

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUDMILA NOSKOSKI SALAZAR

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR UM NOVO ISOLADO DE *Penicillium* sp. EM
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

ERECHIM, RS – BRASIL
NOVEMBRO 2016

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR UM NOVO ISOLADO DE *Penicillium* sp. EM
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

LUDMILA NOSKOSKI SALAZAR

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Erechim, como requisito parcial 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 Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL
NOVEMBRO DE 2016

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR UM NOVO ISOLADO DE *Penicillium* sp. EM
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

Ludmila Noskoski Salazar

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial 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.

Geciane Toniazzi Bakkes, D.Sc.
(Orientadora)

Rogério Luis Cansian, D. Sc.
(Orientador)

Ilizandra Aparecida Fernandes, D.Sc
URI-Campus de Erechim

Eunice valduga, D. Sc.
URI-Campus de Erechim

Simone Maria Golunski, D.Sc
UFFS – Campus de Erechim

Morgana Karin Pierozan, D.Sc
IDEAU – Campus de Getúlio Vargas

Erechim, novembro de 2016.

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, Carlos e Cleide, pelo amor, exemplo, apoio , incentivo e conselhos que me deram sempre.

Ao meu marido Rodrigo Salazar, pelo carinho, paciência e apoio em todos momentos difíceis que passamos juntos.

Aos meus queridos orientadores Geciane e Rogério, pela dedicação e suporte oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos bolsistas Tailan e, em especial Naionara, a qual me ajudou muito e compartilhou comigo alguns dos momentos desafiadores no desenvolvimento da tese.

Aos funcionários dos laboratórios e colegas da URI.

Aos colegas, Viviane Astolfi pela ajuda no início do trabalho; Simone Golunki pela amizade, ajuda e carinho; Aline Ficanha, pela grande amizade que construí nessa etapa de minha vida estando presente nos momentos de descontração e pela ajuda nos entendimentos de alguns pontos; Angela Antunes, pelo carinho e descontração.

Aos colegas da Unicruz.

A uma amiga de longa data, Caroline Hespanha que mesmo distante sempre esteve presente nos momentos que precisei de um apoio.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA TESE DE DOUTORADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DO URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR UM NOVO ISOLADO DE *Penicillium* sp. EM
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

Ludmila Noskoski Salazar

Novembro/2016

Orientadores: Geciane Toniazzi Backes e Rogério Luis Cansian

O objetivo deste estudo consiste na produção de enzimas lignocelulolíticas por cultivo em estado sólido (CES) utilizando *Penicillium* sp. com substratos agroindustriais e a caracterização parcial dos extratos enzimáticos brutos obtidos. Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares para determinar as melhores condições de bioprodução das enzimas FPase, xilanase, carboximetilcelulase e avicelase, investigando-se o efeito da concentração de esporos (4×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e $2,5 \times 10^7$ g⁻¹ de meio de cultivo), o tipo de substrato (casca de soja e bagaço de cana), umidade (70 %, b.u) e tempo de bioprodução (0; 3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21 dias). A concentração de esporos definida foi de 1×10^6 g⁻¹ de meio de cultivo e de bioprodução. Na sequência foi avaliado o processo de extração sólido-líquido das enzimas lignocelulolíticas testando diferentes tipos de solventes e condições de extração (água destilada, NaCl 1%, tampão citrato 0,05 M, pH 4,5), tampão acetato (0,2M pH 5,5) e Tween 80 (0,1%v/v) e, ciclos de extração, seguido de um planejamento fatorial completo 2² a fim de avaliar os efeitos da temperatura (35,9-64,1°C) e agitação (54,5-195,5 rpm) em um tempo de extração fixo de 30 min. As condições que possibilitaram a maior recuperação das enzimas foram: i) solução tampão citrato (0,05 M, pH 4,5); ii) a 50°C; iii) por 30min e; iv) 100 rpm. A produção enzimática do *Penicillium* sp. dependeu de fatores intrínsecos e extrínsecos tais como: i) temperatura; ii) concentração de substrato; iii) quantidade de esporos e; iv) umidade do meio fermentado impactando nas etapas de condução de processo e na etapa de recuperação enzimática. A partir das condições otimizadas as etapas de cultivo e recuperação, foram avaliados a estabilidade térmica das enzimas em função da temperatura e tempo. Desse modo observou-se para xilanase (25 a 40°C a 100 h), avicelase (25°C após 144 h), CMCase (25°C após 132 h), FPase (25°C após 144 h), respectivamente. A energia de desativação (KJ/mol/T°K) para xilanase, avicelase, CMCase e FPase foram de 89,1; 96,7; 78,0 e 89,3, respectivamente. Cinética química do extrato enzimático lignocelulolítico em que se pode concluir o elevado potencial tecnológico e viabilidade econômica do procedimento de CES desenvolvido para produção de FPase, xilanase, CMCase e avicelase com *Penicillium* sp. em substrato de casca de soja.

Palavras-Chave: Celulases. Cultivo estado sólido. Bioprodução.

Abstract of Thesis to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor of Food Engineering.

**PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF
LIGNOCELLULOLYTIC ENZYMES FOR A NEW ISOLATE OF *Penicillium* sp
FROM SOLID STATE FERMENTATION**

Ludmila Noskoski Salazar

November / 2016

Advisors: Geciane Toniazzo Backes and Rogério Luis Cansian

The aim of this study was to evaluate the lignocellulolytic enzymes production by solid state fermentation (SSF) using *Penicillium* sp. using agroindustrial substrates as well as enzymatic extracts characterization. At first moment, FPase enzymes, xylanase, CMCase and avicelase bioproduction were conducted to determine the optimized conditions. In this sense, the effect of the concentration of spores (4×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 and 2.5×10^7 / g of culture medium), the type of substrate (soybean hulls and bagasse), humidity (70% w.b.) and time bioproduction (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 days) were evaluated. The optimized condition of *Penicillium* sp concentration was defined at 1×10^6 spores/ g of culture medium and bioproduction. Consequently, solid-liquid process for lignocellulolytic enzymes extraction was investigated. The evaluated parameters were: i) types of solvents and extraction conditions (distilled water, NaCl 1%, citrate buffer (0.05M, pH 4.5); ii) acetate buffer (0.2 M pH 5.5) and Tween 80 (0.1% v/v) and iii) extraction cycles. The temperature (35.9 to 64.1 °C) and agitation (54.5 to 195.5 rpm) effects on fermentation were evaluated by using of 2^2 full factorial design with 30 min time extraction. The greatest enzymatic extraction was achieved by those conditions: i) citrate buffer (0.05M, pH 4.5); ii) 50 °C; iii) for 30 min and; iv) 100 rpm. Enzymatic production of *Penicillium* sp. was depended on intrinsic and extrinsic factors such as: i) temperature; ii) concentration of substrate; iii) number of spores and; iv) moisture in the fermentation broth impacting process of driving steps and enzyme recovery step. From the optimized conditions the cultivation and recovery steps were evaluated the thermal stability of the enzymes as a function of temperature and time. Thus, xylanase (25 to 40°C to 100 h), avicellase (25°C after 144 h), CMCase (25°C after 132 h), FPase (25°C after 144 h), respectively were observed. The deactivation energy (KJ / mol / T ° K) for xylanase, avicellase, CMCase and FPase were 89.1; 96.7; 78.0 and 89.3, respectively. Chemical kinetics studies of lignocellulolytic enzyme extract have been demonstrated the high technological potential and economic feasibility of the CES procedure developed for the production of FPase, xylanase, CMCase and avicellase with *Penicillium* sp. in soybean hull substrate.

Keywords: Cellulases. Solid State Fermentation. Bioproduction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Objetivo Geral	19
1.2 objetivos Específicos.....	19
2.1 Estrutura da parede celular vegetal	21
2.1.1 Celulose	22
2.1.2 Hemicelulose	23
2.1.3 Lignina.....	23
2.2 Enzimas lignocelulolíticas.....	24
2.2.1 Celulases.....	24
2.2.2 Carboximetilcelulase (CMCase)	26
2.2.3 Xilanase	27
2.2.4 Avicelase	28
2.3 Micro-organismos produtores de enzimas lignocelulíticas.....	29
2.4 Bioprodução de enzimas lignocelulíticas.....	31
2.4.1 Resíduos agroindustriais utilizados na bioprodução de enzimas	34
<i>Bagaço de cana</i>	34
<i>Casca de soja</i>	35
2.5 Fatores que influenciam na estabilidade enzimática.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Screening de micro-organismos lignocelulolíticos	37
3.2 Bioprodução de enzimas lignocelulíticas.....	38
3.2.1 Preparo do inóculo.....	38
3.2.2 Seleção dos micro-organismos e substratos para produção de enzimas lignocelulolíticas	39
3.2.3 Efeito da temperatura, concentração de esporos e do teor de umidade	40
3.3 Processo de extração das enzimas lignocelulolíticas	41
3.4 Caracterização parcial dos extratos lignocelulolíticos	42
3.4.1 Avaliação da temperatura e pH ótimo.....	42

3.4.2 Estabilidade térmica e as diferentes condições de pH	42
3.4.3 Determinação de parâmetros cinéticos da energia de desativação	43
3.5 Avaliação da hidrólise de substratos lignocelulósicos	43
3.6 Determinação analítica	44
3.6.1 Atividade de Avicelase (exo-glucanase)	44
3.6.2 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)	44
3.6.3 Atividade de FPase	45
3.6.4 Atividade da xilanase	46
3.6.5 Determinação da composição centesimal dos substratos	47
3.7 Tratamento estatístico	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Seleção dos micro-organismos e substratos para produção de enzimas lignocelulolíticas	48
4.2 Estudo de variáveis que influenciam na bioprodução de celulasas	53
4.2.1 FPase (7 Dias)	56
FPase (14 Dias)	57
4.2.2 Xilanase (7 Dias)	59
Xilanase (14 Dias)	60
4.2.3 CMCase (7 Dias)	62
CMCase (14 Dias)	63
4.2.4 Avicelase (7 Dias)	65
4.2.5 Avicelase (14 Dias)	66
4.3 Processo de extração das enzimas lignocelulolíticas	68
4.3.1 Efeito de diferentes solventes na extração	68
4.3.2 Efeito da temperatura e agitação no proceso de extração	69
4.3.3 Xilanase	70
4.3.4 FPase	71
4.3.5 CMCase	73
4.3.6 Avicelase	74
4.4 Caracterização parcial de enzimas lignocelulolíticas obtidas por cultivo em estado sólido usando <i>Penicillium</i> sp. em casca de soja	75
4.4.1 pH e temperatura ótimos	75
4.4.2 Efeito do pH na estabilidade	81
4.4.3 Estabilidade térmica das enzimas	82

4.4.3.1 Xilanase	83
4.4.3.2 Avicelase	85
4.4.3.3 CMCase	86
4.4.3.4 FPase	88
4.4.4 Parâmetros cinéticos.....	90
4.5 Aplicação do extrato enzimático na hidrólise de substratos lignocelulolíticos.....	93
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
5.1 Conclusões.....	96
5.2 Sugestões.....	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICES	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das celulasas em diferentes indústrias.....	25
Tabela 2	Celulasas comerciais produzidas por diferentes companhias e suas fontes.	25
Tabela 3	Características das xilanases em diferentes indústrias.....	28
Tabela 4	Micro-organismo e substrato que produzem diferentes enzimas lignocelulolíticas em cultivo em estado sólido	33
Tabela 5	Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para bioprodução de enzimas lignocelulolíticas.....	41
Tabela 6	Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para a extração da celulase.....	41
Tabela 7	Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas FPase e CMCase, xilanase e avicelase.....	42
Tabela 8	Seleção de substratos (casca de soja e bagaço de cana) para a produção de Xilanase e FPase com os fungos CLF1 e T2F4.....	49
Tabela 9	Caracterização dos resíduos agroindustriais utilizados na produção de enzimas lignocelulolíticas.....	50
Tabela 10	Seleção de micro-organismos para produção de enzimas lignocelulíticas com casca de soja.....	52
Tabela 11	Influência da temperatura de fermentação na atividade de FPase, xilanase, CMCase e avicelase.....	53
Tabela 12	Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 valores reais e codificados e respostas em produção das enzimas FPase, Xilanase, CMCase e Avicelase.....	54
Tabela 13	Análise de variância para a bioprodução de FPase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2^2	56
Tabela 14	Análise de variância para a bioprodução de FPase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2	57
Tabela 15	Análise de variância para a bioprodução de xilanase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2^2	59
Tabela 16	Análise de variância para a bioprodução de xilanase em 14 dias do	

	planejamento fatorial completo 2^2	60
Tabela 17	Análise de variância para a bioprodução de CMCase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2^2	62
Tabela 18	Análise de variância para a bioprodução de CMCase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2	63
Tabela 19	Análise de variância para a bioprodução de avicelase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2^2	65
Tabela 20	Análise de variância para a bioprodução de avicelase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2	66
Tabela 21	Atividade celulase em diferentes tipos de soluções extratoras (Tampão Citrato de Sódio 0,05M pH 4,5; Tampão Acetato de sódio 0,2M pH 5,5; Tween 80 (0,1%); Cloreto de Sódio (NaCl) 1,0% e água destilada).....	68
Tabela 22	Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , valores reais e codificados e respostas em produção das enzimas FPase, Xilanase, CMCase e Avicelase.....	70
Tabela 23	Análise de variância para a extração de FPase do planejamento fatorial completo 2^2	72
Tabela 24	Análise de variância para a extração de avicelase do planejamento fatorial completo 2^2	74
Tabela 25	Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 valores reais e codificados e respostas em atividade de xilanase e avicelase para pH e temperatura.....	76
Tabela 26	Análise de variância para a atividade de xilanase e avicelase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.....	77
Tabela 27	Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 valores reais e codificados e respostas em atividade FPase e CMCase para pH e temperatura.....	79
Tabela 28	Análise de variância para a atividade de FPase e CMCase do planejamento fatorial completo 2^2 em função de temperatura e pH ótimos.....	80
Tabela 29	Valores experimentais de kd, $t_{1/2}$ e valor D para xilanase, avicelase, CMCase e FPase em função da temperatura.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da parede celular vegetal.....	21
Figura 2	Estrutura da celulose, formada por unidades de glicose.....	22
Figura 3	Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexo (A) e complexada (B).....	30
Figura 4	Identificação dos fungos filamentosos.....	38
Figura 5	Esporos do fungo filamentoso (a); câmara de Neubauer (b).....	39
Figura 6	Identificação do micro-organismo isolado CLF1.....	51
Figura 7	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de FPase (U/g) 7 dias.....	57
Figura 8	Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de FPase (U/g) em 14 dias.....	58
Figura 9	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de xilanase (U/g) em 7 dias.....	60
Figura 10	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de xilanase (U/g) em 14 dias.....	61
Figura 11	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de CMCase (U/g) em 7 dias.....	63
Figura 12	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de CMCase (U/g) em 14 dias.....	64
Figura 13	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de avicelase (U/g) em 7 dias.....	66
Figura 14	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de avicelase (U/g) em 14 dias.....	67

Figura 15	Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2^2 , para a extração de xilanase..	71
Figura 16	Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da temperatura e agitação na extração de FPase (U/g).....	73
Figura 17	Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2^2 , para a extração de CMCase..	73
Figura 18	Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da temperatura e agitação na extração de avicelase (U/g).....	75
Figura 19	Superfícies de resposta e curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na atividade de xilanase (a) e avicelase (b), respectivamente	78
Figura 20	Superfícies de resposta e curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na atividade de FPase (a) e CMCase (b) , respectivamente.....	80
Figura 21	Resultados da estabilidade em diferentes pH da enzimas lignocelulolíticas xilanase (a), avicelase (b), CMCase (c) e FPase (d) , respectivamente.....	82
Figura 22	Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de avicelase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja.....	83
Figura 23	Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de CMCase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja, respectivamente.....	85
Figura 24	Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de CMCase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja.....	87
Figura 25	Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de FPase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja.....	89
Figura 26	Determinação da energia de desativação baseada na linearização da equação de Arrhenius para uma faixa de temperatura de 25 a 70°C para xilanase (a), avicelase (b), CMCase (c) e FPase (d).....	93
Figura 27	Percentual de hidrólise de casca de soja (a) e sabugo e palha de milho (b) em diferentes condições de agitação.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

‰: Porcentagem

°C: Graus Celsius

μmol: Micro mol

ART: Açúcares Redutores Totais

CS: Casca de soja

BC: Bagaço de cana

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalisílico

EGs: Endoglucanases

CES: Cultivo em estado sólido

FS: Fermentação submersa

FPU: Atividade de papel de filtro (FPase)

g/L: Grama/litro

L: Litro

M: Molaridade

min: Minutos

mL: Mililitros

N: Normalidade

pH: Potencial hidrogeniônico

PM: Peso molecular

R: Razão

R²: Coeficiente de correlação

rpm: Rotação por minutos

RS: Rio Grande do Sul

s: Segundos

t: Tempo

U: Unidade de atividade enzimática

U/g: Unidade de atividade/grama

U/gds: Unidade de atividade/grama sólido seco

URI: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das missões

UV: Ultra Violeta

v/v: Volume por volume

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca economicamente pela forte produção de resíduos agroindustriais como soja e bagaço de cana de açúcar. Estes resíduos são oriundos do processamento grãos que na maioria das vezes são descartados pelas indústrias ou utilizados na alimentação animal. Entretanto, estes resíduos apresentam passivo ambiental em função de suas características físico-químicas quando lançados indevidamente no ambiente.

Conforme Pinto et al. (2005), no final do século XX a sociedade passou a buscar a conscientizar-se ecologicamente e, conseqüentemente, passou a cobrar a produção de serviços e bens que alinhassem o crescimento econômico coma correta gestão e emprego dos recursos naturais. Neste sentido, nos últimos anos, diferentes estudos e pesquisas relativos a processos biotecnológicos envolvendo rotas enzimáticas e microbiológicas buscam propor diferentes empregos para uma série de resíduos e sub-produtos como uma estratégia de gerenciamento de recursos naturais e, paralelamente, buscando a agregação de valores do material que seria descartado. Neste contexto, os resíduos agroindustriais são constituídos de uma matriz lignocelulósica contendo celulose, hemicelulose e lignina como principais constituintes. Além disso, em função de ser uma fonte muito rica de nutrientes, é empregado para produção de biomassa, energia e diferentes insumos, enzimas entre outras aplicações de natureza biotecnológica.

A celulose é o biopolímero mais abundante no mundo e pode ser hidrolisada pela enzima celulase. Sua produção está em terceiro lugar dentre as enzimas industriais comercializadas (CASTRO et al 2010). Essas enzimas são resultado da ação de micro-organismos com o substrato que pode ser bagaço de cana ou casca de soja, por exemplo, através do cultivo estado sólido.

Entretanto, estes micro-organismos exigem condições restritas de meio de cultura, necessitando de rígido controle do tempo de fermentação, temperatura, pH e das características físico-química do substrato que permitam conduzir o processo fermentativo com a eficiência e produtividade necessárias (NELSON e COX, 2014). Com isso, há um grande potencial de estudo e aplicação de diferentes resíduos agroindustriais para a produção de enzimas a baixo custo. Paralelamente, diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos podem ser utilizados com este intuito. O emprego de fungos filamentosos tem sido amplamente investigado em função desses se adaptarem a condições restritivas de meio que apresentam pouca umidade e muitos sólidos presentes e, no que tange o aspecto

citológico, os fungos filamentosos desenvolvem hifas favorecendo a colonização do meio de cultura. Além disso, em função da maturidade tecnológica alcançada nos últimos anos, o emprego de fungos filamentosos tais como *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei* (LYND et al, 2002; MENDES, 2010; SINGHANIA et al.,2010) tem sido proposto em diferentes segmentos científico e biotecnológicos para diferentes finalidades, incluindo a produção de enzimas.

Dentre as enzimas obtidas, as celulases são particularmente interessantes, pois podem ser empregadas em diferentes setores industriais tais como: indústria alimentícia (processos de maceração, em conjunto com hemicelulases e pectinases); indústrias têxtil (remoção do excesso de corantes em tecidos jeans); indústria de papel e celulose (refino da mesma); indústria química entre outras de química fina e materiais (CASTRO E PEREIRA, 2010). Com isso, o emprego do cultivo estado sólido representa uma tecnologia alternativa para a utilização destes resíduos agroindustriais, permitindo reduzir passivos ambientais, agregando valor ao resíduo que seria descartado, podendo contribuir na diversificação do agronegócio e indústria química nacional.

Diante disso, a investigação de micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas pode contribuir para o crescimento do setor biotecnológico, no sentido de permitir o surgimento de rotas auxiliares para o processo de bioprodução empregando resíduos agrícolas e, paralelamente, fazendo com que surjam processos mais eficientes em termos de produção e rendimento.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de celulase total em papel filtro (FPase), carboximetilcelulase (CMCase), xilanase e avicelase (exo-glucanase) por cultivo em estado sólido de uma nova cepa de *Penicillium* sp. em resíduos agroindustriais.

1.2 Objetivos Específicos

1. Selecionar micro-organismos para a produção de enzimas lignocelulolíticas utilizando diferentes substratos (casca de soja e bagaço de cano de açúcar) e pré-identificar o micro-organismo selecionado;
2. Avaliar a influência da temperatura, concentração de esporos e da umidade dos substratos para a produção de FPase, xilanase, avicelase e CMCase, em função do tempo;

3. Avaliar as condições de extração em termos de pH, temperatura, agitação e tipo de solvente para as enzimas lignocelulolíticas;
4. Caracterizar parcialmente o extrato enzimático bruto através de pH e temperatura ótimos e estabilidade de estocagem (altas e baixas temeprtauras em diferentes pHs);
5. Aplicar o extrato bruto para promover a hidrólise em substratos lignocelulolíticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

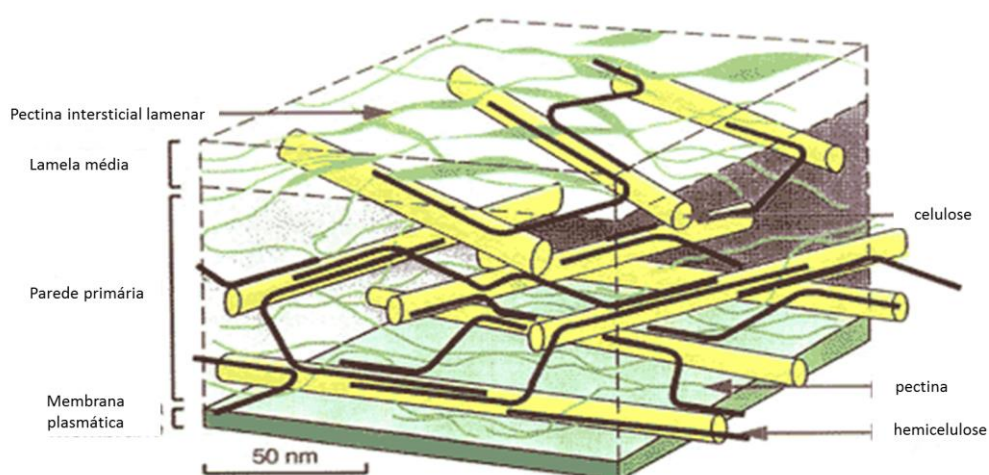
Este capítulo apresenta um levantamento de dados bibliográficos abordando os seguintes assuntos pertinentes: estrutura da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), enzimas lignocelulolíticas (celulase, FPase, CMCase, xilanase, avicelase), cultivo estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substratos lignocelulíticos.

2.1 Estrutura da parede celular vegetal

Segundo Pandey et al. (2000), os materiais lignocelósicos são compostos por celulose, hemicelulose e lignina. Sua composição depende de diversos fatores como o tipo de vegetal, as condições de crescimento, a parte da planta escolhida, o tempo de colheita, entre outros.

A parede celular é composta por uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais (Figura 1). Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede consistindo em celulose, que varia em torno de 20-40% dos constituintes totais da parede celular, hemiceluloses (15-25%) e pectinas (~30%). Essa matriz é altamente ordenada e dinâmica podendo tornar-se mais rígida ou mais estirada conforme as necessidades ontogênicas e comportamentais da célula ou da planta (BUCKERIDGE et al., 2010).

Figura 1– Estrutura da parede celular vegetal.

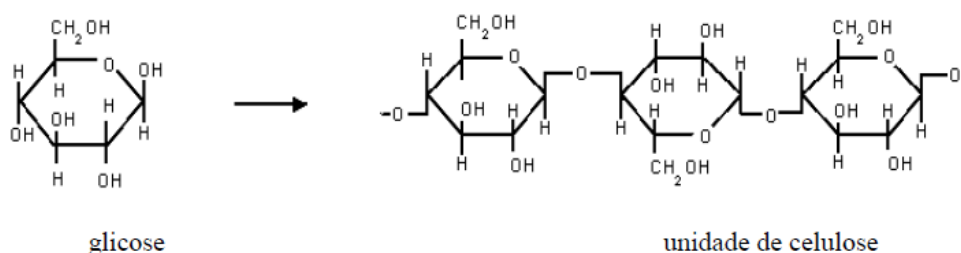


Fonte: IPPA, 2008.

2.1.1 Celulose

A celulose é o constituinte mais abundante da parede celular vegetal sendo definido como um homopolissacarídeo composto por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 2), portanto sendo formada por unidades consecutivas de celobiose (ARANTES e SADDLER, 2010; MENDES, 2010). Os radicais hidroxilas (OH) das moléculas de glicose que compõem a cadeia de celulose permitem que as macroestruturas forme pontes de hidrogênio inter e intramolecular, conferindo a celulose a capacidade de formar uma estrutura cristalina de alta rigidez, conferindo resistência mecânica à parede celular (ZANELATO, 2011).

Figura 2 – Estrutura da celulose, formada por unidades de glicose.



Fonte: Zanelato (2011).

