SK1 | Tronco de palmeira moído | FES | FPase 3,35U.g ⁻¹ CMCase 54,27 U.g ⁻¹ Xilanase 418,70 U.g ⁻¹ | Ang et al. (2013) |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> NCIM 1106 | Palha de sorgo | FES | FPase 0,128 U.mL ⁻¹ EG 2, 42 U.mL ⁻¹ Xilanase 26,8 U.mL ⁻¹ | Waghmare et al. (2014) |
| <i>Trichoderma viride</i> -IR05 | Bagaço de cana | FES | Xilanase 56,6 U.g ⁻¹ | Irfan et al. (2014) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Palha de arroz | FES | EG 33,12 U.g ⁻¹ | Narra et al. (2014) |

EG = Endoglucanase; EX = Exoglucanase.

A crescente necessidade de enzimas celulolíticas como biocatalisadores para a eficiente conversão de celulose em bioetanol tem aumentado o interesse nos sistemas de digestão da celulose em insetos (WATANABE E TOKUDA, 2010). Willis et al. (2011) estudaram a identificação, clonagem e expressão de uma celulase obtida de *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae), esta que está entre as pragas secundárias mais importantes de produtos alimentícios armazenados. O trabalho apresentou a primeira caracterização funcional de uma celulase derivada de um genoma de insetos, com aplicações potenciais na indústria de biocombustíveis, devido à sua alta atividade relativa em pH alcalino.

2.4 Aspectos importantes relacionados a enzimas lignocelulíticas

Milhões de anos atrás, o carbono atmosférico foi capturado pelas plantas em um processo chamado fotossíntese, e ao longo do tempo foi manifestado em petróleo e carvão. No entanto, desde a revolução industrial, temos usado muito destas fontes de energia, causando a liberação excessiva de carbono na atmosfera. Assim, ao longo dos últimos 150 anos os níveis de CO₂ atmosférico aumentaram de $\cong 280$ a $\cong 380$ ppm (GALBE e ZACCHI, 2002; HOEGH-GULDBERG et al., 2007).

O aumento do consumo de energia, o esgotamento de combustíveis fósseis e as crescentes preocupações ambientais têm mudado o foco de geração de energia em relação ao uso de biocombustíveis. A produção mundial de petróleo está prevendo o declínio de cinco vezes abaixo do seu nível atual até 2050. Com base nos cálculos do Conselho Mundial de Energia, o consumo mundial de energia primária é de aproximadamente 12 bilhões de toneladas de carvão por ano. Cálculos das Nações Unidas têm demonstrado que a população mundial aumentará para cerca de 10 bilhões de pessoas em 2050, que por sua vez, aumentará a demanda de energia a pelo menos 24 bilhões de toneladas de carvão por ano (o dobro do que é consumido hoje em dia) em função do desenvolvimento econômico, social e político (SCHIFFER, 2008).

Xaropes de açúcares, que são derivados da hidrólise da biomassa, podem ser usados para a produção de etanol. Esta é atualmente uma opção de grande escala que pode ser usado pelo setor de transportes para combater a mudança climática através da redução de gases de efeito estufa. O etanol de primeira geração é atualmente produzido através da conversão de carboidratos a partir de culturas como o milho (EUA), cana-de-açúcar

(Brasil) e beterraba (Europa). No entanto, o uso da terra para esses combustíveis compete com o fornecimento de alimentos e preservação ambiental (GOTTSCHALK, et al., 2010). Como tal, têm-se buscado esforços para o desenvolvimento e implementação de tecnologias de processo avançado para produzir etanol celulósico a partir de resíduos agrícolas com baixo valor agregado, como palha de milho, palha de trigo, bagaço de cana ou resíduos de madeira (LUO et al., 2009).

O uso potencial desses resíduos em todo o mundo é realmente significativo. No Brasil a agroindústria de milho, cana-de-açúcar, arroz, mandioca, trigo, citros e coco geram coletivamente 597 milhões de toneladas de resíduos por ano. Somente a indústria brasileira de açúcar e álcool gera 195 milhões de toneladas de bagaço de cana por ano, sendo que muitas vezes, este é queimado em usinas de cogeração de energia de forma ineficiente e, como uma forma de reduzir o problema da destinação do bagaço (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Apesar disso, um excedente de 12% permanece inexplorado e pode ser usado como matéria-prima para a produção de etanol lignocelulósico, aumentando assim a produção de combustível por área plantada (HASSUANI et al., 2005). Além disso, um aumento de 12 para 50% no excedente de bagaço foi previsto, sobre o aumento da eficiência das caldeiras e do sistema de geração de eletricidade (BON e FERRARA, 2008). Segundo Sarkar et al. (2012) a palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e bagaço de cana são os quatro principais resíduos agrícolas em termos de quantidade de biomassa disponível e mais favoráveis para a produção de bioetanol, devido à sua disponibilidade ao longo do ano. A Ásia é o maior produtor de palha de arroz e trigo, enquanto palha de milho e bagaço são na sua maioria produzidos na América (Tabela 4).

Tabela 4: Quantidade de resíduos agrícolas (milhões de toneladas) com possibilidade de aplicação para produção de bioetanol.

| Substrato | África | Ásia | Europa | América | Oceania | Referências |
|----------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------------------|
| Palha de arroz | 20,90 | 667,60 | 3,90 | 37,20 | 1,70 | BALAT et al. (2008) |
| Palha de trigo | 5,34 | 145,20 | 132,59 | 62,64 | 8,57 | KIM e DALE (2004) |
| Palha de milho | 0 | 33,90 | 28,61 | 140,86 | 0,24 | KIM e DALE (2004) |
| Bagaço de cana | 11,73 | 74,88 | 0,01 | 87,62 | 6,49 | KIM e DALE (2004) |

Fonte: Sarkar et al. (2012).

Para bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares, eficazes e econômicos pré-tratamentos devem ser desenvolvidos de tal forma que um alto rendimento de açúcares fermentáveis possam ser obtidos na etapa de hidrólise enzimática subsequentes; condições de pré-tratamento também devem ser balanceados para evitar a formação de inibidores da hidrólise e processos de fermentação da biomassa (SANCHEZ e CARDONA, 2008). Além disso, o baixo custo, a estabilidade e a eficiência das enzimas também são de suma importância, isto porque o alto custo de enzimas restringe seu uso em aplicações de larga escala para a conversão de materiais lignocelulósicos.

Atualmente as celulasas são a terceira enzima industrial mais comercializada em todo o mundo, devido às suas amplas aplicações (SAQIB et al., 2010). No entanto, podem se tornar enzimas industriais de maior interesse, se o etanol for produzido a partir da biomassa lignocelulósica por via enzimática, tornando-se assim o principal combustível para o transporte (WILSON 2009).

Embora a maioria das empresas produtora de enzimas em todo o mundo esteja envolvida na produção e comercialização de celulasas e xilanases para diversas aplicações, existem poucas delas que desenvolvem estas enzimas para a conversão de biomassa, no qual as mais bem sucedidas delas provavelmente são a “Genencor” e a “Novozymes”. Ambas as empresas têm desempenhado papel significativo na redução de custos através de pesquisas e adoção de novas tecnologias. A Genencor lançou a Accelerase® 1500, uma celulase complexa destinada especificamente para a indústria de processamento de biomassa lignocelulósica. A Accelerase® 1500 é produzida por uma cepa modificada geneticamente de *Trichoderma reesei*. Tal preparação enzimática apresenta elevados níveis de atividade de β -glicosidase em relação a outras celulasas comerciais disponíveis no mercado de modo assegurar a quase completa conversão de celobiose em glicose. A Genencor lançou também a Accelerase® XY suplementada com a enzima xilanase que melhora tanto a conversão de xilana (C5) e glucana (C6) quando misturada com outras Accelerase®. A Novozymes por sua vez, também apresenta uma grande variedade de celulasas disponíveis tais como a Cellusoft®AP e Cellusoft®CR utilizadas na indústria têxtil, a Carezyme® e Celluclean usada em detergentes e a Denimax®6011 usada na indústria de jeans para o *stonewash* a baixas temperaturas, assim como outras determinações específicas (SINGHANIA et al., 2010).

A Tabela 5 apresenta os principais fornecedores de celulases com diferentes marcas e fonte de origem, muitos dos quais podem ser cepas modificadas geneticamente.

Tabela 5: Celulases comerciais microbianas produzidas por diferentes empresas.

| Enzimas | Fornecedor | Fonte |
|------------------------|------------------|---|
| Cellubrix (Celluclast) | Novozymes | <i>T. longibrachiatum</i> e <i>A. niger</i> |
| Novozymes 188 | Novozymes | <i>A. niger</i> |
| Cellulase 2000L | Rhodia-Danisco | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Rohament CL | Rohm-AB Enzymes | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Viscostar 150L | Dyadic | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Bio-feed beta L | Novozymes | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Energex L | Novozymes | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Ultraflo L | Novozymes | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Viscozyme L | Novozymes | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Cellulyve | 50L Lyven | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| GC 440 | Genencor-Danisco | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| GC 880 | Genencor | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Spezyme CP | Genencor | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| GC 220 | Genencor | <i>T. longibrachiatum/T. reesei</i> |
| Accelerase®1500 | Genencor | <i>T. reesei</i> |
| Cellulase AP30K | Amano Enzyme | <i>A. niger</i> |
| Cellulase TRL | Solvay Enzymes | <i>T. reesei/T. longibrachiatum</i> |
| Econase CE | Alko-EDC | <i>T. reesei/T. longibrachiatum</i> |
| Cellulase TAP106 | Amano Enzyme | <i>T. viride</i> |
| Biocellulase TRI | Quest Intl. | <i>T. reesei/T. longibrachiatum</i> |
| Biocellulase A | Quest Intl. | <i>A. niger</i> |

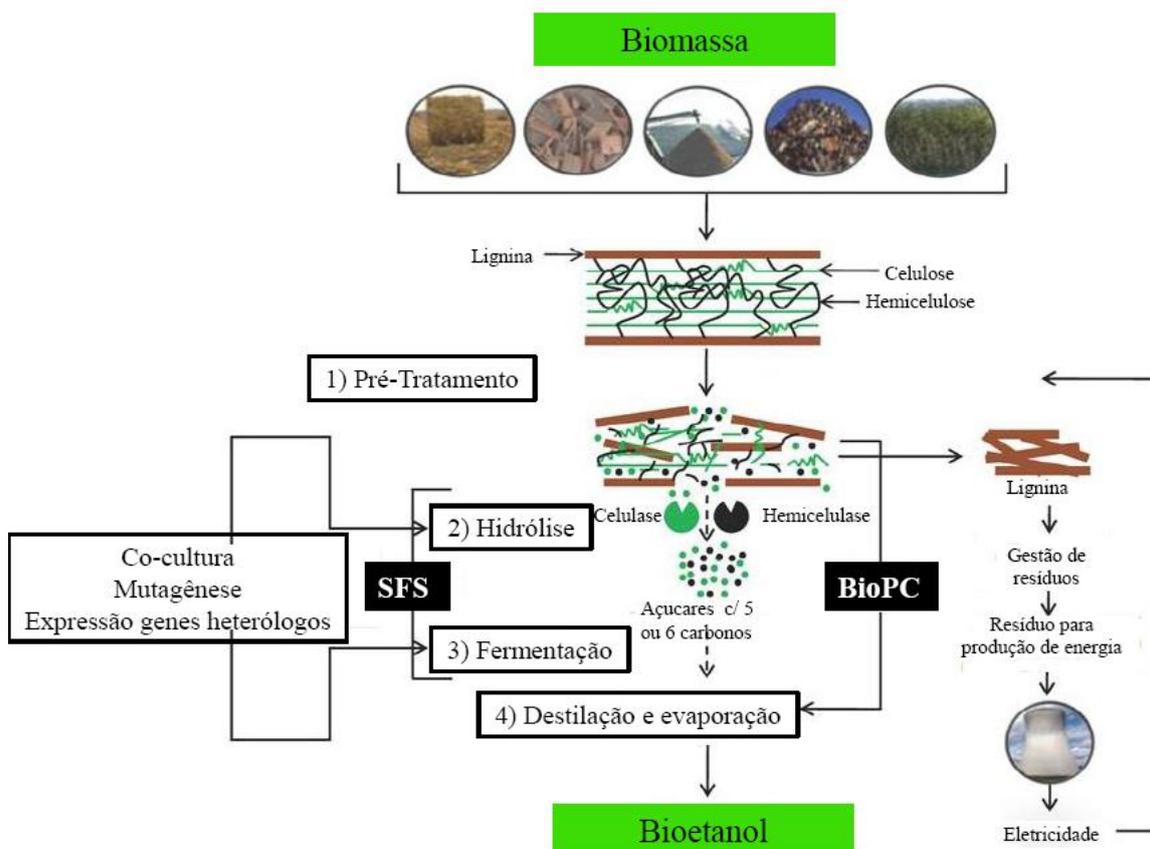
Fonte: Singhanian et al. (2010)

2.5 Bioconversão e aspectos biotecnológicos da degradação de materiais lignocelulósicos

A bioconversão de resíduos lignocelulósicos para materiais valiosos, como o etanol de segunda geração é mais complicada do que a bioconversão de resíduos à base de amido e, portanto, requer quatro etapas de tratamento, dos quais os três primeiros são bio-processos relacionados e o quarto é essencialmente um processo de engenharia química que não será discutido em grande detalhe; i) pré-tratamento; ii) depolimerização (sacarificação) de celulose e hemicelulose sem açúcares solúveis (hexoses e pentoses) por um processo conhecido como hidrólise; iii) a conversão destes açúcares monoméricos para produtos valiosos tais como o etanol em um processo de fermentação e iv) separação e

purificação dos produtos (Figura 6). A fim de melhorar o rendimento, cada passo no processo de bioconversão tem que ser otimizado. Além disso, a integração de processos tem de ser considerado, a fim de minimizar a demanda de energia de processo (HAHN-HAGERDAL et al., 2006). Para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos em cada etapa, serão discutidos abaixo cada um dos itens da bioconversão.

Figura 6: Esquema para a conversão de biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração, incluindo os principais passos.



Fonte: Dashtban et al. (2009).

2.5.1. Pré-tratamento

É necessário o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos porque do contrário a hidrólise é lenta, resultando assim no baixo rendimento do produto. Alguns métodos de pré-tratamento aumentam o tamanho dos poros e reduzem a cristalinidade da celulose (Figura 6). O pré-tratamento da celulose a torna mais acessível às enzimas celulolíticas, o que reduz a quantidade de enzima necessária e, portanto, os custos (MOSIER et al., 2005).

No método de pré-tratamento químico com ácido, por exemplo, hemiceluloses são atingidas, enquanto no pré-tratamento catalisado por bases, é removida principalmente a lignina. Já que muitas enzimas celulolíticas obtidas por fungos (fungos derivados celulasas e β -glicosidasas) trabalham em pH baixo (geralmente 4-5), o pré-tratamento ácido parece ser a melhor opção quando enzimas de fungos são escolhidas para a hidrólise (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

Além disso, alguns dos principais fatores que afetam a taxa de degradação biológica de material lignocelulósico pelas enzimas são: cristalinidade da celulose, sua área superficial acessível e proteção por lignina e hemicelulose, grau de polimerização da celulose e o grau de acetilação de hemiceluloses (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Vários métodos têm sido introduzidos para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos antes da hidrólise enzimática. Estes métodos são classificados em pré-tratamento físico (moagem, irradiação, hidrotérmico, vapor de alta pressão, pirólise); pré-tratamento físico-químico (explosão a vapor, explosão a vapor com adição de SO₂ ou CO₂, água quente, agentes oxidantes, extração com solvente de lignina); pré-tratamento químico (hidrólise ácida ou alcalina); e pré-tratamento biológico (fungos e actinomicetos), embora nem todos tenham se desenvolvido o suficiente para ser viável em aplicações de processos de grande escala (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

O pré-tratamento a vapor é um dos métodos mais investigados para a bioconversão. Estudos demonstram que o rendimento de açúcar e a taxa de hidrólise aumentaram após os substratos serem pré-tratados a vapor, seguidos da deslignificação (PAN et al., 2004; KUMAR et al., 2010).

2.5.2. Hidrólise

Depois do pré-tratamento, celulose e hemiceluloses são hidrolisados em açúcares solúveis monoméricos (hexoses e pentoses) utilizando celulasas e hemicelulasas, respectivamente (Figura 6).

2.5.3. Fermentação

No processo de fermentação, os produtos hidrolisados incluindo hexoses monoméricas (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) serão

fermentados para produtos de valor tais como o etanol de segunda geração (Figura 6). Entre estes produtos hidrolisados, a glicose é normalmente o mais abundante, seguida por xilose ou manose e outros açúcares de menor concentração. *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo frequentemente e tradicionalmente usado para a fermentação de etanol à base de amido de resíduos em escala industrial (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

A *S. cerevisiae* tem algumas vantagens como a sua ampla aceitação, isto porque a alta taxa de fermentação e a tolerância ao etanol o tornam um bom candidato para processos de fermentação. No entanto, esta levedura é incapaz de utilizar eficientemente xilose como única fonte de carbono ou fermentá-la a etanol (CHU e LEE, 2007). Para a bioconversão lignocelulósica industrial ser economicamente viável, é necessário escolher micro-organismos capazes de fermentar glicose e xilose. Portanto, muitas tentativas bem sucedidas foram feitas para melhorar a fermentação de xilose em *S. cerevisiae* (SCHNEIDER et al., 1981). Além de xilose, *S. cerevisiae* também é incapaz de fermentar arabinose, a não ser suplementado com meio enriquecido (McMILLAN e BOYNTON, 1994).

Como mostra a Figura 6, as duas últimas etapas da bioconversão de resíduos pré-tratados lignocelulolíticos a etanol (hidrólise e fermentação) podem ser realizadas separadamente (HFS) (indicado pelas setas pontilhadas) ou através da sacarificação e fermentação simultaneamente (SFS).

Na Hidrólise e Fermentação em Separado (HFS), a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da biomassa para a hidrólise e solubilização da hemicelulose, ocorre num estágio separado da fermentação, bem como a produção de celulasas que são utilizadas na hidrólise da celulose. Neste tipo de estratégia os açúcares provenientes da hemicelulose após o pré-tratamento podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado, sendo o sólido remanescente, denominado celulignina, encaminhado para a hidrólise da celulose (PEREIRA Jr. et al., 2008). A vantagem deste método é que ambos os processos podem ser otimizados individualmente (por exemplo, temperatura ideal para a hidrólise é de 45-50 °C, e para a fermentação é de 30 °C). Por outro lado, a principal desvantagem é a inibição do complexo celulásico pelos açúcares liberados na hidrólise, principalmente celobiose e glicose que se acumulam no meio, conferindo uma hidrólise incompleta da celulose e rendimentos não muito altos (PHILIPPIDIS et al., 1993).

Na Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS), a hidrólise enzimática e a fermentação das hexoses (açúcares C6) ocorrem na mesma etapa, enquanto a hidrólise da

hemicelulose ocorre em etapa diferente, bem como a produção das celulases (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). Essa estratégia de processo apresenta inúmeras vantagens, dentre elas: a redução da inibição das celulases pelos seus produtos de hidrólise, uma vez que os glicídios não se acumulam no meio; menor complexidade e custo do processo, comparado ao SHF, pois reduz o número de reatores; minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre no meio; e maiores rendimentos de hidrólise, já que o equilíbrio das reações enzimáticas é deslocado no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida (VÁSQUEZ et al., 2007). No entanto, a principal desvantagem da SFS é a necessidade de comprometer as condições de processamento tais como temperatura e pH abaixo do ideal para cada etapa individual.

A integração de processos ainda pode ser encontrada por um processo conhecido como Bioprocessamento Consolidado (BioPC), que visa minimizar todos os passos de bioconversão em uma única etapa, em um reator único usando um ou mais micro-organismos. A operação BioPC com a produção de celulase, a hidrólise de celulose/hemicelulose e fermentação de açúcares com 5 ou 6 carbonos em uma única etapa têm mostrado o potencial de fornecer o menor custo para a conversão biológica de biomassa celulósica para combustíveis (Figura 6) (LYND et al., 2005).

2.6 Considerações finais

Com base no apresentado no decorrer deste capítulo, alguns aspectos são evidenciados. Há um grande interesse industrial na obtenção de celulases e hemicelulases devido a suas potenciais aplicações, melhorando a qualidade de produtos, reduzindo os gastos energéticos, proporcionando um melhor aproveitamento das matérias-primas e ainda na busca da redução de impacto ambientais através de tecnologias limpas e economicamente acessíveis.

A produção de etanol de segunda geração, obtida a partir de biomassa lignocelulósica biodegradada por enzimas lignocelulolíticas é uma alternativa que evitaria a expansão desmedida das áreas de cultivo de grandes culturas, destinadas à produção de alcoóis e outros produtos, através do uso de recursos renováveis. No entanto, um dos grandes desafios é otimizar a integração da engenharia de processo, tecnologia de fermentação, engenharia de enzimas e engenharia metabólica.

A bioprodução de enzimas lignocelulotícas, pode ser realizada por cultivos submersos (FS), e em estado sólido (FES), o qual vem recebendo maior atenção como opção para fermentação por apresentar uma série de características favoráveis. Destaque especial deve ser feito à utilização de resíduos agroindustriais, como fonte de nutrientes nestes processos, na sua forma natural por possibilitar ao micro-organismo um ambiente favorável à produção dos metabólitos de interesse, como neste caso as celulases e xilanases. Por este motivo, tem-se intensificado a busca por micro-organismos e meios para bioprodução com condições ideais que resultem em enzimas e ou um *pool* enzimático que sejam altamente eficientes permitindo a sua utilização em diversos setores industriais.

Por isso, a busca por fontes renováveis de energia como o etanol de segunda geração, e de alternativas ao uso do petróleo está mobilizando internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental.

3.1 Caracterização parcial do complexo celulolítico comercial NS 50013

O complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (NS 50013) utilizado como primeira etapa da pesquisa foi doado pela Novozymes Latin América (Brasil). Para tanto como conhecimento e validação de metodologia, utilizou-se o método de dosagem da atividade de celulase total em papel de filtro (FPA – Filter Paper Activity) segundo método de Ghose (1987).

O estudo da caracterização da enzima foi realizado em termos de temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo e estabilidade de pH. Além disso, foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$. A atividade enzimática da celulase foi determinada como descrito no item 3.1.6.

3.1.1 Temperatura e pH ótimos sobre a atividade da celulase

A temperatura e pH ótimos na dosagem da atividade enzimática foram avaliados por meio de dois delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCRs). No primeiro DCCR foi avaliado o efeito da temperatura e pH na faixa de 40 a 70 °C e 4,5 a 5,5, respectivamente, utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M. Pela análise dos efeitos do primeiro DCCR, foi realizado um segundo DCCR para avaliar os efeitos da temperatura e pH na faixa de 35 a 60 °C e 5,2 a 8,0, respectivamente, utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 M. A Tabela 6 apresenta os níveis das variáveis independentes investigados nos dois DCCRs. A atividade da celulase foi determinada como descrito no item 3.1.6 e sua unidade foi expressa em $U.mL^{-1}$.

Tabela 6: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização da atividade nos dois delineamentos experimentais (DCCRs).

| Variáveis Independentes / Níveis | -1,41 | -1 | 0 | 1 | 1,41 |
|------------------------------------|-------|------|------|------|------|
| Primeiro delineamento experimental | | | | | |
| pH | 4,5 | 4,6 | 5,0 | 5,4 | 5,5 |
| Temperatura (°C) | 40,0 | 44,4 | 55,0 | 65,6 | 70,0 |
| Segundo delineamento experimental | | | | | |
| pH | 5,2 | 5,6 | 6,6 | 7,6 | 8,0 |
| Temperatura (°C) | 35,5 | 39,0 | 47,0 | 56,0 | 60,0 |

3.1.2 Determinação da energia de ativação da enzima

Para a determinação da energia de ativação da enzima, foi determinada a atividade da celulase em uma faixa de temperatura de 30 a 65 °C em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5. A energia de ativação foi calculada com base na equação de Arrhenius (Equação 1), descrita a seguir:

$$\ln A = \ln K - \frac{Ea}{RT} \quad (1)$$

sendo que:

A = atividade da enzima obtida em cada temperatura

K = constante de proporcionalidade

Ea = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (8,314 J.mol⁻¹K.⁻¹)

T = temperatura absoluta (K)

3.1.3 Inativação térmica da celulase

O tratamento de inativação térmica foi realizado em banho-maria, na faixa de 30 a 70 °C em pH 5,5, com tampão acetato de sódio 0,2 M. A inativação enzimática, muitas vezes segue a cinética de primeira ordem (ANTHON e BARRET, 2002; MAZUTTI et al., 2007; \). Sob condições isotérmicas e isobáricas, a diminuição da atividade da enzima em função do tempo de tratamento pode ser descrita pela Equação 2:

$$A = A_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

onde k é a taxa de inativação constante; A_0 e A são a atividade inicial da enzima e a atividade remanescente após o aquecimento pelo tempo t , respectivamente.

É comum expressar reações de primeira ordem em termos do valor D (MAZUTTI et al., 2007; RISSO et al., 2010). O tempo de redução decimal, ou D , é definido como o tempo, à temperatura e pressão constantes, necessários para uma redução de 90% da atividade inicial. Para as reações de primeira ordem, o D é inversamente proporcional à constante de inativação:

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (3)$$

A energia de desativação também foi calculada com base na equação de Arrhenius, conforme:

$$\ln k = \ln K - \frac{Ed}{RT} \quad (4)$$

sendo que:

k = constante de desativação da enzima

K = constante de proporcionalidade

Ed = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (8,314 J.mol⁻¹.K.⁻¹)

T = temperatura absoluta(K)

Outro parâmetro frequentemente utilizado para representar a inativação de micro-organismos é o parâmetro z , que expressa a variação da taxa de desativação de enzimas com a temperatura, o que representa um aumento de temperatura necessária para reduzir 90% do tempo de redução decimal. A relação entre o tempo de inativação de enzimas e a temperatura é apresentada na seguinte equação, onde o tempo de redução decimal é plotado em um gráfico como uma função da temperatura. É visto um comportamento linear, onde z é dado por:

$$\log(D) = \frac{1}{z} \cdot (T - T_{ref}) + \log(D_{ref}) \quad (5)$$

sendo que T e T_{ref} são a temperatura do tratamento e a temperatura de referência (ambas em °C), respectivamente, D e D_{ref} são o tempo de redução decimal à temperatura do sistema e à temperatura de referência (ambas em horas), respectivamente. Neste trabalho, adotou-se a temperatura de referência de 50 °C, que corresponde à temperatura ótima para atividade da enzima.

3.1.4 Efeito do pH na estabilidade da enzima

O efeito do pH na estabilidade enzimática foi investigado nas faixas de 3,5-5,5 usando tampão acetato de sódio 0,2 M a 50 °C.

3.1.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten

Ensaio com $1,5 \text{ FPU}\cdot\text{mL}^{-1}$ de celulase foram realizados em tampão acetato de sódio $0,2 \text{ M}$ pH $5,5$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em diferentes concentrações de substrato: $5 - 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que o tempo de reação foi de 60 minutos para cada substrato. Os substratos usados foram: papel de filtro, bagaço de cana, casca de soja, casca de arroz, palha de trigo, inhame e yacon. As constantes K_m e $V_{\text{máx}}$ foram determinados para cada substrato estudado pela linearização utilizando o método de Lineweaver-Burk:

$$v = \frac{v_{\text{máx}}[S]}{k_m[S]} \quad (6)$$

Linearizando-se a Equação 6 tem-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{\text{máx}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\text{máx}}} \quad (7)$$

O resíduo agroindustrial mais adequado para a reação enzimática foi determinado pela análise dos parâmetros da equação de Michaelis-Menten. Do ponto de vista industrial, é desejável em reações enzimáticas, uma taxa constante e máxima, que só poderia ser obtida em baixas concentrações de substrato. Neste sentido, a equação de Michaelis-Menten poderia ser disposta em uma forma simplificada, conforme:

$$v = v_{\text{máx}} \cdot \frac{S}{k_m + S} = \frac{v_{\text{máx}}}{k_m} \cdot S = \alpha \cdot S \quad (8)$$

sendo que α (min^{-1}) representa uma constante expressando a relação entre a taxa de reação máxima ($V_{\text{máx}}$) e constante de saturação (K_m). Quanto mais alto o valor de α , mais adequado é o substrato para a reação enzimática, uma vez que é desejável alta taxa de reação e baixos valores para a constante de saturação, pois indica alta afinidade da enzima pelo substrato.

3.1.6 Atividade de hidrólise em papel de filtro (FPase)

Seguindo a proposta de Ghose (1987), com algumas alterações, foram pesados 50 mg de papel de filtro Whatman número 1 (fonte de celulose) e adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,5. Um volume de 1 mL da solução enzimática foi adicionado ao tubo em banho termostático a 50 °C por 1 hora. A liberação de açúcares redutores foi medida pelo método DNS (MILLER, 1959). Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, $U = \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$.

3.2 Produção de celulasas e hemicelulasas por Fermentação em Estado Sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais

3.2.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

O micro-organismo utilizado para produção de celulasas e hemicelulase foi o *Trichoderma reesei* NRRL 3652, obtido da ARS Culture Collection (NRRL). A cepa do fungo filamentosos foi cultivada em meio Potato Dextrose Agar durante 7 dias a 30 °C. A coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro estéreis adicionadas ao frasco, para uma melhor remoção dos esporos. A suspensão resultante, quando não utilizada de imediato, era armazenada a 4 °C, por um tempo máximo de 15 dias. Para a contagem dos esporos, 1 mL da suspensão, retirada assepticamente, foi diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão resultante foi transferida para uma câmara de Neubauer (Inlab) para contagem dos esporos (FREIRE, 1996). A concentração da suspensão foi ajustada para se alcançar 1×10^7 esporos.g⁻¹ de substrato seco (DHILLON et al., 2011).

3.2.2 Obtenção dos substratos

Os substratos utilizados no processo fermentativo para a produção de celulasas e hemicelulase por FES foram: casca de arroz (CA), que é um subproduto do processo de beneficiamento do arroz, obtido em uma indústria de parboilização de arroz (Josapar Pelotas, RS); casca de soja (CS), que consiste no resíduo da extração do óleo de soja, obtido após a prensagem de grãos e extração com solventes, doado por uma indústria de

óleo de soja local (Olfar, Erechim, RS); bagaço de cana (BC), adquirido na Cooperativa Tritícola de Erechim Ltda (Erechim, RS); e pó do palito de erva mate (PPE), que é um resíduo do processamento da erva mate obtido após o peneiramento do palito moído, sendo a menor granulometria da peneira, doado por uma indústria de erva mate (Barão Comércio e Indústria de Erva Mate Ltda., Barão de Cotegipe, RS). Todos os substratos foram estocados à temperatura ambiente e utilizados sem tratamento prévio.

A caracterização dos substratos-suporte foi realizada determinando-se a umidade, carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e cinzas.

3.2.3 Análise elementar

A análise elementar das amostras foi realizada em equipamento CHNS - TRUSPEC Micro (LECO) 4277 na Central de Análises, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (EQA-UFSC).

As amostras foram trituradas, homogeneizadas, classificadas em peneira Tyler 60 mesh (<0,250 mm) e secas em estufa. Dois miligramas de amostra foram pesados em microbalança (Sartorius, Modelo CP2P, precisão 0,001 mg) em cápsulas de estanho e seladas. A cápsula contendo a amostra foi queimada a 1100 °C em um analisador elementar de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) (LECO, Modelo TRUSPEC Micro CHNS). O teor de cinzas foi determinado após a queima das amostras em uma mufla a 550°C por 6 h. A umidade foi determinada pelo método da AOAC 934.01, o qual se baseia na secagem em estufa a 105°C até a amostra atingir peso constante. As análises foram realizadas em duplicatas. O teor de oxigênio foi calculado por diferença conforme recomendado por Bech et al. (2009), e apresentado na Equação 9:

$$O(\%) = 100 - C(\%) - H(\%) - N(\%) - S(\%) - CZ(\%) \quad (9)$$

Sendo que:

O = teor de oxigênio (%);

C = teor de carbono (%);

H = teor de hidrogênio (%);

N = teor de nitrogênio (%);

S = teor de enxofre (%);

CZ = teor de cinzas (%).

3.2.4 Avaliação cinética para a produção de celulases e hemicelulase em diferentes substratos

As fermentações em estado sólido (FES) foram conduzidas em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de substrato seco com umidade ajustada para 70 % com água destilada (DESWAL et al., 2011). Após a esterilização (121 °C, 15 min), procedeu-se à inoculação do substrato utilizando-se 2 mL de inóculo com 1×10^7 esporos.g⁻¹ de substrato seco. Os béqueres com os substratos lignocelulósicos bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e a mistura de casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) foram preparados como descrito acima e em seguida, incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410) a 30 ± 1 °C, com injeção de ar úmido segundo Dhillon et al. (2011).

O comportamento cinético do processo de produção de celulases e xilanase foi acompanhado, realizando análise de amostras destrutivas do fermentado em 0; 3; 6; 9; 12 e 15 dias e as análises enzimáticas determinadas em duplicata segundo os procedimentos descritos nos itens 3.2.6, 3.2.7 e 3.2.8.

3.2.5 Processo de extração das enzimas FPase, carboximetilcelulase (CMCase) e xilanase

O processo de extração foi realizado em erlenmeyeres de 250 mL, onde ao meio fermentado foi adicionado tampão citrato de sódio 0,5 M pH 5,5 na razão 1:15 (3,33 g de substrato fermentado para 50 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 30 min a 50 °C e 100 rpm em agitador orbital. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato enzimático bruto conforme, Dhillon et al. (2011) com modificações.

Todas as determinações de atividades enzimáticas foram realizadas em duplicata e determinadas segundo procedimento descrito nos itens 3.2.6; 3.2.7 e 3.2.8.

3.2.6 Determinação da atividade de FPase

Para a enzima celulase, a atividade é determinada como atividade de papel filtro (FPA) e expressa em unidades de papel filtro (FPU – *Filter Paper Units*) por volume de enzima original, como recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987). Durante as reações,

parte da concentração da glicose pode vir da própria enzima e/ou do substrato, uma vez que o complexo enzimático pode conter açúcares nutrientes, assim como as extremidades da celulose podem, às vezes, ser quantificadas como glicose antes de todo o ataque da enzima. Por esta razão, os tubos controle, que consistem (a) na enzima sem substrato e (b) no substrato sem enzima, são incluídos durante as análises das amostras e têm seus valores de absorvância subtraídos dos valores das absorvâncias lidas em cada um dos tubos reacionais.

Assim, a quantificação da glicose pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), envolveu quatro categorias de reações: (1) tubos das amostras a serem quantificadas (atividade enzimática); (2) tubo do branco reacional (para zerar o espectrofotômetro); (3) tubos controle da enzima (extrato enzimático sem substrato); e (4) tubos controle do substrato (substrato sem extrato enzimático).

Em cada tubo de ensaio adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 e em seguida, 50 mg de papel filtro enrolado em forma espiral (tiras de aproximadamente $1,0 \times 6,0$ cm de papel filtro Whatman nº 1), tomando o devido cuidado para que este fique saturado pelo tampão. Os tubos foram colocados em um banho termostático a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que a temperatura se equilibre. Após 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL de extrato enzimático e os tubos foram incubados por exatamente 60 minutos. Ao final deste período, os tubos foram removidos e em 0,5 mL do meio reacional adicionou-se 0,5 mL do reagente DNS com leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Ao final, adicionou-se 8 mL da solução estabilizante (tartarato de sódio e potássio) e os tubos foram homogeneizados. Para o preparo do tubo do branco reacional, adicionou-se 1,5 mL do tampão citrato e após os 60 minutos de reação aplicou-se o método DNS como descrito anteriormente.

Para o preparo dos tubos controle da enzima, adicionou-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL do extrato enzimático, que ao final do tempo reacional, teve a reação paralisada com a adição do tartarato de sódio e potássio. O tubo controle do substrato foi preparado adicionando-se 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de filtro de papel enrolado em espiral, que ao final de 60 minutos, também foi analisado pelo método DNS. A curva padrão para o teste de FPase foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de $6,7\text{-}0,1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As leituras foram plotadas em um gráfico (Absorvância X Concentração

de glicose), obtendo-se assim a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A partir da Equação 10 calculou-se a atividade enzimática:

$$U.\text{mL}^{-1} = AR \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad (10)$$

Sendo que:

AR = açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise (mg.mL^{-1});

V_T = volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume de extrato enzimático bruto) (mL);

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

T_H = tempo de hidrólise (60 minutos);

0,18 = 1 μmol de glicose (mg).

3.2.7 Determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade celulolítica CMCase foi determinada pela medida dos açúcares redutores produzidos durante a incubação de 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL de carboximetilcelulose (na forma de sal sódico) 2% (m/v) em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8, a 50 °C durante 30 minutos (GHOSE, 1987). Os açúcares redutores produzidos foram determinados espectrofotometricamente, pelo método do DNS (MILLER, 1959), e a quantificação da glicose envolveu quatro categorias de reações: (1) tubos das amostras a serem quantificadas (atividade enzimática); (2) tubo do branco reacional (para zerar o espectrofotômetro); (3) tubos controle da enzima (extrato enzimático sem substrato); e (4) tubos controle do substrato (substrato sem extrato enzimático).

A curva padrão para o teste de carboximetilcelulase foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de 6,7-0,1 mg.mL^{-1} . As leituras foram plotadas em um gráfico (Absorbância X Concentração de glicose), obtendo-se assim a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, $U = \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$. A partir da Equação 11 calculou-se a atividade enzimática:

$$U.\text{mL}^{-1} = AR \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad (11)$$

Sendo que:

AR = açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise (mg.mL^{-1});

V_T = volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume de extrato enzimático bruto) (mL);

V_C = volume de extrato enzimático bruto na hidrólise (mL);

T_H = tempo de hidrólise (30 minutos);

0,18 = $1\mu\text{mol}$ de glicose (mg).

3.2.8 Determinação da atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana “birchwood” (Sigma), conforme descrito por Bailey et al. (1992). Os açúcares redutores (como a D-xilose) foram dosados espectrofotometricamente, pelo método do DNS (MILLER, 1959), envolvendo quatro categorias de reações: (1) tubos das amostras a serem quantificadas (atividade enzimática); (2) tubo do branco reacional (para zerar o espectrofotômetro); (3) tubos controle da enzima (extrato enzimático bruto sem substrato); e (4) tubos controle do substrato (substrato sem extrato enzimático bruto).

A solução de xilana 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5,3, foi previamente aquecida, adicionando-se 1,8 mL da solução em tubos que são incubados em banho termostatizado, a 50 °C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 200 μL do extrato enzimático bruto, incubando-se a mistura por 5 minutos. Desta, retirou-se 0,5 mL, que foram adicionados a 0,5 mL de DNS. Esta reação foi conduzida em banho de água fervente por 5 minutos, sendo paralisada com o resfriamento da solução em banho de gelo. Após a adição de 8 mL da solução tartarato de sódio e potássio, a absorbância das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm, contra um branco reacional.

A curva padrão para o teste de xilanase foi estabelecida utilizando-se xilose nas concentrações de 5,0-0,1 mg.mL^{-1} . As leituras foram plotadas em um gráfico (Absorbância

X Concentração de xilose), obtendo-se assim a equação da reta que foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática.

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores, expressos como xilose, por mL por minuto, a 50°C.

Como fins comparativos e de padronização para os ensaio de produção, as atividades enzimáticas finais para FPase, carboximetilcelulase e xilanase, foram expressas em produção enzimática por grama de substrato seco ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) de acordo com a Equação 12:

$$U\cdot\text{g}^{-1} = \frac{[\text{enzima}] \times V_{\text{tampão}}}{M} \quad (12)$$

Sendo que:

[enzima] = atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$);

$V_{\text{tampão}}$ = volume de tampão na extração (mL);

M = massa de substrato seco (g).

3.3 Caracterização parcial de celulasas e xilanase obtidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja

Para esta etapa, o extrato enzimático bruto foi obtido da condição experimental ótima determinada em etapa anterior da pesquisa da fermentação em estado sólido usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652. Este estudo foi realizado em termos de temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo e estabilidade de pH. Além disso, foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{\text{máx}}$. As atividades enzimáticas de FPase, carboximetilcelulase e xilanase foram determinadas como descrito nos itens 3.2.6; 3.2.7 e 3.2.8, respectivamente e suas unidades foram expressas em $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.3.1 Temperatura e pH ótimos sobre a atividade de FPase, CMCase e xilanase de *Trichoderma reesei* NRRL 3652 fermentado em casca de soja

A temperatura e pH ótimo na dosagem da atividade enzimática foram avaliados por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Para tanto, foi avaliado o efeito da temperatura e pH na faixa de 40 a 70 °C e 3,0 a 6,2, respectivamente, para ambas

enzimas utilizando tampão citrato de sódio 0,05 M. A Tabela 7 apresenta os níveis das variáveis independentes investigados no DCCR.

Tabela 7: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das atividades no delineamento experimental (DCCR).

| Variáveis Independentes / Níveis | -1,41 | -1 | 0 | 1 | 1,41 |
|----------------------------------|-------|------|------|------|------|
| pH | 3,0 | 3,5 | 4,6 | 5,7 | 6,2 |
| Temperatura (°C) | 40,0 | 44,4 | 55,0 | 65,6 | 70,0 |

3.3.2 Efeito da estabilidade térmica de FPase, CMCase e xilanase de *Trichoderma reesei* NRRL 3652 fermentado em casca de soja

A estabilidade térmica de FPase, carboximetilcelulase e xilanase foram testadas incubando o extrato enzimático bruto em tampão citrato 0,05 M a pH 4,6 nas temperaturas 40; 50; 60 e 70 °C. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo, para as respectivas medidas de atividade. O estudo foi interrompido quando foi verificado a perda de mais de 50% da sua atividade enzimática em relação atividade inicial.

3.3.3 Efeito do pH na estabilidade de FPase, CMCase e xilanase de *Trichoderma reesei* NRRL 3652 fermentado em casca de soja

A estabilidade de pH de FPase, carboximetilcelulase e xilanase foram testadas incubando o extrato enzimático bruto em tampão citrato de sódio 0,05 M nas faixas de pH 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 a uma temperatura de 55 °C. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo medindo-se as respectivas atividades enzimáticas.

3.3.4 Efeito da estabilidade a baixas temperaturas de FPase, CMCase e xilanase de *Trichoderma reesei* NRRL 3652 fermentado em casca de soja

Amostras do extrato enzimático bruto foram armazenadas em temperaturas de -80; -10 e 4 °C e em determinados intervalos de tempo realizou-se medidas de atividade de FPase, carboximetilcelulase e xilanase a fim de acompanhar a estabilidade das respectivas enzimas.

3.3.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten

O efeito da concentração do substrato na velocidade das reações enzimáticas catalisadas por FPase, CMCCase e xilanase foi realizado avaliando-se a atividade enzimática em concentrações variáveis de substrato, em temperatura de 50 °C e tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 para FPase e CMCCase e pH 5,3 para xilanase. Os substratos utilizados foram papel filtro Whatman nº 1 (1-200 mg.mL⁻¹), carboximetilcelulose (1-100 mg.mL⁻¹) e xilana padrão de “birchwood” (1-30 mg.mL⁻¹) para a atividade de FPase, CMCCase e xilanase, respectivamente. Para a determinação dos parâmetros cinéticos, utilizou-se a Equação 7 do modelo de Lineweaver-Burk (1934), graficando-se 1/V em função de 1/S, e através da equação obtida dos dados linearizados, obteve-se o valor de K_m e V_{máx}.