As regiões cristalinas se formam em função do aumento da densidade de empacotamento. Há celuloses acessíveis e celuloses não acessíveis. Quanto mais acessíveis, mais interações podem ocorrer entre a celulose e fatores diversos como água e microorganismos, por exemplo. As superfícies da celulose cristalina são muito acessíveis, mas o resto da estrutura não é. A maioria das celuloses não cristalinas são acessíveis, porém como a estrutura é coberta por hemicelulose e lignina, a acessibilidade fica diminuída (ROWELL et al., 2005).

Nos materiais lignocelulósicos açúcares estão na forma de polímeros (celulose e hemicelulose), ficando eles associados entre si e recobertos por uma molécula aromática complexa de lignina. Este conjunto é chamado de parede celular vegetal, difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (CANILHA et al., 2010).

Segundo Rabelo (2007), a celulose corresponde a aproximadamente 40% de toda a reserva de carbono disponível no vegetal. Seu conteúdo na estrutura vegetal oscila de 20 a

99%, perfazendo a fisiologia de todos os vegetais, desde os mais simples até as árvores mais complexas.

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é composta, principalmente, de dois grupos de heteropolissacarídeos categorizados em pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose). Esses açúcares estão ligados entre si, principalmente por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo que diferem no tamanho das microfibrilas a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos (FARINAS et al, 2008).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN). Dentre os diversos reagentes a base de hemiceluloses disponíveis no mercado podem ser citados as xilanas obtidas 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*) (FARINAS et al, 2008).

2.1.3 Lignina

A lignina é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É uma substância que aos poucos é incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidade fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo da biossíntese da lignina. Esta se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (RABELO, 2007).

2.2 Enzimas lignocelulolíticas

2.2.1 Celulases

As celulases são enzimas hidrolíticas importantes industrialmente e são de grande significância para a biotecnologia. Estas enzimas são produzidas por várias espécies de micro-organismos como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e espécies de *Trichoderma* (AZZAZ et al., 2012).

Estas consistem em um sistema complexo de três grupos de enzimas que agem em sinergia para hidrolisar a celulose rompendo as ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ da celulose (KESHWANI e CHENG, 2009; SINGHANIA et al., 2010). Conforme Singhanian et al. (2010), esse complexo de enzimas representam 13 das 82 enzimas da família das hidrolases identificadas e sequenciadas até o momento e, além disso, é o mais estudado.

Este complexo enzimático apresenta como os principais componentes as endo-glucanases (EG), celobio-hidrolases (CBH) e as β -glucosidases (BGL). As endo-glucanases produzem sulcos no polímero de celulose expondo as extremidades redutoras e não redutoras. As celobio-hidrolases atuam sobre estas extremidades redutoras e não redutoras liberando oligossacarídeos e unidades de celobiose. E as β -glucosidases clivam a celobiose para gerar a glicose e assim completar a hidrólise (SUKUMARAN et al., 2005).

Conforme Singhanian et al. (2010), o mercado de enzimas celulolíticas é o terceiro maior em volume de produção no mundo em função de suas inúmeras aplicações tais como: setor têxtil, reciclagem de papel, na extração e elaboração de sucos, como agente enzimático de detergentes biodegradáveis e como aditivo em ração animal, conforme apresentado na Tabela 1.

A produção de enzimas celulolíticas pode vir a ser a primeira em volume de produção se houver o surgimento de novos procedimentos com menores custos energéticos e de manutenção e, principalmente, se o mercado de bioetanol obtido de biomassa vegetal através de hidrólise enzimática tornar-se mais viável econômico e tecnologicamente e vir a ser a matriz energética de mais países (SUKUMARAN et al., 2005; SINGHANIA et al., 2010; MENDES, 2010).

Tabela 1 – Características das celulasas em diferentes indústrias.

Setor	Aplicação	Função	Referência
Indústria de alimentos	Utilizado no processo de maceração de frutas	Clarificação e filtração de sucos	Bhat.(2000); BhateBhat (1997)
	Vinhos	Liberar compostos fenólicos e aromáticos	Daroit et al. (2007)
Alimentação animal	Monogástricos	Hidrólise de polissacarídeos não amiláveis	BhateBhat (1997)
	Ruminantes	Aumentar a digestão de forrageiras	Niehaus et al. (1999)
Têxtil e lavanderia	Remoção do excesso de corantes em jeans	Bioestonagem	Mussatto et al. (2008)
		Redução do tempo no uso da máquina de estonagem	Han e Chen (2007)
Polpa de celulose e papel	Fabricação de polpa de celulose	Modificar propriedade das fibras	Bhat(2000)

Singhania et al. (2010) fizeram a avaliação do mercado de celulasas em função das principais indústrias produtoras de enzimas celulolíticas, o tipo de cultura empregada e o nome comercial conforme pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Celulasas comerciais produzidas por diferentes companhias e suas fontes.

Nome comercial	Fornecedores	Micro-organismos utilizados para produção do extrato enzimático
Cellubrix (Celluclast)	Novozymes (Dinamarca)	<i>T. longibrachiatum</i> e <i>A.niger</i>
Novozymes 188	Novozymes (Dinamarca)	<i>A. niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco (Vinay, França)	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Rohament CL	Rohm-AB Enzymes (Rajamaki, Finlândia)	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic (Jupiter, USA)	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Multifect CL	Genencor Intl (S. São Francisco, CA)	<i>T. reesei</i>
Biocellulase A	Quest Intl.	<i>A. niger</i>
Ultra-low microbial (ULM)	Iogen (Ottawa, Canada)	<i>T. reesei/T. Longibrachiatum</i>

Fonte: Singhania et al. (2010).

Festushi-Bussell et al. (2007), estimaram que aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose são produzidos por ano mundialmente, tornando o reino vegetal o maior sorvedouro desse polissacarídeo bem como o maior reservatório de carbono no mundo. Paralelamente, os micro-organismos capazes de processar celulose, hemicelulose entre outros componentes lignocelulósicos tem despertado o interesse em diversos setores científicos, produtivo e tecnológico (papel, tecidos, açúcares, ácidos orgânicos, tensoativos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos) além da produção do bioetanol ou álcool de segunda geração (KESHWANI e CHENG, 2009).

As 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. A atividade de papel filtro, o FPU – Filter Paper Units, é o método-chave para análise da atividade celulase total. Em 1976, o FPA – Filter Paper Activity 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 totais (ART) é medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

2.2.2 Carboximetilcelulase (CMCase)

As carboximetilcelulasas são endoglucanases (EGs) que podem hidrolisar aleatoriamente a cadeia de celulose atacando as ligações internas 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) com base no procedimento descrito por Mandels et al. (1976).

Conforme Peixoto (2006) uma das divisões das enzimas celulasas são as Endo- β (1-4) glucanase ou β (1-4) D-glucano-4-glucanohidrolase ou Cxcelulase ou MCMase que hidrolisa

ligações $\beta(1-4)$ ao acaso dentro da cadeia de celulose liberando glicose, celobiose e celodextrinas.

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 (FUJITA et al., 2002).

2.2.3 Xilanase

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 xilana representa a principal classe de hemicelulose. É mais suscetível à hidrólise que a celulose, pois não possui regiões cristalinas e apresenta baixo grau de polimerização. Apesar disso, é necessário um sistema de enzimas específicas para degradação completa, dada a sua estrutura variável e ramificada (SHALLOM e SHOHAM, 2003).

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 organo-clorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente (WONG et al., 2001). A Tabela 3 apresenta as diferentes características das xilanases em diferentes indústrias.

Tabela 3 – Características das xilanases em diferentes indústrias.

Setor	Aplicação	Função	Referência
Indústria de alimentos	Sucos e Vinhos	Rendimento e operacionalidade e melhorar a qualidade do produto	Haros et al. (2002)
	Filtração de cerveja		
Alimentação Animal	Panificação	Utilizada sobre as arabinoxilanas, com função de aumentar o volume e melhorar estrutura do miolo	Butt et al. (2008)
	Monogástricos (aves e suínos)	Aumentar a digestibilidade	Kang et al. (2004)
Celulose e Papel	Biobranquiamento da polpa	Substituição do cloro que remove a xilana ligada ao complexo lignina-carboidrato	Gomes (2007) Bhat (2000)
Têxtil e Lavanderia	Maceração do linho, rami e cânhamo	Redução e substituição das metodologias de maceração	Beg et al. (2001)

2.2.4 Avicelase

As exoglicanases (EC 3.2.1.91), conhecidas também como celobiohidrolases, β -1,4-celobiohidrolases ou avicelases hidrolisam as ligações glicosídicas da celulose a partir das extremidades redutora e não redutora, liberando celobiose. Elas atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização (MANSUR, 2011).

As avicelases agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos (MANSUR, 2011).

O 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 (KOHRING 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.

A enzimas celulasas, entre elas a avicelase, podem ser aplicadas na produção animal, processamento de amido, de maltagem e fabricação de cerveja, álcool de cereais fermentação, indústria têxtil e indústria de celulose e papel (FAUZI e MAKKI, 2014).

2.3 Micro-organismos produtores de enzimas lignocelulíticas

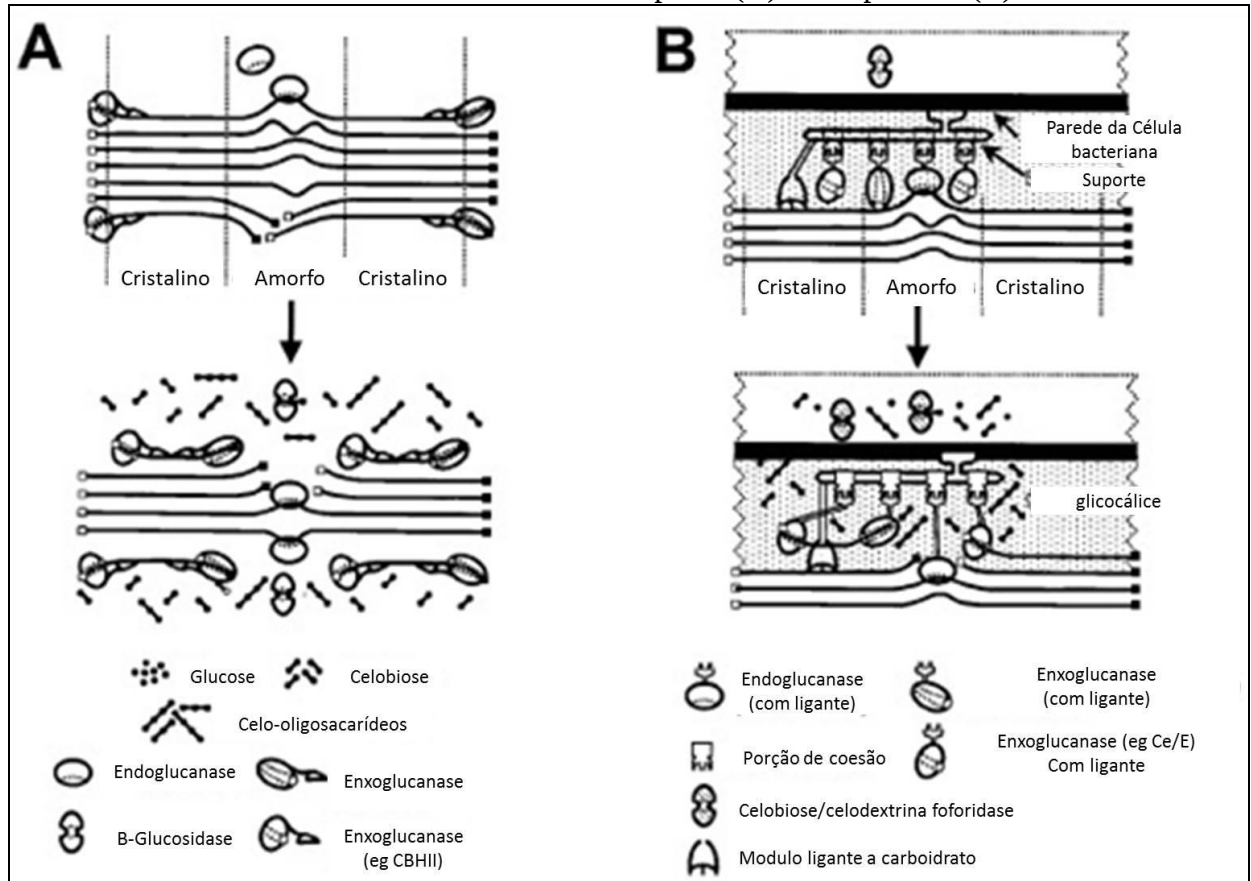
A variedade de substratos existentes na natureza faz com que haja uma série de micro-organismos com diferentes capacidades metabólicas. Esta diversidade varia amplamente entre espécies desde aquelas altamente especializadas que podem utilizar apenas um substrato como fonte energética, até aquelas altamente versáteis que podem utilizar variados compostos como fonte de energia e precursores metabólitos (LYND et al., 2002). Os micro-organismos especialistas em obter energia de fontes de carbono advindas de açúcares da madeira, principalmente a celulose, são chamados de celulolíticos (LYND et al., 2002; MENDES, 2010).

As celulasas podem ser produzidas por um espectro de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos (DE OLIVEIRA, 2014). As principais culturas produtoras desse complexo enzimático são fungos filamentosos (ZHONG et al., 2012) tais como *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei* (LYND et al., 2002; SUKUMARAN et al., 2005; MENDES, 2010; SINGHANIA et al., 2010). O maior interesse nos sistemas celulolíticos fúngicos reside no fato de serem extracelulares e, por isso, de mais fácil obtenção (SUKUMARAN et al., 2005).

Além dos fungos filamentosos, as celulasas podem ser produzidas por outros micro-organismos que incluem bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Ruminococcus*, etc) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, etc), actinomicetos (*Streptomyces*), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002).

A Figura 3 apresenta um esquema de hidrólise enzimática realizado por micro-organismos.

Figura 3 – Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexo (A) e complexada (B).



Fonte: Lynd et al. (2002).

Entretanto, outros tipos de fungos merecem atenção na produção de tais enzimas, como o fungo *Penicillium*, que foi utilizado neste trabalho.

2.3.1 *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é composto por espécies pouco exigentes nutricionalmente, capazes de crescer em qualquer ambiente com uma fonte de sais minerais ou qualquer fonte de carbono exceto as mais complexas, numa vasta gama de condições físico-químicas. Eles apresentam hifas septadas e conodióforos na forma de pincéis. Seus esporos assexuados produzem uma estrutura típica do gênero designada de *penicillus* (pl. penicilli, que em latim significa pincel). Os conídios nascem em cadeias produzidas pelas fiálides. As fiálides estão

em verticilos no estipe, e assentam nele diretamente ou com a intervenção de células de suporte especializadas. O penicillus é toda estrutura suportada pelo estipe. Os conídios são regra geral de cor verde, as fiálides tem pescoços curtos e paredes lisas (TORTORA et al., 2000; FASANELLA, 2008).

A espécie de fungos *Penicillium* é relatado para produção de enzimas. Estudos feitos por Adsul et al. (2004), demostram que *P. janthinellum* NCIM 1117 foi identificado como produtor de celulase utilizando bagaço de cana como substrato. Marjamaa et al. (2013), relatou que algumas estirpes de *Penicillium* demonstraram ter um bom potencial na sacarificação de lignoceluloses. Para produção de celulase destacam-se o *P. brasilianum*, *P. echinulatum*, *P. decumbens*, *P. funiculosum*, *P. janthinellum*, *P. pinophilum* e *P. purpurogenum*. Alguns complexos de *Penicillium* mostraram-se competitivos com o *T. reesei* na hidrólise da celulose.

A produção de celulasas e hemicelulasas, segundo Jorgensen et al. (2007), por *Penicillium pinophilum* IBT 4186, *P. persicinum* IBT 13226 e *P. brasilianum* IBT 20888 foi estudada durante o cultivo em batelada controlados usando vários polissacarídeos como fonte de carbono. Dillon et al. (2012), pesquisaram o efeito de produção de enzima celulase e xilanase por *P. echinulatum* S1M29 com emprego de biorreator e substrato de bagaço de cana pré tratado. Singhvi et al. (2011) produziram celulase através de cultivo em estado sólido pelo fungo *P. janthinellum*. Utilizando farelo e palha de trigo, Mo et al. (2004) conseguiram a produção de celulase pelo fungo *P. decumbens*.

No entanto, com os estudos realizados ficou comprovado que a utilização de fungos filamentosos são mais propícios para a produção de enzimas em cultivo em estado sólido.

2.4 Bioprodução de enzimas lignocelulíticas

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO et al., 2005). Aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, por um lado oferece uma alternativa de substratos, e por outro lado ajuda a resolver problemas de poluição, o que sua disposição de outra forma causa (PANDEY et al., 2000). Para a produção de celulasas tem-se dois tipos de cultivos o em estado sólido e submerso.

Segundo Zúñiga et al.(2011), as duas principais estratégias para a produção de celulasas por micro-organismos são o cultivo estado sólido e o cultivo submerso. O que difere estes dois métodos é principalmente o teor de água presente no meio reacional.

O cultivo estado sólido é definido como o crescimento de micro-organismos em substrato sólidos, na ausência de água livre (RAHARDJO et al., 2006). Com teor de umidade variando de 30-85% e a atividade de água típica de 0,40-0,90. Esse processo permite a produção de complexos enzimáticos únicos que podem ser utilizados na indústria de alimentação animal para melhorar o desempenho e reduzir os custos de produção. O estudo do cultivo estado sólido se torna de extrema importância do ponto de vista social, econômico e ambiental, visto que o processo consiste em degradar substâncias tóxicas perigosas liberadas no ambiente em substâncias menos ou não tóxicos (PINTO et al., 2005).

Este tipo de estratégia para a produção de celulasas está rapidamente ganhando interesse, como tecnologia de baixo custo como os micro-organismos, em especial as culturas de fungos que produzem comparativamente altos títulos de celulase, devido às condições de cultivo que mostra semelhança com o ambiente natural (SINGHANIA et al., 2010).

No cultivo em estado sólido, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como materiais lignocelulósicos, na presença de quantidades variáveis de água. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produção quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (FLORENCIO, 2011; PANDEY et al., 2000).

Outra vantagem de destaque é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, servindo estes como fontes de carbono e energia.

Segundo Singhanian et al. (2010), quando otimizado, o cultivo em estado sólido, apresenta uma concentração elevada de produtos, menos geração de efluentes, e baixa repressão catabólica que o torna uma tecnologia promissora. Na Tabela 4 apresenta-se alguns relatos de autores em estudos com diferentes micro-organismos, substratos e enzimas em cultivo em estado sólido.

Tabela 4 – Micro-organismo e substrato que produzem diferentes enzimas lignocelulolíticas em cultivo em estado sólido.

Micro-organismo	Substrato	Enzima	Referência
<i>P.decumbens</i>	Farelo e palha de trigo	17,7FPU.g ⁻¹	Mo et al. (2004)
<i>Penicillium citrinum</i> YS40-5	Farelo de arroz	β-glicosidase 159,1 U.g ⁻¹	Ng et al. (2010)
<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	Bagaço de cana de açúcar e água de maceração de milho	avicelase 0,83 U.mL ⁻¹ CMCase 0,29 U.mL ⁻¹	Ladeira et al. (2015)
<i>A. fumigatus</i> MS16	Bagaço de cana	xilanase 2 IU.mL ⁻¹	Samina Naseeb et al. (2015)
<i>A. niger</i> + <i>T. reesei</i>	Palha de arroz + farelo de trigo	FPase 35,8 IU.g ⁻¹ β-glicosidase 33,71 U.g ⁻¹ CMCase 131,34 IU.g ⁻¹ xilanase 3106,34 IU.g ⁻¹	Dhillon et al. (2011)
<i>Trichoderma viridae</i>	Bagaço de cana	FPase 0,88 U.mL ⁻¹ , CMCase 33,8 U.mL ⁻¹ , BGL 0,33U.mL ⁻¹	Adsul et al. (2004)
<i>Penicillium decumbens</i> L-06	Farelo de arroz	FPase 5,76 U.g ⁻¹	Long et al. (2009)
<i>T. reesei</i> QM2124	Casca de soja+ farelo de trigo	Fpase 10,55 U.g ⁻¹	Brijwani et al.(2010)
<i>P.echinulatum</i>	Bagaço de cana+farelo de trigo	xilanase 10 U.g ⁻¹	Camassola e Dhillon (2007)
<i>P.janthinellum</i>	Bagaço de cana	xilanase 23 U.mL ⁻¹	Oliveira et al. (2005)
<i>A.aculeatus</i> URM4953	Bagaço de cana de açúcar	celulase total 0,45 UImL ⁻¹ ;endoglucanase 0,60UImL ⁻¹ xilanase 30,05 U mL ⁻¹	Sales et al. (2010)
<i>A. phoenicis</i> URM 4924			
<i>Penicillium</i> spp. LEMI A822	Resíduo de soja	CMCase 0,65 U.mg ⁻¹	Cunha et al. (2016)

Diversos pesquisadores têm investigado a utilização de resíduos lignocelulósicos como substrato em processos fermentativos para produção de enzimas como, por exemplo, a

utilização de farelo de trigo (ROOPESH et al., 2006; GOMATHI et al., 2012), farelo de arroz (NG et al. 2010), bagaço de cana (CUNHA et al., 2012; KARP et al., 2012), palha de arroz (SHARMA e ARORA, 2011), palha de cana, sabugo de milho e folhas secas (KUMAR et al. 2013) e a casca do coco verde (OLIVEIRA, 2010).

2.4.1 Resíduos agroindustriais utilizados na bioprodução de enzimas

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais são, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, e representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Estes substratos são os mais pesquisados, pois apresentam baixo custo (TORRES et al., 2012).

Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúveis em água, são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos. Bactérias e leveduras crescem na superfície, enquanto que a estrutura micelar de fungos filamentosos penetra nas partículas do substrato (CORREIA, 2004).

Vários resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela de milho, bagaço de cana, casca de maracujá, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju, palha de arroz (CORREIA, 2004). O bagaço de cana de açúcar e a casca de soja são os substratos que mais se destacam nessa proução, pelo fácil acesso e alta produção no Brasil. São ricos em nutrientes o que faz com que o meio seja propício para o desenvolvimento de micro-organismos.

Bagaço de cana

A cana-de-açúcar, nome comum de uma herbácea vivaz, planta da família das gramíneas, espécie *Saccharum officinarum*, originária da Ásia Meridional, é muito cultivada em países tropicais e subtropicais para obtenção do açúcar, do álcool e da aguardente, devido a sacarose contida em seu caule, formado por numerosos nós (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar é, sem dúvida, o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil, aproximadamente 280 kg/ton moída. Estima-se que a cada ano sejam produzidos de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a cerca de 30% do total moído (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010). É um resíduo fibroso do colmo, remanescente

do processo de obtenção do caldo de cana para produção de açúcar e álcool. Ao ser hidrolisado, o produto apresenta uma fase líquida, constituída principalmente de glicose e xilose, entre outros açúcares (BOCCHINI et al., 2005).

Para Zúñiga (2009), o bagaço de cana apresentou melhores resultados quando utilizado como substrato na produção de celulases.

Casca de soja

Outro substrato muito encontrado no Brasil é a casca de soja. Segundo BRASIL (2015), estima-se que foram gerados cerca de 1,64 milhões de toneladas deste resíduo na safra 2013/2014.

A casca de soja, um subproduto obtido da industrialização da soja, é uma película que reveste o grão, e consiste de uma fonte rica em fibra de baixa lignificação, com um teor de proteína bruta de cerca de 12% e um teor de fibra bruta ao redor de 36%. Tem grande destaque no cenário nacional, em virtude da alta produção brasileira de soja (RESTLE et al., 2004).

É uma matéria-prima de custo acessível e que apresenta em sua composição importantes elementos bioquímicos (proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, polissacarídeos, lecitina, isoflavonóides, dentre outros) que constituem excelente meio nutricional para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos utilizados em processos como o cultivo estado sólido (PARIS, 2008).

Segundo Mitchell et al. (2000), o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho menores que 1mm a 1 cm tem sido frequentemente usadas em CES.

Conforme Pandey et al. (1999), as partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana e pode resultar em pouco crescimento. Já nas partículas maiores, há uma melhor aeração devido aos espaços entre estas partículas e com isso limitam a superfície para o ataque microbiano. Cada processo necessita, em particular, um tamanho de partícula.

2.5 Fatores que influenciam na estabilidade enzimática

A estabilidade de uma enzima pode ser afetada pelas condições do meio, dentre elas a temperatura e pH. Altas temperaturas podem levar a desnaturação da enzima e acarretará na inativação da mesma, e com isso a não obtenção dos resultados desejados com seu uso. O mesmo acontece quando as temperaturas são muito baixas. Outro fator a ser cuidado é a velocidade de reação, pois com uma determinada temperatura, a velocidade pode diminuir bruscamente. Para cada tipo de enzima existe uma temperatura ideal, onde a velocidade da reação é máxima, permitindo um maior numero possível de colisões moleculares sem desnaturá-la (NELSON e COX, 2014).

O pH também afeta a estabilidade das enzimas de forma que estas apresentam um valor ou uma região de pH ótimo onde sua atividade será máxima. O pH ótimo para a maioria das enzimas lignocelulolíticas fica entre 6 e 8, mas há exceções, uma vez que a concentração de íons H^+ pode influenciar na ligação das enzimas e seus substratos devido a repulsão de cargas ou afetar resíduos dos sítios catalíticos (NELSON e COX, 2014).

Devido às condições de processamento na indústria, como elevadas temperaturas e valores de pH extremos, as enzimas podem se tornar instáveis e totalmente inativas durante o processo, assim é importante conhecer certas características das enzimas para avaliar qual melhor faixa de operação (SOUZA, 2008).

Conforme Castro e Pereira Jr. (2010), de forma geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulasas altamente ativas em valores de pH alcalinos. Zhang et al. (2004) avaliaram a linhagem *Bacillus* sp. em pH 10,5 para produção de celulasas. Riou et al. (1998) e Bollók et al. (2000), avaliaram em relação as celulasas de actinomicetos (*Streptomyces*) onde os resultados para temperatura por volta de 50°C e valores de pH entre moderadamente ácidos e neutros foram os melhores.