3.4 Sacarificação de biomassa

A capacidade de sacarificação de diferentes resíduos agroindustriais pelo extrato enzimático bruto produzido por *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja foi avaliado. O extrato enzimático bruto foi filtrado em bomba de vácuo com o auxílio de papel filtro e continha atividade de 6,35 U.g⁻¹; 4,30 U.g⁻¹; 1228,52 U.g⁻¹ para FPase, CMCCase e xilanase, respectivamente. A sacarificação enzimática da casca de soja, bagaço de cana e casca de arroz (autoclavados por 15 minutos à 121 °C) sem nenhum tratamento foi realizada conforme Liu et al. (2011a) com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers do qual, 2 g do respectivo resíduo lignocelulósico foi adicionado em 100 mL da mistura reacional, contendo: 94 mL de tampão citrato de sódio 0,05M pH 5,3; 1 mL de tetraciclina (40µ.mL⁻¹), com o intuito de inibir a contaminação microbiana e 5 mL do extrato enzimático bruto. As reações foram realizadas em agitador orbital a 150 rpm e 50 °C por um período de 7 dias, do qual, amostras foram retiradas da mistura reacional em intervalos de 24 horas e a liberação de AR e glicose na hidrólise foram estimados usando o método do DNS e GOD-POD, conforme item 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente.

Ensaio sem substrato lignocelulósico e extrato enzimático bruto (enzima) foram realizados como controle. A % de sacarificação foi quantificada conforme a Equação 13:

$$\text{Sacarificação (\%)} = \frac{A_L \times 0,9}{P} \times 100 \quad (13)$$

Sendo que:

A_L = açúcar liberado (g)

0,9 = fator de correção para compensar adição de uma molécula de água durante a hidrólise

P = polissacarídeos no substrato lignocelulósico (g)

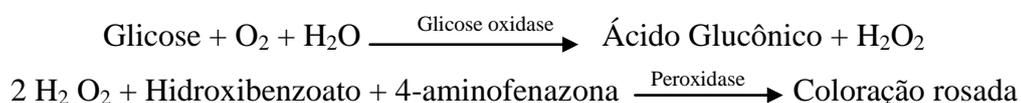
3.4.1 Quantificação dos açúcares redutores (AR)

Para a quantificação dos AR, adicionou-se 0,5 mL das amostras a serem quantificadas em 0,5 mL de DNS. Os tubos foram mantidos em um banho a 95 °C por 5 minutos para desenvolvimento da coloração avermelhada. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente pela imersão dos tubos em um banho de gelo fundente, adicionando-se em seguida 8 mL da solução estabilizante de tartarato de sódio e potássio tetra hidratado. Os tubos foram agitados para homogeneizar a solução e as leituras da absorbância, efetuadas no espectrofotômetro a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um tubo onde o volume da amostra foi substituído por água destilada. Para determinar a concentração dos AR em cada uma das amostras analisadas utilizou-se a curva-padrão de glicose.

3.4.2 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada de acordo com o método enzimático Glicose Oxidase/Peroxidase (GOD-POD), proposto por Keston (1956). Trata-se de um kit enzimático contendo um reativo mono-reagente pronto para uso, além de uma solução padrão de glicose com a concentração de 100 mg.dL⁻¹. O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando em peróxido de hidrogênio, o qual é subsequentemente usado na geração da coloração rosada pela peroxidase (POD).

A reação a seguir mostra as reações enzimáticas ocorridas para a quantificação da glicose.



Para a quantificação da glicose, adicionou-se 30 µL de cada uma das amostras em estudo em 1,0 mL do mono-reagente. Os tubos foram mantidos em um banho termostático a 37 °C por 10 minutos para que houvesse o desenvolvimento da coloração rosada e em seguida, efetuou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm.

Os tubos do branco da reação e do padrão de glicose foram feitos juntamente com os tubos das amostras. Para o branco adicionou-se 30 µL de água destilada em 1,0 mL do reagente enzimático e para o tubo padrão adicionou-se 30 µL da solução padrão de glicose (100 mg.dL⁻¹) em 1,0 mL do mono-reagente enzimático. Outra observação relevante do fabricante é que, quando a leitura do branco apresenta absorbância acima de 0,300, o mono-reagente deve ser descartado, já que isso indica uma deterioração do reativo de trabalho. A cor final da reação deverá ser estável por 60 minutos. Para determinar a concentração de glicose utilizou-se a solução padrão como calibrador e os cálculos foram realizados através da Equação 14.

$$\text{Glicose (mg.dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100 \quad (14)$$

3.5 Análise estatística

A tabulação dos resultados, cálculo de médias e desvio padrão foram realizados utilizando o Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Co). A análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, em nível de 95% de confiança, foi realizada empregando o software Statistica® 7.0 (STATSOFT, INC). A análise estatística dos efeitos e da interação entre as variáveis estudadas nos planejamentos propostos foram realizadas utilizando-se o software Statistica® 7.0 (STATSOFT, INC) em nível de confiança de 95%, (p<0,05).

4.1 Caracterização parcial da celulase NS 50013

4.1.1 Temperatura e pH ótimo sobre a atividade da celulase

O pH e a temperatura ótimos para atividade da celulase NS 50013 foram determinados através da execução de 2 delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCRs). No primeiro, utilizou-se tampão acetato de sódio 0,2 M e no segundo tampão fosfato de sódio 0,2 M, totalizando 11 experimentos cada DCCR (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes).

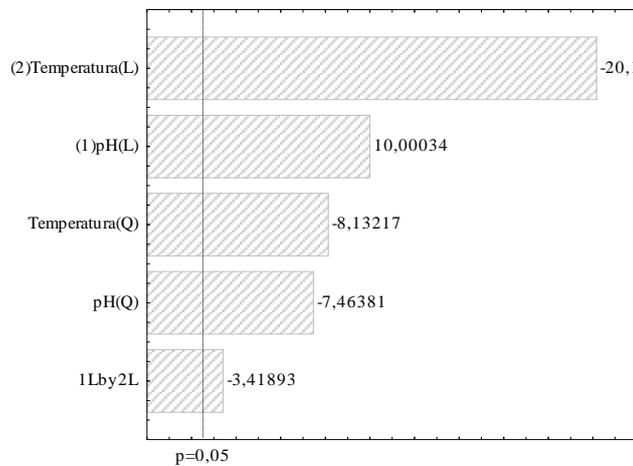
A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos no primeiro DCCR em relação a atividade da enzima em função da temperatura e pH utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M. Os valores de atividade da celulase NS 50013 obtidos experimentalmente variaram de 0,73 a 3,24 FPU.mL⁻¹ (ensaios 3 e 2, respectivamente).

Tabela 8: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática da celulase NS 50013 em função do pH e temperatura usando tampão acetato de sódio.

| Ensaio | pH | Temperatura (°C) | Atividade (FPU.mL ⁻¹) |
|--------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| 1 | 4,6 (-1) | 44,4 (-1) | 2,07 |
| 2 | 5,4 (1) | 44,4 (-1) | 3,24 |
| 3 | 4,6 (-1) | 65,6 (+1) | 0,73 |
| 4 | 5,4 (1) | 65,6 (+1) | 1,10 |
| 5 | 4,5 (-1,41) | 55,0 (0) | 1,32 |
| 6 | 5,5 (+1,41) | 55,0 (0) | 2,58 |
| 7 | 5,0 (0) | 40 (-1,41) | 3,02 |
| 8 | 5,0 (0) | 70 (+1,41) | 0,76 |
| 9 | 5,0 (0) | 55,0 (0) | 2,63 |
| 10 | 5,0 (0) | 55,0 (0) | 2,71 |
| 11 | 5,0 (0) | 55,0 (0) | 2,53 |

Os dados da Tabela 8 foram tratados estatisticamente com o objetivo de determinar os efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade enzimática. Os resultados são apresentados na Figura 7.

Figura 7: Efeitos dos parâmetros do modelo que representa a atividade da celulase NS 50013 obtidos no primeiro DCCR usando tampão acetato de sódio.



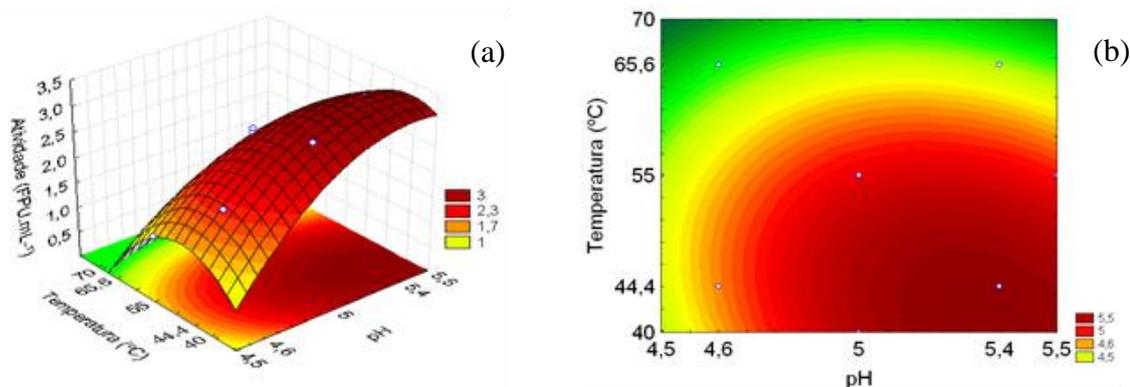
A análise estatística permitiu a construção de um modelo empírico e verificar que as variáveis avaliadas foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no intervalo avaliado. Os termos lineares de temperatura e pH mostraram que um aumento do pH e a diminuição da temperatura poderiam melhorar a atividade enzimática. Ambos os termos quadráticos apresentaram influência negativa sobre a atividade, indicando a presença de um ponto máximo. A Equação 15 representa o modelo codificado da atividade enzimática em função do pH e temperatura, que foi validado pela análise de variância (ANOVA) e apresentou um coeficiente de variação de 0,99, permitindo a construção do gráfico de contorno.

$$Y_{TAS} = 2,62 + 0,42 \cdot pH - 0,37 \cdot pH^2 - 0,84 \cdot T - 0,40 \cdot T^2 - 0,20 \cdot pH \cdot T \quad (15)$$

sendo que Y_{TAS} é a atividade enzimática calculada ($\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$) usando tampão acetato de sódio, pH e T são as variáveis codificadas independente.

A Figura 8 apresenta as curvas de contorno obtidas no primeiro DCCR usando tampão acetato de sódio. Como pode ser observado, a máxima atividade de celulase foi obtida a uma temperatura que varia de 40-50 °C e pH de 5,2-5,5. Esta região permite uma grande flexibilidade na utilização da enzima, uma vez que as variações em torno do ponto ótimo não afetam a atividade enzimática. Além disso, pode-se ver claramente que há uma tendência de que o aumento do pH e a diminuição da temperatura podem aumentar a atividade da enzima, como já verificado pela análise dos efeitos (Figura 7).

Figura 8: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) indicando a influência da temperatura e pH na atividade enzimática da celulase NS 50013 obtidos no DCCR usando tampão acetato de sódio.



Estes resultados estão dentro da faixa reportada para outras celulases comerciais. A celulase comercial Accelerase® 1500 tem um pH ótimo na faixa de 4,6-5,0 ficando inativa abaixo de pH 4,0 ou acima de pH 7,0. Geralmente a temperatura de 50 °C é empregada para a hidrólise por estas celulases (SUKUMARAN et al., 2009). Liu e Xia (2006) caracterizaram a celulase comercial de *Trichoderma viride* e obtiveram pH ótimo de 4,0 e 5,2 e uma temperatura ótima de 50 e 60 °C para atividade em carboximetilcelulose (CMC) e quitosana, respectivamente. Ko et al. (2010) obtiveram temperatura e pH ótimo de 60 °C e 7,0, respectivamente, para uma celulase não-comercial produzido por *Paenibacillus campinasensis*.

Resultado semelhante foi obtido por Lee et al. (2008) que encontraram temperatura ótima e pH de 50 °C e 7,0, respectivamente para uma celulase não-comercial produzida por *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3. Outros resultados semelhantes em termos de temperatura e pH ótimo para celulase otidos por fungos são relatados na literatura (RAN et al., 2009; JORDAN et al., 2011).

Com base nesses resultados, foi realizado um segundo DCCR modificando os níveis das variáveis como indicado, e os resultados são apresentados na Tabela 9. É importante ressaltar a necessidade de mudar-se o tampão, pois o tampão acetato de sódio atua na faixa de pH entre 3,6 - 5,6. Neste sentido, foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,2 M que é efetivo na faixa de pH 5,2-8,0.

Tabela 9: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática da celulase NS 50013 em função do pH e da temperatura usando tampão fosfato de sódio.

| Ensaio | pH | Temperatura (°C) | Atividade (FPU.mL ⁻¹) |
|--------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| 1 | 5,6 (-1) | 39,0 (-1) | 0,98 |
| 2 | 7,6 (1) | 39,0 (-1) | 0,77 |
| 3 | 5,6 (-1) | 56,0 (+1) | 1,12 |
| 4 | 7,6 (1) | 56,0 (+1) | 0,17 |
| 5 | 5,2 (-1,41) | 47,0 (0) | 1,02 |
| 6 | 8,0 (+1,41) | 47,0 (0) | 0,18 |
| 7 | 6,6 (0) | 35,0 (-1,41) | 0,81 |
| 8 | 6,6 (0) | 60,0 (+1,41) | 0,09 |
| 9 | 6,6 (0) | 47,0 (0) | 1,21 |
| 10 | 6,6 (0) | 47,0 (0) | 1,30 |
| 11 | 6,6 (0) | 47,0 (0) | 1,43 |

A atividade da celulase NS 50013 diminuiu (em média) em comparação com os obtidos no primeiro DCCR usando tampão acetato de sódio. Este resultado pode ser devido a alterações na forma iônica no tampão, o que pode alterar a estrutura terciária da enzima, com consequente alteração de atividade. Segundo Bailey e Ollis (1986), os grupos ionizáveis presentes na estrutura das enzimas fazem parte, geralmente, do sítio ativo. Assim, a enzima ativa cataliticamente atua somente em um estado de ionização definido. Além disso, variações no pH do meio resultam em mudanças na forma iônica do sítio ativo e em mudanças na atividade das enzimas. Mudanças no pH podem alterar a forma tridimensional da enzima (SHULER, 1992).

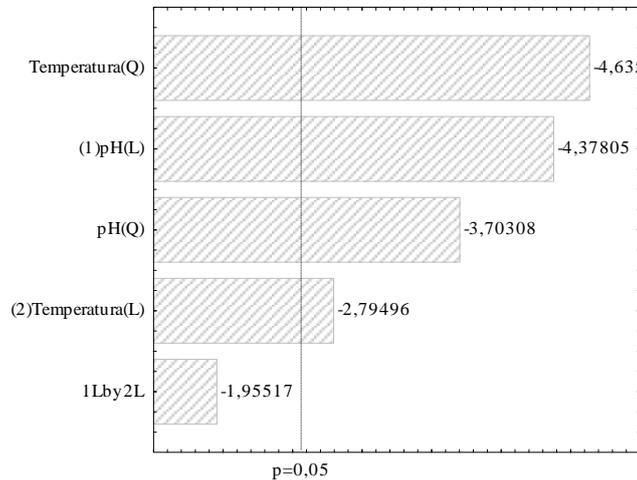
Os dados da Tabela 9 foram tratados estatisticamente para determinar os efeitos significativos ($p < 0,05$) dos parâmetros do modelo que representam a atividade da enzima e os resultados são apresentados na Figura 9 na forma de um gráfico de Pareto.

Pode-se notar que os termos lineares de temperatura e pH apresentaram efeitos negativos, indicando que o aumento dessas variáveis leva a uma diminuição da atividade enzimática. A Equação 16 representa o modelo quadrático codificado da atividade enzimática em função do pH e temperatura, que foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentando um coeficiente de variação de 0,92, permitindo a apresentação do gráfico de contorno.

$$Y_{TFS} = 1,31 - 0,29 \cdot pH - 0,30 \cdot pH^2 - 0,19 \cdot T - 0,37 \cdot T^2 - 0,19 \cdot pH \cdot T \quad (16)$$

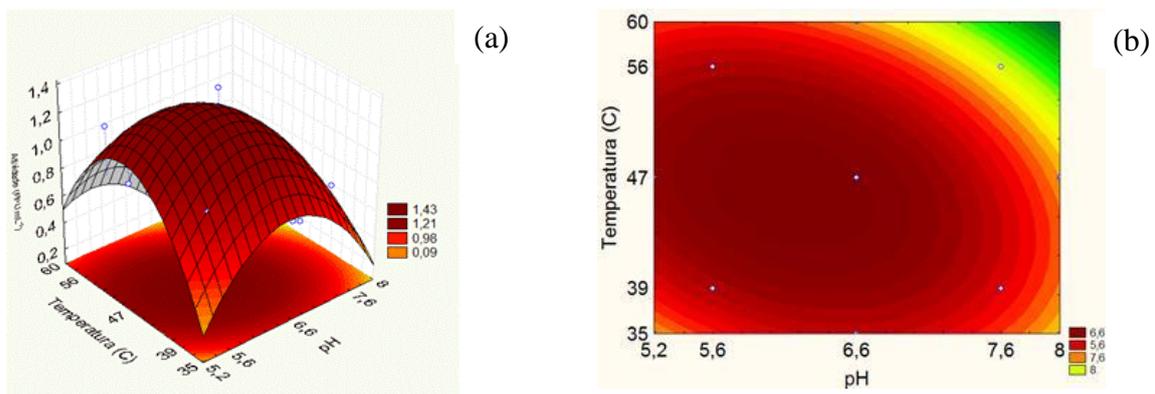
sendo que Y_{TFS} é a atividade enzimática calculada ($\text{FPU}\cdot\text{mL}^{-1}$) utilizando tampão fosfato de sódio, pH e T são as variáveis codificadas independente.

Figura 9: Efeitos dos parâmetros do modelo que representa a atividade da celulase NS 50013 obtida no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio.



As curvas de contorno obtidas no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio estão apresentadas na Figura 10. Como pode ser observado, a atividade máxima da celulase NS 50013 foi obtida em intervalos de temperatura e pH de 40-50 °C e 5,6-6,6, respectivamente. No entanto, essas atividades foram inferiores às obtidas no DCCR anterior. É importante observar a consistência dos resultados, já que a região ideal para a temperatura foi semelhante nos dois DCCR. Com base nos resultados obtidos no primeiro planejamento usando tampão acetato de sódio, verificou-se que a atividade ótima da celulase NS 50013 é obtida em uma faixa de pH entre 5,2-5,5.

Figura 10: Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) indicando a influência da temperatura e pH na atividade da celulase NS 50013 obtidos no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio.

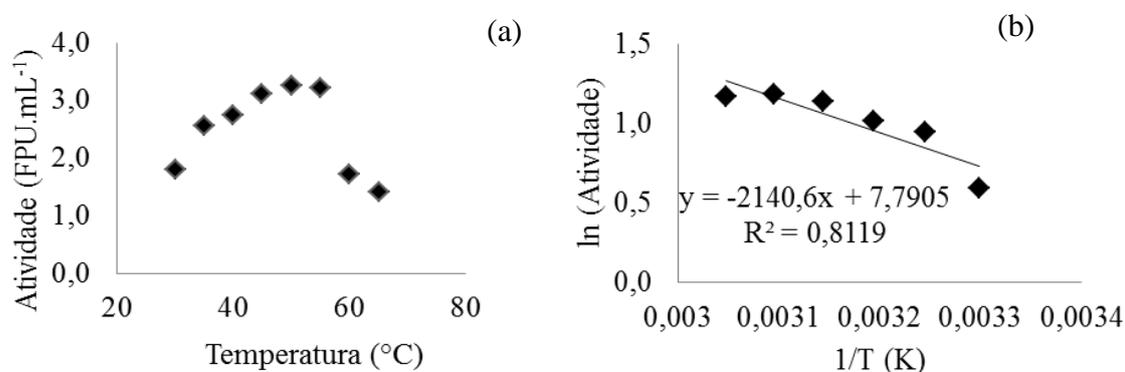


Cabe ressaltar que os resultados encontrados são interessantes em termos de processos, já que celulases ácidas são geralmente mais desejáveis para bioconversões, já que existem situações onde é empregado o pré-tratamento ácido da biomassa em uma faixa de pH 4,0-6,0 (SINGHANIA et al., 2010).

4.1.2 Determinação da energia de ativação para a celulase NS 50013

Para determinar a energia de ativação da celulase NS 50013 foram realizados experimentos entre 30 a 65 °C em tampão acetato 0,2 M pH 5,5, por 60 min. A Figura 11(a) apresenta os resultados obtidos, onde se observa o aumento da atividade até 50 °C, diminuindo em temperaturas acima deste valor. Os dados obtidos de 30-50 °C foram utilizados para estimar a energia de ativação para a celulase NS 50013 utilizando um gráfico de Arrhenius (Figura 11b).

Figura 11: (a) Influência da temperatura sobre a atividade enzimática da celulase NS 50013; (b) Determinação da energia de ativação baseada na linearização da equação de Arrhenius para uma faixa de temperatura de 30 - 50 °C.

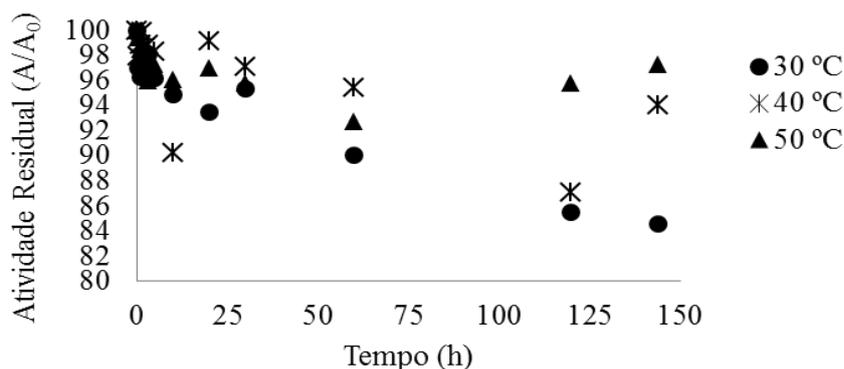


Neste trabalho obteve-se uma energia de ativação de $17,80 \pm 4,28 \text{ kJ. mol}^{-1}$. Do ponto de vista industrial, é desejável se obter valores baixos para a energia de ativação, uma vez que nesta condição a enzima é mais reativa. Khalili et al. (2011) relataram valores de $7,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $6,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$, e $6,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$, para celulases obtidas de solo de floresta nativa, solo de pastagem e solo salino de deserto, respectivamente. Liu et al. (2011b) usando celulase comercial obtida a partir de *Aspergillus niger* relataram E_a de $34,11 \pm 1,03 \text{ kJ mol}^{-1}$ e He et al. (2000) relataram E_a de $52,0 \pm 1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ usando uma celulase obtida de *Trichoderma viride*.