Segundo Kulkarni et al. (1999), geralmente as xilanases produzidas por fungos são estáveis na faixa de pH de 3,0 a 10,0. Estudos com o extrato produzido pelo fungo *Aspergillus foetidus* quando incubados a 60°C após uma hora apresentou 20% da sua atividade original (SHAH e MADAMWAR, 2005).

Makky (2009) investigou a produção de avicelase pelo fungo filamentoso termofílico *Geobacillus stearothermophilus* quando cultivado no bagaço de cana de açúcar e enzima apresentou pH e temperatura ótima a 7,0 e 50°C, respectivamente. Além disso, mostrou boa estabilidade entre temperaturas variando de 30-80°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta as metodologias utilizadas na otimização e/ou maximização do processo de bioprodução e da extração das enzimas lignocelulolíticas, da caracterização parcial das enzimas e potencial aplicação na hidrólise de substratos linocelulósicos.

3.1 Screening de micro-organismos lignocelulolíticos

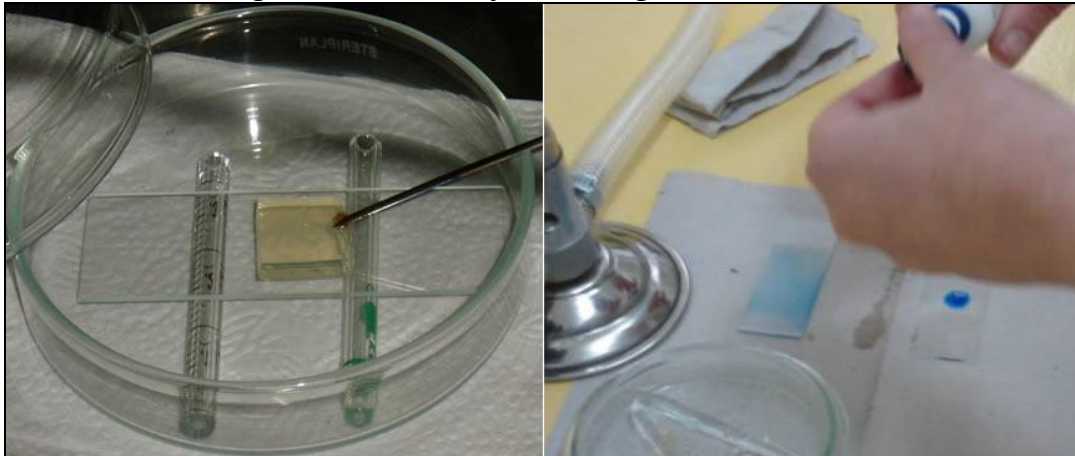
Os micro-organismos utilizados para este estudo foram previamente isolados por Bortoli et al. (2015) e encontram-se no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI Erechim.

As amostras utilizadas para o isolamento dos micro-organismos foram coletadas e inoculadas em erlenmeyers contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) e incubadas em estufas (Tecnol modelo: TF 393/2) a 25°C por 5 a 7 dias. Após o crescimento dos micro-organismos em cada erlenmeyer, estes foram repicados, um a um, para placas de Petri com PDA e incubadas novamente a 28°C por 5 a 7 dias. Os micro-organismos crescidos foram repicados sucessivamente até isolamento completo dos mesmos.

Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento das culturas de fungos filamentosos em ultra *freezer* a -80°C (MDF U3086S - Sanyo).

Os fungos filamentosos foram pré-identificados pela técnica de microcultivo conforme descrito por Barnett e Hunter (1998). Os micro-organismos foram inoculados em uma fatia de ágar colocado sobre uma lâmina de vidro esterilizado e coberto por uma lamínula estéril. A lâmina foi colocada em uma placa de Petri, e incubada por cinco dias a 25°C. A lamela com as hifas aderidas foi retirada e corada com corante azul de algodão (Figura 4) e identificadas em microscópio.

Figura 4 – Identificação dos fungos filamentosos.

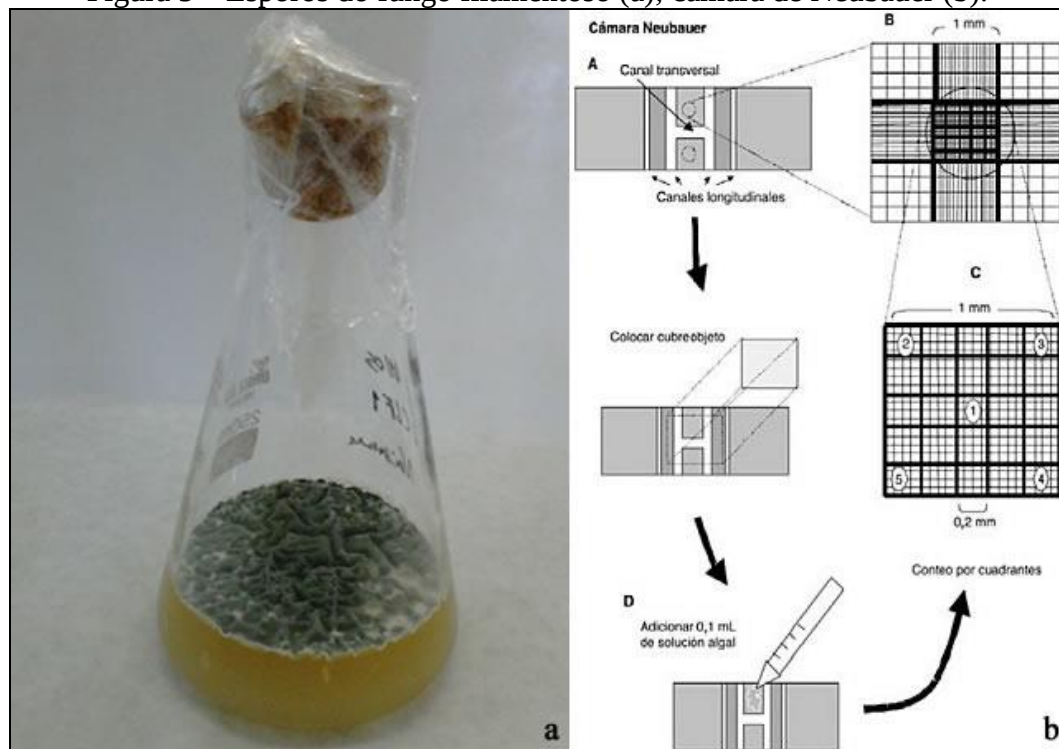


3.2 Bioprodução de enzimas lignocelulíticas

3.2.1 Preparo do inóculo

Como descrito anteriormente, realizou-se o crescimento do fungo e seus respectivos repiques. Após esta etapa realizou-se a coleta dos esporos 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) (Figura 5) para contagem dos esporos (FREIRE, 1996) e realizado o cálculo da quantidade de esporos desejada. A concentração da suspensão foi ajustada para se alcançar 1×10^7 esporos/g de substrato seco de acordo com a concentração definida por Dhillon et al. (2011).

Figura 5 – Esporos do fungo filamentoso (a); câmara de Neubauer (b).



(a)

(b)

3.2.2 Seleção dos micro-organismos e substratos para produção de enzimas lignocelulolíticas

Para a seleção dos micro-organismos potenciais produtores de enzimas lignocelulolíticas (nesta etapa especificamente xilanase e FPase), foram realizados cultivos em estado sólido avaliando-se o comportamento cinético de produção pela análise de amostras do cultivo em 0; 3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21 dias e os substratos cana de açúcar e casca de soja.

Os cultivos em estado sólido foram conduzidos 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). Estes foram submetidos ao processo de esterilização em autoclave (Phoenix modelo: AV-75) por 15 min a 121°C. Após esta etapa iniciou-se a inoculação do substrato utilizando 2mL de inóculo com 1×10^7 esporos/g de substrato seco. Os béqueres, com os substratos lignocelulósicos (casca de soja ou bagaço de cana), foram incubados em câmara de germinação (MOD. 347 CDG) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, com injeção de ar úmido conforme Dhillon et al. (2011).

Foram utilizados erlenmeyeres de 250 mL para o processo de extração, no qual o meio fermentado foi adicionado ao tampão citrato (0,1M pH 4,8) 1:15 (3,33g de substrato

fermentado para 50 mL de tampão). Os frascos foram colocados em um agitador orbital mecânico (Nova Ética, incubadora 430 RDB) por 30 min a 50°C e 100 rpm, conforme descrito por Dhillon et al. (2011). Para este estudo, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os substratos utilizados para este estudo foram a casca de soja cedida pela Empresa Olfar, Erechim/RS e o bagaço de cana, proveniente da Cooperativa Tritícola de Erechim Ltda (Erechim, RS). Os substratos foram estocados à temperatura ambiente e utilizados sem tratamento prévio. Para caracterização dos resíduos de bagaço de cana, casca de soja e sabugo e palha de milho amostras foram encaminhadas ao Laboratório Físico-Química do CEPA (Universidade de Passo Fundo/RS) onde realizou-se as análises de: umidade, fibra bruta, proteína bruta e resíduo mineral fixo pelo método da Espectrofotometria de Reflectância no Infravermelho Próximo (NIR).

3.2.3 Efeito da temperatura, concentração de esporos e do teor de umidade

Para avaliar a influência da temperatura na bioprodução de enzimas lignocelulolíticas produzidas pelo fungo filamento *Penicillium* sp. variou-se a temperatura de 20 a 35°C, utilizando como substrato casca de soja com umidade de 70%, concentração de esporos 10^7 e 14 dias de fermentação para xilanase e 7 dias para FPase, avicelase e CMCase. As condições de extração foram 50°C, 100 rpm por 30 min, utilizando tampão citrato 0,1M a pH 4,8 conforme descrito por Dhillon et al. (2011).

Para avaliar se a quantidade de esporos por *Penicillium* sp. (CLF1) e o teor de umidade apresentavam efeito significativo na produção de FPase, xilanase, CMCase e avicelase, em 7 e 14 dias, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 5). As variáveis independentes foram: concentração de esporos por grama de meio úmido (X_1) e umidade (% b.u.) (X_2) e a variável dependente (resposta) foi a medida da atividade enzimática (U/g). A agitação, temperatura e tempo de extração foram mantidos constantes como descritas no item 3.2.2 100 rpm, 50°C e 30 min, respectivamente.

A quantidade volumétrica de água a ser adicionada foi dimensionada através de cálculo de balanço de massa, descontando a umidade inicial da mistura e a alíquota de suspensão de esporos.

Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para bioprodução de enzimas lignocelulolíticas.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	+1	+1,41
esporos (Log)	X_1	(4×10^4)	(1×10^5)	(1×10^6)	(1×10^7)	$(2,5 \times 10^7)$
Concentração		4,6	5	6	7	7,4
Umidade (%)	X_2	34	40	55	70	76

3.3 Processo de extração das enzimas lignocelulolíticas

Para os ensaios que apresentaram a maior produção enzimática conforme item 3.2.3, foram testados diferentes solventes e soluções para a extração das enzimas lignocelulolíticas, dentre as quais: água destilada, NaCl 1%, tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,5), tampão acetato de sódio (0,2M pH 5,5) e Tween 80 (0,1% v/v). Nesta etapa, o processo de extração foi realizado adicionando-se a 50 mL de tampão ou solução 3,33g de substrato fermentado (razão 1:15 m/v). Os frascos foram colocados em um agitador orbital mecânico (Nova Ética, incubadora 430 RDB) por 30 min a 50°C e 100 rpm. Para este estudo, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Na sequência, como estratégia para a otimização do processo de extração com o solvente/tampão que apresentou o melhor resultado foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 (Delineamento Central Composto Rotacional - DCCR), incluindo 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios nos pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes foram: temperatura de extração (°C, X_1), e velocidade de agitação (rpm, X_2). A Tabela 6 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis. A variável dependente (resposta) foi à medida da atividade enzimática (U/g).

Tabela 6 – Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para a extração da celulase.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	X_1	35,9	40	50	60	64,1
Agitação (rpm)	X_2	54,5	75	125	175	195,5

3.4 Caracterização parcial dos extratos lignocelulolíticos

3.4.1 Avaliação da temperatura e pH ótimo

Para avaliar a temperatura e pHs ótimos das enzimas FPase e CMCase, xilanase e avicelase empregou-se um planejamento fatorial completo 2^2 , sendo que os níveis das variáveis encontram-se descritos na Tabela 7. Para o ajuste dos valores de pH empregou-se soluções tampão de Tris-HCl 0,05 M e NaOH 0,01 M e para o controle da temperatura os extratos foram incubados em banho-maria (Nova Ética).

Tabela 7 – Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos das enzimas FPase e CMCase, xilanase e avicelase.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
FPase e CMCase						
pH	X ₇	3,5	3,9	4,9	5,9	6,3
Temperatura (°C)	X ₈	36	40	50	60	64
Xilanase e Avicelase						
pH	X ₇	3,9	4,3	5,3	6,3	6,7
Temperatura (°C)	X ₈	36	40	50	60	64

3.4.2 Estabilidade térmica e as diferentes condições de pH

A fim de determinar a estabilidade térmica dos extratos enzimáticos brutos da FPase e CMCase, xilanase e avicelase, estes foram submetidos a diferentes temperaturas, -20, 4, 25, 40 e 50, 60 e 70°C em pH de 4,9. Também foi realizado outro estudo de estabilidade especificamente na temperatura de 25°C com variação de pH de 4; 5; 6 e 6,5 para CMCase e FPase e pH de 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 para avicelase e xilanase a 25°C.

As amostras foram coletadas periodicamente para avaliação das atividades enzimáticas. A estabilidade térmica foi expressa em termos de porcentagem residual da atividade enzimática de FPase, xilanase, avicelase e CMCase.

3.4.3 Determinação de parâmetros cinéticos da energia de desativação

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$), constante cinética de desnaturação térmica (K_d) e valor D foi determinado com temperaturas de 25, 40, 50, 60 e 70 °C. A influência da temperatura sobre a constante de velocidade de inativação enzimática (K_d) obedece a lei de Arrhenius [$K_d = Ae^{\frac{E_d}{RT}}$], e sua linearização [$\ln(K_d) = \ln(A) - \frac{E_d}{RT}$], onde os parâmetros E_d e A foram estimados da inclinação e o coeficiente angular da reta, onde A é a constante pré-exponencial de Arrhenius, E_d é a energia de ativação da desnaturação enzimática, R é a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (K).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) [$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K_d}$] e o valor de redução decimal (D) [$D = \frac{\ln(10)}{K_d}$] corresponde aos tempos necessários para obter uma redução de 50% na atividade inicial em uma dada temperatura e para reduzir a velocidade de reação até 10 % do valor inicial. O valor Z, especificado como a variação da temperatura requerida para que o valor D sofra uma redução de um ciclo logarítmico, foi estimado pelo inverso do coeficiente angular da reta no gráfico de $\log(D)$ versus temperatura (°C).

3.5 Avaliação da hidrólise de substratos lignocelulósicos

A hidrólise enzimática de cada substrato sem tratamento prévio foi realizada como descrita previamente com algumas modificações por Liu et al. (2011). Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers nos quais foram adicionadas 2 g do resíduo lignocelulósico (casca de soja, sabugo e palha de milho) e autoclavados por 15 min a 121°C. Posteriormente adicionou-se a cada um dos substratos, separadamente, 100 mL da mistura reacional, contendo: 94 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M em pH 5,0; 1 mL de tetraciclina ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$), visando inibir a contaminação microbiana, e 5 mL do extrato enzimático bruto. As reações foram realizadas em agitador orbital sob agitação de 200, 300 e 350 rpm até a hidrólise estabilizar. A liberação de açúcares redutores (AR) na hidrólise foram estimados usando o método do DNS (ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

3.6 Determinação analítica

3.6.1 Atividade de Avicelase (exo-glucanase)

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel), em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 min conforme Método AVC (Avicelase) descrito por Maki et al. (2009). Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5- dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

3.6.2 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

Para determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase), utilizou-se o procedimento recomendado por Ghose (1987), tendo empregado como substrato a carboximetilcelulose sódica a 2%, em tampão citrato 0,05 M (pH 4,8). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos de ensaio com capacidade de 25 mL, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C, durante 30 min. A seguir, a quantidade de glicose liberada foi dosada em espectrofotômetro pelo método DNS (MILLER, 1959) nas seguintes categorias: (1) tubos das amostras para serem quantificadas (AE); (2) tubo com branco reacional para zerar o espectrofotômetro; (3) tubos de controle da enzima (enzima e/ou extrato enzimático sem substrato) e (4) tubos controle do substrato (substrato sem enzima e/ ou extrato enzimático).

Antes das leituras, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 95°C por 5 min e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Para o término desta etapa, adicionou-se 8 mL de solução estabilizante (tartarato de sódio e potássio) e os tubos foram homogeneizados. O tubo com o branco reacional foi preparado com 1,5 mL de tampão citrato e após os 60 min adicionou-se DNS.

A curva padrão para o teste de CMCase foi estabelecida com a utilização de glicose nas concentrações de 0,1 a 6,7 mg.mL⁻¹. Após as leituras em espectrofotômetro, os dados foram plotados em um gráfico (absorbância x concentração de glicose), obtendo-se 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, obtida pela Equação 1.

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

Onde:

ART: açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg.mL^{-1});

V_T : volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume de enzima) (mL);

V_C : volume de enzima utilizado na hidrólise (mL);

T_H : tempo de hidrólise (min);

0,18: 1 μmol de glicose (mg).

3.6.3 Atividade de FPase

De acordo com Ghose (1987) a atividade de celulase é determinada como atividade de papel filtro (FPA) e expressa em unidades de papel filtro (FPU – *Filter Paper Units*) por volume de enzima original. Durante as reações, parte da concentração da glicose pode surgir do substrato e/ou da própria enzima, sendo que o complexo enzimático pode conter açúcares nutrientes.

Utilizou-se quatro tubos de ensaio onde cada um deles continha: (1) tubos das amostras para serem quantificadas (AE); (2) tubo com branco reacional para zerar o espectrofotômetro; (3) tubos de controle da enzima (enzima e/ou extrato enzimático sem substrato) e (4) tubos controle do substrato (substrato sem enzima e/ ou extrato enzimático).

Para a quantificação enzimática, onde em cada tubo de ensaio, colocou-se 1 mL de solução tampão citrato 0,2 M pH 4,9 e 0,5 g de papel filtro enrolado (tiras de papel filtro Whatman n°1 com tamanho de aproximadamente 1,0 x 6,0 cm). Estes sofreram um aquecimento prévio (banho maria, 50°C, 10 min) para o equilíbrio da temperatura. Após este tempo, adicionou-se 0,5 mL de enzima e/ou extrato enzimático e os tubos retornaram ao banho maria por mais 60 min. Ao final desta etapa, foi removido de cada tubo a alíquota de 0,5 mL e adicionou-se 0,5 mL do DNS com leitura no espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959). Antes das leituras, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 95°C por 5 min e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Para o término desta etapa, adicionou-se 8 mL de solução estabilizante (tartarato de sódio e potássio) e os líquidos

internos dos tubos foram homogeneizados. O tubo com o branco reacional foi preparado com 1,5 mL de tampão citrato e após os 60 min adicionou-se DNS como descrito anteriormente.

A curva padrão para o teste de FPase 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, $U = \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, idem a equação 1.

3.6.4 Atividade da xilanase

A atividade da xilanase foi determinada pela liberação da quantidade de açúcar redutor de uma solução a 1% xilana “birchwood” (Sigma) preparada em solução tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 5,3, a 50°C (BAILEY et al., 1992).

Os açúcares redutores DNS (MILLER, 1959) foram dosados nas seguintes categorias: (1) tubos das amostras para serem quantificadas (AE); (2) tubo com branco reacional para zerar o espectrofotômetro; (3) tubos de controle da enzima (enzima e/ou extrato enzimático sem substrato) e (4) tubos controle do substrato (substrato sem enzima e/ ou extrato enzimático).

Para quantificação adicionou-se 1,8 mL da solução xilana em tubos que foram incubados em banho maria, a 50°C por 5 min. Em seguida, fez-se a adição de 200 μL da enzima e/ou extrato enzimático, incubando-se por mais 5 min. Desta, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi adicionado a 0,5 mL de DNS. Antes das leituras, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 95°C por 5 min e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Para o término desta etapa, adicionou-se 8 mL de solução estabilizante (tartarato de sódio e potássio) e os tubos foram homogeneizados. O tubo com o branco reacional foi preparado com 1,5 mL de tampão citrato e após os 60 min adicionou-se DNS.

A curva padrão para o teste de xilanase foi estabelecida com a utilização de xilose nas concentrações de 5,0 – 0,1 mg.mL⁻¹. Após as leituras em espectrofotômetro, os dados foram plotados em um gráfico (absorbância x concentração de xilose), obtendo-se 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 minuto, a 50°C.

Como fins comparativos e de padronização, as atividades enzimáticas finais para FPase, carboximetilcelulase e xilanase, foram expressas em produção enzimática por grama de substrato seco ($U.g^{-1}$) de acordo com a Equação 2.

$$FPase (U.g^{-1}) = \frac{[enzima] \times V_{\text{tampão}}}{M} \quad (2)$$

Onde:

[enzima]: atividade enzimática ($U.mL^{-1}$);

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

M: massa de substrato seco (g).

3.6.5 Determinação da composição centesimal dos substratos

Os ensaios para obtenção dos resultados de umidade, fibra bruta, proteína bruta e matéria mineral foram realizados no Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo, pelo método da Espectrofotometria de Reflectância no Infravermelho Próximo (NIR).

3.7 Tratamento estatístico

Os resultados obtidos referentes a seleção do micro-organismo e substratos, influência do tempo e da temperatura, foram tratados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as diferenças das médias pelo teste de Tukey com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95 % de confiança. Os resultados obtidos nos planejamentos fatoriais foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95 % de confiança. Para validação dos modelos foi utilizada a análise de variância, verificando-se o coeficiente de correlação (R) e a amplitude de grandeza do F calculado em relação ao F tabelado ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões referentes à seleção de micro-organismos e substratos, estudo de variáveis que influenciam na produção e extração de celulasas, caracterização parcial e aplicação dos extratos enzimáticos obtidos.

4.1 Seleção dos micro-organismos e substratos para produção de enzimas lignocelulolíticas

Para selecionar micro-organismos com potencial para produção de enzimas lignocelulósicas foram testadas cepas isoladas por Bortoli et al. (2015) de óleo de oliva, requeijão, queijo minas, extrato de tomate, óleo de soja, folhas, frutas, nata, creme de leite, carne, maionese e também de amostras de farelo de soja deterioradas e contaminações existentes em meios de cultura.

Dentre os fungos isolados com atividade celulolítica qualitativa, selecionou-se os isolados 04.03.12; T2F4; CLF1 e T2F1 por apresentarem diâmetros de halo de degradação da celulose ao redor da colônia em agar carboximetilcelulose grandes, em relação a outros isolados testados (BORTOLI et al., 2015).

A Tabela 8 apresenta os resultados de atividade de xilanase e FPase empregando os isolados CLF1 e T2F4 crescidos em casca de soja e bagaço de cana por um período de cultivo de até 21 dias, a fim de selecionar o melhor substrato. Não houve aumento significativo de atividade enzimática a partir de 14 dias de cultivo, independentemente do fungo isolado e da enzima avaliada. Ao analisar os resultados obtidos, verifica-se que entre estes, o melhor substrato foi a casca de soja para a produção tanto de xilanase como de FPase, independentemente do fungo utilizado, desta maneira, o substrato selecionado para dar continuidade ao trabalho foi a casca de soja.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 8 optou-se por realizar o estudo com o fungo CLF1 com tempos de fermentação de 7 dias para as enzimas FPase e CMCase e de 14 dias para xilanase.

Tabela 8 – Seleção de substratos (casca de soja e bagaço de cana) para a produção de xilanase e FPase com os fungos CLF1 e T2F4.

Tempo (dias)	CLF1				T2F4			
	Xilanase(U/g)		FPase(U/g)		Xilanase(U/g)		FPase(U/g)	
	Casca de soja	Bagaço de cana	Casca de soja	Bagaço de cana	Casca de soja	Bagaço de cana	Casca de soja	Bagaço de cana
0	3,60 ^a ± 0,25	2,43 ^b ± 0,21	0,44 ^a ± 0,03	0,29 ^b ± 0,01	6,65 ^a ± 0,31	3,17 ^b ± 0,28	0,32 ^a ± 0,02	0,22 ^a ± 0,03
3	63,24 ^a ± 4,02	32,19 ^b ± 3,20	0,48 ^a ± 0,02	0,36 ^b ± 0,02	54,42 ^a ± 5,27	14,41 ^b ± 1,33	0,79 ^a ± 0,06	0,25 ^b ± 0,02
7	127,34 ^a ± 11,52	81,24 ^b ± 9,71	0,69 ^a ± 0,04	0,50 ^b ± 0,03	75,84 ^a ± 6,87	24,30 ^b ± 3,16	0,82 ^a ± 0,07	0,47 ^b ± 0,04
10	162,05 ^a ± 13,40	102,10 ^b ± 10,27	1,05 ^a ± 0,07	0,82 ^b ± 0,06	122,72 ^a ± 11,62	52,37 ^b ± 5,24	0,89 ^a ± 0,09	0,49 ^b ± 0,04
14	212,11 ^a ± 19,25	109,67 ^b ± 9,02	1,02 ^a ± 0,07	0,82 ^b ± 0,05	177,72 ^a ± 15,91	65,05 ^b ± 6,18	0,86 ^a ± 0,09	0,57 ^b ± 0,06
17	213,20 ^a ± 23,09	105,75 ^b ± 10,44	1,03 ^a ± 0,06	0,79 ^b ± 0,08	169,54 ^a ± 17, 73	57,38 ^b ± 5,86	0,75 ^a ± 0,06	0,56 ^b ± 0,05
21	206,20 ^a ± 18,78	98,96 ^b ± 8,30	0,95 ^a ± 0,08	0,75 ^a ± 0,07	163,31 ^a ± 16,48	66,68 ^b ± 6,36	0,74 ^a ± 0,06	0,52 ^b ± 0,04

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste t de Student com 95% de confiança, comparando os substratos para cada enzima e cada fungo em cada tempo.

Além da casca de soja, muitos outros resíduos agroindustriais são utilizados como substratos. Castro e Pereira Jr (2010) relatam o uso de alguns como: bagaço de cana, palha de cana, palha de soja, palha de arroz e sabugo de milho. Astolfi (2014), em seus experimentos com a utilização de casca de soja e bagaço de cana, obteve melhores respostas de produção enzimática quando comparado ao presente trabalho que a casca de soja apresentou-se com um substrato de melhores produções. Sales et al. (2010) utilizaram como substrato o bagaço de cana para produção de enzimas celulasas e xilanases. Brijwani et al. (2010) utilizaram como substratos a casca de soja associada ao farelo de trigo para produção de *T. reesei* QM 2124. Yoo et al. (2011) para a sacarificação enzimática de casca de soja (as quais foram submetidas a diferentes tratamentos) combinaram três celulasas comerciais (Celluclast 1,5L, Novozyme 188 e Viscozyme®L) submetida a diferentes pré-tratamentos, e obtiveram um rendimento de glicose de 0,16 g.g⁻¹ em casca de soja sem tratamento.

A Tabela 9 apresenta os resultados de umidade, fibra bruta, proteína bruta e resíduo mineral fixo dos resíduos agroindustriais empregados como substratos para produção das enzimas (bagaço de cana e casca de soja) e nos testes de hidrólise (sabugo/palha de milho).

Tabela 9 – Caracterização dos resíduos agroindustriais utilizados na produção de enzimas lignocelulolíticas.

Resíduo agroindustrial	Caracterização (%)			
	Umidade	Fibra Bruta	Proteína Bruta	Resíduo Mineral Fixo
Bagaço de cana	7,30	41,3	2,44	1,29
Casca de soja	10,06	41,14	9,85	4,94

Analisando a Tabela 9 verifica-se que os teores de fibra bruta da casca de soja e bagaço de cana foram similares. Entretanto, em relação aos teores de proteína bruta, a casca de soja apresentaram quatro vezes mais do que o resíduo de bagaço de cana de açúcar. Em relação ao resíduo constituído de sabugo/palha de milho se observa que os teores de fibra bruta estão abaixo dos encontrados para os outros resíduos nesse estudo e apresenta metade do teor de proteína bruta da casca de soja. Conforme Dal'Toé e Fiorese (2012) o teor de proteína bruta e fibra bruta em resíduos de soja podem oscilar em torno de 12 e 36%, respectivamente. Neste sentido, os valores obtidos nesse estudo estão condizentes com resultados apontados na literatura.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos com a casca de soja na produção de xilanases, FPase e CMCase pelos fungos isolados 04.03.12, T2F4, CLF1 e T2F1 durante 21 dias visando selecionar o micro-organismo com maior potencial de produção empregando um método quantitativo.

Analizando a Tabela 10, pode-se observar que o isolado se destacou na produção de xilanase, FPase e CMCase, o qual apresentou maior atividade para xilanase (233,19 U/g) a partir de 14 dias de fermentação. Para a enzima FPase, verifica-se que a maior atividade enzimática foi obtida a partir de 7 dias de fermentação, não diferindo também em comparação aos demais fungos, com exceção do isolado T2F4 que foi estatisticamente inferior. Para a CMCase os isolados CLF1, 04.03.12 e T2F4 apresentaram as maiores atividades enzimáticas, diferindo do isolado T2F1 a partir do 3º dia de fermentação.

Como o micro-organismo CLF1 apresentou melhores resultados de atividade para as enzimas estudadas, foi realizada a identificação pela técnica de microcultivo sendo este identificado como fungo filamentoso *Penicillium* sp. (Figura 6).

Figura 6 – Identificação do micro-organismo isolado CLF1

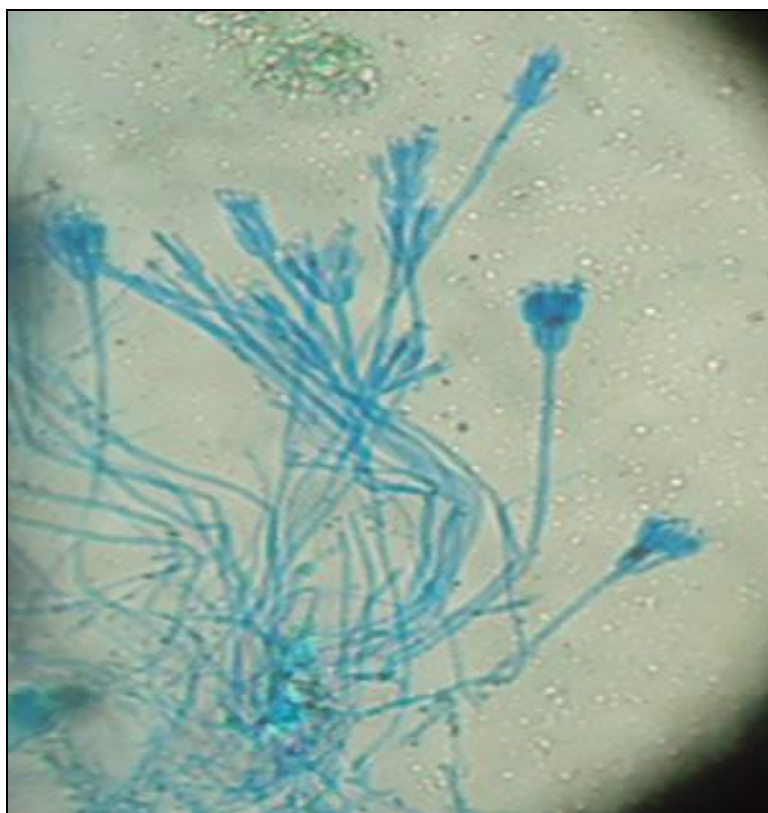


Tabela 10 – Seleção de micro-organismos para produção de enzimas lignocelulíticas com casca de soja.

Enzima	Isolado	Atividade Enzimática (U/g)						
		Tempo (dias)						
		0	3	7	10	14	17	21
Xilanase	T2F1	4,28 ^{aE} ± 0,45	79,12 ^{aD} ± 5,74	93,62 ^{bC} ± 6,11	150,56 ^{bB} ± 13,61	182,60 ^{bA} ± 16,17	187,41 ^{aA} ± 16,58	186,87 ^{abA} ± 16,37
	CLF1	4,97 ^{aE} ± 0,52	79,17 ^{aD} ± 6,37	111,63 ^{aC} ± 8,23	189,58 ^{aB} ± 14,75	233,19 ^{aA} ± 18,48	200,94 ^{aA} ± 15,83	196,76 ^{aA} ± 14,24
	04.03.12	3,32 ^{aD} ± 0,38	78,49 ^{aC} ± 5,91	92,14 ^{bB} ± 6,47	97,34 ^{cB} ± 9,37	193,87 ^{bA} ± 16,48	192,69 ^{aA} ± 14,48	189,67 ^{aA} ± 15,48
	T2F4	4,60 ^{aD} ± 0,47	61,04 ^{bC} ± 6,12	74,59 ^{cC} ± 6,94	111,39 ^{cB} ± 10,43	171,92 ^{bA} ± 15,48	174,96 ^{aA} ± 16,44	166,37 ^{bA} ± 11,48
FPase	T2F1	0,40 ^{aC} ± 0,03	0,72 ^{aB} ± 0,05	0,93 ^{aA} ± 0,07	1,02 ^{aA} ± 0,06	1,03 ^{aA} ± 0,08	1,02 ^{aA} ± 0,07	1,01 ^{aA} ± 0,07
	CLF1	0,43 ^{aC} ± 0,04	0,76 ^{aB} ± 0,05	0,98 ^{aA} ± 0,08	1,01 ^{aA} ± 0,07	1,04 ^{aA} ± 0,07	1,03 ^{aA} ± 0,06	1,01 ^{aA} ± 0,08
	04.03.12	0,39 ^{aC} ± 0,04	0,75 ^{aB} ± 0,06	0,93 ^{aA} ± 0,07	0,91 ^{abA} ± 0,07	0,91 ^{abA} ± 0,05	0,83 ^{bAB} ± 0,04	0,82 ^{bAB} ± 0,05
	T2F4	0,42 ^{aC} ± 0,03	0,67 ^{aB} ± 0,04	0,74 ^{bB} ± 0,05	0,79 ^{bAB} ± 0,06	0,84 ^{bAB} ± 0,05	0,91 ^{abA} ± 0,05	0,87 ^{abA} ± 0,06
CMCase	T2F1	0,64 ^{aD} ± 0,09	0,96 ^{bD} ± 0,09	1,93 ^{bC} ± 0,16	2,48 ^{bB} ± 0,18	3,00 ^{bA} ± 0,22	3,05 ^{bA} ± 0,25	2,83 ^{bA} ± 0,28
	CLF1	0,68 ^{aD} ± 0,06	4,11 ^{aC} ± 0,28	6,15 ^{aB} ± 0,75	8,77 ^{aA} ± 0,82	8,81 ^{aA} ± 0,75	9,11 ^{aA} ± 0,83	7,90 ^{aA} ± 0,74
	04.03.12	0,61 ^{aD} ± 0,05	3,83 ^{aC} ± 0,27	6,62 ^{aB} ± 0,71	9,01 ^{aA} ± 0,74	9,19 ^{aA} ± 0,78	9,20 ^{aA} ± 0,87	9,07 ^{aA} ± 0,85
	T2F4	0,60 ^{aD} ± 0,06	4,09 ^{aC} ± 0,31	7,48 ^{aB} ± 0,57	9,16 ^{aA} ± 0,81	9,17 ^{aA} ± 0,86	9,15 ^{aA} ± 0,81	8,75 ^{aAB} ± 0,75

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas para cada enzima e maiúsculas nas linhas para cada fungo, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

4.2 Estudo de variáveis que influenciam na bioprodução de celulases

Após a definição do micro-organismo, do tempo de 14 dias de produção para a enzima xilanase e 7 dias para FPase, CMCase e avicelase e casca de soja como substrato, foram realizados estudos para avaliar a influência da temperatura de bioprodução de enzimas lignocelulolíticas, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 – Influência da temperatura de cultivo na atividade de FPase, xilanase, CMCase e avicelase.

Temperatura (°C)	Atividade Enzimática (U/g)			
	FPase	Xilanase	CMCase	Avicelase
20	1,28 ^a ± 0,11	36,70 ^c ± 2,14	10,32 ^b ± 2,18	0,79 ^c ± 0,04
25	1,12 ^a ± 0,18	125,85 ^b ± 13,54	13,60 ^b ± 1,24	2,36 ^b ± 0,16
30	1,42 ^a ± 0,15	407,42 ^a ± 21,31	16,21 ^a ± 1,43	20,80 ^a ± 2,18
35	0,63 ^b ± 0,06	48,90 ^c ± 6,76	4,26 ^c ± 0,47	0,08 ^d ± 0,01

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

A temperatura ótima para bioprodução de FPase, xilanase, CMCase e avicelase foi de 30°C. Observa-se que, nessa temperatura foram obtidos as maiores atividades enzimáticas (407 U/g) (Tabela 11). Dentre as enzimas, a xilanase apresentou maior atividade enzimática. A influência da temperatura sobre a atividade da xilanase promoveu variações na atividade enzimática obtida em torno de onze vezes. Já em relação a FPase, a temperatura foi que apresentou menor influencia sobre as enzimas. Deve-se destacar também que, a atividade da enzima avicelase oscilou em duzentos e sessenta vezes em relação a influencia de temperatura sobre a atividade enzimática.

Conforme Kim et al. (2014) a faixa ótima de temperatura para produção de enzimas oriundas de *Penicillium* sp. oscila entre 25 e 35°C, tendo a temperatura de 30°C o ponto ótimo para otimização da FPase e CMCase, o que foi confirmado neste trabalho.

De qualquer modo os valores de atividade enzimática para FPase observados para essa cepa estão bem aquém aos encontrados na literatura, possivelmente sendo decorrente da espécie de *Penicillium* sp. investigada nesse trabalho pois, em condições otimizadas Kim et al. (2014), obtiveram a FPase em torno de 500 U/g.

Em relação a CMCase verifica-se consonância em relação a temperatura de produção com os estudos conduzidos por Atif et al. (2004), Deswal et al. (2011) e Kim et al. (2014).

Após definida a temperatura de bioprodução, investigou-se a influência da concentração de esporos e teor de umidade em 7 e 14 dias de cultivo em estado sólido por *Penicillium* sp. (isolado CLF1) empregando casca de soja como substrato. A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento do fatorial completo 2^2 com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade de FPase, xilanase, CMCase e avicelase. Para todas as fermentações utilizou-se 10 g de casca de soja e temperatura fixa em 30°C conforme descritas por Deswal et al. (2011).

Analisando a Tabela 12, verifica-se que as melhores respostas de atividade enzimática para a FPase, CMCase e avicelase foram no 7º dia com 1,19, 16,37 e 23,73 U/g, respectivamente e para xilanase foi aos 14º dias com 435,35 U/g. A seguir são apresentados os tratamentos estatísticos de cada uma das enzimas avaliadas.

Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial completo 2² valores reais e codificados e respostas em produção das enzimas FPase, Xilanase, CMCase e Avicelase.

Ensaio	Variáveis independentes		Resposta de Atividade (U/g)							
	X ₁	X ₂	FPase		Xilanase		CMCase		Avicelase	
			7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
1	-1 (5)	-1 (40)	0,18	0,33	75,70	36,76	3,52	3,82	11,52	9,95
2	1 (7)	-1 (40)	0,17	0,17	50,00	35,48	8,38	4,54	13,43	9,97
3	-1 (5)	1 (70)	1,19	0,73	179,79	416,58	15,59	8,4	21,93	16,93
4	1 (7)	1 (70)	0,91	0,52	179,00	435,35	16,37	9,16	23,73	19,01
5	-1,41 (4,6)	0 (55)	0,37	0,33	155,28	128,97	10,07	9,36	12,65	7,16
6	1,41 (7,4)	0 (55)	0,37	0,32	178,58	220,86	10,06	10,76	10,91	10,04
7	0 (6)	-1,41 (34)	0,10	0,17	33,73	21,62	2,32	2,65	8,85	7,02
8	0 (6)	1,41 (76)	1,10	0,94	187,00	220,00	9,30	6,36	21,99	17,41
9	0 (6)	0 (55)	0,71	0,70	215,08	210,00	12,30	9,44	10,71	14,91
10	0 (6)	0 (55)	0,81	0,72	200,00	224,42	10,57	10,72	11,17	13,7
11	0 (6)	0 (55)	0,85	0,72	215,00	222,02	10,48	10,93	10,85	14,3

X₁:Concentração de esporos (Log); X₂:Umidade (%); Variáveis independentes fixas: 30°C.

4.2.1 FPase (7 Dias)

Para a FPase com 7 dias de cultivo a máxima atividade foi de 1,19U/g (Ensaio 3, Tabela 12), onde o meio de cultivo apresentava concentração de esporos igual a 5 Log e umidade igual a 70%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise de variância para a bioprodução de FPase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	1,41	2	0,70	47,49
Resíduo	0,12	8	0,01	
Falta de Ajuste	0,11	6		
Erro Puro	0,01	2		
Total	1,53	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,46$

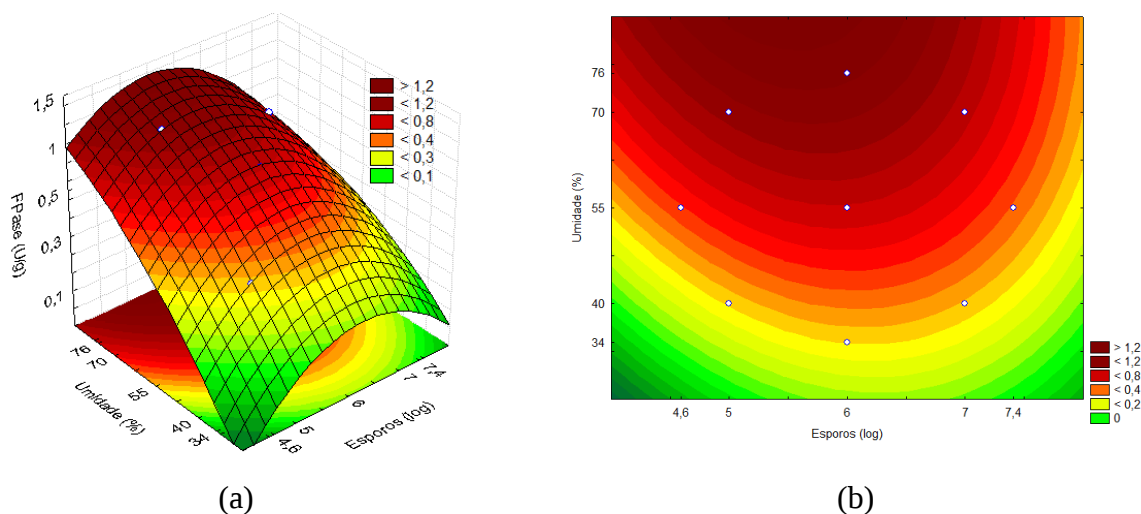
A Equação 3 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da FPase em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,97 e F calculado 10,65 vezes maior que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 7. Onde pode-se observar que a máxima produção de FPase em 7 dias se dará com concentração de 6 Log e umidade mais elevada, a partir de 70%.

$$\text{FPase} = 0,79 - 0,17 \cdot X_1^2 + 0,39 \cdot X_2 \quad (3)$$

Onde:

FPase: Atividade de FPase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%).

Figura 7 – Superfícies de resposta(a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de FPase (U/g) 7 dias.



FPase (14 Dias)

Para a FPase com 14 dias de cultivo a máxima atividade foi de 0,94U/g (Ensaio 8, Tabela 12), onde o meio de cultivo apresentava concentração de esporos igual a 6 Log e umidade igual a 76%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 14).

Tabela 14 – Análise de variância para a bioprodução de FPase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2 .

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	0,66	4	0,16	31,59
Resíduo	0,03	6	0,01	
Falta de Ajuste	0,03	4		
Erro Puro	0,00	2		
Total	0,68	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,53$

As concentrações esporos quadráticas e a umidade linear tiveram influência significativa ($p < 0,05$) negativa e positiva, respectivamente, sobre a atividade de FPase. Os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t(2) para atividade de FPase em 7 e 14 dias de cultivo encontram-se no Apêndice A, Tabela I.

A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da FPase de 14 dias em função da concentração de esporos e umidade, dentro das

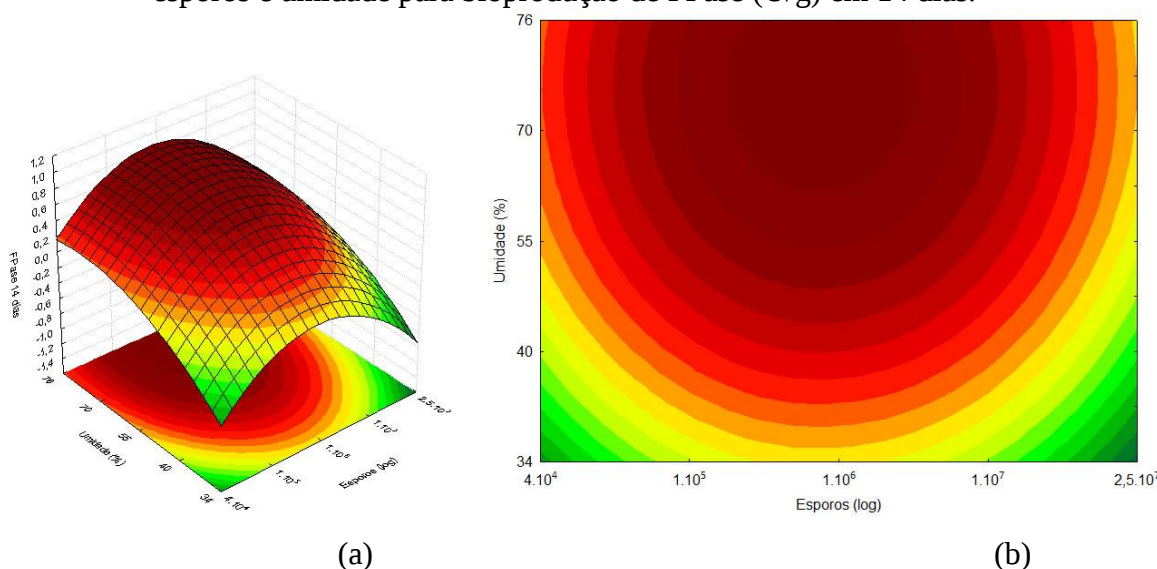
faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,98 e F calculado 6,97 vezes maior que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 8 demonstrando que a máxima produção de FPase em 14 dias se dará com concentração de 6 Log e umidade a partir de 70%.

$$\text{FPase} = 0,71 - 0,05 \cdot X_1 - 0,20 \cdot X_1^2 + 0,23 \cdot X_2 - 0,08 \cdot X_2^2 \quad (4)$$

Onde:

FPase: Atividade de FPase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%).

Figura 8 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de FPase (U/g) em 14 dias.



Os resultados obtidos da atividade enzimática de FPase com substrato de casca de soja, no presente estudo, foram para o 7º e 14º dia de cultivo com atividade de 1,19 U/g e 0,94 U/g, respectivamente. Em um estudo realizado por Dhillon et al. (2012), que utilizaram *A. niger* NRRL 567 e *A. niger* NRRL 2001 em bagaço de maçã, a atividade para FPase foi de 383,7 U/g e 401,0U/g, respectivamente, em quatro dias de cultivo. Zuñiga et al. (2009) utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato e o micro-organismo *A. niger*, em uma temperatura de 32°C, obteve resultado para atividade de FPase 0,59 U/g, após 72h de processo. Já, Astolfi (2014), utilizando como substrato casca de soja, *T. reesei* NRRL 3652, obteve 6,71 U/g, após três dias de cultivo. Este comparativo indica que a produção de FPase pelo isolado *Penicillium* sp. é baixa, em relação aos resultados encontrados na literatura com outros fungos filamentosos. Para Pirota et al. (2015), o resultado encontrado para atividade de FPase na linhagem P75P1 (*A. niger*) utilizando como substrato o farelo de trigo a produção

foi de 2,25 U/g após 120h de cultivo. Já Soni et al. (2010), para fungos *A. fumigatus* foi de 3,37 U/g, também, em 120 h de cultivo em CES. Kim et al. (2014) utilizaram como substrato o resíduo da extração de óleo de palma e a máxima atividade de FPase ocorreu no 10º dia de CES com o micro-organismo *Penicillium* sp. GDX01 no valor de 606 U/g com o substrato grupo de frutas. Já para Singhvi et al. (2011) que utilizaram uma estirpe mutante de *P. janthinellum*, o valor para FPase foi de 67 U/g.

Os valores encontrados no presente trabalho são inferiores, quando comparados com a literatura indicando que, alterando o substrato e o micro-organismo, os valores de atividade e tempo de cultivo também sofrem alteração na resposta.

4.2.2 Xilanase (7 Dias)

Para a xilanase com 7 dias de cultivo a máxima atividade foi de 215,0U/g (Ensaio 9 e 11, Tabela 12), quando a concentração de esporos foi de 6 Log e umidade de 55%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 15).

Tabela 15 – Análise de variância para a bioprodução de xilanase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	42543,74	3	14181,25	72,74
Resíduo	1364,63	7	194,95	
Falta de Ajuste	1213,83	5		
Erro Puro	150,80	2		
Total	43908,37	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,34$

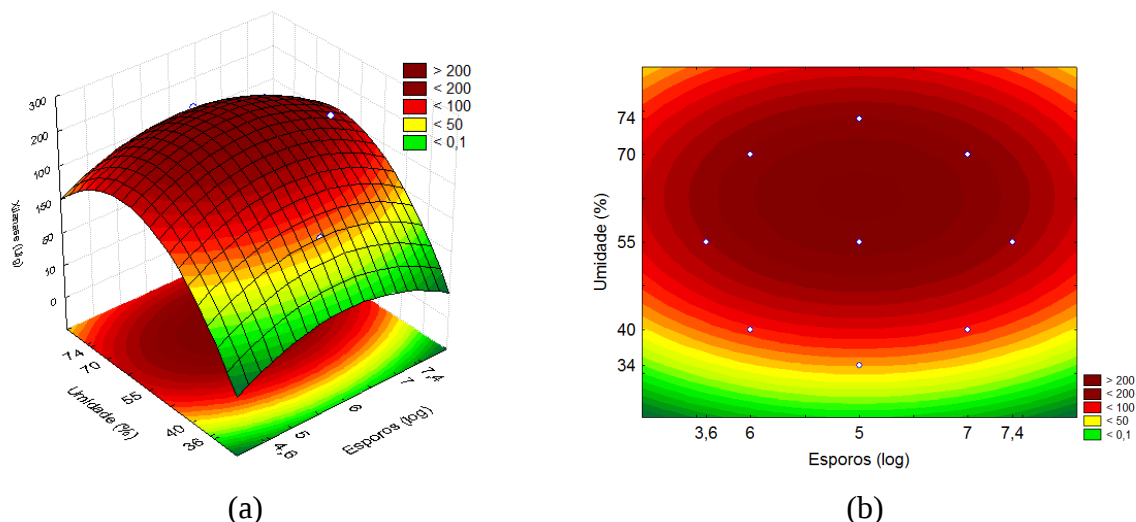
A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da xilanase em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,98 e F calculado 16,76 vezes maiores que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 9.

$$\text{Xilanase} = 210,00 - 26,01 \cdot X_1^2 + 56,31 \cdot X_2 - 54,47 \cdot X_2^2 \quad (5)$$

Onde:

Xilanase: Atividade de xilanase (U/g); X_1 : Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%).

Figura 9 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de xilanase (U/g) em 7 dias.



Observa-se na Figura 9 que a máxima produção de xilanase em 7 dias se dará em uma faixa próxima a concentração de esporos de 6 Log e 55% de umidade, referente aos ensaios do ponto central do planejamento.