4.1.3 Temoestabilidade para a celulase NS 50013

A temoestabilidade da celulase no intervalo de 30-50 °C é apresentada na Figura 12. Os resultados para 60 e 70 °C não foram apresentados, uma vez que uma perda total de atividade em menos de duas horas de reação foi verificada.

Figura 12: Influência da temperatura sobre a estabilidade da celulase NS 50013.



Como pode ser observado, houve uma redução máxima de 15% na atividade da enzima após 150 horas de reação. Um modelo de pseudo-primeira ordem foi utilizado para ajustar os dados da Figura 12 e a Tabela 10 resume os resultados obtidos em relação à constante de inativação e o tempo de redução decimal.

Tabela 10: Efeito da temperatura na inativação e tempo de redução constante e decimais obtidos durante a avaliação da temoestabilidade da celulase NS 50013.

| Temperatura (°C) | k (h ⁻¹) | D (h) | R ² |
|------------------|----------------------|----------------------------|----------------|
| 30 | 0,0010±0,0001 | 2318,60±136,1 ^a | 0,96 |
| 40 | 0,0011±0,0001 | 2109,50±131,5 ^a | 0,96 |
| 50 | 0,0123±0,0023 | 194,00±25,6 ^b | 0,94 |
| 60 | 0,9555±0,0418 | 2,40±0,07 ^c | 0,99 |
| 70 | 1,0176±0,1753 | 2,30±0,28 ^c | 0,96 |

a, b, c letras diferentes representam uma diferença significativa de 95% (p<0,05 - Teste de Tukey)

Pode-se observar que a constante de inativação aumenta com a temperatura, indicando que acima de 50 °C a taxa de inativação é maior, diminuindo consideravelmente o tempo de redução decimal, como esperado.

A enzima mostrou boa estabilidade nas temperaturas de 30-40 °C, apresentando D superior a 1000 horas, não apresentando diferenças estatisticamente significativa (p<0,05)

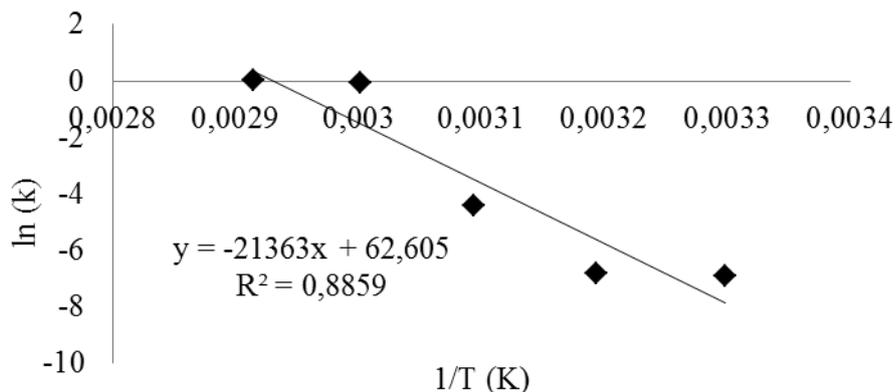
entre as duas temperaturas. A celulase comercial NS 50013 apresentou estabilidade moderada a 50 °C, pois D foi de cerca de 200 horas nesta temperatura. No entanto, em temperaturas acima de 50 °C, foi observada uma baixa estabilidade, uma vez que o valor D foi inferior a 3 horas.

Os dados de tempo de redução decimal são importantes em reações enzimáticas, pois é possível se fazer previsões sobre o tempo de processamento. Enzimas termoestáveis possuem grande importância biotecnológica, tendo em vista que as celulases termoestáveis podem ser utilizadas na indústria alimentícia, onde ocorrem processos que requerem altas temperaturas, como por exemplo, na pasteurização. Outras aplicações incluem as indústrias de polpa e papel, tratamento de efluentes industriais e processamento de materiais celulósicos (JANG e CHEN, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes a outros encontrados na literatura para celulases produzidas por actinomicetos, como é o caso de celulases produzidas por *Streptomyces* T3-1, que se mostraram termoestáveis a 40 e 50 °C (JANG e CHEN, 2003), e *Streptomyces drozdowiczii* M7A, cuja enzima foi capaz de reter 100% de sua atividade a 50 °C por uma hora, também perdendo consideravelmente a atividade em 60 °C (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2005). Song e Wei (2010), em um estudo com celulases produzidas por *Cellulosimicrobium cellulans*, obtiveram boa estabilidade térmica a 30 °C por 72 horas. Já Liu e Xia (2006) obtiveram estabilidade térmica para celulase comercial entre 30 e 70 °C para hidrólise de quitosana e carboximetilcelulose em 2 horas de incubação. Lee et al. (2008) em estudo com celulase purificada produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3, observaram que a enzima reteve 80% da atividade original em temperaturas variando de 50 a 70 °C após 20 horas de incubação. A estabilidade à temperatura também foi reportada por Ko et al. (2010) no trabalho com celulases Cel-BL11 purificadas, com massa molar de 38 kDa, que apresentaram estabilidade na faixa de 30 até 60 °C, após 7 horas de incubação.

De acordo com a Equação 4, os dados da Tabela 10 foram utilizados para calcular a energia de desativação (Ed) para a celulase NS 50013 utilizando a equação de Arrhenius e são apresentados na Figura 13.

Figura 13: Determinação da energia de desativação baseada na linearização da equação de Arrhenius para uma faixa de temperatura de 30 a 70 °C.



O valor da energia de desativação (E_d) para celulase NS 50013 obtida neste estudo foi de $177,6 \pm 36,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$, que foi consideravelmente inferior ao relatado por Mazutti et al. (2007) e Treichel et al. (2009) para inulinase ($343,9$ e 527 kJ.mol^{-1} , respectivamente), e semelhante ao relatado por Wolski et al. (2009) para lipase de *Penicillium* sp. obtido por fermentação em estado sólido ($100,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$) e fermentação submersa ($72,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

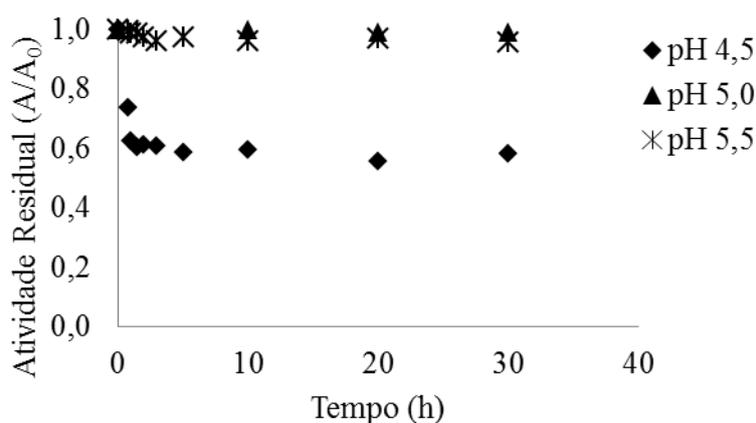
Kim et al. (1982) relataram energia de desativação para celulase de $393,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ a partir de dados medidos para desativação de primeira ordem a 50- 60 °C. Calsavara et al. (2000) avaliaram a termoestabilidade de uma celobiase comercial para variação de temperatura de 40 a 70 °C e a energia de desativação obtida foi de $356,7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Outro parâmetro frequentemente utilizado para representar a desativação da enzima é o parâmetro z , que expressa a variação da taxa de desativação de enzimas com a temperatura, o que representa um aumento de temperatura necessária para reduzir 90% do tempo de redução decimal. Os dados da Tabela 10 foram utilizados para determinar o valor de z de acordo com metodologia previamente definida. A celulase em estudo apresentou um valor de z de 12,7, indicando que para reduzir 90% no tempo de redução decimal é necessário aumentar a temperatura em 12,7 °C. Valores semelhantes de z (10,2 °C e 10,4 °C, respectivamente) foram relatados na literatura para a estabilidade térmica de α -amilase de *Aspergillus oryzae* (RAVIYAN et al., 2003) e poligalacturonase (ANTHON et al., 2002).

4.1.4 Influência do pH no estudo da estabilidade da celulase NS 50013

A influência do pH na estabilidade da celulase foi verificada nas faixas de pH 3,5 - 5,5 usando tampão acetato de sódio 0,2 M a 50 °C em diferentes intervalos de tempo. Na Figura 14, observa-se que praticamente não houve perda de atividade enzimática em pH

5,0 e 5,5. No entanto, para pH 4,5, houve uma redução de 40% sobre a atividade nas primeiras horas de reação, estabilizando-se ao longo do tempo de avaliação. Para o pH de 3,5 foi verificada perda total da atividade em poucos minutos de reação, motivo pelo qual não está sendo apresentado no gráfico. Provavelmente porque este valor de pH é muito próximo do ponto isoelétrico da proteína, que pode levar à desnaturação da enzima.

Figura 14: Influência do pH nos experimentos de avaliação cinética para atividade da celulase NS 50013.



A estabilidade do pH foi relatada por Ko et al. (2010), mostrando que, a celulase purificada de 38 kDa recombinante Cel-BL11 apresentou boa estabilidade para pH neutro. No entanto, a estabilidade de pH de celulase produzida por *B. amyloliquefaciens* DL-3 apresentou ampla faixa de pH (4,0-9,0) após 20 horas de incubação a 50 °C (LEE et al., 2008).

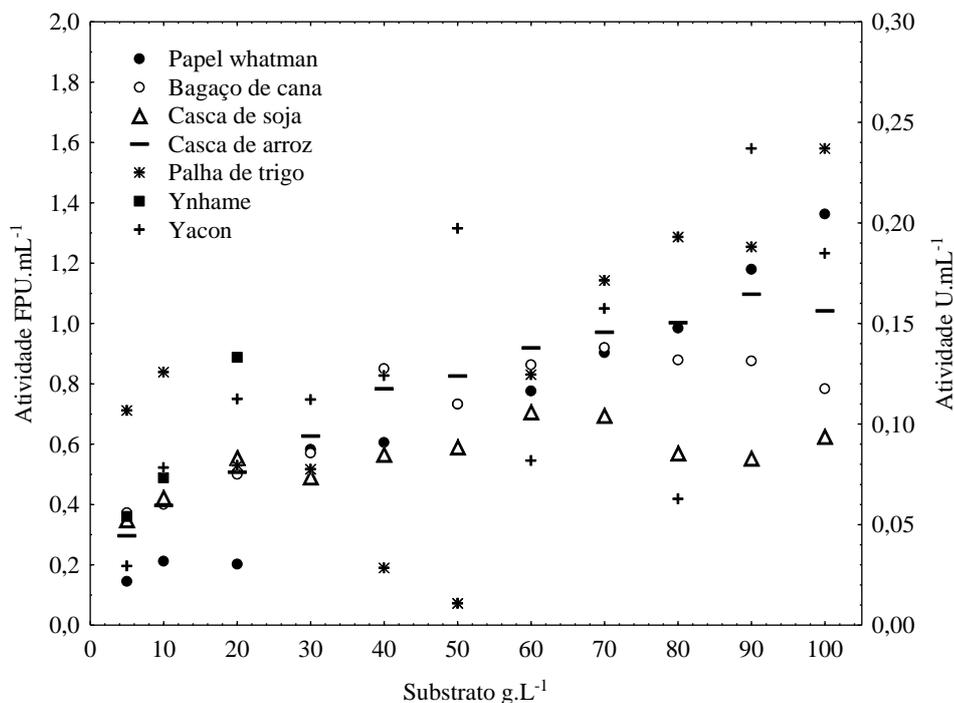
Em estudos com celulases purificadas produzidas por *Bacillus flexus*, a atividade enzimática mostrou-se estabilizada na faixa de pH entre 9,0 - 12,0 (TRIVEDI et al. 2011). Estes resultados estão de acordo com os relatados por Shanmughapriya et al. (2010) que encontraram estabilidade para pH de 12,0 para uma enzima purificada obtida a partir de *Marinobactersp.* MSI032.

4.1.5 Efeito do substrato sobre os parâmetros de Michaelis-Menten

O efeito da concentração do papel filtro, bagaço de cana, casca de soja, casca de arroz, palha de trigo, inhame e yacon na atividade enzimática da celulase NS 50013 foram

avaliados na faixa de 5 - 100 g.L⁻¹. A Figura 15 apresenta a atividade enzimática para cada substrato em estudo.

Figura 15: Influência da concentração de substrato na atividade enzimática. O eixo y da esquerda refere-se à atividade obtida para papel filtro; o eixo y da direita refere-se à atividade obtida para os demais substratos.



Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. A Tabela 11 resume os resultados obtidos para a influência do substrato sobre as constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$.

Tabela 11: Efeito dos diferentes tipos de substratos para os parâmetros de Michaelis-Menten para celulase NS 50013.

| Substratos | K_m ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) | $V_{máx}$ (FPU.mL ⁻¹) | $\alpha \times 1000$ (min ⁻¹) | R^2 |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|-------|
| Papel Filtro | 1115,9±585,2 | 3,64±1,41 | 2,40±0,09 | 0,97 |
| Bagaço de Cana | 92,4±26,5 | 0,16±0,01 | 1,73±0,37 | 0,92 |
| Casca de Soja | 26,7±8,9 | 0,10±0,01 | 3,74±1,12 | 0,95 |
| Casca de Arroz | 174,5±31,3 | 0,21±0,01 | 1,20±0,31 | 0,94 |
| Palha de Trigo | 211,6±44,9 | 0,27±0,02 | 1,27±0,44 | 0,96 |
| Inhame | 16723,0±11,492 | 29,8±19,40 | 1,74±0,06 | 0,94 |
| Yacon | 91,9±13,8 | 0,21±0,01 | 2,28±0,72 | 0,95 |

A celulase NS 50013 apresentou alta afinidade para casca de soja, uma vez que o seu valor para K_m foi o mais baixo entre os substratos. Yacon, bagaço de cana e casca de arroz apresentaram valores de K_m de $91,9 \pm 13,8$; $92,4 \pm 26,5$ e $174,5 \pm 31,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto a palha de trigo e papel filtro apresentaram valores de $211,6 \pm 44,9$ e $1115,9 \pm 585,2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, respectivamente. A enzima apresentou a menor afinidade com inhame, uma vez que seu valor de K_m foi $16723,0 \pm 11,49 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

De acordo com o critério utilizado para determinar a afinidade da celulase pelos substratos (em ordem decrescente), observa-se maior afinidade para casca de soja seguida de papel filtro, yacon, inhame, bagaço de cana, palha de trigo e casca de arroz uma vez que apresentaram os maiores valores de α . Além disso, os substratos com as mesmas estruturas físicas/químicas como inhame e yacon (ricos em amido), bem como bagaço de cana e palha de trigo (materiais rico em lignocelulósicos) apresentaram valores semelhantes para o parâmetro α .

Os resultados mostram que a enzima avaliada neste estudo apresentou resultados satisfatórios para a hidrólise de substratos agroindustriais, uma vez que foram obtidos resultados semelhantes para o papel de filtro e outros substratos. Substratos agroindustriais são estruturas mais complexas do que papel de filtro, devido à presença de lignina e hemicelulose, que requerem a utilização de pré-tratamento da matéria-prima antes da sua utilização ou o uso de enzimas mais eficientes/selectivas. Estudos de pré-tratamento de resíduos são intensivamente relatados na literatura e pesquisadores de todo o mundo estão empenhados em desenvolver processos eficientes e economicamente viáveis para a hidrólise de materiais lignocelulósicos (HUBER et al., 2006; ALVIRA et al., 2010).

Para a hidrólise de quitosana, a enzima bifuncional purificada a partir de celulase comercial, exibiu cinética típica de Michaelis-Menten com valor de K_m e $V_{\text{máx}}$ de 10 mg.mL^{-1} e $0,164 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente (LIU e XIA 2006). A celulase purificada 38 kDa recombinante Cel-BL11 apresentou K_m de $11,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $V_{\text{máx}}$ de $1250 \text{ L.mol.min. mg}^{-1}$ com carboximetilcelulose (KO et al., 2010). A conformação secundária e a atividade de celulase foram investigados sob campos magnéticos estáticos e os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ atingiram valor máximo em campo magnético de 0,30 T (valor de K_m e $V_{\text{máx}}$ $113,51 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,46 \text{ mmol de proteína.min.mL}^{-1}$, respectivamente) (RAN et al., 2009).

4.2 Produção de celulases e hemicelulases por Fermentação em Estado Sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais

Para produção de enzimas lignocelulolíticas, o substrato lignocelulósico deve ser barato, disponível em grandes quantidades ao longo do ano e a sua composição deve ser adaptada tanto para a hidrólise como para a produção destas enzimas. Além disso, a escolha do resíduo é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo, quanto à escolha do micro-organismo. Nem sempre o substrato lignocelulósico que permite o melhor desenvolvimento do micro-organismo favorece a formação de enzimas (YOON et al., 2014).

Nesse sentido, faz-se necessário a caracterização do substrato utilizado no processo, onde a análise elementar fornece os constituintes individuais em termos de seus elementos principais como carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio presente nos resíduos agroindustriais, podendo-se assim comparar a disponibilidade de nutrientes em cada resíduo. Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos da análise elementar além da quantificação de cinzas dos referidos substratos.

Tabela 12: Caracterização dos resíduos agroindustriais usados na produção de enzimas lignocelulolíticas.

| Resíduos lignocelulósicos | % | | | | | |
|---------------------------|---------|------------|------------|---------|----------|--------|
| | Carbono | Hidrogênio | Nitrogênio | Enxofre | Oxigênio | Cinzas |
| Bagaço de cana | 41,27 | 6,17 | 0,39 | 0,81 | 50,07 | 1,29 |
| Casca de arroz | 35,50 | 5,57 | 0,86 | 0,94 | 41,31 | 15,82 |
| Casca de soja | 38,16 | 6,08 | 1,38 | 0,94 | 49,77 | 3,67 |
| Pó do palito de erva mate | 43,06 | 5,76 | 1,19 | 0,91 | 45,17 | 3,91 |

De forma geral, entre os resíduos avaliados, pó de palito de erva mate e bagaço de cana apresentaram os maiores teores de carbono 43,06% e 41,27%, respectivamente. No caso de bagaço de cana, Protásio et al. (2012) e Horst (2013) obtiveram 46,8% de teor de carbono. Já casca de soja e pó de palito de erva mate apresentaram-se como as melhores fontes de nitrogênio 1,38% e 1,19%, respectivamente. Cassales et al. (2011) relataram teor de 2,03% de nitrogênio para casca de soja. Os teores de oxigênio, hidrogênio e enxofre apresentaram pouca variação entre os resíduos. Quanto ao teor de cinzas, casca de arroz apresentou a maior porcentagem e está de acordo com os resultados de Horst (2013).

Segundo, Silva et al. (2008) o elevado teor de cinzas em casca de arroz, deve-se à presença predominante de óxido de silício (SiO_2).

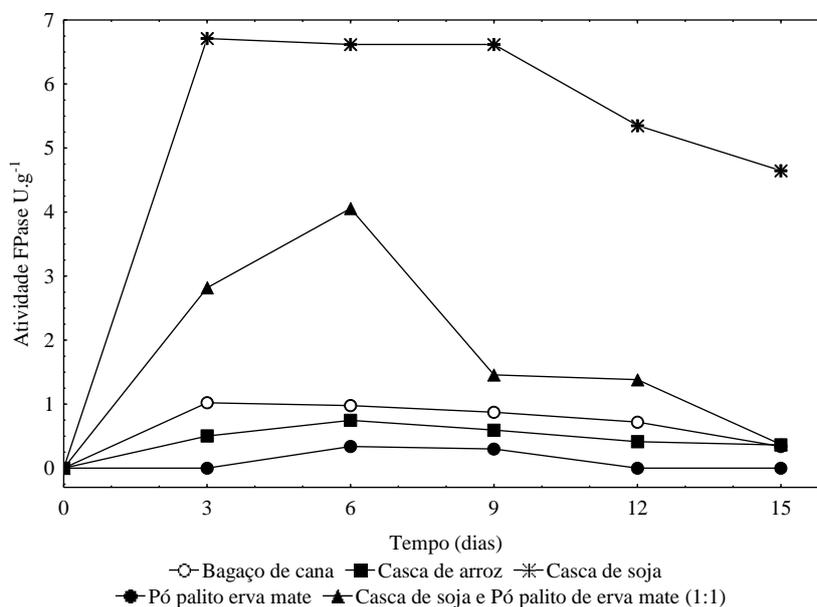
O crescimento microbiano em FES tem forte correlação com as quantidades de carbono/nitrogênio disponíveis (KRISHNA, 2005), assim sendo, casca de soja ($\text{C/N} = 27,65$), pó de palito de erva mate ($\text{C/N} = 36,18$) e a mistura de casca de soja e pó de palito de erva mate ($\text{C/N} = 31,60$) provavelmente ofereceram melhores condições para o crescimento de *T. reesei* NRRL 3652 e conseqüentemente a maior produção de enzimas.

A influência da composição dos substratos frente ao desenvolvimento do *T. reesei* NRRL 3652 utilizado nesta pesquisa para produção de celulasas e xilanase será apresentada através dos diferentes perfis cinéticos (Figura 16, 17 e 18). De uma forma geral, as atividades obtidas para casca de arroz e bagaço de cana, apresentaram menores valores de atividade, porém para casca de soja e pó de palito de erva mate, observaram-se as maiores atividades enzimáticas, possivelmente devido à relação entre a produção das enzimas e a natureza da fonte de carbono utilizada. Contudo estes comportamentos podem ser melhores evidenciados nos itens a seguir, onde serão descritas a produção da FPase, CMcase e xilanase em cada substrato avaliado nesta pesquisa.