Xilanase (14 Dias)

Para a xilanase com 14 dias de cultivo a máxima atividade foi de 435,35U/g (Ensaio 4, Tabela 12), com a concentração de esporos igual a 7 Log e umidade de 70%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 16).

Tabela 16 – Análise de variância para a bioprodução de xilanase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2 .

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	148168,28	3	49389,43	7,41
Resíduo	46652,44	7	6664,63	
Falta de Ajuste	46533,00	5		
Erro Puro	119,40	2		
Total	194820,70	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,34$

Os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t(2) para atividade de xilanase em 7 e 14 dias de cultivo encontram-se no Apêndice B, Tabela II.

A Equação 7 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da xilanase de 14 dias em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,87 e F calculado 1,71 vezes maiores que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 10 demonstrando que a máxima produção de xilanase em 14 dias se dará nas diferentes concentrações de esporos avaliadas, requerendo maior umidade com as menores concentrações de esporo ou menor umidade com a maior concentração de esporos.

$$\text{Xilanase} = 218,48 + 18,44 \cdot X_1 + 132,82 \cdot X_2 - 28,10 \cdot X_2^2 \quad (7)$$

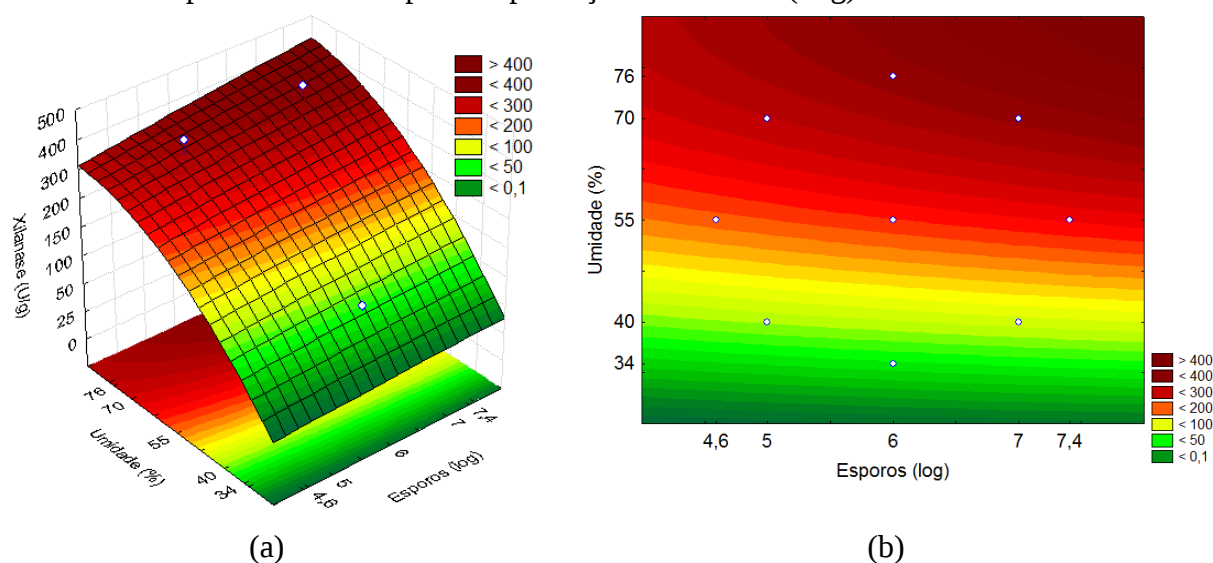
Onde:

Xilanase: Atividade de Xilanase (U/g);

X_1 = Concentração de esporos (Log);

X_2 = Umidade (%).

Figura 10 – Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de xilanase (U/g) em 14 dias.



Os resultados obtidos da atividade enzimática de xilanase com o substrato de casca de soja, no presente estudo foram de 215,08 e 435,35 U/g para o 7º e 14º dia, respectivamente. Para a enzima xilanase, Astolfi (2014), utilizando o mesmo substrato do presente estudo, obteve 1130,70 U/g no sexto dia de cultivo utilizando o fungo *T. reesei* NRRL 3652. Zuñiga et al. (2009), encontraram o valor de atividade para xilanase de 43 U/g após 72h de processo a uma temperatura de 32°C. Dhillon et al. (2012), utilizando os micro-organismos *A. awamori*,

A. niger e *T. reesei* ATCC 26921 e *A. oryzae* ATCC 12892 obtiveram atividade de xilanase em diferentes substratos de 40 U/g (24h), 408-753 U/g (168h) e 505 U/g (96h), respectivamente. De maneira geral, a atividade enzimática de xilanase obtida com o fungo isolado *Penicillium* sp. foi semelhante a encontrada por outros autores com diferentes micro-organismos, embora resultados até 3 vezes superiores também tenham sido encontrados (ASTOLFI, 2014). Já para Pirota et al. (2015), utilizando como substrato farelo de trigo e *A. niger* (isolado P6B2), obtiveram atividade enzimática de xilanase de 1076,94 U/g em 72 h de cultivo. Dhillon et al. (2011) reportaram uma produção de 2604,06 U/g após 96h de cultivo com bagaço de maçã como substrato. Utilizando o substrato farelo de trigo Farina et al. (2008), obtiveram 76,55 U/g após 42h de cultivo em CES. Já Mamma et al. (2008), utilizaram como substrato casca de laranja, obtiveram a atividade máxima de 77U/g durante 10 dias de cultivo. Os valores reportados neste trabalho em termos de atividade enzimática para xilanase, são intermediários quando comparados com outros estudos da literatura, mas com atividade máxima em 14 dias de cultivo.

4.2.3 CMCase (7 Dias)

Para a CMCase com 7 dias de cultivo a máxima atividade foi de 16,37U/g (Ensaio 4, Tabela 12), com concentração de esporos de 7 Log e umidade de 70%. Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 17).

Tabela 17 – Análise de variância para a bioprodução de CMCase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	135,80	2	67,90	11,84
Resíduo	45,86	8	5,73	
Falta de Ajuste	43,7599	6		
Erro Puro	2,1045	2		
Total	181,6677	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,45$

A Equação 8 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da CMCase em função da concentração e esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação

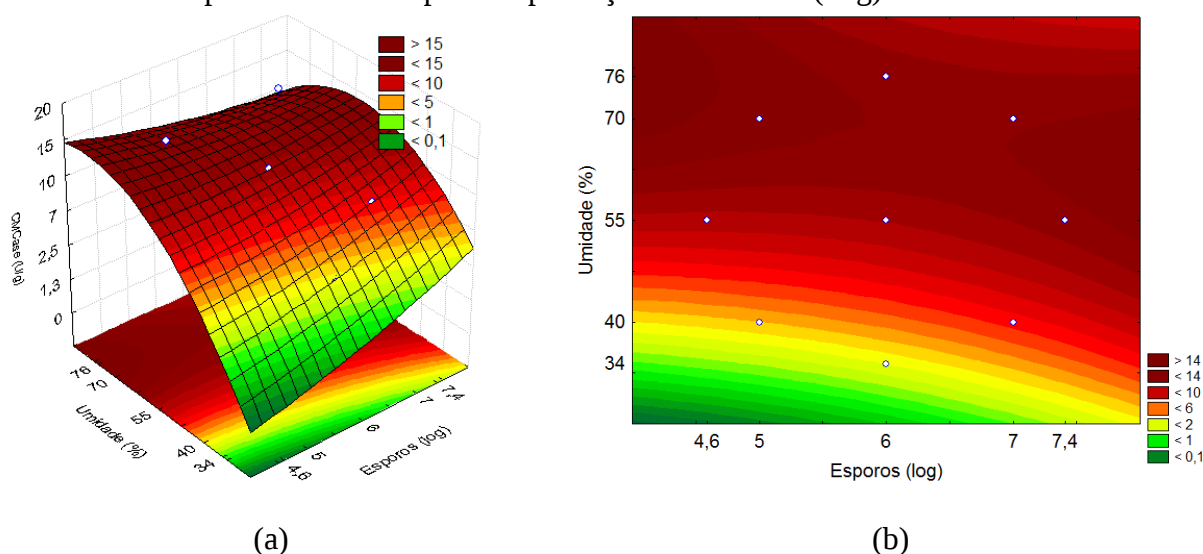
de 0,89 e F calculado 2,66 vezes maiores que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 11, onde observa-se que a máxima produção de CMCase em 7 dias se dará com umidade acima de 55%, independentemente da concentração de esporos, dentro da faixa avaliada.

$$\text{CMCase} = 11,10 + 3,75.X_2 - 1,90.X_2^2 \quad (8)$$

Onde:

CMCase: Atividade de CMCase (U/g); X_2 = Umidade (%).

Figura 11– Superfícies de resposta e curvas de contorno em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de CMCase (U/g) em 7 dias.



CMCase (14 Dias)

Para a CMCase com 14 dias de cultivo a máxima atividade foi de 10,93U/g (Ensaio 11, Tabela 12), com concentração de esporos igual a 6 Log e umidade de 55%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 18).

Tabela 18 – Análise de variância para a bioprodução de CMCase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2 .

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	82,80	2	41,40	49,62
Resíduo	6,67	8	0,83	
Falta de Ajuste	5,37	6		
Erro Puro	1,30	2		
Total	89,47	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,45$

Os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t(2) para atividade de CMCase em 7 e 14 dias de cultivo encontram-se no Apêndice C, Tabela III.

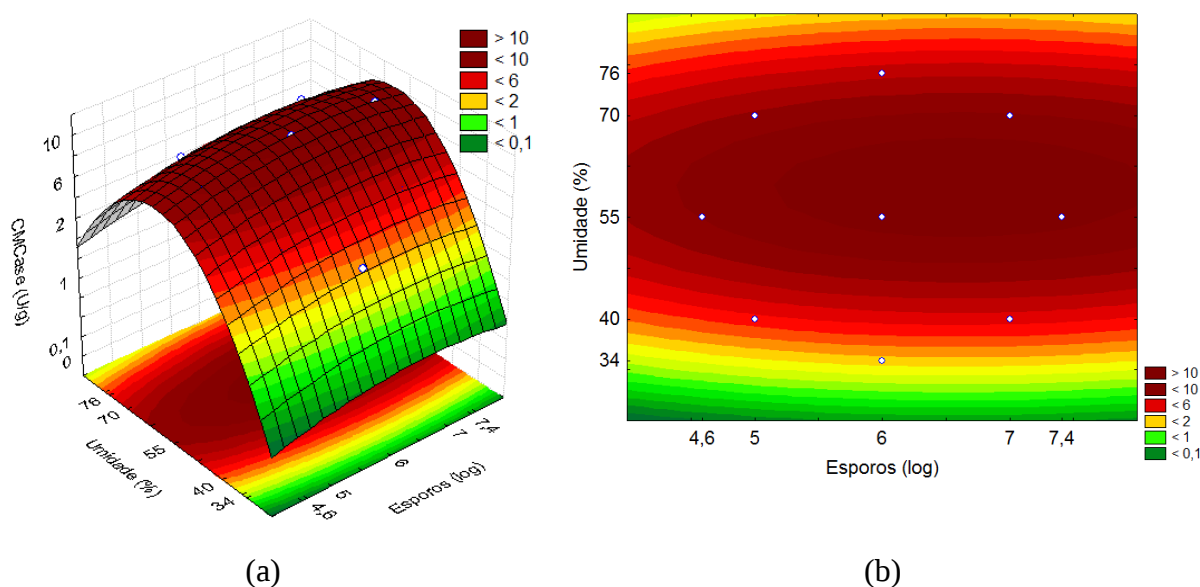
A Equação 9 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da CMCase de 14 dias em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,97 e F calculado 11,15 vezes maiores que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 12, demonstrando que a máxima produção de CMCase em 14 dias se dará com umidade entre 55 e 70%, independentemente da concentração de esporos, dentro da faixa avaliada.

$$\text{CMCase} = 10,37 + 1,81 \cdot X_1 - 3,14 \cdot X_2^2 \quad (9)$$

Onde:

CMCase: Atividade de CMCase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%).

Figura 12 – Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de CMCase (U/g) em 14 dias.



No presente estudo as atividades enzimáticas encontradas para CMCase foram de 16,37 e 10,93 U/g no 7º e 14º dia, respectivamente. Para Astolfi (2014), a atividade máxima encontrada em 15 dias de experimento com cultivo em casca de soja do fungo *T. reesei* NRRL 3652 foi de 5,45 U/g. Liu et al. (2011), encontraram resultados mais expressivos quando utilizando *Aspergillus fumigatus* Z5 e palha de trigo como substrato, o valor foi de 341,3 U/g. Zuñiga et al. (2009), encontraram para atividade enzimática de CMCase o valor de 41 U/g,

após 72h de processo a uma temperatura de 32°C com bagaço de cana como substrato. Florencio (2011), utilizando substrato misto de bagaço de cana e farelo de trigo (50%:50%), com concentração de esporos de 10^7 esporos/g, temperatura de 30°C em 8 dias de cultivo com o fungo *Trichoderma* sp. LCB 46 obteve atividade de 5,95 U/g. Pirota et al. (2015), utilizaram como substrato o farelo de trigo e *A. niger*, inoculando 10^7 esporos/g, umidade de 60%, a 35°C em 10 dias e encontraram atividade de CMCase de 294,33 U/g em 24h para *A. niger fumigatus* e 242,12 U/g também em 24h para o *A. niger oryzae*. Soni et al. (2010), obtiveram produção máxima de CMCase de 98,5U/g com *A. fumigatus* em estudo de seleção de substratos. Dhillon et al. (2011), utilizando *A. niger*, obtiveram uma atividade para CMCase de 48,2U/g após 120 h de CES empregando como substrato farelo de trigo. Pode-se observar que os valores reportados neste trabalho para as atividades de CMCases foram significativamente inferiores aos relatados na literatura.

4.2.4 Avicelase (7 Dias)

Para a avicelase com 7 dias de cultivo a máxima atividade foi de 21,99U/g (Ensaio 8, Tabela 12), com concentração de esporos de 6 Log e umidade de 76%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 19).

Tabela 19 – Análise de variância para a bioprodução de avicelase em 7 dias do planejamento fatorial completo 2^2 .

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	255,37	3	85,09	15,68
Resíduo	27,88	7	5,43	
Falta de Ajuste	27,8446	5		
Erro Puro	0,1112	2		
Total	293,2500	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,34$

A Equação 10 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da avicelase em função da concentração e esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,93 e F calculado 3,61 vezes maiores que o valor do F tabelado. Os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 13, onde

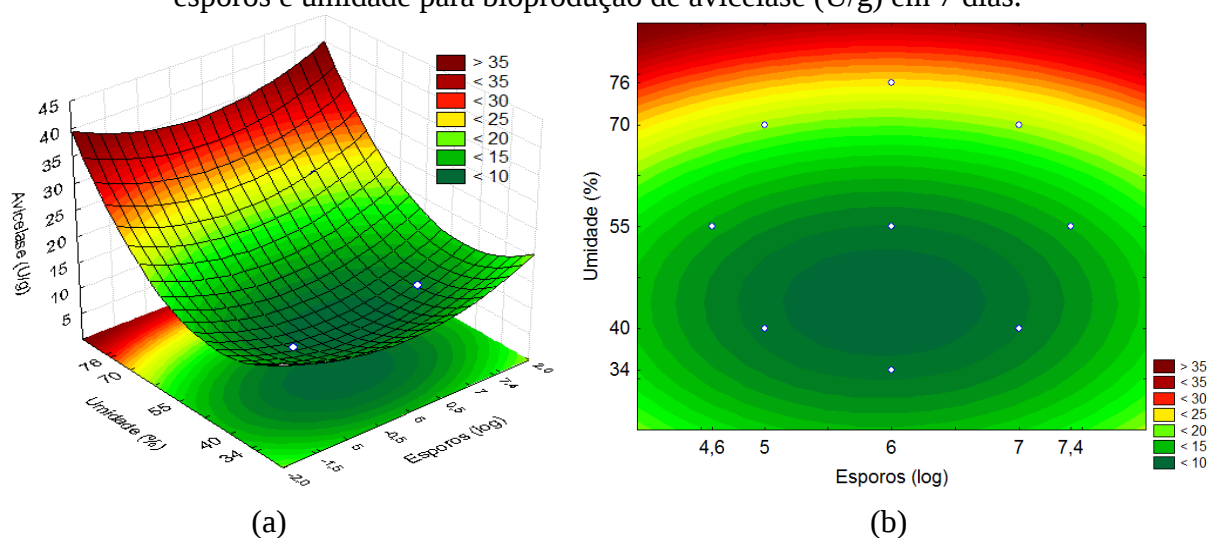
pode-se observar que a máxima produção de avicelase em 7 dias se dará com qualquer concentração de esporos e umidade de 76%.

$$\text{Avicelase} = 10,90 + 1,46 \cdot X_1^2 + 4,92 \cdot X_2 + 3,29 \cdot X_2^2 \quad (10)$$

Onde:

Avicelase = Atividade de avicelase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%).

Figura 13 – Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de avicelase (U/g) em 7 dias.



4.2.5 Avicelase (14 Dias)

Para a avicelase com 14 dias de cultivo a máxima atividade foi de 19,01U/g (Ensaio 4, Tabela 12), com concentração de esporos de 7 Log e umidade de 70%.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 20).

Tabela 20 – Análise de variância para a bioprodução de avicelase em 14 dias do planejamento fatorial completo 2^2 .

Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	140,48	2	70,24	17,10
Resíduo	32,85	8	4,11	
Falta de Ajuste	32,12	6		
Erro Puro	0,73	2		
Total	173,34	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,45$

Os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t(2) para atividade de avicelase em 7 e 14 dias de cultivo encontram-se no Apêndice D, Tabela IV.

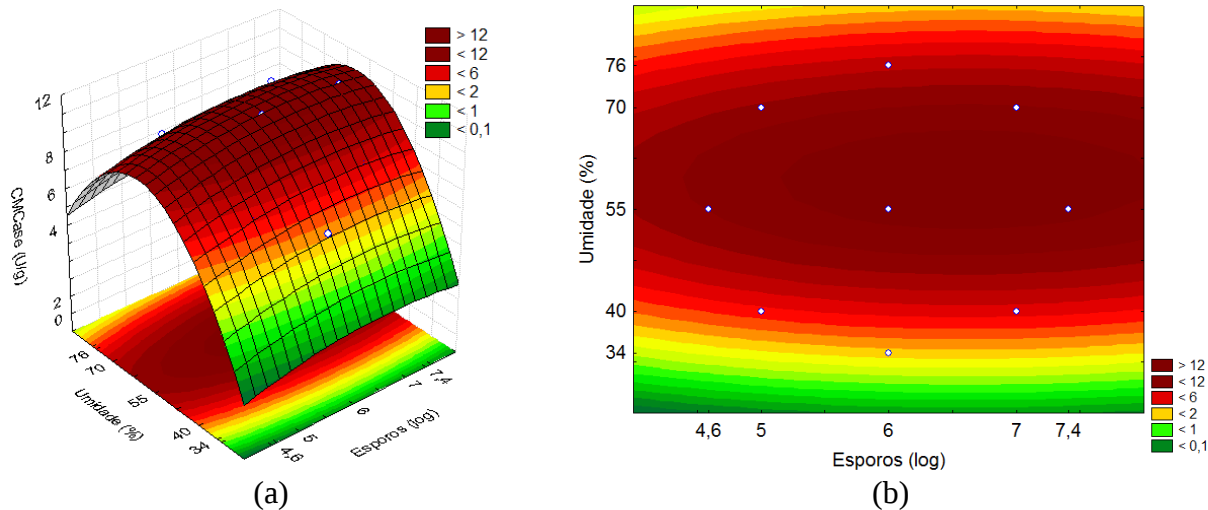
A Equação 11 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da avicelase de 14 dias em função da concentração de esporos e umidade, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,91 e F calculado 3,84 vezes maiores que o valor do F tabelado. Estes permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 14, demonstrando que a máxima produção de avicelase em 14 dias se dará em concentração de esporos de 6 Log e umidade a partir de 70%.

$$\text{Avicelase} = 14,29 - 1,96 \cdot X_1^2 + 3,84 \cdot X_2 \quad (11)$$

Onde:

Avicelase: Atividade de avicelase (U/g); X_1 = Concentração de esporos (Log); X_2 = Umidade (%).

Figura 14 – Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) em função da concentração de esporos e umidade para bioprodução de avicelase (U/g) em 14 dias.



No presente estudo os valores encontrados para atividade enzimática de avicelase no 7º e 14º dia foi 21,99 e 19,01 U/g, respectivamente. Para Mansur (2011), o valor encontrado para esta atividade enzimática foi de 85,54 U/mL em 120h de incubação de *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio líquido, contendo avicel (0,5% p/v) como fonte principal de carbono e suplementada com água de maceração de milho (0,5% p/v). Já Brito et al. (2011), utilizando *Streptomyces* sp. em substrato de bagaço de cana de açúcar e em cultivo submersa, a maior produção enzimática para avicelase foi de 1,213 U/mL no segundo dia de cultivo. Já Ganzer et al. (2014), com seu experimento em CES e a associação dos fungos *Trichoderma* sp. e

Ganoderma lucidum, o resultado obtido para avicelase foi de 0,38 U/mL. A comparação dos resultados com a literatura demonstra que as atividades de avicelase obtidas com o fungo isolado *Penicillium* sp. (CLF1) foram altas em relação às reportadas com outros fungos, mas baixa em relação ao reportado com *Bacillus* sp. em cultivo submersa.

4.3 Processo de extração das enzimas lignocelulolíticas

4.3.1 Efeito de diferentes solventes na extração

Além de obter as condições propícias do cultivo em estado sólido objetivando a máxima atividade, é interessante também, estimar quais são as variáveis que interferem no processo de obtenção do extrato bruto enzimático. Para tanto, foram avaliados diferentes solventes no processo de extração enzimática. A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos na avaliação dos diferentes tipos de soluções extratoras (Tampão Citrato de Sódio 0,05M pH 4,5; Tampão Acetato de sódio 0,2M pH 5,5; Tween 80 (0,1%); Cloreto de Sódio (NaCl) 1,0% e água destilada). Na extração das enzimas, observa-se que, para a atividade das enzimas lignocelulolíticas, o solvente que apresentou os melhores resultados foi o tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5 com 2,67; 176,54; 14,02; 14,22 U/g para a FPase, xilanase, CMCase e avicelase, respectivamente. Sendo que esta difere estatisticamente dos demais solventes e soluções.

Tabela 21 – Atividade celulase em diferentes tipos de soluções extratoras (Tampão Citrato de Sódio 0,05M pH 4,5; Tampão Acetato de sódio 0,2M pH 5,5; Tween 80 (0,1%); Cloreto de Sódio (NaCl) 1,0% e água destilada)

Solução de Extração	Atividade (U/g)			
	FPase	Xilanase	CMCase	Avicelase
Tampão Citrato de Sódio 0,05M pH 4,5	2,67 ^a ± 0,05	176,54 ^a ± 5,75	14,02 ^a ± 1,113	14,22 ^a ± 0,41
Tampão Acetato de Sódio 0,2M pH 5,5	2,11 ^b ± 0,10	129,69 ^b ± 4,47	12,053 ^{ab} ± 1,315	15,17 ^a ± 0,53
Tween 80, 0,1%	1,32 ^b ± 0,052	116,52 ^b ± 3,23	10,953 ^b ± 0,263	15,03 ^a ± 0,59
Cloreto de Sódio (NaCl) 1,0%	1,22 ^b ± 0,315	98,83 ^c ± 5,32	13,713 ^a ± 0,412	1,91 ^b ± 0,44
Água destilada	1,56 ^b ± 0,740	46,65 ^d ± 9,22	10,663 ^b ± 0,977	2,65 ^b ± 0,46

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p > 0,05)

Na extração da enzima CMCase, o tampão citrato de sódio, acetato de sódio e cloreto de sódio não apresentaram diferença significativa entre eles, com maior capacidade de extração de CMCase em relação ao uso de Tween 80 e água destilada.

Para a extração de avicelase, o tampão citrato de sódio, o tampão acetato de sódio e o Tween 80 não apresentaram diferença significativa entre eles, com as maiores extrações. O NaCl e a água destilada demonstraram baixa capacidade de extração de avicelase.

Portanto, a melhor resposta obtida para os diferentes solventes testados para a extração das enzimas FPase, xilanase, CMCase e avicelase foi o tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,5, sendo este utilizado para a extração das enzimas nos próximos experimentos na razão 1:15.

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, no estudo feito por Dhilon et al. (2012), utilizando diferentes solventes de extração, tampão citrato 0,1M pH 4,8; água destilada; água miliQ, Tween 80 e NaCl, o que apresentou melhor extração enzimática para FPase, CMCase e xilanase foi o tampão citrato pH 4,8.

4.3.2 Efeito da temperatura e agitação no processo de extração

Após definição do solvente de extração, tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,5, foram realizados estudos para otimizar o processo de extração de enzimas lignocelulolíticas. Para tanto, foi avaliada a influência da temperatura e agitação, através de um planejamento fatorial completo 2^2 com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade de FPase, xilanase, CMCase e avicelase, cujos resultados estão apresentados na Tabela 22.

Conforme resultados apresentados na Tabela 22, onde avaliou-se a influência da temperatura e o tempo de agitação, a máxima atividade para as enzimas lignocelulolíticas foram de 430,77 U/g para xilanase (ensaio 4), onde a condição de extração foi de 60°C e 175 rpm; para a CMCase a máxima atividade foi de 26,63 U/g (ensaio 8), onde a condição de extração foi de 50°C e 195,5 rpm; FPase a máxima atividade foi de aproximadamente 3,2 U/g obtida com temperatura de 50°C e agitação de 125 rpm (ensaios do ponto central) e para a avicelase os melhores resultados, 26,77 U/g, foram obtidos nos ensaios do ponto central com 125 rpm e 50°C.

Tabela 22 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 , valores reais e codificados e respostas em produção das enzimas FPase, Xilanase, CMCase e Avicelase.