4.2.1 Atividade para FPase

A atividade FPase é considerada como a atividade celulolítica total. Como mostra a Figura 16 a produção máxima para FPase ocorreu após 3 dias de fermentação para casca de soja ($6,71 \text{ U.g}^{-1}$) mantendo-se até o nono dia ($6,62 \text{ U.g}^{-1}$) e após, observou-se queda de cerca de 30% da produção até o décimo quinto dia. Porém, para a fermentação mista de casca de soja e pó de palito, observou-se a máxima produção de $4,06 \text{ U.g}^{-1}$ após 6 dias, valor este 40% menor se comparado com apenas o uso de casca de soja. Quando apenas pó de palito de erva mate como substrato foi usado, praticamente, não observou-se a produção de FPase. Para bagaço de cana e casca de arroz, as atividades de $1,02 \text{ U.g}^{-1}$ e $0,75 \text{ U.g}^{-1}$ foram obtidas em 3 e 6 dias respectivamente, após estes tempos, os rendimentos das enzimas diminuíram gradualmente.

Figura 16: Perfil cinético para a produção de FPase usando bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) como substrato em FES.



Segundo Dhillon et al. (2012), os resíduos agrícolas apresentam componentes celulósicos que podem induzir a produção de celulase quando utilizados como fontes de carbono para o crescimento de fungos. Além disso, segundo os mesmos autores, a produção de celulase é dependente de outros nutrientes essenciais utilizados nos meios de cultura. Tais nutrientes podem ser necessários para o crescimento do micro-organismo e, consequentemente, para a produção de enzima celulase.

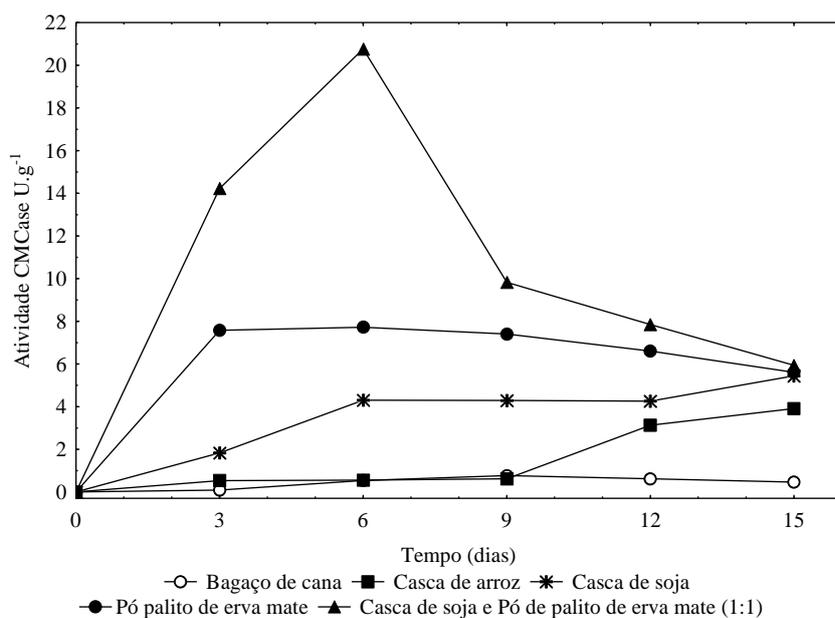
Soni et al. (2010) estudaram a produção de celulases utilizando *Aspergillus fumigatus fresenius* em sete diferentes fontes de carbono a partir de resíduos agrícolas, sendo que para bagaço de cana a atividade enzimática foi de $1,43 \pm 0,06 \text{ U.g}^{-1}$; $29,2 \pm 0,52 \text{ U.g}^{-1}$ e $890 \pm 1,23 \text{ U.g}^{-1}$, para FPase, CMCCase e xilanase, respectivamente. Tais resultados são relativamente altos se comparados com este estudo.

Falkoski et al. (2013) estudaram a produção de celulases e hemicelulases em FES usando *Chrysosporthe cubensis* em farelo de trigo como fonte de carbono, do qual relataram atividade de $2,5 \text{ U.g}^{-1}$, $33,8 \text{ U.g}^{-1}$ e $362,3 \text{ U.g}^{-1}$ para FPase, CMCCase e xilanase respectivamente. Estes resultados são inferiores para FPase e xilanase e superiores para CMCCase, se comparados com este estudo.

4.2.2 Atividade para CMCCase

Como pode ser visto na Figura 17, a atividade máxima para CMCCase foi encontrada em 6 dias ($20,77 \text{ U.g}^{-1}$) para os ensaios de fermentação com substrato misto. Para o pó do palito de erva mate a atividade manteve-se estável a partir do terceiro dia até o décimo segundo dia de fermentação ($7,58 \text{ U.g}^{-1}$ - $6,61 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente). A atividade máxima para casca de soja ($5,45 \text{ U.g}^{-1}$) e casca de arroz ($3,91 \text{ U.g}^{-1}$) foi encontrada em 15 dias de fermentação. A produção a partir de casca de soja foi cerca de 70% menor se comparada com a fermentação de substrato misto. Para bagaço de cana a atividade máxima ($0,77 \text{ U.g}^{-1}$) foi observada em 9 dias de fermentação.

Figura 17: Perfil cinético para a produção de CMCCase usando bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) como substrato em FES.



Contrariamente a estes resultados, Liu et al. (2011a) encontraram alta atividade de FPase e CMCCase ($100,8$ e $507,6 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente) quando a palha de milho foi utilizada como fonte de carbono em FES utilizando *Aspergillus fumigatus* Z5. Sukumaran et al. (2009) obtiveram atividade de CMCCase de $299,6 \text{ U.g}^{-1}$ e FPase de $22,8 \text{ U.g}^{-1}$ em estado sólido usando *Trichoderma reesei* RUT em farelo de trigo como substrato. Grigorevski-Lima et al. (2009) obtiveram atividade de CMCCase de $21,06 \text{ U.g}^{-1}$ em estado sólido usando bagaço de cana como substrato. Delabona et al. (2012) reportaram a máxima

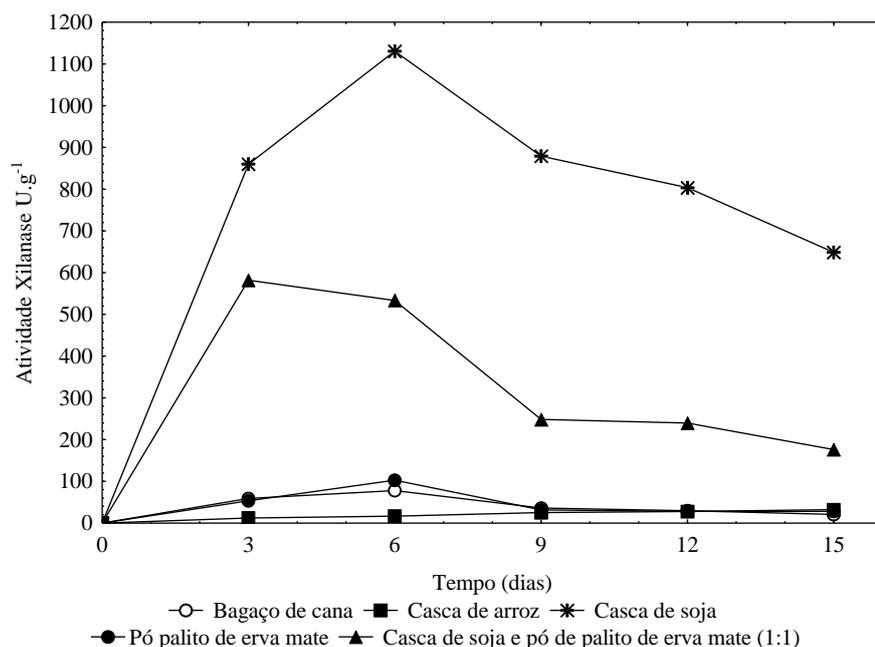
produção CMCase de $160,1 \text{ U.g}^{-1}$ em 3 dias ao usar farelo de soja e baixa produção de $16,71 \text{ U.g}^{-1}$ em 4 dias quando usado bagaço de cana como substrato durante o crescimento de *A. fumigatus*. Harshvardhan et al. (2013) obtiveram a atividade máxima de CMCase em fermentação líquida usando palha de trigo e *Bacillus* sp. H1666.

4.2.3 Atividade para xilanase

Xilana pura é demasiadamente cara para ser usada em grandes volumes na produção industrial de xilanases. Com isso, resíduos agrícolas podem servir como substratos adequados para a produção econômica de xilanases (NCUBE et al., 2012).

A Figura 18 mostra alta produção de xilanase para casca de soja no terceiro dia, porém, o valor máximo de $1130,70 \text{ U.g}^{-1}$ foi obtido em 6 dias de fermentação. Depois disso a atividade decresce cerca de 40% ($648,38 \text{ U.g}^{-1}$) no décimo quinto dia. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Ncube et al. (2012), os quais estudaram a cinética para a produção de xilanase em torta de semente de pinhão-manso como substrato em FES por *Aspergillus niger*. Na cinética, a máxima produção foi obtida no segundo dia de fermentação, em seguida houve decréscimo de cerca de 50% da produção no décimo dia.

Figura 18: Perfil cinético para a produção de xilanase usando bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, pó de palito de erva mate e casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1) como substrato em FES.



Na fermentação com substrato misto observou-se a máxima produção de 581,72 U.g⁻¹ em 3 dias e em seguida os rendimentos da enzima diminuem gradualmente. Quando utilizado apenas pó de palito de erva mate como substrato observou-se o mesmo comportamento que para FPase, ou seja, a baixa produção desta enzima. Observa-se assim que para a fermentação com substrato misto a casca de soja é que foi o substrato utilizado pelo micro-organismo para a produção de xilanase, já que de forma geral os valores de atividades foram praticamente a metade. O bagaço de cana com atividade máxima de 77,61 U.g⁻¹ e casca de arroz, com 32,08 U.g⁻¹, não demonstraram ser bons substratos para a produção de xilanase.

Bajaj et al. (2012) obtiveram máxima produção de xilanase quando *Bacillus pumilus* SS1 foi cultivado em farelo de trigo como única fonte de carbono. Porém, farelo de arroz, serragem e bagaço de cana não induziram à produção de xilanase, segundo os autores, isto ocorreu provavelmente devido à natureza complexa destes substratos. Bajaj e Manhas (2012) estudaram a produção de xilanase com xilana, farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz, triturados de cevada e farinha de milho como fonte de carbono por fermentação submersa usando *Bacillus licheniformis* P11(C). A máxima produção foi de 30 U.mL⁻¹ e 28 U.mL⁻¹ quando xilana e farelo de trigo, respectivamente, foram usados e, assim como para o presente trabalho e embora com diferente tipo de fermentação, a casca de arroz não apresentou bons resultados. Delabona et al. (2012) relataram atividade máxima de xilanase de 1055,62 U.g⁻¹ e 68,10 U.g⁻¹, respectivamente para farelo de trigo e bagaço de cana durante o crescimento de *A. fumigatus* e Senthilkumar et al. (2005) relataram uma atividade máxima de 1024 U.g⁻¹ utilizando farelo de trigo como substrato por *A. fischeri*. Sadaf e Khare (2014) relataram atividade de xilanase de 1025 U.g⁻¹ em condições otimizadas, utilizando *Sporotrichum hermophile* em um subproduto da indústria do biodiesel por fermentação em estado sólido.

Embora seja difícil comparar a produção de enzimas com diferentes condições de cultivo e de micro-organismos empregados em cada estudo, os valores aqui apresentados utilizando diferentes resíduos agroindustriais foram capazes de demonstrar que a casca de soja pode ser utilizada para produção das enzimas FPase, CMCase e xilanase obtidos por *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em FES. Isto ocorreu provavelmente porque a casca de soja é um material lignocelulósico basicamente composta por açúcares fermentáveis, polimerizados como celulose (glucose) e hemicelulose (xilose e arabinose), e apresenta

uma proporção muito baixa de lignina (compostos fenólicos) (como pode ser visto na Tabela 2), facilitando o acesso do micro-organismo ao substrato, já que a degradação da lignina produz compostos tóxicos para o micro-organismo (JEFFRIES et al., 2004; MUSSATTO e ROBERTO 2004; BRIJWANI et al., 2010).

4.3 Caracterização parcial de celulasas e hemicelulase obtidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja

Com o intuito de se utilizar celulasas e xilanase em processos industriais como a sacarificação de biomassa, por exemplo, o extrato enzimático bruto obtido da condição experimental ótima da fermentação em casca de soja foi parcialmente caracterizado. Este estudo foi realizado em termos de temperatura e pH ótimo, termoestabilidade e estabilidade de pH. Além disso, foram determinados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

4.3.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade de FPase, CMCase e xilanase

O pH e a temperatura ótimo para atividade de FPase, CMCase e xilanase foram determinados através da execução de 1 delineamento composto central rotacional 2^2 , totalizando 11 experimentos para cada enzima, (2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes).

Na Tabela 13 apresenta-se a matriz do planejamento experimental, bem como os valores reais, codificados das variáveis independentes e as respostas obtidas para atividades das respectivas enzimas presentes no extrato bruto. Os valores de atividade de FPase obtidos experimentalmente variaram de 0,00 a 0,18 FPase.mL⁻¹. Como pode ser visto nos ensaios 1, 2, 5 e 7, a atividade máxima de FPase foi obtida na faixa de temperatura de 40-55 °C e uma ampla faixa de pH (3,0-6,0). As atividades de carboximetilcelulase variaram de 0,09 a 0,31 CMCase.mL⁻¹, e a atividade máxima foi obtida nos pontos centrais, ou seja, na temperatura e pH de 55 °C e 4,6, respectivamente. Já as atividades de xilanase variaram 18,56 a 33,34 U.mL⁻¹ e a atividade máxima também foi obtida nos pontos centrais.

Tabela 13: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos das atividades enzimáticas de FPase, CMCCase e xilanase em função do pH e temperatura obtidas do extrato enzimático da FES em casca de soja.

| Ensaio | pH | Temperatura (°C) | FPase U.mL ⁻¹ | CMCase U.mL ⁻¹ | Xilanase U.mL ⁻¹ |
|--------|-------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 3,5 (-1) | 44,4 (-1) | 0,18 | 0,12 | 18,56 |
| 2 | 5,7 (1) | 44,4 (-1) | 0,15 | 0,10 | 21,58 |
| 3 | 3,5 (-1) | 65,6 (1) | 0,04 | 0,12 | 22,13 |
| 4 | 5,7 (1) | 65,6 (1) | 0,02 | 0,09 | 28,18 |
| 5 | 3,0 (-1,41) | 55,0 (0) | 0,18 | 0,10 | 19,07 |
| 6 | 6,2(1,41) | 55,0 (0) | 0,11 | 0,10 | 26,76 |
| 7 | 4,6 (0) | 40,0 (-1,41) | 0,16 | 0,12 | 20,91 |
| 8 | 4,6 (0) | 70,0 (1,41) | 0,00 | 0,09 | 27,30 |
| 9 | 4,6 (0) | 55,0 (0) | 0,07 | 0,25 | 33,23 |
| 10 | 4,6 (0) | 55,0 (0) | 0,05 | 0,31 | 32,92 |
| 11 | 4,6 (0) | 55,0 (0) | 0,06 | 0,29 | 33,34 |

Os dados da Tabela 13 foram analisados estatisticamente com o objetivo de determinar os efeitos estimados das variáveis estudadas sobre a atividade enzimática.

As Tabelas 14, 15 e 16 apresentam os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t (2), para atividade de FPase, CMCCase e xilanase, respectivamente, a um nível de confiança de 95%.

Tabela 14: Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para a atividade de FPase em função da temperatura e pH ótimos.

| | Coeficiente de Regressão | Erro Padrão | t(5) | p |
|----------------------|--------------------------|-------------|--------|----------|
| Média * | 0,059 | 0,012 | 4,730 | 0,005195 |
| (1) pH (L) | -0,014 | 0,007 | -1,840 | 0,124997 |
| pH (Q) * | 0,040 | 0,009 | 4,404 | 0,006991 |
| (2) Temperatura (L)* | -0,067 | 0,007 | -8,719 | 0,000328 |
| Temperatura (Q) | 0,008 | 0,009 | 0,880 | 0,418673 |
| 1L.2L | -0,006 | 0,010 | -0,606 | 0,570585 |

* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 15: Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para a atividade de CMCCase em função da temperatura e pH ótimos.

| | Coeficiente de Regressão | Erro Padrão | t(5) | p |
|---------------------|--------------------------|-------------|--------|----------|
| Média * | 0,282 | 0,012 | 22,059 | 0,000004 |
| (1) pH (L) | -0,008 | 0,007 | -1,111 | 0,317030 |
| pH (Q)* | -0,090 | 0,009 | -9,638 | 0,000204 |
| (2) Temperatura (L) | -0,007 | 0,007 | -0,900 | 0,409360 |
| Temperatura (Q)* | -0,089 | 0,009 | -9,536 | 0,000215 |
| 1L.2L | -0,002 | 0,011 | -0,189 | 0,856968 |

* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Tabela 16: Coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para a atividade de xilanase em função da temperatura e pH ótimos.

| | Coeficiente de Regressão | Erro Padrão | t(5) | p |
|-----------------------|--------------------------|-------------|---------|----------|
| Média * | 33,167 | 0,372 | 88,993 | 0,000000 |
| (1) pH (L) * | 2,497 | 0,228 | 10,928 | 0,000112 |
| pH (Q) * | -5,369 | 0,272 | -19,685 | 0,000006 |
| (2) Temperatura (L) * | 2,404 | 0,228 | 10,520 | 0,000134 |
| Temperatura (Q) * | -4,769 | 0,272 | -17,488 | 0,000011 |
| 1L.2L | 0,759 | 0,322 | 2,353 | 0,065271 |

* Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

Na Tabela 14, correspondente aos efeitos das variáveis na atividade de FPase, verifica-se que o pH (Q) exerceu um efeito positivo significativo (p<0,05) sobre a resposta ao contrário da temperatura (L) que apresentou um efeito negativo significativo.

Para a matriz de CMCase (Tabela 15), constatou-se que o pH (Q) e a temperatura (Q) exerceram efeitos significativos (p<0,05) e negativos sobre o processo, ou seja, que a diminuição destes, proporcionam um incremento da atividade de CMCase obtida do extrato enzimático bruto.

Na Tabela 16, correspondente aos efeitos das variáveis na atividade de xilanase, verifica-se que o pH (L) e a temperatura (L) exercem um efeito positivo significativo (p<0,05), já ambos os termos quadráticos exercem um efeito negativo significativo (p<0,05) sobre a resposta.

As Equações 17, 18 e 19 apresentam os modelos matemáticos empíricos, obtidos através dos coeficientes de regressão, referentes às atividades enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase, respectivamente, em função do pH e temperatura, dentro da faixa estudada.

$$Y_{FPase} = 0,059 + 0,040.PH^2 - 0,067.T \quad (17)$$

$$Y_{CMCase} = 0,282 - 0,090.PH^2 - 0,089.T^2 \quad (18)$$

$$Y_{xilanase} = 33,167 + 2,497PH - 5,369PH^2 + 2,404T - 4,769T^2 \quad (19)$$

sendo que:

Y_{FPase} = atividade FPase (U.mL⁻¹);

Y_{CMCase} = atividade CMCase (U.mL⁻¹);

$Y_{xilanase}$ = atividade xilanase (U.mL⁻¹);

T = temperatura (°C)

Os modelos codificados foram validados pelas análises de variância apresentadas nas Tabelas 17, 18 e 19 referentes à FPase, CMCase e xilanase, respectivamente.

Tabela 17: Análise de variância para a atividade de FPase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.

| Fontes de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrados médios | F calculado |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 0,045 | 2 | 0,0227 | 39,79 |
| Resíduo | 0,004 | 8 | 0,0005 | |
| Total | 0,050 | 10 | | |

$$R^2 = 0,95; F_{\text{tab. } 0,95;2;8} = 4,46$$

Tabela 18: Análise de variância para a atividade de CMCase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.

| Fontes de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrados médios | F calculado |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 0,070 | 2 | 0,035 | 80,42 |
| Resíduo | 0,003 | 8 | 0,000 | |
| Total | 0,073 | 10 | | |

$$R^2 = 0,96; F_{\text{tab. } 0,95;2;8} = 4,46$$

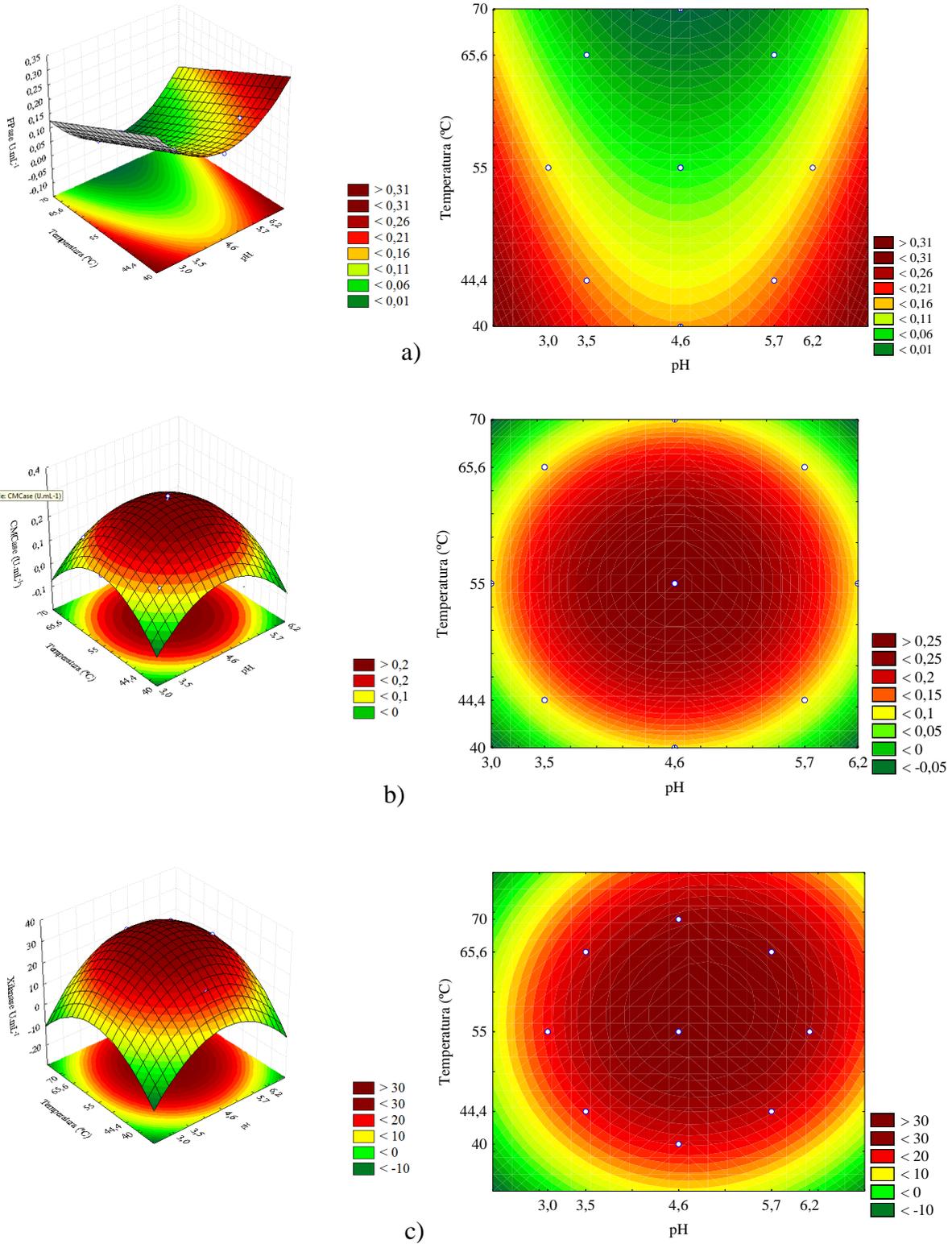
Tabela 19: Análise de variância para a atividade de xilanase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.

| Fontes de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrados médios | F calculado |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------|
| Regressão | 320,275 | 4 | 80,068 | 109,38 |
| Resíduo | 4,391 | 6 | 0,731 | |
| Total | 324,667 | 10 | | |

$$R^2 = 0,99; F_{\text{tab. } 0,95;2;8} = 4,46$$

Verificou-se que para todas as enzimas o valor de F calculado foi maior que o valor tabelado, apresentando coeficientes de correlação (R^2) superiores ou igual a 95%, o que permitiu a validação estatística dos modelos matemáticos empíricos ($p < 0,05$) e a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 19.

Figura 19: Superfícies de resposta e curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na: a) atividade de FPase; b) atividade de CMCase; c) atividade de xilanase, obtidas do extrato enzimático da FES em casca de soja.



A Tabela 20 apresenta vários trabalhos na literatura que relatam pH e temperatura ótimos para atividade FPase, CMCase e xilanase obtida por fermentação submersa e fermentação em estado sólido e sintetizadas por vários micro-organismos.

Efeitos de pH e temperatura ótima de atividade são fundamentais para se entender o comportamento enzimático e possivelmente determinar suas condições ótimas de trabalho. De forma geral, as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos. Já as temperaturas ótimas para atuação encontram-se em sua maioria acima de 40 °C (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010).

Tabela 20: Valores de temperatura e pH ótimos para celulases e xilanase obtidas por diferentes micro-organismos, substratos e formas de cultivo referentes a trabalhos publicados na literatura nos últimos anos.

| Micro-organismo | Forma de Cultivo | pH Ótimo | | | Temp. Ótima (°C) | | | Referências |
|----------------------------------|------------------|----------|--------|----------|------------------|--------|----------|------------------------|
| | | FPase | CMCase | xilanase | FPase | CMCase | xilanase | |
| <i>A. fumigatus</i> | FES | - | - | - | - | 64,3 | - | Saqib et al. (2010) |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | FES | - | 3-3,5 | - | - | 65 | - | Delabona et al. (2012) |
| <i>Bacillus altitudinis</i> DHN8 | FS | - | - | 7 | - | - | 50 | Adhyaru et al. (2013) |
| <i>Bacillus</i> sp. PKD-9 | FES | - | - | 8 | - | - | 50 | Panwar et al. (2013) |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> SK1 | FES | 5 | 3 | 4 | 60 | 70 | 60 | Ang et al., (2013) |
| <i>Chrysosporium cubensis</i> | FS | 4 | 4 | 4 | 50 | 60 | 55 | Falkoski et al. (2013) |
| <i>T. ressei</i> NRRL 3652 | FES | 3-6 | 4,6 | 4,6 | 40-55 | 55 | 55 | Neste trabalho |

4.3.2 Efeito da estabilidade térmica de FPase, CMCCase e xilanase

A sacarificação enzimática da biomassa é um processo que exige longos períodos de reação. Em geral, um tempo de reação entre 24 e 72 horas é usado (JIANG et al., 2010; SANTOS et al., 2012) e por esse motivo a estabilidade térmica é uma característica essencial para um complexo lignocelulolítico ser empregue em um processo de sacarificação de biomassa por exemplo.

Neste estudo, a estabilidade térmica consistiu da incubação do extrato enzimático bruto por 96 h a temperaturas que variaram de 40 a 70 °C. Os resultados mostraram que FPase, CMCase e xilanase apresentaram maior estabilidade a 40 °C, ou seja, uma redução de cerca de 25% na atividade das respectivas enzimas após 60 horas de reação e 44, 66 e 65% para FPase, CMCase e xilanase, respectivamente após 96 horas. Além disso, a 40 °C não houve perda significativa na atividade de xilanase por um período de 8 h. Para a temperatura de 50 °C, todas as enzimas em estudo apresentaram redução de 50% após 8 horas de reação. Perdas drásticas para todas as enzimas foram observadas nas temperaturas de 60 e 70 °C (Figuras 20, 21 e 22).

Figura 20: Influência da temperatura na estabilidade de FPase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja.

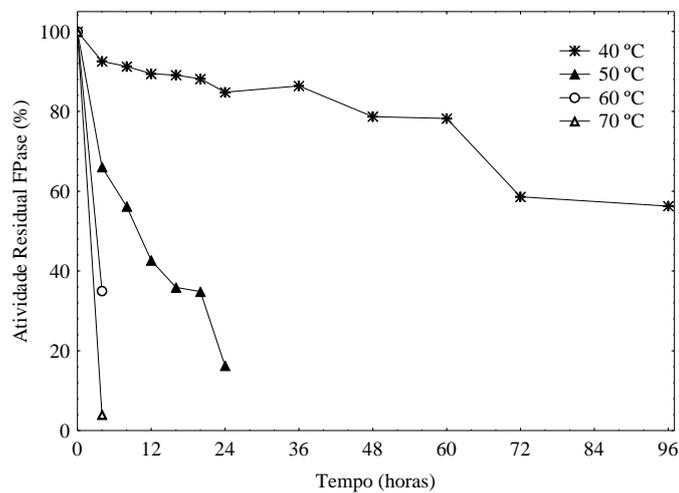


Figura 21: Influência da temperatura na estabilidade de CMCase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja.

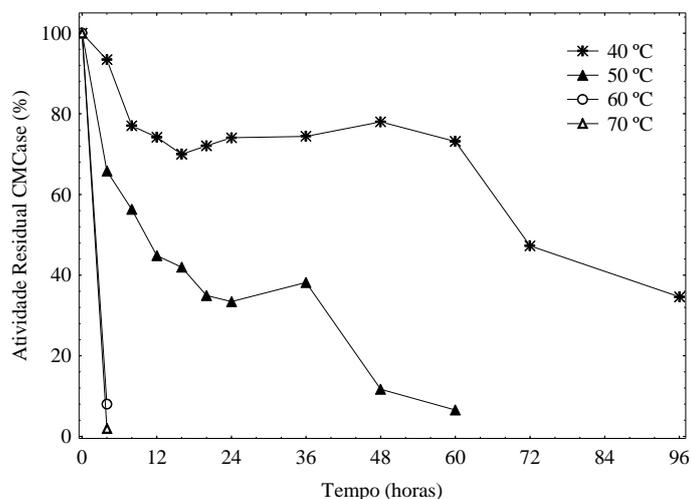
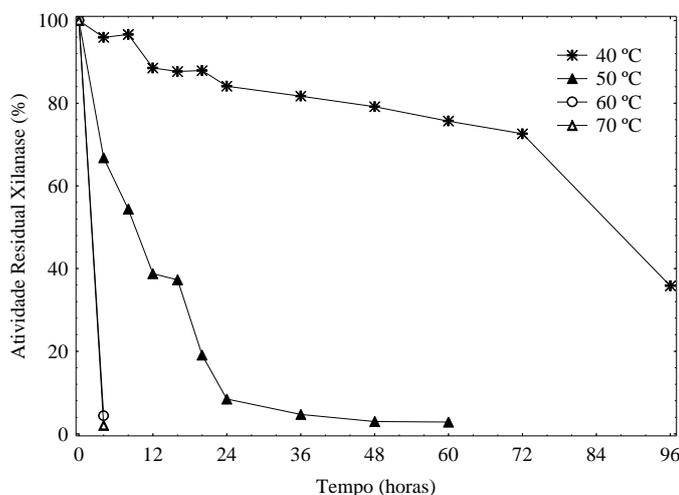


Figura 22: Influência da temperatura na estabilidade de xilanase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja.



Tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Falkoski et al. (2013) que após 48 h de incubação do extrato bruto produzido por *C. cubensis*, todas as atividades enzimáticas foram altamente estáveis a 40 °C e, com atividades residuais de 98,1, 86,4 e 92,3% para FPase, CMCCase, e xilanase, respectivamente.

4.3.3 Efeito do pH na estabilidade de FPase, CMCCase e xilanase

Os resultados mostraram que FPase e xilanase apresentaram maior estabilidade a pH 5,5, ou seja, uma redução de cerca de 50% na atividade após 20 e 16 horas respectivamente. Já CMCCase com redução de 45% após 16 horas de reação, apresentou-se mais estável em pH 4,5. Para o pH de 3,5 foi verificada perda total da atividade para todas as enzimas em poucas horas de reação. Provavelmente porque este valor de pH é muito próximo do ponto isoelétrico da proteína, que pode levar à desnaturação da enzima (Figuras 23, 24 e 25).

Uma das etapas críticas no processo industrial de produção de etanol é o pré-tratamento, que pode ser realizado utilizando-se diferentes métodos, em diferentes pHs, sendo este seguido pela sacarificação da biomassa utilizando-se enzimas ou catalisadores químicos. No caso da utilização de hidrólise enzimática após o pré-tratamento é necessário o ajuste do pH para a faixa de atuação do catalisador biológico.

Desta forma, quando enzimas apresentam-se estáveis em uma faixa de pH de 4,0 a 7,0, indicam assim, uma característica positiva para sua utilização no processo de produção de bioetanol.

Figura 23: Influência do pH na estabilidade de FPase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja.

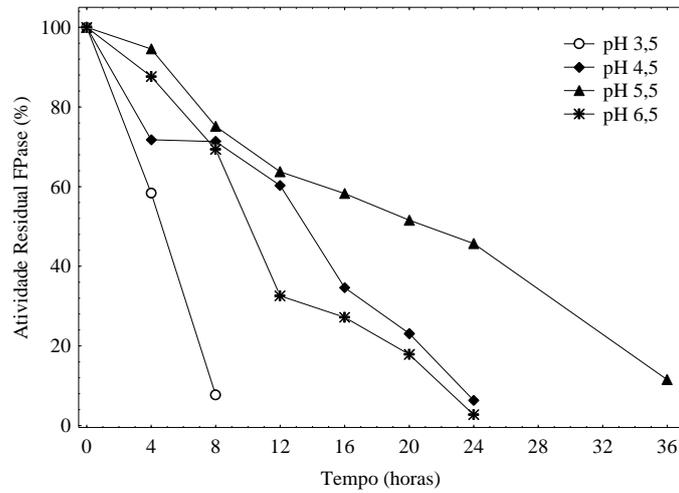


Figura 24: Influência do pH na estabilidade de CMCase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja.

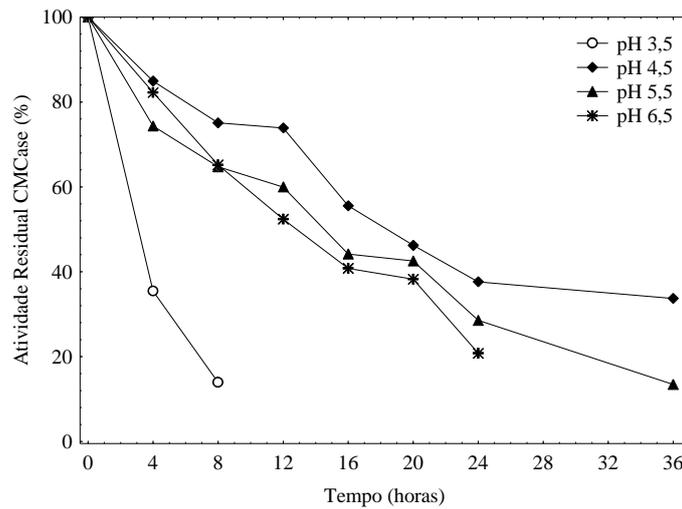
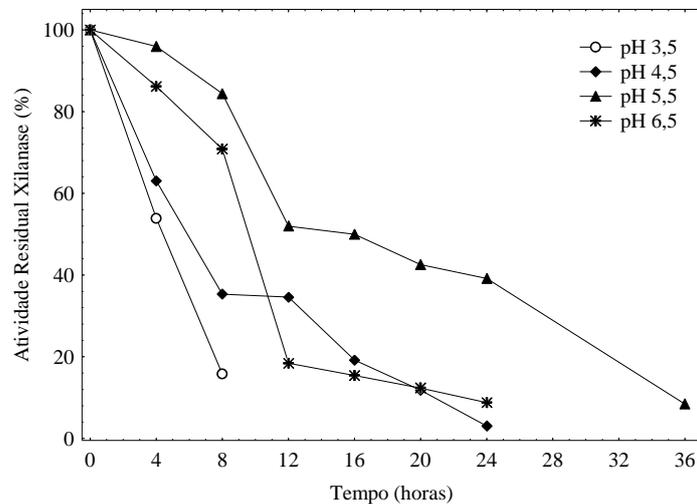


Figura 25: Influência do pH na estabilidade de xilanase obtida do extrato enzimático bruto por FES em casca de soja.



4.3.4 Efeito da estabilidade de FPase, CMCase e xilanase a baixas temperaturas

Uma característica muito importante e que deve ser avaliada é a estabilidade da enzima quando armazenada a baixas temperaturas, pois esta influenciará no tempo em que a enzima poderá ser armazenada, mantendo suas características iniciais em termos de atividade enzimática.

A estabilidade do extrato enzimático bruto à baixas temperaturas foi avaliada submetendo-se amostras à temperaturas de -80; -10 e 4 °C. A atividade enzimática foi monitorada inicialmente a cada 15 dias e, em seguida em pontos aleatórios até completar 290 dias.

Os resultados obtidos para a atividade enzimática nas diferentes temperaturas e diferentes enzimas demonstram um comportamento variável em relação à manutenção de sua atividade durante o seu tempo de armazenamento (Figuras 26, 27 e 28).

Observou-se que não houve comportamento distinto entre as diferentes temperaturas de armazenamento em teste. As três formas de armazenamento, apresentaram em alguns momentos, diminuição da atividade e, em outros, aumento. No entanto, após 290 dias cerca de 60% da atividade de FPase em temperatura de 4 °C e cerca de 20% da atividade de CMCase e xilanase foram perdidas em relação as suas atividades iniciais.

Figura 26: Influência de baixas temperaturas sobre a estabilidade de FPase.

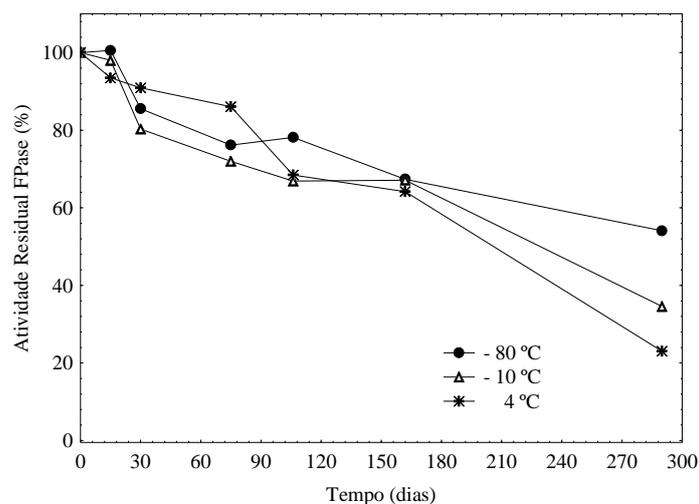


Figura 27: Influência de baixas temperaturas sobre a estabilidade de CMCCase.

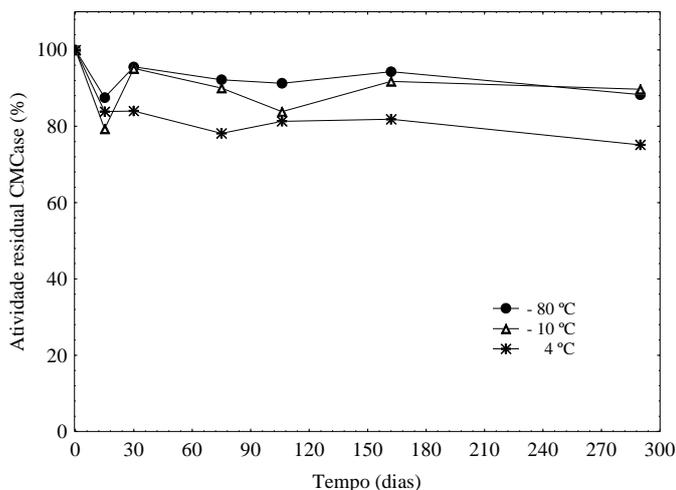
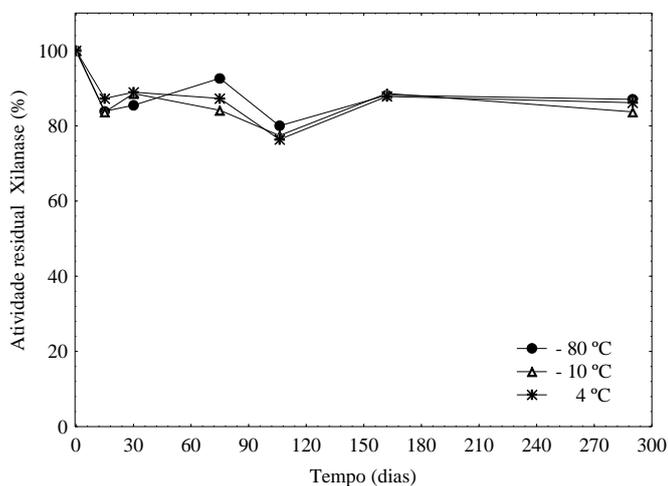


Figura 28: Influência de baixas temperaturas sobre a estabilidade de xilanase.



4.3.5 Determinação das constantes de Michaelis-Menten

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$, foram conduzidas utilizando diferentes concentrações dos substratos celulose - papel filtro Whatman nº 1 ($1-200 \text{ mg.mL}^{-1}$), carboximetilcelulose ($1-100 \text{ mg.mL}^{-1}$) e xilana padrão de “birchwood” ($1-30 \text{ mg.mL}^{-1}$) para a atividade de FPase, CMCCase e xilanase respectivamente. Ambos parâmetros foram obtidos pela análise das velocidades iniciais de reação nas diferentes concentrações de substrato estabelecidas para este estudo.

Nas Figuras 29, 30 e 31 são apresentados os resultados da atividade de FPase, CMCCase e xilanase do extrato bruto lignocelulolítico obtidos em função das concentrações dos respectivos substratos. Percebe-se um aumento nas atividades de todas as enzimas em estudo, com a concentração do substrato, não apresentando inibição pelo substrato mesmo na maior concentração avaliada.

Figura 29: Velocidade da reação de FPase em função de diferentes concentrações de celulose (papel filtro).

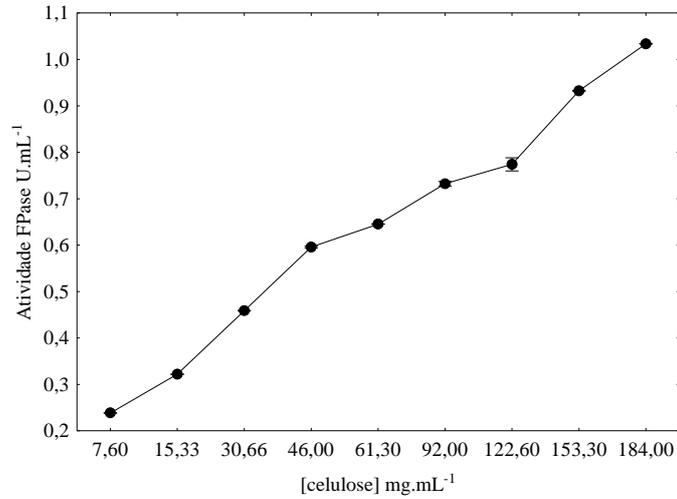


Figura 30: Velocidade da reação de CMCCase em função de diferentes concentrações de carboximetilcelulose.