Ensaio	Variáveis Independentes		Resposta de Atividade (U/g)			
	X_1	X_2	FPase	Xilanase	CMCase	Avicelase
			7 dias	14 dias	7 dias	7 dias
1	-1 (40)	-1 (75)	0,33	283,63	16,34	5,62
2	1 (40)	-1 (175)	0,56	280,48	15,14	4,03
3	-1 (60)	1 (75)	1,48	309,54	14,53	3,25
4	1 (60)	1 (175)	1,5	430,77	17,83	5,44
5	-1,41 (35,9)	0 (125)	0,48	350,46	19,54	3,8
6	1,41 (64,1)	0 (125)	0,91	370,01	25,15	4,57
7	0 (50)	-1,41 (54,5)	0,75	151,6	19,03	0,4
8	0 (50)	1,41 (195,5)	2,05	272,62	26,63	5,72
9	0 (50)	0 (125)	3,15	282,93	22,6	26,77
10	0 (50)	0 (125)	3,28	267,65	21,07	24,15
11	0 (50)	0 (125)	3,23	252,36	19,12	25,55

X1= Temperatura (°C); X2= Agitação (rpm). Variáveis independentes fixas: 30 min.

4.3.3 Xilanase

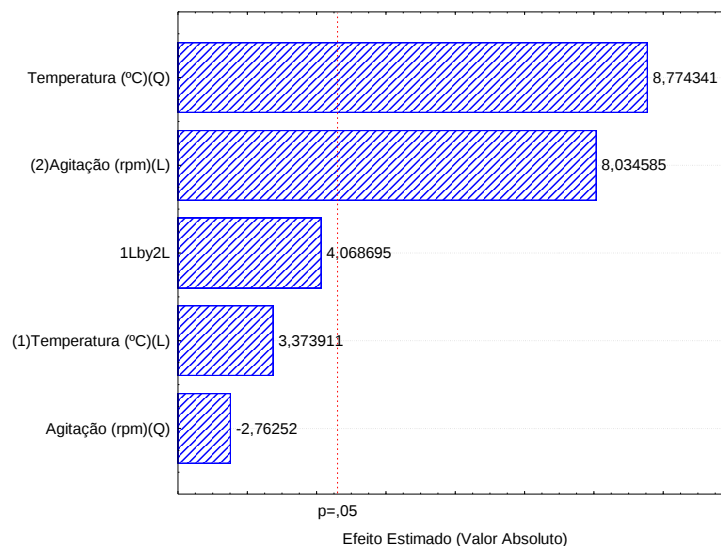
Conforme resultados apresentados na Tabela 30, a máxima atividade de xilanase foi de 430,77 U/g (ensaio 4), onde a condição de extração foi de 60°C e 175 rpm. Para melhor compreensão dos resultados encontrados, estes foram tratados com o software Statisc, onde a Figura 15 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas.

Verifica-se na Figura 15 que as variáveis temperatura (quadrática) e agitação (linear) apresentaram efeito significativo positivo em nível de confiança de 95%, demonstrando que um aumento da temperatura e/ou agitação possivelmente ocasionará um incremento na recuperação de xilanase. Sendo que a temperatura utilizada é considerada alta, e o seu aumento poderia acarretar em desnaturação enzimática com redução da atividade.

Parte das condições utilizadas neste trabalho para a obtenção do melhor resultado encontrado para a enzima xilanase (430,77 U/g) se assemelha ao trabalho de Astolfi (2014), que utilizou uma temperatura de 50°C. Já a melhor condição de agitação encontrada no trabalho analisado, foi de 100 rpm, sendo que neste foi de 175 rpm. Cabe ressaltar que Astolfi (2014) utilizando o micro-organismo *Trichoderma reesei* NRRL 3652 obteve uma atividade

enzimática para a enzima xilanase de 1130,70 U/g durante 6 dias de cultivo em substrato de casca de soja.

Figura 15 – Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2^2 , para a extração de xilanase.



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 cultivo submersa usando *Bacillus licheniformis* P11(C). A máxima produção foi de 30 U/mL e 28 U/mL quando xilana e farelo de trigo, respectivamente, foram usados. Embora seja difícil comparar a produção de enzimas com diferentes condições de cultivo e de micro-organismos empregados em cada estudo, pode-se concluir que as atividades encontradas para a enzima xilanase se encontram de acordo com as relatadas na literatura.

4.3.4 FPase

No processo de extração de FPase a máxima atividade foi de aproximadamente 3,2 U/g obtida nos ensaios do ponto central (9, 10 e 11, Tabela 30) com temperatura de 50°C e agitação de 125rpm.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 23).

Tabela 23 – Análise de variância para a extração de FPase do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	13,20	4	3,30	379,12
Resíduo	0,05	6	0,01	
Falta de Ajuste	0,04364	4		
Erro Puro	0,00860	2		
Total	13,25489	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,53$

Os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t(2) para atividade de FPase entre temperatura e agitação encontram-se no Apêndice E, Tabela V. A temperatura e agitação linear apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) negativa sobre a atividade de FPase. Já a temperatura e agitação quadráticas apresentaram influência significativa positiva e a interação não teve influência.

A Equação 12 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da FPase em função da temperatura e agitação, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,97 e F calculado 83,69 vezes maiores que o valor do F tabelado, os quais permitiram a validação do modelo apresentado.

$$\text{FPase} = 3,22 + 0,21.X_1 - 2,57.X_1^2 + 0,98.X_2 - 1,86.X_2^2 \quad (12)$$

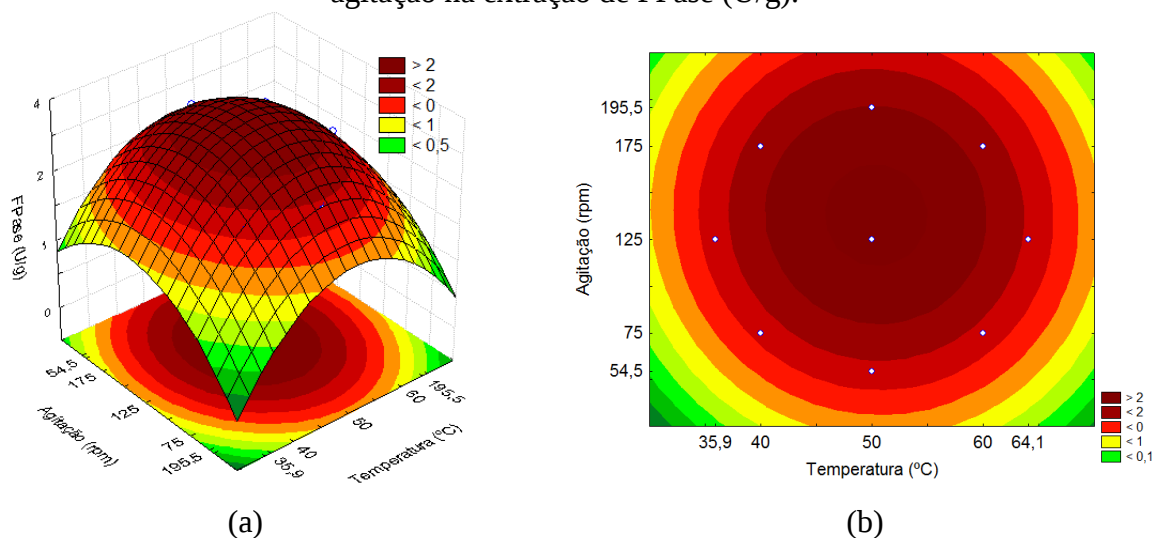
Onde:

FPase: Atividade de FPase (U/g); X_1 : Temperatura (°C); X_2 : Agitação (rpm).

Após a validação do modelo empírico, foi possível construir a superfície de resposta e curva de contorno para a atividade enzimática da FPase. Avaliando a Figura 16 pode-se observar que a máxima atividade extraída foi encontrada em condições intermediárias de temperatura (50 °C) e agitação (125 rpm) avaliadas.

Pirota et al. (2015) em seu estudo de várias linhagens isoladas de fungos, a linhagem P75P1 apresentou atividade para a enzima FPase de 2,25U/g sob condições de agitação em 100 rpm na temperatura de 30°C, FES e substrato de farelo de trigo. Os dados deste autor são semelhantes aos resultados obtidos no presente estudo.

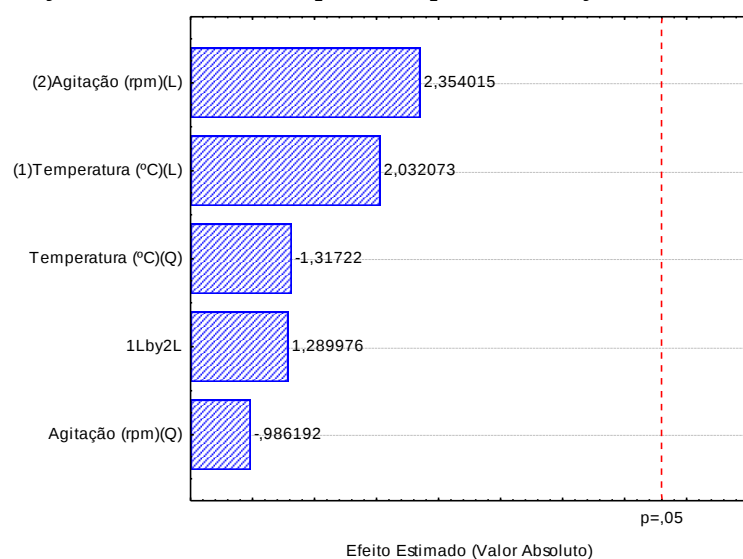
Figura 16 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da temperatura e agitação na extração de FPase (U/g).



4.3.5 CMCase

A máxima atividade de CMCase (26,63 U/g) foi obtida no ensaio 8 (Tabela 30), onde a condição de extração foi de 50°C e 195,5 rpm. A Figura 17 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis, onde verifica-se que a temperatura e agitação não apresentaram efeito significativo sobre o processo de extração.

Figura 17 – Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento fatorial completo 2^2 , para a extração de CMCase.



Pirota et al. (2015) para extração da CMCase utilizaram dois micro-organismos, um de linhagem de fungo *A. fumigatus* P40M2 e o *A. niger*. O estudo foi realizado através da CES

em meio de cultivo o farelo de trigo no valor de agitação de 100 rpm em uma temperatura de 30°C obtiveram os valores de 294,33 U/g e 351, 79 U/g, respectivamente. Já Kim et al. (2014) que cultivaram o fungo *Penicillium* sp. GDX01 em substrato óleo de palma de frutas em CES, sob uma agitação de 250 rpm a uma temperatura de 30°C obtiveram a atividade para FPase no valor de 606 UI/g.

4.3.6 Avicelase

Na extração de avicelase a máxima atividade foi de 25 U/g obtida (ensaios 9, 10 e 11, Tabela 30) com temperatura de 50°C e agitação de 125rpm.

Os fatores que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância - ANOVA (Tabela 24).

Tabela 24 – Análise de variância para a extração de avicelase do planejamento fatorial completo 2².

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Regressão	998,64	2	499,32	165,38
Resíduo	24,15	8	3,02	
Falta de Ajuste	20,717	6		
Erro Puro	3,438	2		
Total	1022,798	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,45$

Os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t(2) para atividade de avicelase entre temperatura e agitação encontram-se no Apêndice F, Tabela VI. A temperatura e agitação quadrática apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) sobre a atividade de avicelase. As demais variáveis não apresentaram efeito significativo.

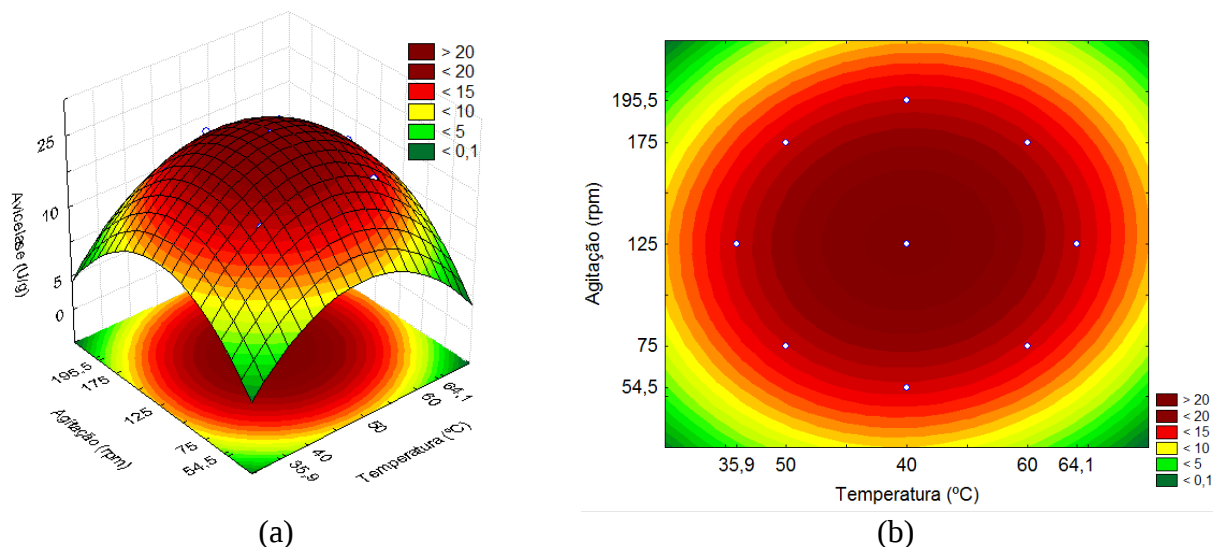
A Equação 13 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da avicelase em função da temperatura e agitação, dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância, com um coeficiente de correlação de 0,99 e F calculado 37,6 vezes maiores que o valor do F tabelado, os quais permitiram a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 18).

$$\text{Avicelase} = 25,49 - 22,88 \cdot X_1^2 - 22,01 \cdot X_2^2 \quad (13)$$

Onde:

Avicelase: Atividade de avicelase (U/g); X_1 : Temperatura (°C); X_2 : Agitação (rpm).

Figura 18 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da temperatura e agitação na extração de avicelase (U/g).



De posse dos resultados obtidos e apresentados foi verificado que a melhor condição de extração para as quatro enzimas foi a utilização de solução tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5. Para a enzima FPase a melhor condições de extração foi a uma temperatura de 50°C e agitação de 125 rpm; já para a enzima xilanase a temperatura foi de 60°C a uma agitação de 175 rpm; a CMCase foi apartir de 50°C e 195,5 rpm e a enzima avicelase obteve melhor condição de extração a uma temperatura de 50°C e agitação na extração de 125 rpm.

4.4 Caracterização parcial de enzimas lignocelulolíticas obtidas por cultivo em estado sólido usando *Penicillium* sp. em casca de soja

Visando a utilização das enzimas lignocelulolíticas em processos industriais como a sacarificação de biomassa, por exemplo, os extratos enzimáticos brutos obtidos das condições experimentais ótimas da cultivo em casca de soja foram parcialmente caracterizados. Este estudo foi realizado em termos de temperatura e pH ótimo, termoestabilidade e estabilidade a diferentes valores de pH.

4.4.1 pH e temperatura ótimos

a) Xilanase e avicelase

O pH e a temperatura ótimo para atividade de xilanase e avicelase foram determinados através da execução de um delineamento composto central rotacional 2^2 , com pontos axiais para cada variável independente (Tabelas 25).

Os valores de atividade de xilanase obtidos experimentalmente variaram de 74,61 a 463,31 U/g. Como pode ser visto nos ensaios do ponto central a atividade máxima de xilanase foi obtida na temperatura de 50°C e pH 5,3. Já as atividades de avicelase variaram de 1,03 a 27,31 U/g e a atividade máxima também foi obtida nos ensaios do ponto central.

Tabela 25 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 valores reais e codificados e respostas em atividade de xilanase e avicelase para pH e temperatura.

Ensaio	Variáveis independentes		Xilanase (U/g)	Avicelase (U/g)
	X ₁	X ₂		
1	-1 (4,3)	-1 (40)	158,30	2,6
2	1 (6,3)	-1 (40)	312,22	1,03
3	-1 (4,3)	1 (60)	155,06	3,21
4	1 (6,3)	1 (60)	274,63	2,42
5	-1,41 (3,9)	0 (50)	74,61	1,69
6	1,41 (6,7)	0 (50)	323,95	3,52
7	0 (5,3)	-1,41 (36)	314,64	6,14
8	0 (5,3)	1,41 (64)	104,07	9,85
9	0 (5,3)	0 (50)	463,31	27,31
10	0 (5,3)	0 (50)	425,73	24,46
11	0 (5,3)	0 (50)	444,52	23,45

X₁:pH; X₂:temperatura.

A partir da análise de variância para os parâmetros avaliados na medida de atividade enzimática para xilanase e avicelase (Apêndice G, Tabela VII) observou-se que, tanto a temperatura quanto o pH, foram significativos para xilanase ($p < 0,05$), independente se adotado o ajuste linear ou quadrático. Já, para avicelase, somente foram significativos as variáveis pH (Q) e temperatura (L) ($p < 0,05$).

As Equações 14 e 15 apresentam os modelos matemáticos empíricos, obtidos através dos coeficientes de regressão, referentes às atividades enzimáticas de xilanase e avicelase, respectivamente, em função do pH e temperatura, dentro da faixa estudada.

$$\text{Xilanase (U/g)} = 444,43 + 78,36.\text{pH} - 117,73.\text{pH}^2 - 42,34.T - 112,66.T^2 \quad (14)$$

$$\text{Avicelase (U/g)} = 25,08 - 12,02.\text{pH}^2 - 9,31.T^2 \quad (15)$$

Os modelos codificados foram validados pelas análises de variância apresentadas na Tabela 26 referentes à xilanase e avicelase.

Tabela 26 – Análise de variância para a atividade de xilanase e avicelase do planejamento fatorial completo 2² em função de temperatura e pH ótimos.

Fontes de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado
Xilanase				
Regressão	4	178520,34	44630,08	24,20
Resíduo	6	11065,85	1844,21	
Falta de Ajuste	4	10359,7		
Erro Puro	2	706,10		
Total	10	189586,20		
Avicelase				
Regressão	2	1017,23	508,62	114,77
Resíduo	8	35,45	4,43	
Falta de Ajuste	6	27,44		
Erro Puro	2	8,01		
Total	10	1052,68		

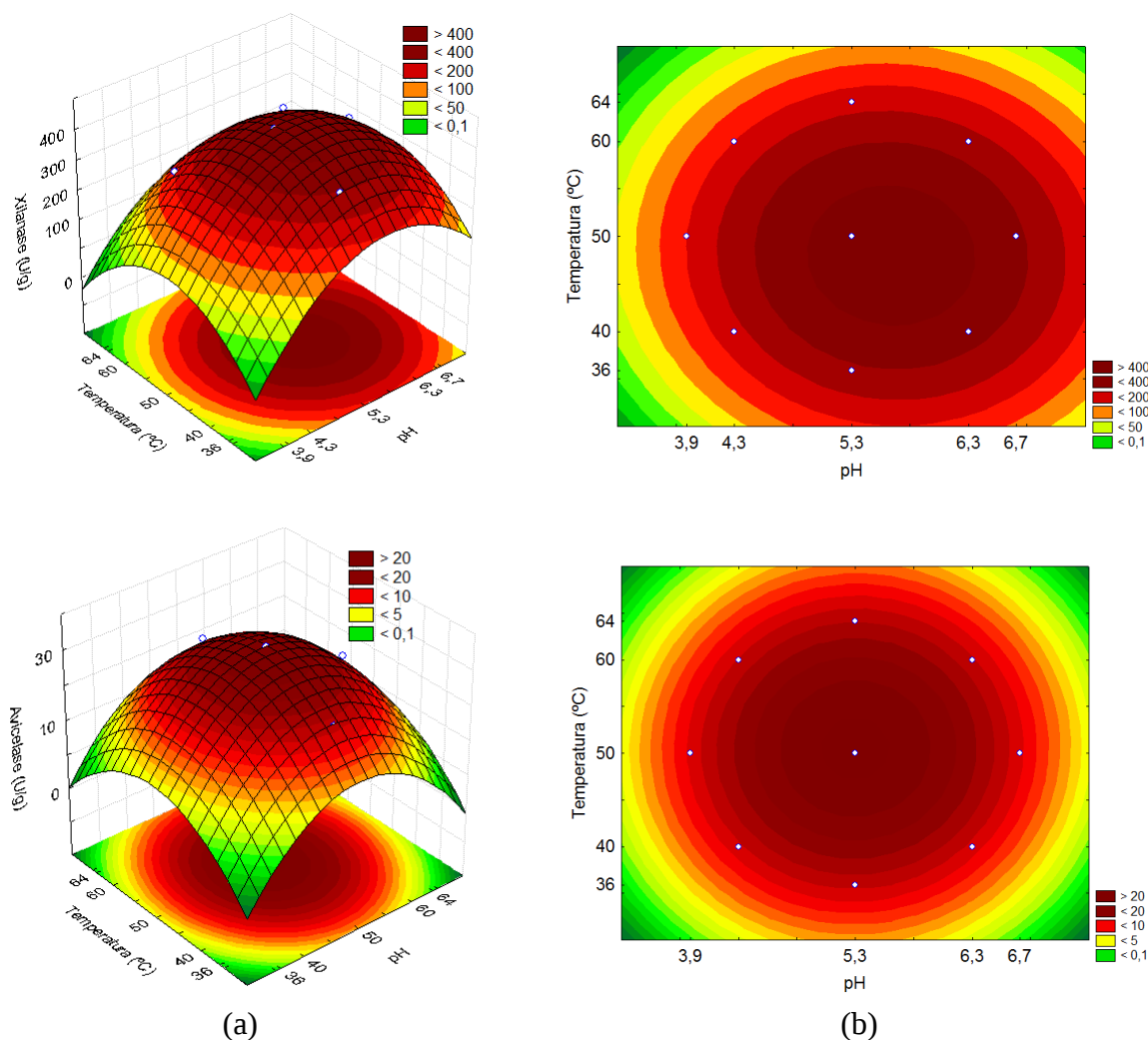
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,45(\text{avicelase})$ e $4,53(\text{xilanase})$

Verificou-se que para xilanase e avicelase 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, as quais confirmam que para ambas as enzimas a temperatura e pH ótimos são 50°C e 5,3, respectivamente.

Para Albano (2012), na condição de cultivo em CES, utilizando o substrato de bagaço de cana e o fungo *A. fumigatus* da linhagem 100P, tendo otimizado a temperatura entre 25 e 75 °C. Kuo et al. (2015) investigou o efeito da temperatura somente na atividade da avicelase obtida da cepa #58 da linhagem de fungo *Meyerozyma* sp. em meio de cultura a base de PDA, tendo observado a maior atividade enzimática em temperaturas em torno de 70 °C. Makky (2009) investigou a produção de celulasas (avicelase) pelo termofílico *Geobacillus stearothermophilus* quando cultivado no bagaço de cana-de-açúcar em CES e esta enzima apresentou temperatura ótima para atividade de 50 °C.

Neste sentido, verifica-se que a temperatura otimizada obtida para a xilanase e avicelase nesse estudo são similares às condições de temperatura otimizadas por outros pesquisadores empregando outros fungos, diferenciando o substrato empregado na cultivo.

Figura 19 – Superfícies de resposta e curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na atividade de xilanase (a) e avicelase (b).



b) FPase e CMCase

O pH e a temperatura ótimos para atividade de FPase e CMCase foram determinados através da execução de um delineamento composto central rotacional 2^2 , com pontos axiais para cada variável independente (Tabela 27).

As atividades de FPase e CMCase variaram de 0,26 a 2,92 U/g e 8,01 a 22,00, respectivamente. A atividade máxima foi obtida nos ensaios do ponto central, pH 4,9 e 50°C, tanto para FPase como para CMCase.

Tabela 27 – Matriz do planejamento fatorial completo 2² valores reais e codificados e respostas em atividade FPase e CMCase para pH e temperatura.

Ensaio	Variáveis independentes		FPase (U/g)	CMCase (U/g)
	X ₁	X ₂		
1	-1 (3,9)	-1 (40)	1,06	11,94
2	1 (5,9)	-1 (40)	1,84	8,38
3	-1 (3,9)	1 (60)	0,34	9,61
4	1 (5,9)	1 (60)	0,26	8,43
5	-1,41 (3,5)	0 (50)	0,42	13,46
6	1,41 (6,3)	0 (50)	2,09	8,27
7	0 (4,9)	-1,41 (36)	0,36	10,47
8	0 (4,9)	1,41 (64)	0,27	8,01
9	0 (4,9)	0 (50)	2,85	21,77
10	0 (4,9)	0 (50)	2,88	21,45
11	0 (4,9)	0 (50)	2,92	22,00

X₁: pH; X₂: temperatura.

Os coeficientes de regressão e erro padrão, valores de pH e temperatura do planejamento fatorial completo 2² para atividade de FPase e CMCase encontram-se no Apêndice H, Tabela VIII.

As Equações 16 e 17 apresentam os modelos matemáticos empíricos, obtidos através dos coeficientes de regressão, referentes às atividades enzimáticas de FPase e CMCase, respectivamente, em função do pH e temperatura, dentro da faixa estudada.

$$\text{FPase(U/g)} = 2,88 + 0,38.\text{pH} - 0,79.\text{pH}^2 - 0,30.T - 1,26.T^2 - 0,215.\text{pH}.T \quad (16)$$

$$\text{CMCase (U/g)} = 21,74 - 1,51.\text{pH} - 5,57.\text{pH}^2 - 0,72.T - 6,38.T^2 + 0,59.\text{pH}.T \quad (17)$$

Os modelos codificados foram validados pelas análises de variância apresentadas na Tabela 28 referentes à FPase e CMCase.