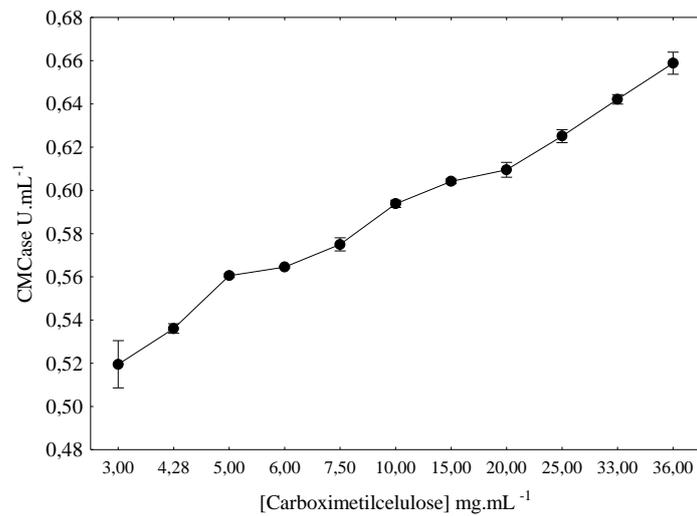
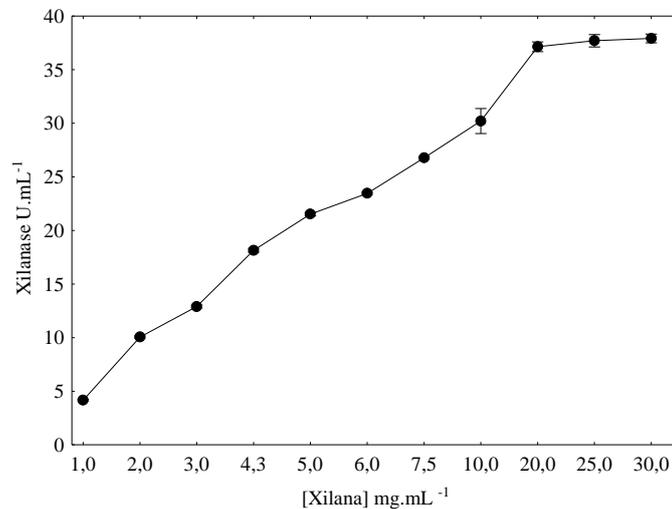


Figura 31: Velocidade da reação de xilanase em função de diferentes concentrações de xilana.



Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. As Equações (20, 21 e 22) e os R^2 obtidos dos perfis de linearização (Figura 34, 35 e 36, Apêndice I), utilizando-se o modelo de Lineweaver-Burk (Equação 7) para os dados de atividade de FPase, CMCCase e xilanase, respectivamente, são apresentados a seguir:

$$1/v = 23,9728 (1/[S]) + 1,2153; R^2 = 0,97 \quad (20)$$

$$1/v = 1,0482 (1/[S]) + 1,5899; R^2 = 0,97 \quad (21)$$

$$1/v = 0,2173 (1/[S]) + 0,0096; R^2 = 0,97 \quad (22)$$

Os elevados fatores de correlação ($R^2 > 0,97$) indicam uma boa adequação dos resultados. Na Tabela 21, são apresentados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ obtidos para as enzimas estudadas e comparados com a literatura.

Tabela 21: Valores de K_m e $V_{máx}$ obtidos para FPase, CMCCase e xilanase em comparação com os publicados em trabalhos nos últimos anos.

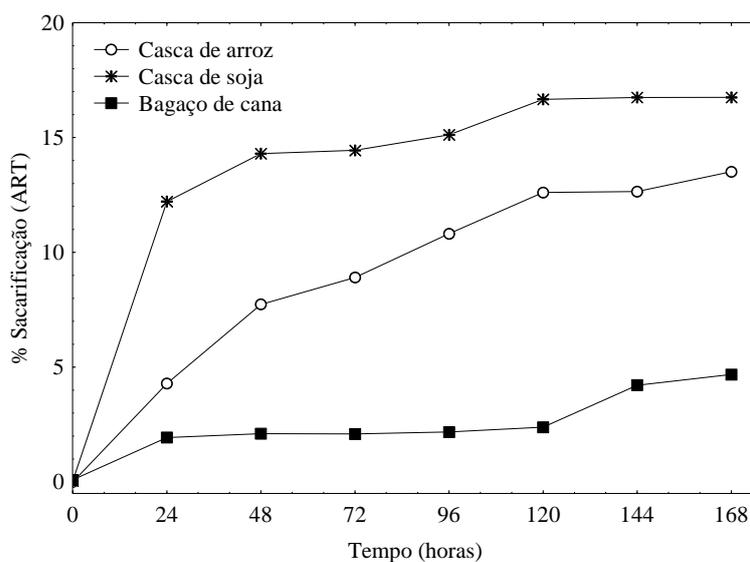
| Enzima | Origem | K_m | $V_{máx}$ | Referência |
|----------|--|-------------------------------------|---|-------------------------|
| FPase | <i>T. reesei</i> NRRL 3652 | 19,73 mg.mL ⁻¹ | 0,82 mol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ | Neste trabalho |
| | <i>A. oryzae</i> | 20 mg.mL ⁻¹ | 854 U.mg ⁻¹ | Muhammad et al. (2009) |
| | <i>P. campinasensis</i> | 11,25 mg.mL ⁻¹ | 1250 μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ | Ko et al. (2010) |
| | <i>P. pinophilum</i> | 1,08 mg.mL ⁻¹ | 225,6 U.mg ⁻¹ | Marimuthu et al. (2010) |
| CMCase | <i>A. flavus</i> | 0,5 mg.mL ⁻¹ | 40 U.mg ⁻¹ | Gomathi et al. (2012) |
| | <i>A. niger</i> VTCC-F021 | 8,58 mg.mL ⁻¹ | 20,1 U.mg ⁻¹ | Pham et al. (2012) |
| | <i>A. terreus</i> | 12,01 mg.mL ⁻¹ | 16,15 μmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ | Narra et al. (2014) |
| | <i>T. reesei</i> NRRL 3652 | 0,65 mg.mL ⁻¹ | 0,62 mol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ | Neste trabalho |
| xilanase | <i>Malbranchea flava</i> | 6,6 mg.mL ⁻¹ | 3333 μmol.min.mg ⁻¹ | Sharma et al. (2010) |
| | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. MTCC 10645 | 4,76 mg.mL ⁻¹ | 232,5 μmol .min ⁻¹ .mg ⁻¹ | Kamble e Jadhav (2012) |
| | <i>S. thermocarboxydus</i> | 1,71 mg.mL ⁻¹ | 357,14 U.mg | Chi et al. (2013) |
| | <i>S. thermophile</i> | 12,54 mg.mL ⁻¹ | 454,5 U.min ⁻¹ .mL ⁻¹ | Sadaf e Khare (2014) |
| | <i>T. reesei</i> NRRL 3652 | 22,64 mg.mL ⁻¹ | 104,17 mol .min ⁻¹ .mg ⁻¹ | Neste trabalho |

4.4 Sacarificação de biomassa

A sacarificação enzimática é dependente tanto, das características da biomassa quanto da eficácia das enzimas. Para tanto, a eficácia do extrato enzimático bruto produzido por *T. reesei* NRRL 3652 foi testada na sacarificação de casca de arroz, casca de soja e bagaço de cana sem tratamentos, com a finalidade da obtenção de açúcares redutores (AR) e glicose.

Sukumaran et al. (2009) demonstraram que a concentração de enzima pode ter um efeito menor sobre a hidrólise da celulose em comparação com o efeito do tempo de reação. Assim de acordo com Liu et al. (2011a) um período de sete dias foi definido no ensaio de sacarificação de biomassa, a fim de se obter açúcares fermentescíveis. As Figuras 35 e 36 apresentam os rendimentos de AR e glicose, respectivamente, liberados experimentalmente por um período de 170 h de reação. Como pode ser visto na Figura 32, a liberação de AR aumentou rapidamente na fase inicial (0 e 24 h), principalmente, para casca de arroz e casca de soja, e a porcentagem mais elevada (16,8%) foi obtida depois de 120 horas de reação utilizando-se casca de soja. Assim sendo, a quantidade total de AR liberados a partir de 1 g de casca de soja catalisado pelas enzimas presentes no extrato enzimático bruto foi de $0,16 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato seco.

Figura 32: Perfil da produção de açúcares redutores na sacarificação de resíduos agroindustriais usando extrato bruto enzimático produzido por *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja.



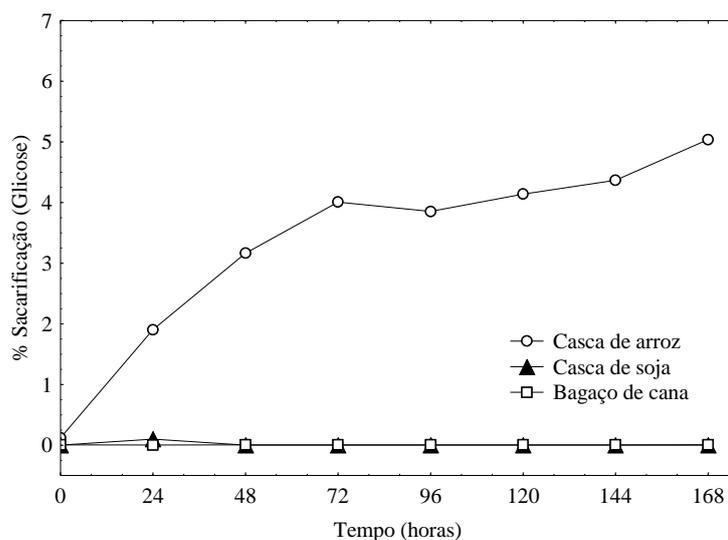
Raghuwanshi et al. (2014) utilizaram o extrato enzimático bruto produzido a partir da cepa selvagem *Trichoderma asperellum* RCK2011 e a cepa mutante, *Trichoderma asperellum* SR1-7 para sacarificação de sabugo de milho, bagaço de cana e palha de trigo pré-tratados e não tratados. Os rendimentos de AR foram de 0,53 g.g⁻¹, 0,33 g.g⁻¹ e 0,29 g.g⁻¹ de substrato seco, respectivamente, do qual, isto foi 1,6 vezes mais elevado do que a estirpe do tipo selvagem.

Deswal et al. (2011) utilizaram o extrato enzimático bruto de *Fomitopsis* sp. RCK2010 para sacarificação em palha de trigo e palha de arroz pré-tratada alcalinamente. Os rendimentos de AR para palha de trigo e palha de arroz foram de 0,214 g.g⁻¹ e 0,157 g.g⁻¹ de substrato seco, respectivamente, porém rendimentos abaixo de 0,10 g.g⁻¹ de substrato seco foram obtidos quando os substratos não foram tratados.

Liu et al. (2011a) obtiveram rendimentos de AR de 0,45 g.g⁻¹ de substrato seco a partir da hidrólise de palha de milho utilizando o extrato enzimático bruto produzido por *A. fumigatus* Z5.

Como pode ser observado na Figura 33, a casca de arroz apresentou o melhor rendimento em glicose liberada principalmente, nas primeiras 72 horas (4%) depois disso, o aumento observado foi muito baixo (cerca de 1%). Por outro lado, não obteve-se rendimento de glicose para casca de soja e bagaço de cana.

Figura 33: Perfil da produção de glicose na sacarificação de resíduos agroindustriais usando extrato bruto enzimático produzido por *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja.



Considerando que a casca de arroz não passou por nenhum tipo de pré-tratamento, esse maior rendimento de glicose pode ser atribuído possivelmente ao pó de arroz que está junto com a casca de arroz e que por sua vez pode conter açúcares que podem ter sido hidrolizados pelas enzimas presentes no extrato enzimático. Segundo Falkoski et al. (2013) a biomassa lignocelulósica não pode ser sacarificada por enzimas com rendimentos elevados sem um processo de pré-tratamento, isso porque, a lignina e a hemicelulose presentes na parede da célula vegetal formam um obstáculo para a ação de enzimas.

A remoção eficiente da lignina é um dos requisitos mais importantes para uma eficaz sacarificação enzimática. A lignina limita a taxa de hidrólise, atuando como um escudo, evitando que as partes hidrolizáveis do substrato sejam hidrolisadas. Além disso, a lignina condensada pode absorver proteínas a partir de soluções aquosas e a remoção de lignina deve melhorar o desempenho da hidrólise pela redução de adsorção não específica das celulasas (YANG e WYMAN, 2004).

Yoo et al. (2011) utilizaram a combinação de três celulasas comerciais (Celluclast 1,5L, Novozyme 188 e Viscozyme®L) para a sacarificação enzimática de casca de soja submetida a diferentes pré-tratamentos, e obtiveram um rendimento de glicose de $0,16 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ em casca de soja sem tratamento.

Ortega et al. (2001) estudaram a cinética da sacarificação de celulasas de *Trichoderma reesei*, tal como a concentração de substrato, diversas enzimas, temperatura e pH, e obtendo assim as melhores condições experimentais para degradar celulose padrão (CMC, celulose microgranular e Sigmacell 100).

A crescente demanda de celulasas e hemicelulasas, especialmente na indústria de biocombustíveis faz com que se busquem métodos eficazes e econômicos para a produção destas enzimas. Assim, neste trabalho propôs-se como objetivo geral a produção de enzimas lignocelulíticas FES usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais, e a caracterização do extrato enzimático obtido, assim como a aplicação deste.

- Para comparar a eficácia da atividade de celulase entre os micro-organismos ou suas enzimas secretadas, são necessárias técnicas para a medida da atividade da celulase total. Assim o método de atividade de papel de filtro (FPA – Filter Paper Activity) foi usado como ponto de partida para este estudo, através da caracterização da enzima comercial celulase NS 50013. A atividade máxima do complexo celulolítico foi obtida a temperatura e pH variando de 40-50 °C e 5,2-5,5, respectivamente. No que diz respeito à estabilidade térmica, houve redução de cerca de 15% na atividade da enzima depois de 150 h de reação nas temperaturas de 30-50 °C. A enzima foi estável a pH 5,0 e 5,5. A celulase NS 50013 apresentou resultados satisfatórios quando usada para hidrolisar substratos agroindustriais, uma vez que foi observado desempenho semelhante sobre a hidrólise de papel de filtro e outros substratos. No entanto, melhores resultados podem ser obtidos aumentando a acessibilidade da celulose por pré-tratamento da matéria-prima ou em adição, a utilização de enzimas mais eficientes/selectivas, como por exemplo, a combinação de atividades enzimáticas otimizada.

- A produção de enzimas lignocelulolíticas por FES foi investigada visando avaliar o efeito de diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Entre os substratos testados, a casca de soja foi o substrato mais adequado para a produção de FPase (6,71 U.g⁻¹) e xilanase (1130,70 U.g⁻¹). Já a maior produção de CMCase (20,77 U.g⁻¹) foi observada usando o substrato misto de casca de soja e pó de palito de erva mate (1:1). Notavelmente a rica composição celulósica da casca de soja favoreceu o acesso do micro-organismo ao substrato induzindo a síntese das enzimas. As atividades encontradas foram superiores aquelas observadas quando bagaço de cana e casca de arroz foram utilizados como fonte de carbono no meio.

- A caracterização parcial do extrato enzimático bruto produzido por *T. reesei* NRRL 3652 em casca de soja apresentou condições de pH e temperatura ótimos na faixa de 40-55 °C e

3,0-6,0 para FPase, e 55 °C e 4,6, para CMCase e xilanase, respectivamente. O extrato enzimático bruto apresentou alta estabilidade a 40 °C e pH 5,5. Os valores de K_m encontrados para FPase, CMCase e xilanase foram $19,73 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,65 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $22,64 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente e os valores de $V_{m\acute{a}x}$ foram de $0,82 \text{ mol.min.mg}^{-1}$, $0,62 \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ e $104,17 \text{ mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, para celulose (papel filtro), carboximetilcelulose e xilana, respectivamente. Esta etapa é de extrema importância para estabelecer em quais condições de processo o uso da enzima poderá propiciar melhores resultados técnicos e econômicos para processos biotecnológicos.

- O extrato enzimático bruto produzido por *T. reesei* NRRL 3652 obtido da casca de soja foi testado na sacarificação de biomassa lignocelulolítica com a finalidade da obtenção de açúcares fermentescíveis. Assim sendo, o maior rendimento de açúcares redutores catalisado pelas enzimas presentes no extrato enzimático bruto foi obtido em casca de soja. No entanto, este valor poderá ser melhorado com o estudo de diferentes tipos de pré-tratamentos em diferentes resíduos lignocelulósicos. O processo de produção de etanol de segunda geração a partir de diferentes tipos de resíduos agrícolas é uma estratégia que diminuiria os impactos ambientais. Assim, novos avanços para este processo devem ser alcançados para torná-lo mais eficaz e uma realidade sustentável.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos na produção de celulasas e hemicelulasas por fermentação em estado sólido usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em casca de soja, sugere-se que para trabalhos futuros seja realizado:

- Avaliação da adição de diferentes resíduos agroindustriais como fontes suplementares de carbono e nitrogênio tais como água de maceração de milho, extrato de levedura, melão de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de soja e ureia;
- Otimização das condições de produção das enzimas em escala de bancada utilizando a técnica de planejamento de experimentos para avaliar o efeito da temperatura, umidade, concentração dos suplementos;
- Quantificação indireta do crescimento celular no substrato durante o processo fermentativo;
- Produção destas enzimas usando biorreator de maior escala com medidas apropriadas para monitorar parâmetros como temperatura, produção de CO₂ e umidade ao longo da estrutura do biorreator durante o processo fermentativo.
- Avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento em resíduos lignocelulósicos que visam o fracionamento da hemicelulose e a deslignificação do resíduo sólido, facilitando o processo de hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares fermentescíveis.
- Avaliação de diferentes estratégias de processo para produção de etanol de segunda geração.

- ACHARYA, B. K.; MOHANA, S.; JOG, R.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D., Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 2019-2027, 2010.
- ADEL, A. M.; EL-WAHAB, Z. H. A.; IBRAHIMA, A. A.; AL-SHEMY, M. T., Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 676-687, 2011.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A., Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.003>
- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDEA, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J., Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67-72, 2004.
- AGNIHOTRI, S.; DUTT, D.; TYAGI, C. H., Complete characterization of bagasse of *Saccharum officinerum* early species - co 89003 for pulp and paper making. **Bioresource**, v. 5, p. 1197-1214, 2010.
- 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**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ANDREAUS, J.; FERREIRA FILHO, E. X.; BON, E. P. S., Biotechnology of holocellulose degrading enzymes, in: C.T. Hou, J.-F. Shaw (Eds.), **Biocatalysis and Bioenergy**, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ 07030-5774, p. 197-229, 2008.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S., Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293-1302, 2013.
- ANGEL, J. D. M.; VÁSQUEZ, T. G. P., Caracterização de cinza obtida por combustão de casca de arroz em reator de leito fluidizado. **Química Nova**, v. 32, p. 1110-1114, 2009.
- ANTHON, G. E.; BARRET, D. M., Kinetic parameters of the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 4119-4125, 2002.
- ARMESTO, L., BAHILLO, A.; VEIJONEN, K.; CABANILLAS, A.; OTERO, J., Combustion behavior of rice husk in a bubbling fluidised bed. **Biomass and Bioenergy**, v.23, p.171-179, 2002.
- BAILEY, J. M; OLLIS, D. F., **Biochemical Engineering Fundamental**. Nova York: Mc Graw Hill Intl Editions, Ed. 2, p. 928, 1986.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, vol. 23, p. 257-270, 1992.

BAJAJ, B. K.; KHAJURIA, Y. P.; SINGH, V. P., Agricultural residues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2012.05.001>

BAJAJ, B. K.; MANHAS, K., Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2012.07.003>

BAK, J. S.; KO, J. K.; CHOI, I. G.; PARK, Y. C.; SEO, J. H.; KIM, K. H., Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. **Biotechnology Bioengineering**, v. 104, p. 471-82, 2009.

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

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M.S.; WALTON, J. D., Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3(22), 2010. doi:10.1186/1754-6834-3-22.

BAYER, E. A.; LAMED, R., The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.

BECH, N.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Determining the elemental composition of fuels by bomb calorimetry and the inverse correlation of HHV with elemental composition. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 534-537, 2009.

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

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J., Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 287-296, 2007.

BEST, D.; BOROSS, L.; TRAMPER, J., **Applied Biocatalysis**. Harwood Academic Publishers. Chur, Switzerland, 1994.

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

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BIELY, P., Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 286-290, 1985.

BOLUDA-AGUILAR, M.; LÓPEZ-GÓMEZ, A., Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.188– 197, 2013.

BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; FERRARA, M. A., **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicação e Mercado**. Ed. Interciência, ISBN: 9788571931893, 2008.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass, in: FAO Symposium on the Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2008.

BORTOLAZZO, Nara G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado).

BOTELLA, C.; DIAZ, A. B.; WANG, R.; KOUTINAS, A.; WEBB, C., Particulate bioprocessing: a novel strategy for biorefineries. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 546-555, 2009.

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

CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M, Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized cellobiase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p. 841-848, 2000.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W., **The fungi**, Ed Elsevier Academic Press, ed.2, 588, 2002.

CASPI, J.; IRWIN, D.; LAMED, R.; LI, Y.; FIEROBE, H. P.; WILSON, D. B.; BAYER, E. A., Conversion of *Thermobifida fusca* free exoglucanases into cellulosomal components: comparative impact on cellulose-degrading activity. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 351-357, 2008.

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z., Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

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

CAVACO-PAULO, A.; ALMEIDA, L.; BISHOP, D., Hydrolysis of cotton cellulose by engineered cellulases from *Trichoderma reesei*. **Textile Research Journal**, v. 68, p. 273-280, 1998.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P. K.; SANGWAN, R. S., Cellulase production by six *Trichoderma* spp. fermented on medicinal plant processings. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 605-609, 2009.

CHI, W. J.; LIM, J. H.; PARK, D. Y.; PARK, J. S.; HONG, S. K., Production and characterization of a thermostable endo-type-xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. **Process Biochemistry**. v. 48, p.1736-1743, 2013.

CHU, B. C. H.; LEE, H., Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425-441, 2007.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 3-23, 2005.

CORREDOR, D.Y.; SUN, X. S.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K.L.; WANG, D., Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**. v.2, p. 43-50, 2008.

COSTA, J.A.V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

COURTY, P. E.; PRITSCH, K.; SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J., Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. **New Phytologist**, v.167, p. 309-319, 2005.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A., Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

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

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

DAS, N. N.; DAS, S. C.; SARKAR, A. K.; MUKHERJEE, A. K., Lignin–xylan ester linkage in mesta fiber. **Carbohydrate Research**, v. 129, 197-207, 1984.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K. T.; MAO, C.; QIN, W., Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-8, 2010.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W., Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 578-95, 2009.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C., Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with

pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production, **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C., Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; METAHNI, S. M'HAMDI, N., Lactoserum as a moistening medium and crude inducer for fungal cellulase and hemicellulase induction through solid-state fermentation of apple pomace. **Biomass and Bioenergy**, v.41, p. 165-174, 2012.

DHILLON, G. S.; OBEROI, H. S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S. K., Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v.34, p. 1160-1167, 2011.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S. S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S., Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 35, p. 275-82, 2008.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/ca p01.htm>> Acesso em: 4 de Setembro de 2012.

FALKOSKI, D. F.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; REZENDE, S. T., *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.

FARINAS, C. F.; VITCOSQUE, G. L.; FONSECA, R. F.; NETO, V. B.; COURI, S., Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1186-1192, 2011.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S., Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**. v. 1, p. 65-76, 2010.

FREDERIX, S. A.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A., Impact of xylanases with different substrate selectivity on gluten-starch separation of wheat flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7338-7345, 2003.

FREIRE, D. M. G., **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 1996.

FUJITA, Y.; TAKAHASHI, S.; UEDA, M.; TANAKA, A.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A., Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 5136-5141, 2002.

GALBE, M.; ZACCHI, G., A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 618-628, 2002.

GENTIL, R. S.; SUSIN, I.; PIRES, A. V.; MENDES, C. Q.; FERREIRA, E. M.; URANO, F. S.; MENEGHINI, R. C. M., Substituição do feno de *Coastcross* por casca de soja na alimentação de cabras em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2844-2851, 2011.

GHOSE, T. K., Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOMATHI, D.; MUTHULAKSHMI, C.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C., Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. **Soil Biology & Biochemistry**, v.48, p. 28-38, 2012.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. 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**, v. 51, p. 72-78, 2010.

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

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E.P. S.; COELHO, R. R. R., *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potencial use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 272-277, 2005.

GUOWEIA, S.; MAN, H.; SHIKAI, W.; HE, C., Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 357-361, 2011.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G., Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 549-556, 2006.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D; STEINER, W.; ZUPANIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D., Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**. v.11, p. 349-355, 2008.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B., Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 51-56, 2013.

HASSUANI, J. S.; LEAL, M. R. L. V.; MACEDO, I. C., **Biomass Power Generation: Sugar Cane Bagasse and Trash**, 1st ed., PNUD/CTC, Piracicaba, 2005.

HE, D. L.; BAO, L. L.; LONG, Y. M.; WEI, W. Z.; YAO, S. Z., A new study of the enzymatic hydrolysis of carboxymethyl cellulose with a bulk acoustic wave sensor. **Talanta**, v. 50, p. 1267-1273, 2000.

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

HERPOËL-GIMBERT, I.; MARGEOT, A.; DOLLA, A.; JAN, G.; MOLLÉ, D.; LIGNON, S.; MATHIS, H.; SIGOILLOT, J. C.; MONOT, F.; ASTHER, M., Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. **Biotechnology for Biofuels**, 2008;1:18. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.006

HOEGH-GULDBERG, O.; MUMBY, P. J.; HOOTEN, A. J.; STENECK, R. S.; GREENFIELD, P.; GOMEZ, E.; HARVELL, C. D.; SALE, P. F.; EDWARDS, A. J.; CALDEIRA, K.; KNOWLTON, N.; EAKIN, C. M.; IGLESIAS-PRIETO, R.; MUTHIGA, N.; BRADBURY, R. H.; DUBI, A.; HATZIOLOS, M. E., Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. **Science**, v. 318, p. 1737-1742, 2007.

HÖLKER, U. AND LENZ, J., Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J., Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-86, 2004.

HORST, D.J., Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa. 103p. 2013.

HUANG, J. S.; TANG, J., Sensitive assay for cellulase and dextranase. **Analytical Biochemistry**, v.73, p. 369-377, 1976.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A., Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. **Chemical Review**, v.106, p. 4044-4098, 2006.

INGRAM, L. O.; DORAN, J. B., Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 235-241, 1995.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q., One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. **Journal of**

Radiation Research and Applied Sciences, (2014).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>

IRWIN, D.; SPEZIO, M.; WALKER, L., Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain efforts. **Biotechnology Bioengineering**, v. 42, p.1002-1013, 1993.

JABASINGH, S. A.; NACHIYAR, C. V., Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1564-1571, 2011.

JANG, H. D.; CHEN, K. S., Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 263-268, 2003.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S., Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 63, p. 495-509, 2004.

JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q., New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, 121-127, 2010.

JIANGA, Z.; BAILB, A. L.; WUA, A., Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. **Journal of Cereal Science**, v. 47, p. 172-179, 2008.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A., Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 93-99, 2012.

JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C., Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68 p. 139-146, 2011.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R., Production, purification and characterization of alkali stable xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1790 - S1797, 2012.

KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABLE, I., Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranoside from *Aspergillus niger* 5-16. **Bioscience, Biotechnology e Biochemistry**, v. 57, p. 1161-1165, 1993.

KAPILAN, R.; ARASARATNAM, V., Paddy Husk as Support for Solid State Fermentation to Produce Xylanase from *Bacillus pumilus*. **Rice Science**, v. 18, p. 36-45, 2011.

- KESTON, A. Paper 31C, 129th Meeting of the American Chemical Society, April, 1956.
- KHALILI, B.; NOURBAKHS, F.; NILI, N.; KHADEMI, H.; SHARIFNABI, B., Diversity of soil cellulase isoenzymes is associated with soil cellulose kinetic and thermodynamic parameters. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 43, p. 1639-1648, 2011.
- KIDDINAMOORTHY, J.; ANCENO, A. J.; HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K., Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus kraft pulp biobleaching. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 605-612, 2008.
- KIM, M. H.; LEE, S. B.; RYU, D. D. Y.; REESE, E. T, Surface deactivation of cellulase and its prevention. **Enzyme Microbial Technology**, v. 4, p. 99-103, 1982.
- KIM, S.; DALE, B. E., Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361-375, 2004.
- KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C., β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 26, p. 389-407, 2010.
- KO, C.; TSAI, C.; LIN, P.; CHANG, K.; TU, J.; WANG, Y.; YANG, C., Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7882-7888, 2010.
- KO, J. K.; BAK, J. S.; JUNG, M. W.; LEE, H. J.; CHOI, I. G.; KIM, T. H.; KIM, K. H., Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4374-4380, 2009.
- KOHRING, S.; WIEGEL, J.; MAYER, F., Subunit composition and glycosidic activities of the cellulase complex from *Clostridium thermocellum* JW20. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3798-3804, 1990.
- KRISHNA C., Solid state fermentation systems: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.
- KRISHNANI, K. K, MENG, X., CHRISTODULATOS, C., BODDU, V. M. Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from Rice husk. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p.1222-1234, 2008.
- KUBICEK, C. P., Beta-glucosidase excretion by *Trichoderma pseudokoningii*: correlation with cell wall bound beta-1,3-glucanase activities. **Archives Microbiology**, v. 132, p. 349-354, 1982.
- KUMAR, L.; CHANDRA, R.; CHUNG, P. A.; SADDLER, J., Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields? **Bioresource Technology**, v.101, p. 7827-7833, 2010.

KUMAR, M.; JOSHI, A.; KASHYAP, R.; KHANNA, S., Production of xylanase by *Promicromonospora* sp MARS with rice straw under non sterile conditions. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1614-1618, 2011.

KUMAR, R., WYMAN, C. E., Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4203-4213. 2009.

KVIEN, I.; TANEM, B. S.; OKSMAN, K.; Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 3160-3165, 2005.

LAKSHMI, G. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J.; PRAKASHAM, R. S., Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 51-57, 2009.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LYND, L. R., A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81 p. 33-44, 2002.

LEE, J. W.; PARK, J. Y.; KWON, M.; CHOI, I. G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

LEE, Y.; KIM, B.; LEE, B.; JO, K.; LEE, N.; CHUNG, C.; LEE, Y.; LEE, J., Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99 p. 378-386, 2008.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J.S.; ERIKSSON K.E.L. Relationships between activities of xilanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 89-94, 2000.

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 e Biodegradation**, v. 65, p. 717-725, 2011a.

LIU, J.; LU, J.; CUI, Z., Enzymatic hydrolysis of cellulose in a membrane bioreactor: assessment of operating conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 525-532, 2011b.

LIU, J.; XIA, W., Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 82-87, 2006.

LJUNGDAHL, L. G., The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1125, p. 308-3221, 2008.

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

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

LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARC, M. C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENOA, J., Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 794-800, 2007.

LUDDEN, P.A.; CECAVA, M.J.; HENDRIX, K.S. The value of soybean hulls as a replacement for corn in beef cattle diets formulated with or without added fat. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2706-2711, 1995.

LUDWIG, V.S., **A agroindústria processadora de arroz: um estudo das principais características organizacionais e estratégicas das empresas líderes gaúchas**. Dissertação (Mestrado Em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

LUO, L.; VOET, E.; HUPPES, G., Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13 p. 1613-1619, 2009.

LYND, L. R.; Van ZYL, W. H.; McBRIDE, J. E.; LASER, M., Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion Biotechnology**, v.16, p. 577-583, 2005.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.; Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W., The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 500-516, 2009.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C., Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology & Bioengineering Symposium** , v. 21-33, 1976.

MARIMUTHU, J.; AH-REUM, J.; KYOUNG-MI, L.; WON- II, S.; DEOK-KUN, O.; YEONG-SUK, K.; IN-WON, K.; JUNG-KUL, L., Characterization of endo-b-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1005-1014, 2010.

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F., Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.85, p. 109-114, 2010.

MAZUTTI, M.; CENI G.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. **Bioprocess Biosyst Engineering**, v. 30, p. 297-304, 2007.

McMILLAN, J. D.; BOYNTON, B. L., Arbinose utilization by xylose- fermenting yeasts and fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, p. 569-584, 1994.

MIELLENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E., Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 3532-9, 2009.

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

MOREIRA, I.; MOURINHO, F. L.; CARVALHO, P. L. O.; DIOVANI, P.; PIANO, L. M.; KURODA JUNIOR, I. S., Avaliação nutricional da casca de soja com ou sem complexo enzimático na alimentação de leitões na fase inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p. 2408-2416, 2009.

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

MUHAMMAD, R.J., MUHAMMAD, H.R., HABIBULLAH, N., MUHAMMAD, R., RAHEELA, P., Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 483-497, 2009.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C., Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; KUHAD, R. C.; GUPTA, V. K., Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. **New Biotechnology**, In Press, Corrected Proof, Available online 11 January 2011.

NAKATA, Y.; SUZUKI, M.; OKUTANI, T. Preparation and properties of SiO₂ from rice hulls. **Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi**, v. 97, p. 842-9, 1989.

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

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T., Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, 549-555, 2002.

NASSAR, M. M.; ASHOR, E. A.; WAHID, S. S., Thermal characteristics of bagasse. **Journal of Applied Polymer Science**, v.61, p.885-890, 1996.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J. V.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products** v. 37, p.118-123, 2012.

NELSON, N., A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p. 375-380, 1944.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.49-58, 2002.

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

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G., **Aguardente de cana**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2005.

ORBERG, P.K. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon, 1981.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M., Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration e Biodegradation**. v. 47, p. 7-14, 2001.

PAL, A.; KHANUM, F., Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7563-7569, 2010.

PAL, S.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S., Mustard stalk and straw: A new source for production of lignocellulolytic enzymes by the fungus *Termitomyces clypeatus* and as a substrate for saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 283-288, 2013.

PAN, X.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N., Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, p.1103-1114, 2004.

- PANDEY, A., Solid-state fermentation. **Journal Engineering Biochemical**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PANWAR, D.; SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M., Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.006>
- PASSOS, C. P.; YILMAZ, S.; SILVA, C. M.; COIMBRA, M. A., Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. **Food Chemistry**, v. 115, p. 48-53, 2009.
- PEIXOTO, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP., 2006.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; BETINI, J. H. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; LOURDES, M.; POLIZELI, T. M., Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: Application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 149-155, 2009.
- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **In Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p. 45, 2008.
- PERLACK, R. D.; WRIGHT, L. L.; TURHOLLOW, A. F.; GRAHAM, R. L.; STOKES, B. J.; ERBACH, D. C., Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. **US Department of Energy**. Oak Ridge, TN, 2005.
- PHAM, T. H.; QUYEN, D. T.; NGHIEM, N. M., Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. **Turkish Journal of Biology**, v.36, p. 694-701, 2012.
- PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K.; WYMAN, C. E., Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p. 846-853, 1993.
- PROTÁSIO, T. P.; TONOLI, G. H. D.; JÚNIOR, M. G.; BUFALINO, L.; COUTO, A. M.; TRUGILHO, P. F, Correlações canônicas entre as características químicas e energéticas de resíduos lignocelulósicos. **Cerne**, v.18, n.3. 2012
- PULS, J., SCHMIDT, O.; GRANZOW, C., Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 83-88, 1987.
- RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C., Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183-189, 2014.

RAN, J.; JIA, S.; LIU, Y.; WU, S., Characterization of cellulase under various intensities of static magnetic fields. **Catalysis Communications**, v. 11, p. 91-95, 2009.

RAVIYAN, P.; TANG, J.; RASCO, B. A, Thermal stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae* entrapped in polyacrylamide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5462-5466, 2003.

REN21, 2012. **Renewables 2012 Global Status Report**. REN21 Secretariat, Paris.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N., Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v, 211, p. 140-143, 1998.

RISSE, F. V. A.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; COSTA, F.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Effect of organic solvent on the characteristics of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 48, p. 143-150, 2010.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V., Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274-279, 2012.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M., Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663- 670, 2011.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaco de cana-de-açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico**. São Joaquim da Barra: Colégio Iara Coimbra, 2008.

ROSA, S. S.; GARCIA, J. L. F., O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 119-150, dez. 2009.

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**. v.153, p.126-130, 2014.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.

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

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S., Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 641- 646, 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K., Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SCHIFFER, H. W., WEC energy policy scenarios to 2050. **Energy Policy**, v. 36, p. 2464-2470, 2008.

SCHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K.; MALESZKA, R., Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 3, p. 89-92, 1981.

SENTHILKUMAR, S. R.; ASHOKKUMAR, B.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P., Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1380-1386, 2005.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y., Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHANMUGHAPRIYA, S.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RANI, C., Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, 625-640, 2010.

SHARMA, M.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S., Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Malbranchea flava* active under alkaline conditions. **Bioresource Technology**, v.101, p. 8834-8842, 2010.

SHULER, M. L.; KARGI, F., **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SILVA, A. M., BENTES, M. A.; MEDRADO, S. B., CARVALHO JÚNIOR, J. A. Estudo da utilização da biomassa em substituição parcial ao carvão mineral na fabricação do coque na coqueira da CSN. **Revista Tecnologia em Metalurgia e Materiais**, São Paulo, v. 5, n. 1, p.40-45, 2008.

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

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

SINGHANIA, R. R.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid state fermentation process. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 412.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A., Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 142, p. 60-70, 2007.

SIQUEIRA, F. G.; SIQUEIRA, E. G.; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FILHO, E. X. F., The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 20- 26, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, P. S. Overview of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-18, 2003.

SOMOGYI, M., Notes on sugar determination. **Journal Biological Chemistry**, v.195, p. 19-23, 1952.

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

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

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2005. 155 p.

STEPHENS, D. E.; SINGH, S.; PERMAUL, K., Error-prone PCR of a fungal 15 xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability. **FEMS Microbiology**, v. 293, p. 42-47, 2009.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P., Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 22, v. 33-64, 2002.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY A., Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p.421-428. 2009.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G., Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.17, p. 39-67, 1997.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K., Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, p. 707-738, 2007.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K., Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 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**, v. 45, p. 384-90, 2009.

TEN, L. N.; IM, W. T.; KIM, M. K.; KANG, M. S.; LEE, S. T., Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 375-382, 2004.

TOLAN, J. S., Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 3, p.339-345, 2002.

TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Technical viability of the production, partial characterization of inulinase using pretreated agroindustrial residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 425-433, 2009.

TRINDER, P., Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, p.246, 1969.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B., An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 891-897, 2011.

VALLS, M. C.; RONCERO, B., Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2032-2039, 2009.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M. B.; PEREIRA Jr., N., Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 141- 153, 2007.

VIDMANTIENE, D.; JUODEIKIENE, G.; BASINSKIENE, L., Technical ethanol production from waste of cereals and its products using a complex enzyme preparation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1732-1736, 2006.

WAGHMARE, P. R.; KADAM, A. A.; SARATALE, G. D.; GOVINDWAR, S. P., Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.099>

- WANG, C. Y.; HSIEH, Y. R.; NG, C. C.; CHAN, H.; LIN, H. T.; TZENG, W. S.; SHY, Y. T., Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 373-379, 2009.
- WATANABE, H.; TOKUDA, G., Cellulolytic systems in insects. **Annual Review of Entomology**. v.55, p. 609-632, 2010.
- WIEBE, M. G., Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi - problems and improvements. **Mycologist**, v. 17, p. 140-144, 2003.
- WILLIAMS, P. T.; NUGRANAD, N., Comparison of products from the pyrolysis and catalytic of rice husks, **Energy**, v. 25, p. 493-513, 2000.
- WILLIS, J. D.; OPPERT, B.; OPPERT, C.; KLINGEMAN, W. E.; JURAT-FUENTES, J. L., Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 300-306, 2011.
- WILSON, D. B., Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.295-299, 2009.
- WITHER, S. G., Mechanism of glycosyl transferase and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**. v. 44, p. 325–337, 2001.
- WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H., Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 1557-1560, 2009.
- WONG, K. K. Y.; ALISON, R. W.; SPEHR, S., Effects of alkali and oxygen extractions of kraft pulp on xylanase-aided bleaching. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 27, p. 229-234, 2001.
- WOOD, T. M. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: *Coughlan, M. P. (Ed). Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. Elsevier, London. pp. 17-35, 1989.
- WOOD, T. M.; BHAT, K. M., Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-117, 1988.
- WYK, J. P. H. van, Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 172-177, 2001.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A., Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 832-837, 2004.
- YANG, B.; WYMAN, C. E., Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, 88-95, 2004.

- YANG, P.; GUO, L.; CHENG, S.; LOU, N.; LIN, J., Recombinant multi-functional cellulase activity in submerged fermentation of lignocellulosic wastes. **Renewable Energy**, v. 36, p. 3268-3272, 2011.
- YANG, S. Q.; YAN, Q. J.; JIANG, Z. Q.; LI, L. T.; TIAN, H. M.; WANG, Y. Z., High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.97, p. 1794-1800, 2006.
- YOO, J.; SAJID ALAVI, S.; PRAVEEN VADLANI, P.; AMANOR-BOAD, V., Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7583- 7590, 2011.
- YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M., Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production, **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.
- YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M., Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 160-169, 2012.
- ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T. dos; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C. da; SILVA, K. T. da; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 937-943, 2001.
- ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 170-176, 2004.
- ZANZI, R., **Pyrolysis of biomass**, Royal Institute of Technology, Department of Chemical Engineering and Technology, Stockholm, 52, Dissertation, 2001.
- ZHANG, L.; LIU, Y.; NIU, X.; LIU, Y. W., Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 16-24, 2012.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.
- ZHU, J. Y.; PAN, X. J.; WANG, G. S.; GLEISNER, R., Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2411-2418, 2009.
- ZUCCO, L. L., Estudo da viabilidade de fabricação de placas de compósitos à base de cimento e casca de arroz. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

ANEXO I (Representações gráficas em função da determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$)

Figura 34: Representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de FPase em relação à concentração de celulose (papel filtro) para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

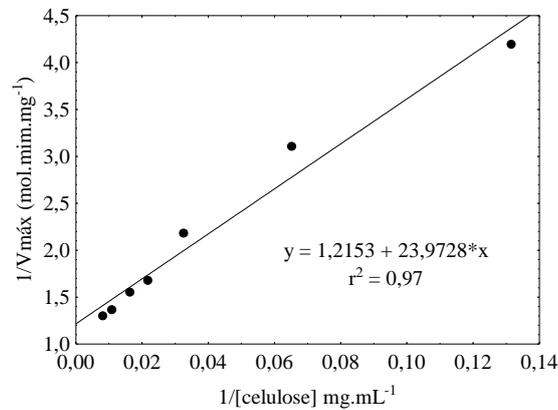


Figura 35: Representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de CMCase em relação à concentração de carboximetilcelulose para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

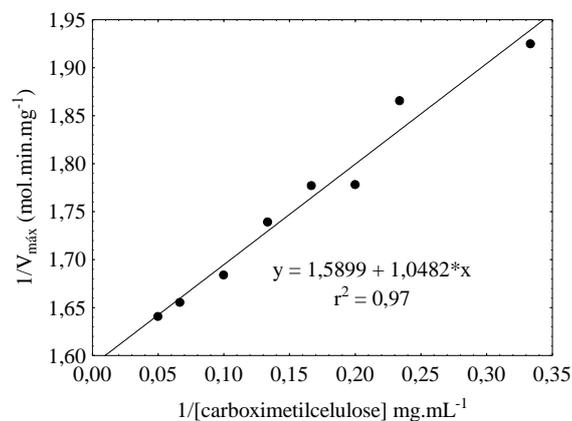
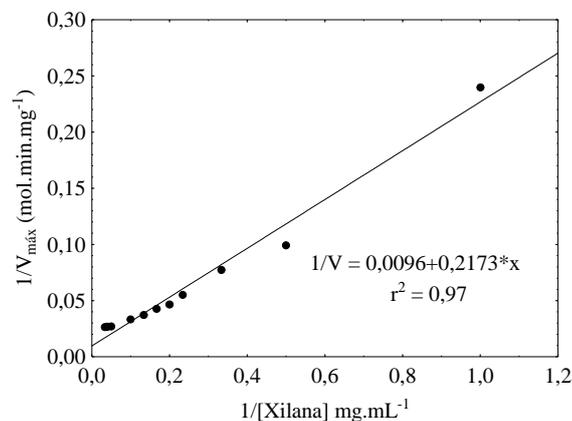


Figura 36: Representação gráfica linearizada pelo método de Lineweaver-Burk dos dados de atividade de xilanase em relação à concentração de xilana para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$.



ANEXO II (Artigo completo publicado em periódico)