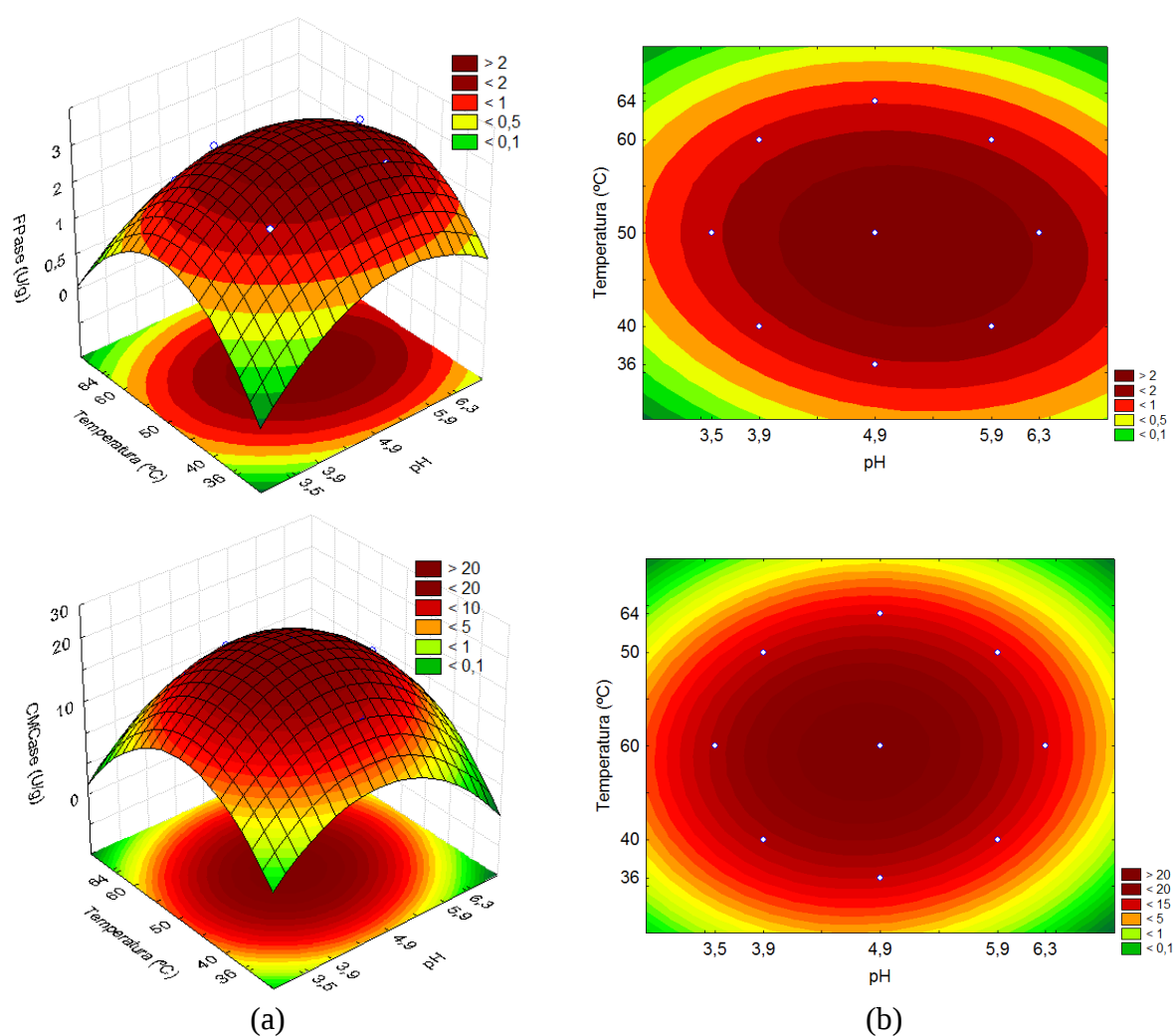
Verificou-se que para FPase e CMCase o valor de F calculado foi maior que o valor tabelado, apresentando coeficientes de correlação (R²) superiores ou igual a 95%, o que permitiu a validação estatística dos modelos matemáticos empíricos (p<0,05) e a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 20, as quais confirmam que para ambas as enzimas a temperatura ótima foi próxima de 50°C e pH ótimo de 4,9.

Tabela 28 – Análise de variância para a atividade de FPase e 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
FPase				
Regressão	12,17	5	2,43	12,70
Resíduo	0,96	5	0,19	
Falta de Ajuste	0,956	3		
Erro Puro	0,002	2		
Total	13,129	10		
CMCase				
Regressão	336,49	5	67,30	224,66
Resíduo	1,50	5	0,30	
Falta de Ajuste	1,35	3		
Erro Puro	0,15	2		
Total	337,99	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 5,05$

Figura 20 – Superfícies de resposta e curvas de contorno indicando a influência da temperatura e pH na atividade de FPase (a) e CMCase (b), respectivamente.



Falkoski et al. (2013), utilizando *Chrysosporthe cubensis* em CES, verificaram que a melhor condição de trabalho para FPase foi em pH 4 e temperatura de 50°C. Para Cunha et al. (2012) a melhor condição de trabalho para FPase foi de pH 5,5 a uma temperatura de 45°C e para CMCase com pH e temperatura de 4,5 e 75°C, respectivamente empregando o *Streptomyces* sp. em cultivo submersa com substrato de farelo de trigo (CUNHA, 2012).

Neste estudo verificou-se que, as condições otimizadas de pH e temperatura das enzimas FPase e CMCase em CES utilizando micro-organismo *Penicillium* sp. e como substrato a casca de soja como sendo de 4,9 e 50°C, respectivamente. Já para as enzimas xilanase e avicelase os valores de pH e temperatura foram na faixa próxima a 5,3 e 50°C, respectivamente. No estudo feito por Astolfi (2014), utilizando *T. ressei* NRRL 3652, em CES o pH e temperatura para FPase variaram de 3-6 e 40-55°C, respectivamente. E o mesmo autor encontrou para CMCase os valores de pH e temperatura de 4,6 e 55°C, respectivamente. Para Kim et al. (2014), o valor de pH para CMCase foi de 4,0 utilizando o *Penicillium* sp. GDX01.

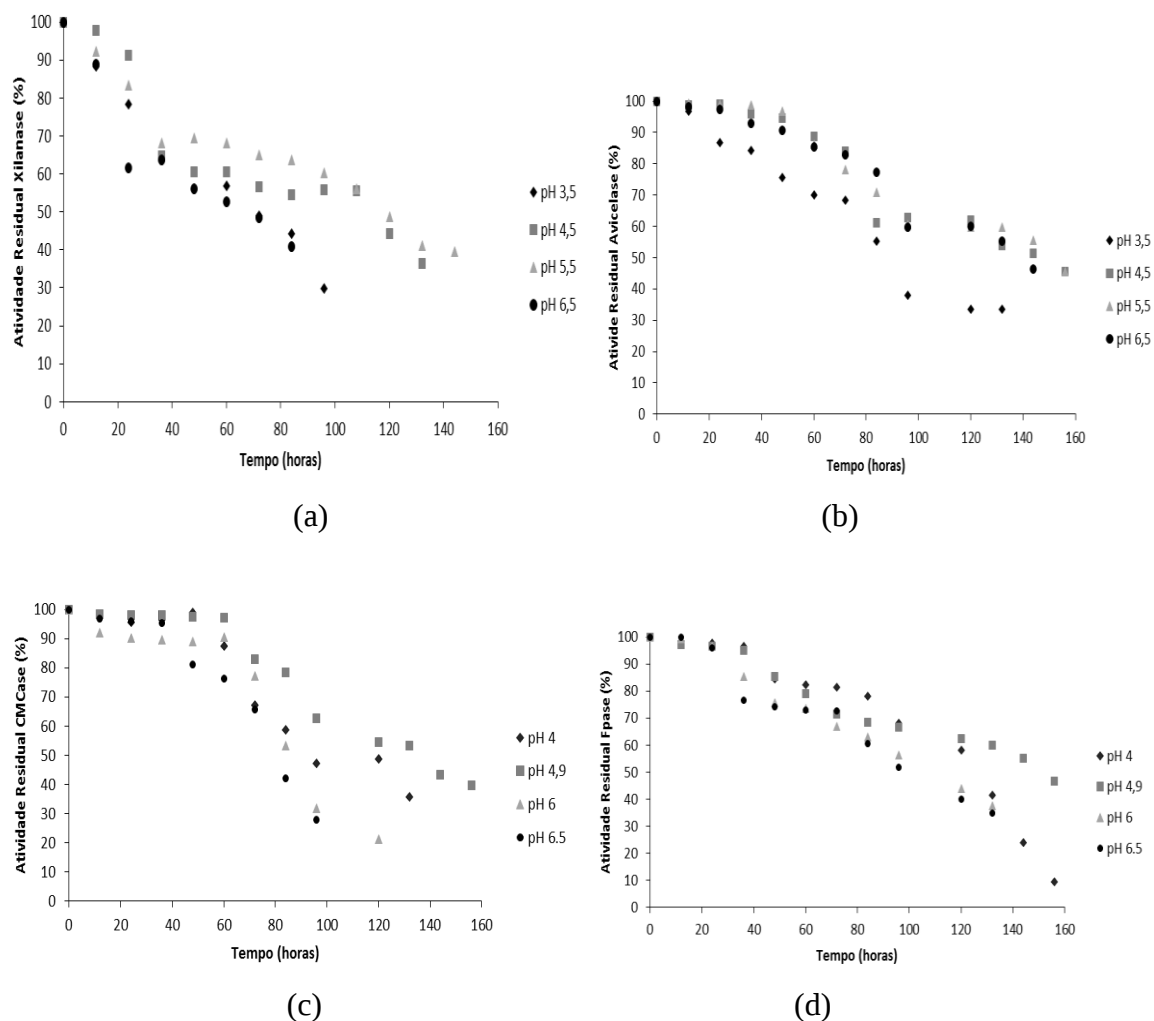
De forma geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6 -5,0). Para temperatura, estudos divulgados indicam que acima de 40°C obtem-se melhores resultados de atuação (CASTRO e PEREIRA, 2010).

4.4.2 Efeito do pH na estabilidade

A Figura 21 apresenta os resultados da estabilidade de xilanase (a), avicelase (b), CMCase (c) e FPase (d). A xilanase e avicelase apresentaram maior estabilidade a pH entre 4,5 e 5,5, ou seja, uma redução de cerca de 50% na atividade após 108 e 144 h, respectivamente. Já CMCase e FPase com redução de 50% após 132 e 144 h, respectivamente, apresentaram-se mais estáveis em pH 4,9.

Resultados encontrados por Astolfi (2014), demostram que para valores de pH na FPase e xilanase apresentaram maior estabilidade em pH 5,5 não corroborando com os dados apresentados no presente estudo. Isso se deve, possivelmente, pela diferença no uso das culturas utilizadas. Já para Albano (2012), a estabilidade da enzima xilanase, utilizando *A. fumigatus* M51 com bagaço de cana como subtrato apresentou máxima atividade em pH 3 e manteve 90% da atividade residual em pH 4 durante 168 h. Para o mesmo autor a estabilidade de CMCase produzida por *A. fumigatus* SMN1 apresentou melhor resultado em pH 3 e manteve 70% da atividade residual entre pH 4 e 5 durante 168 h.

Figura 21 – Resultados da estabilidade em diferentes pH da enzimas lignocelulolíticas xilanase (a), avicelase (b), CMCase (c) e FPase (d), respectivamente.



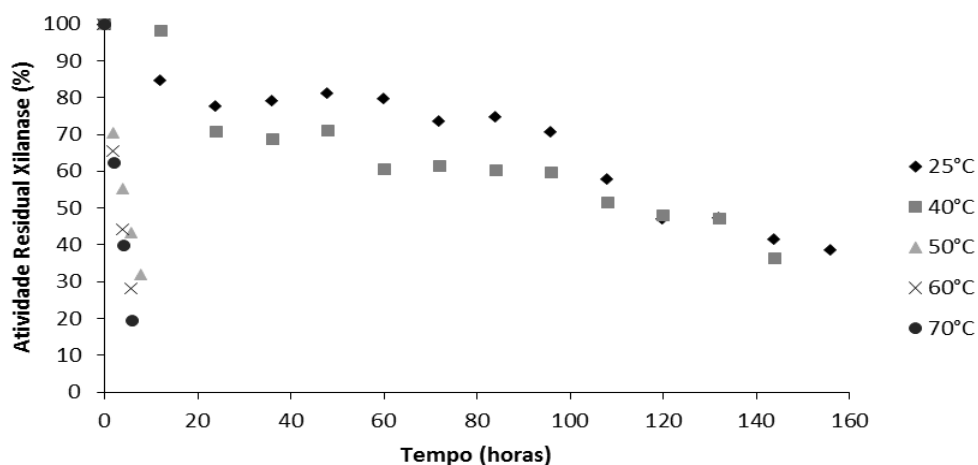
4.4.3 Estabilidade térmica das enzimas

A avaliação da estabilidade térmica é uma característica importante para enzimas lignocelulolíticas para serem empregadas em processos indústrias, como por exemplo, hidrólise de substratos, bem como outras aplicações. Uma característica muito importante e que deve ser avaliada é a estabilidade da enzima quando armazenada, pois esta influenciará no tempo em que a enzima poderá ser armazenada, mantendo suas características iniciais em termos de atividade enzimática.

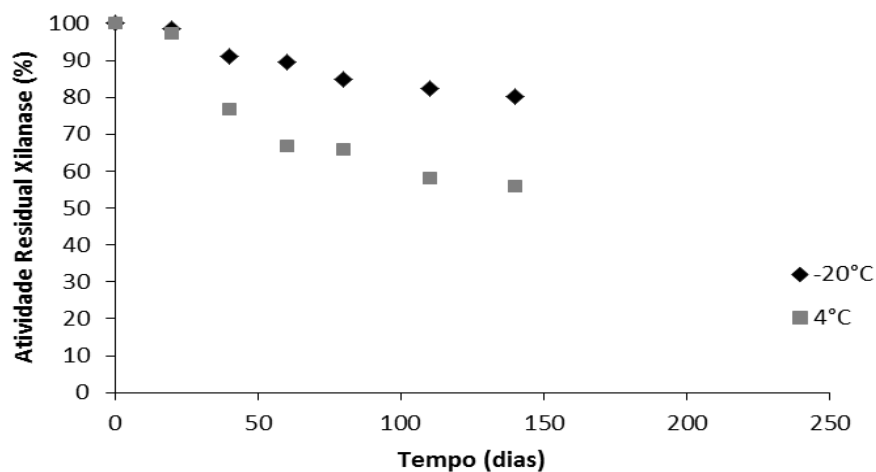
4.4.3.1 Xilanase

A determinação da estabilidade térmica da enzima xilanase em temperaturas mais elevadas consistiu-se da incubação do extrato enzimático bruto por até 160 h de reação a temperaturas que variaram de 25 a 70°C. Observando a Figura 22 (a), pode-se perceber que a enzima xilanase se apresentou estável, com atividade residual de aproximadamente 80% até 60 h a 25°C e de 70% até 40h a 40°C de armazenamento. Uma redução da atividade residual da enzima xilanase (cerca de 50%) foi observada após 108h de reação Figura 22 (b) em ambas as temperaturas. Perdas drásticas de atividade enzimática foram observadas nas temperaturas de 50, 60 e 70°C possivelmente por estas serem temperaturas mais elevadas provocando a desativação da enzima em um pequeno espaço de tempo.

Figura 22 – Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de xilanase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja, respectivamente.



(a)



(b)

A estabilidade térmica da enzima xilanase em baixas temperaturas também foi avaliada, sendo que para isto a enzima foi incubada nas temperaturas de 4 °C e -20 °C. Os resultados desta avaliação se encontram Figura 22 (b) onde é possível observar que atividade residual da enzima xilanase praticamente se manteve nos primeiros dias de incubação em ambas as temperaturas avaliadas com atividade residual acima de 50% com mais de 160 dias. Comparando as temperaturas avaliadas, é possível observar que a temperatura de - 20°C é considerada melhor para o armazenamento desta enzima (atividade residual de 80%), pois apresentou uma pequena perda da atividade residual se mantendo no decorrer do tempo avaliado (160 dias) em relação a temperatura de 4°C (atividade residual de 56%). É importante ressaltar que a avaliação da estabilidade da enzima xilanase nas condições apresentadas (4 °C e -20 °C) continuam sendo avaliadas.

Comparando os resultados encontrados neste trabalho com os apresentados na literatura é possível concluir que estes se assemelham, pois Astolfi (2014) avaliando a estabilidade térmica de xilanase produzida por *Trichoderma reesei* em temperaturas mais elevadas, também observou maior atividade residual com uma temperatura de 40 °C, porém com uma redução de cerca de 25% na atividade após 60 h de reação e 65% após 96 h. 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, a xilanase apresentou redução de 50% após 8 h de reação. Os resultados apresentados para temperaturas baixas, também podem ser comparados com Astolfi (2014), que avaliou a estabilidade de extrato enzimático bruto da enzima xilanase nas temperaturas de -80; -10 e 4 °C. Os resultados obtidos para a atividade enzimática nas diferentes temperaturas demonstraram um comportamento variável em relação à manutenção de sua atividade durante o seu tempo de armazenamento, com redução de cerca de 20% de atividade em relação à atividade inicial após 290 dias de armazenamento para a temperatura de 4 °C, resultados estes que divergem dos obtidos no presente estudo.

Falkoski et al. (2013) após 48 h de incubação do extrato bruto de xilanase produzido por *Chrysosporthe cubensis*, observaram que este manteve-se estável a 40°C com atividade residual de 92,3%. Ao comparar os resultados apresentados na literatura com os do presente estudo, observa-se que o extrato bruto de xilanase obtido do cultivo em meio sólido de *Penicillium* sp. apresenta maior estabilidade a 40 °C (108 h).

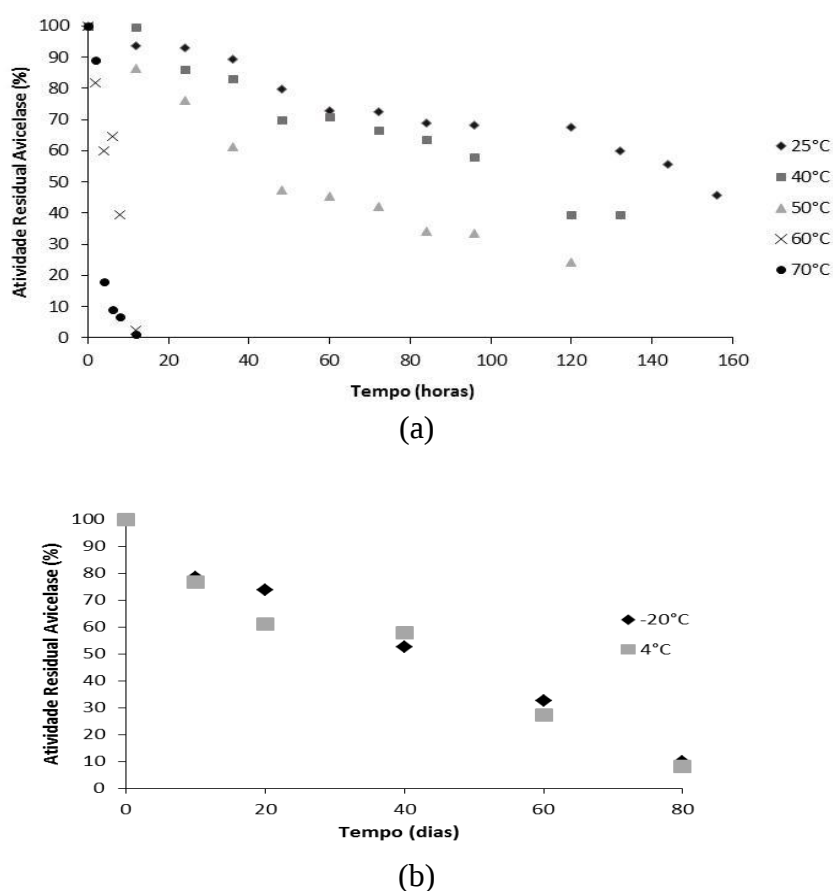
Para Albano (2012), a enzima xilanase apresentou estabilidade térmica à temperatura de 25 a 50°C, entretanto o autor não menciona sobre o tempo de estabilidade. Estudo feito por Cunha et al. (2012) relatou que no teste de estabilidade térmica para a enzima xilanase um excelente

perfil de estabilidade foi obtido após 4 h de incubação com atividade residual de 70% em relação a sua atividade inicial a 50°C e 80% a 60°C, após 8 h mantiveram 75% da atividade a 50°C e 55% a 60°C.

4.4.3.2 Avicelase

Para a enzima avicelase também foi avaliada a estabilidade térmica em relação a altas temperaturas (25 a 70 °C) por um período de até 160 h em relação a sua atividade enzimática inicial e os resultados estão apresentados na Figura 23 (a). No que tange a estabilidade térmica para avicelase se verificou que para as temperaturas de 25, 40, 50, 60 e 70°C a estabilidade a 50% da atividade residual da enzima oscilou em 144, 96, 36, 6 e 4h, respectivamente. Ao avaliar o efeito das baixas temperaturas no armazenamento do extrato pode-se observar que a atividade residual da avicelase foi de 53 a 57% para temperaturas de -20°C a 4°C, respectivamente (Figura 23b).

Figura 23 – Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de avicelase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja.



Para Makky (2009) que investigou a produção de avicelase pelo micro-organismo termofílico *Geobacillus stearothermophilus*, cultivado em bagaço de cana de açúcar. O autor observou que a enzima apresentou boa estabilidade entre temperaturas variando de 30 a 80°C.

Já para Mansur (2011), ao avaliar a termoestabilidade de avicelase produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2, a enzima manteve 59 e 40% da atividade residual após 20 min de incubação a 80 e 90°C, respectivamente.

Cunha (2012) avaliou a influência da temperatura sobre a atividade de avicelase produzida por *Streptomyces* sp. cultivada em resíduos lignocelulósicos, e concluiu que esta apresentou estabilidade de 60% após duas hde incubação à 50 e 60°C.

Para Castro e Pereira (2010), que utilizaram fungos *Actinomicetos* a termoestabilidade para a enzima avicelase foi que após 60 min de incubação manteve-se 90% e 60% da atividade a 50°C e 60°C, respectivamente.

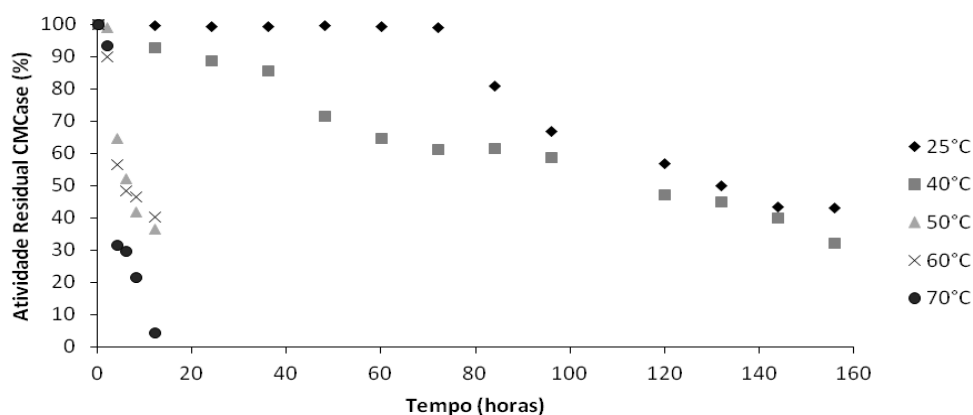
A estabilidade do extrato enzimático bruto à baixas temperaturas foi avaliada incubando-se as amostras à temperaturas de -20 e 4 °C conforme apresentado na Figura 22b. Observou-se que a enzima apresenta o mesmo comportamento quando armazenada -20 e 4°C, com atividade residual de 52,6 e 57,8%, durante 40 dias de armazenamento, respectivamente.

A maioria dos estudos apresentados na literatura avalia apenas a estabilidade da avicelase a altas temperaturas (MAKKY, 2009; MANSUR, 2011; CUNHA, 2012; GOMATHI et al., 2012; MIHAJLOVSKI et al., 2015).

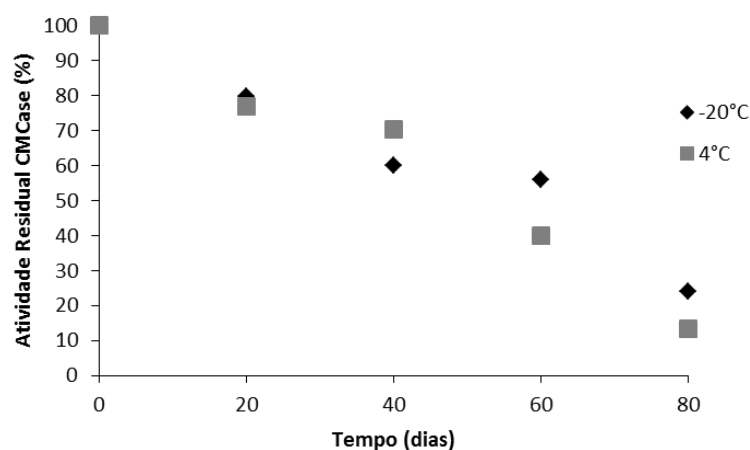
4.4.3.3 CMCase

A avaliação da estabilidade térmica da enzima CMCase em temperaturas mais elevadas também consistiu da incubação do extrato enzimático bruto por até 160 h a temperaturas que variaram de 25 a 70 °C. Os resultados mostraram que a CMCase apresentou maior estabilidade a 25 e 40 °C, ou seja, com uma redução de cerca de 50% na atividade após 132 e 96 hde reação, respectivamente. Paralelamente, perdas drásticas de atividade enzimática foram observadas quando o extrato bruto foi armazenado nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C, com redução de 50% da atividade enzimática após 4 a 6 horas. (Figura 24a).

Figura 24 – Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de CMCase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja.



(a)



(b)

A estabilidade do extrato enzimático bruto da enzima CMCase à baixas temperaturas foi avaliada submetendo-se amostras à temperaturas de -20 e 4 °C e avaliada a cada 20 dias (Figura 24b). A temperatura de 4°C foi mais eficiente para conservação do extrato enzimático por um período de 40 dias, com uma estabilidade que oscilou de 70%. Na mesma temperatura, mas com 60 dias de armazenamento o valor de estabilidade enzimática ficou em 39%. Quando a temperatura de armazenamento foi de -20°C em um período de 60 dias a estabilidade oscilou em 56%, sendo superior a atividade residual percentual da CMCase para o mesmo tempo de armazenamento.

Resultados semelhantes ou até inferiores tem sido reportados por diversos autores em relação a estabilidade de CMCase a altas temperaturas. Ladeira et al. (2015) utilizaram como substrato bagaço de cana e a enzima CMCase de *Bacillus* sp. SMIA-2, observando que esta

permaneceu aproximadamente 100% estável durante 1h em até 60°C, após esse tempo começou a sofrer desnaturação.

Astolfi (2014), avaliou a estabilidade de extrato enzimático bruto de CMCase produzida por *Trichoderma reesei* NRRL 3652 a baixas temperaturas (-80; -10 e 4 °C), e após 290 dias cerca de 20% da atividade de CMCase em temperatura de 4 °C foi perdida em relação a sua atividade inicial.

Santos et al. (2016), que avaliaram a produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. com cultivo em estado sólido de palma forrageira, observaram que, em temperatura de congelamento (-25 °C), não ocorreu nenhuma perda súbita de atividade da enzima CMCase, com atividade relativa do extrato bruto enzimático de 85% após 144 horas. Entretanto, em temperatura de refrigeração (4 °C), observaram degradação devido ao crescimento microbiano no extrato enzimático.

4.4.3.4 FPase

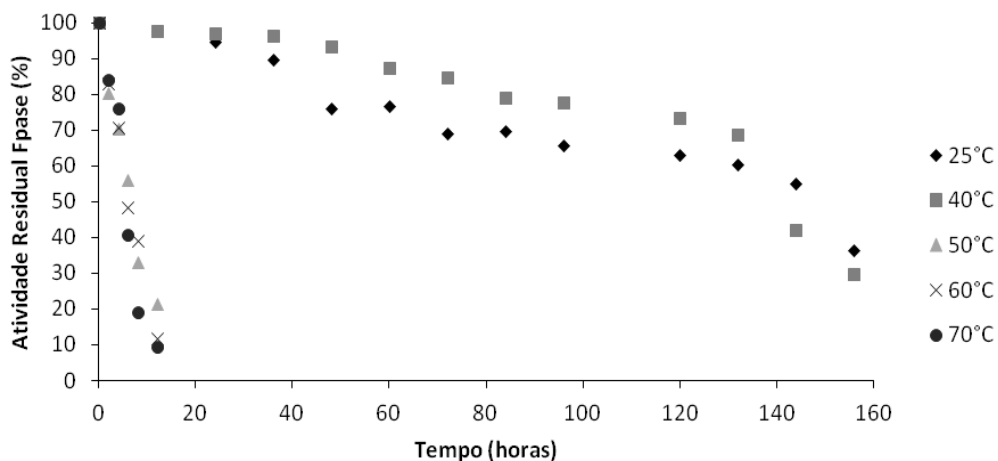
A estabilidade térmica da enzima FPase consistiu da incubação do extrato enzimático bruto por até 160 h de incubação a temperaturas que variaram de 25 a 70 °C. Os resultados mostraram que a enzima FPase apresentou maiores estabilidades a 25 e 40 °C, ou seja, uma redução de cerca de 50% na atividade após 140 h de reação. Paralelamente, perdas drásticas de atividade enzimática foram observadas nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C (Figura 25a) em que a redução de cerca de 50% da atividade enzimática ficou inferior a 10 horas.

A estabilidade do extrato enzimático bruto à baixas temperaturas foi avaliada submetendo-se amostras à temperaturas de -20 e 4 °C e avaliada a cada 20 dias (Figura 25b). Em 90 dias de armazenamento verificou-se que a viabilidade da FPase esteve em torno de 74%. Em contrapartida, para a temperatura de 4° C se observou menor atividade residual para FPase, ficando em torno de 58% transcorridos 60 dias.

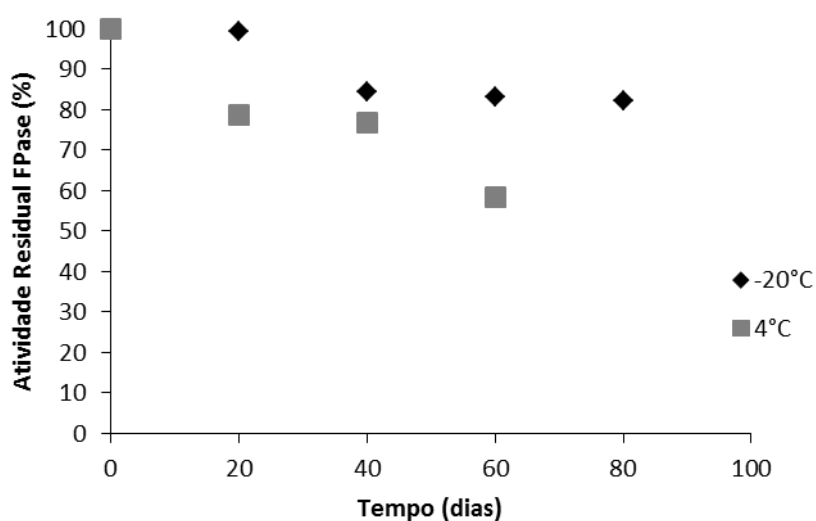
Comparando os resultados obtidos com Astolfi (2014) que avaliou a estabilidade térmica de FPase obtida do cultivo de *Trichoderma reesei* e obteve a maior estabilidade a 40°C, que resultou em 25% de redução após 60 h de armazenamento. Sendo que após 96 h houve uma redução de 44,66% na estabilidade enzimática, demonstrando que os resultados obtidos neste trabalho são mais promissores. Comparando ainda os resultados encontrados com o mesmo autor, para a FPase produzida com substrato de casca de soja e o fungo *T.*

ressei NRRL 3652, após 290 dias de armazenamento a baixas temperaturas, a enzima FPase apresentou cerca de 60% da atividade residual em temperatura de 4 °C.

Figura 25 – Influência das temperaturas altas (a) e baixas (b) na estabilidade de FPase obtida do extrato enzimático bruto por CES em casca de soja.



(a)



(b)

Os resultados obtidos por Falkoski et al. (2013) mostraram que após 48 h de incubação do extrato bruto de FPase produzida por *C. cubensis*, a atividade enzimática foi altamente estável a 40 °C e, com atividade residual de 98,1% para FPase.

Resultados inferiores foram reportados por Santos et al. (2016), que avaliando a produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. com

cultivo em estado sólido de palma forrageira, observaram que em temperatura de congelamento (-25°C), não ocorreu nenhuma perda súbita de atividade da enzima FPase, com atividade relativa do extrato bruto enzimático de 85% após 144 horas. Entretanto, em temperatura de refrigeração (4°C), observaram degradação devido ao crescimento microbiano no extrato enzimático.

O processo de congelamento interrompe reações químicas e atividades biológicas (TATTINI JUNIOR et al., 2006; AGUIAR e LUCENA, 2011), o que não ocorre quando enzimas são armazenadas em refrigeração. Durante o congelamento, a água livre cristaliza-se não estando disponível como solvente para a ação de agentes causadores da desativação enzimática como forças hidrodinâmicas, entre outras (BAILEY e OLLIS, 1986).

4.4.4 Parâmetros cinéticos.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$), constante cinética de desnaturação térmica (K_d), valor D Ed e valor Z para as temperaturas de 25, 40, 50, 60 e 70°C das diferentes enzimas é apresentado na Tabela 29.

O aumento da temperatura afeta o processo de desativação térmica das enzimas avaliadas com velocidades de inativação (K_d) semelhantes entre as enzimas estudadas, nas diferentes temperaturas avaliadas. Os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) e de redução decimal (D) de um biocatalisador correspondem a valores numericamente iguais ao tempo necessário para atingir uma diminuição de 50 % e 10 % da sua atividade enzimática inicial, respectivamente.

A avicelase mostrou-se mais estável à desativação térmica em relação as demais enzimas, obtendo-se tempos de $t_{1/2}$ na faixa de 173,29 a 63,01 h e valores de D de 575,65 a 209,33 h em temperaturas de 25 a 50°C . A xilanase, CMCase e FPase mostraram estabilidade somente até 40°C , e todas apresentaram forte desativação térmica em temperaturas mais elevadas. Valores altos desses parâmetros são desejáveis durante as operações industriais, pois garantem que a enzima é mais resistente à desativação ocasionada pelo efeito da temperatura (HEIDTMANN et al., 2012).

Tabela 29 – Valores experimentais de K_d , $t_{1/2}$, valor D, Ed e valor Z para xilanase, avicelase, CMCase e FPase em função da temperatura.

Temperatura (°C)	K _d (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Valor D	Ed (KJ/mol/T°K)	Valor Z (°C)
Xilanase					
25	0,005	138,629	460,517	89,1	22,2
40	0,005	138,629	460,517		
50	0,138	5,0228	16,685		
60	0,209	3,3165	11,017		
70	0,267	2,5961	8,624		
Avicelase					
25	0,004	173,286	575,646	96,7	20,4
40	0,006	115,524	383,764		
50	0,011	63,013	209,326		
60	0,279	2,484	8,253		
70	0,381	1,819	6,044		
CMCase					
25	0,006	115,5245	383,7642	78,0	25,0
40	0,007	100,4561	333,708		
50	0,094	7,373906	24,49559		
60	0,110	6,301338	20,93259		
70	0,257	2,697071	8,959475		
FPase					
25	0,004	173,2868	575,6463	89,3	22,2
40	0,005	154,0327	511,6856		
50	0,132	5,251115	17,44383		
60	0,173	4,006631	13,30974		
70	0,210	3,300701	10,96469		

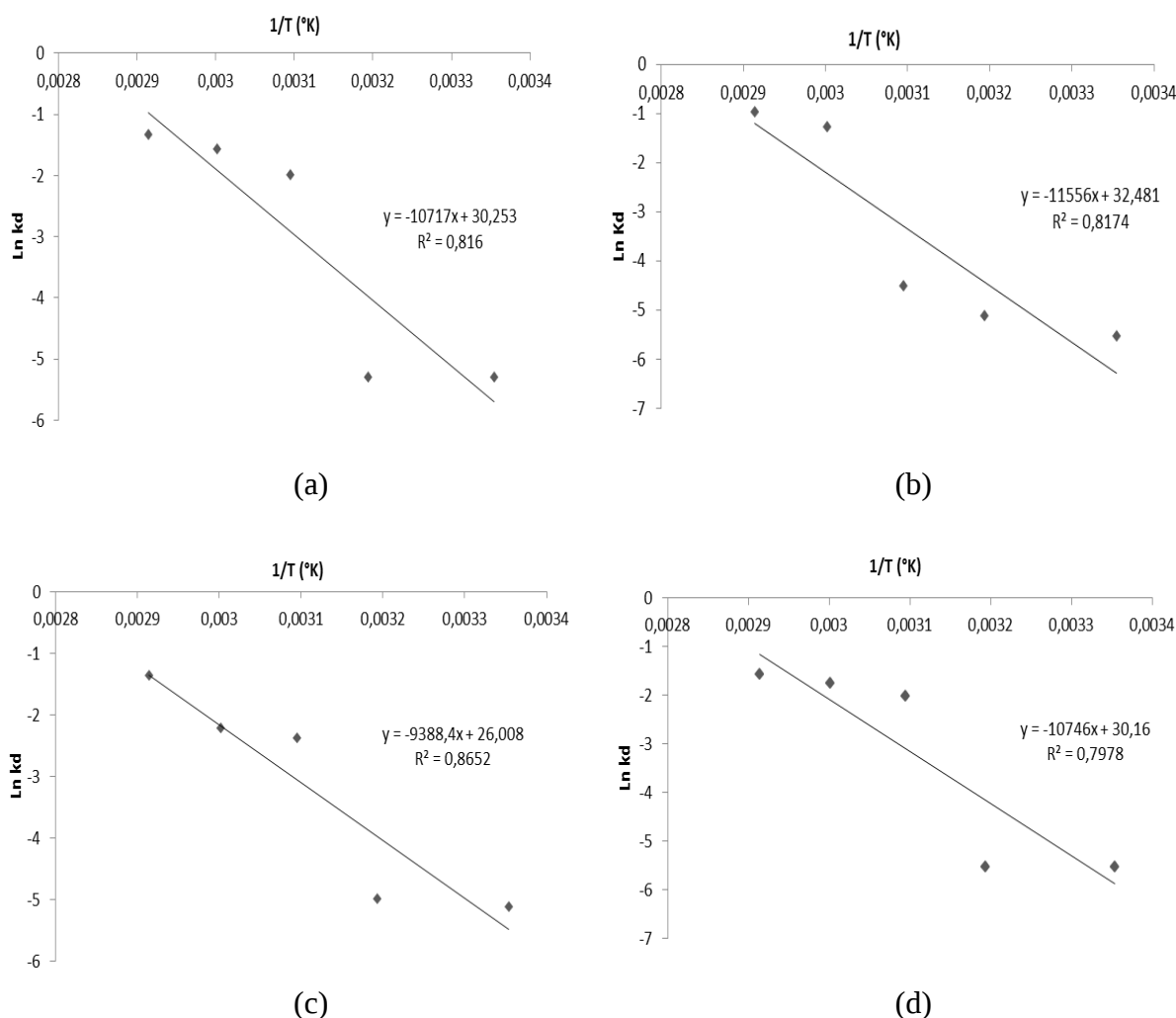
Os valores de Z de 22,2; 20,4; 25,0 e 22,2 (Tabela 29) indicam que uma mudança nesses intervalos de temperatura geraria uma redução de um ciclo logarítmico na atividade enzimática da xilanase, avicelase, CMCase e FPase, respectivamente.

Driss et al. (2014) utilizaram o fungo *Penicillium occitanis* na produção de enzima xilanase, obtendo tempo de meia vida de 729,6; 420 e 115,5 h e 0,00095, 0,00165 e 0,00600 para constante cinética de desnaturação térmica (K_d) nas temperaturas de 50, 60 e 70°C. Esses valores foram superiores aos encontrados no presente trabalho. Calsavara et al. (2000) utilizando *A. niger* em substrato de celobiose obtiveram valores de K_d e $t_{1/2}$ de 0.0492 e 4.1678; 14.1 e 0.17, para 60 e 70°C respectivamente. Não foram encontrados na literatura dados referentes a energia de desativação e o valor de Z de avicelase produzida por *Penicillium* sp.

Nos processos enzimáticos além dos estudos de desativação térmica, a determinação dos parâmetros termodinâmicos, também é necessária para elucidar o comportamento das moléculas frente à inativação enzimática em diferentes condições fisiológicas, assim como o efeito da temperatura na taxa de desativação enzimática (HEIDTMANN et al., 2012). A linearização de Arrhenius foi empregada para representar a variação da atividade enzimática em função das constantes cinéticas de desnaturação enzimáticas (K_d) a diferentes temperaturas ($1/T$) (Figura 26).

Os valores de E_d da xilanase, CMCCase e FPase (89,1; 78,0 e 89,3 kJ mol⁻¹, respectivamente) foram ligeiramente menores que da avicelase (96.7 kJ mol⁻¹), corroborando a maior termoestabilidade da avicelase. Diferentes autores têm encontrado valores variáveis de E_d de celulasas de extratos enzimáticos de diferentes isolados. Em um estudo desenvolvido por Driss et al. (2014) com *P. occitanis* imobilizado para aumentar a digestibilidade na ração de frangos o valor encontrado para E_d da xilanase imobilizada foi de 83,02 KJ/mol. No estudo realizado por Balsan et al. (2012) o valor encontrado para a E_d foi de 177.6 KJ/mol produzida pela enzima celulase a partir do fungo *T. reesei* (NS 50013) em meios de cultivos lignocelulolíticos. Calsavara et al. (2000) utilizando *A. niger* em substrato de celobiose obtiveram valores para energia de desativação térmica de 80,6 Kcal/mol em enzima livre.

Figura 26 – Determinação da energia de desativação baseada na linearização da equação de Arrhenius para uma faixa de temperatura de 25 a 70°C para xilanase (a), avicelase (b), CMCase (c) e FPase (d).



4.5 Aplicação do extrato enzimático na hidrólise de substratos lignocelulolíticos

O processo de hidrólise enzimática da biomassa está sujeito a diversos fatores que podem influenciar o rendimento da hidrólise, destacando-se a temperatura, pH, teor de sólido e relação enzima-sustrato (GONÇALVES, 2010).

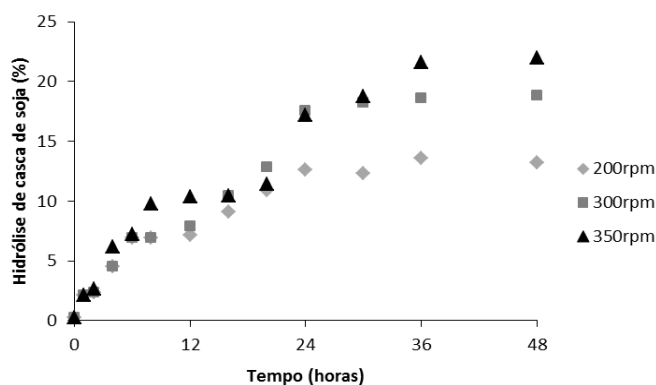
A hidrólise de substratos lignocelulolíticos é dependente tanto, das características do substrato quanto da eficácia das enzimas. Para tanto, avaliou-se o extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium* sp. na hidrólise de casca de soja e sabugo e palha de milho sem pré-tratamentos, com a finalidade da obtenção de açúcares redutores (AR) e glicose.

A Figura 27 apresenta a influência da agitação sobre o percentual de hidrólise de casca de soja (a) e sabugo e palha de milho (b). Como pode ser observado na Figura 27, a liberação

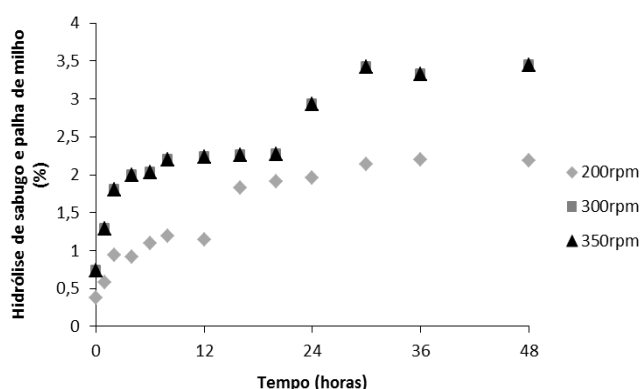
de AR aumenta linearmente até 36 h com 300 e 350 rpm e até 24 h com 200 rpm para casca de soja (Figura 27a). Para sabugo e palha de milho observa-se um aumento rápido de hidrólise na fase inicial, com posterior redução na velocidade de hidrólise e estabilização a partir de 30h independente da agitação empregada (Figura 27b). Para a casca de soja a porcentagem de hidrólise mais elevada (22%) foi obtida em 36 h de reação com 350 rpm. Para o substrato sabugo e palha de milho, o maior percentual de hidrólise (3,44%) foi obtido nas agitações de 300 e 350 rpm em 30 horas.

Segundo Martin et al. (2006), a hidrólise é necessária para a conversão de polissacarídeos da lignocelulose a açúcares fermentescíveis. Para Astolfi (2014), que testou a eficácia do extrato enzimático bruto produzido por *T.reesei* NRRL 3652 a liberação de AR aumentou rapidamente na fase inicial (0 e 24 h), utilizando como substrato casca de arroz e casca de soja. O mesmo autor observou que utilizando casca de soja como substrato a hidrólise foi de 16,8% após 120 h de reação.

Figura 27 – Percentual de hidrólise de casca de soja (a) e sabugo e palha de milho (b) em diferentes condições de agitação empregando extrato bruto lignocelulolítico de *Penicillium* sp..



(a)



(b)

Souza (2011), utilizando extrato enzimático de *Cryptococcus laurentii* visando hidrolisar bagaço de cana *in natura*, pré-tratado com 2% de H₂SO₄, durante 30 min a 150°C, observou uma conversão da celulose de aproximadamente 16%, após 72 h de hidrólise enzimática.

Conforme Teixeira (2016), a hidrólise de casca de soja, sabugo/palha de milho, casca de arroz e feno de Tifton 85 empregando celulasas e pectinases comerciais e não comerciais, os maiores percentuais de hidrólise da casca de soja com celulase comercial foram observados em temperatura de 45°C e agitação a partir de 300 rpm (47,95 %), estabilizando-se em 350 rpm. A maior hidrólise (26,05 %) de sabugo/palha de milho com celulase comercial foi observada em temperatura de 45°C e agitação de 350 rpm.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

A partir desse estudo foi possível avaliar a bioprodução de celulasas através do cultivo em estado sólido utilizando o fungo filamentoso *Penicillium* sp., isolado CLF1.

- *Penicillium* sp. (CLF1) e casca de soja obtiveram melhores resultados para produção de FPase, Xilanase, CMCase e Avicelase;
- Tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,5;
- Tempo de extração de 30 min, agitação de 125 rpm e temperatura de 50°C;
- Planejamento fatorial completo 2² permitiu maximizar a produção de enzimas lignocelulolíticas avaliadas:
 - FPase obteve-se 1,19 U/g e 0,94 U/g em 7 e 14 dias 6 log e 70%;
 - Xilanase 7 dias obteve-se 215,08U/g 6 Log e 55% e 14 dias 435,35U/g;
 - CMCase as máximas atividades foram de 16,37 U/g e 10,93 U/g em 7 e 14 dias entre 55 e 70%;
 - Avicelase com 7 dias 21,99 U/g qualquer concentração de esporos e umidade de 76% e 14 dias foi de 19,01 U/g 6 Log e umidade a partir de 70%;
- Caracterização parcial do extrato bruto determinou-se como condições de temperatura e pH ótimos em:
 - xilanase e avicelase, 50 °C e pH 5,3;
 - FPase e CMCase, 50°C e pH 4,9;
- Estabilidade térmica das enzimas, estas apresentaram respostas eficazes em diferentes faixas de temperatura e horas.
 - A xilanase se apresentou eficaz nas temperaturas de 25 e 40 °C até praticamente 100 h de reação. Uma redução da atividade residual da enzima xilanase (cerca de 50%) foi observada após 108 h de reação;
 - Em relação à avicelase foi possível verificar que a estabilidade térmica foi maior quando a temperatura de 25 °C foi empregada, tendo sido observado atividade residual de 50 % da enzima oscilou em 144 h;
 - Para a CMCase os resultados mostraram que a maior estabilidade foi obtida a 25 e 40 °C com concomitante redução de cerca de 50% na atividade após 132 e 96 h de reação, respectivamente;

- Em relação a FPase, verificou-se que nas temperaturas de 25 e 40 °C foi obtido maior estabilidade térmica e, em relação ao tempo de meia-vida, houve redução de cerca de 50% na atividade após 140 h de reação;
- Além disso, foram determinados valores para energia de desativação (KJ/mol/T°K) para xilanase, avicelase, CMCase e FPase foram de 89,1; 96,7; 78,0 e 89,3, respectivamente;
- Influência da conservação do extrato enzimático em condições de resfriamento/congelamento:
 - Em 90 dias de conservação verificou-se que a viabilidade da FPase manteve em torno de 74%;
 - A temperatura de 4° C se observou menor atividade residual para FPase, ficando em torno de 58% transcorridos 60 dias;
 - Para a xilanase observou-se uma maior estabilidade a -20°C com atividade residual de 80% em 140 dias de armazenamento;
 - A avicelase quando armazenada -20 e 4°C, apresentou atividade residual de 52,6 e 57,8%, durante 40 dias de armazenamento, respectivamente;
 - CMCase em temperatura de -20°C apresentou atividade residual de 56,1% em 60 dias de armazenamento, enquanto que a 4°C, a atividade residual foi em torno de 70% após 40 dias;
- A hidrólise enzimática com o extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium* sp. de casca de soja mais elevada (22%) foi obtida em 36 h de reação com 350 rpm

5.2 Sugestões

Apartir dos estudos apresentados nesta tese pode-se aprofundar futuras investigações no eixo tecnológico que envolva o aumento de escala e viabilidade econômica da proposta. Cientificamente pode-se aprofundar as investigações com os dados resultantes dessa tese sob os aspectos termo químicos e de cinética química clássica para compreensão dos mecanismos de reação, limitações e necessidades reacionais que permitam o controle mais otimizado do processo fermentativo envolvendo essa variedade de *Penicillium*.

Por fim é possível adotar o protocolo analítico desenvolvido nesta tese para seleção de outras cepas e materiais lignocelulósicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, 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.

AGUIAR, C. M., LUCENA, S. L. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011

ALBANO, M. **Comparação da Produção de celulasas e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. Dissertação (mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 82p. 2012.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, n.4, p.2-11, 2010.

ASTOLFI, V. **Produção de celulasas e hemicelulase por cultivo em estado sólido usando *Trichoderma reesei* NRRL 3652 em resíduos agroindustriais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 130p. 2014.

ATIF, H.; AMBER, Y.; RAJOKA, M. I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.** 94:311-319, 2004.

AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; KHOLIF, A. M.; HANFY, M. A.; ABDEL GAWAD, M. H. Optimization of culture conditions affecting fungal cellulose production. **Research Journal of Microbiology** v.7 (1):23-31, 2012.

BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Nova York: McGraw-Hill. 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.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab>, v 7, 2012.

BALSAN, G.; ASTOLFI, V.; BENAZZI, T.; MEIRELES, M. A.; MAUGERI, F.; DILUCCIO, M.; DAL PRA, V.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustrial substrates. **Bioprocess Biosyst Eng** 35:1229–1237, 2012.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th edition. APS Press, St Paul, Minnesota. Pg. 218, 1998.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56 (3–4), p.326–338, 2001.

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 industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BORTOLI, V. de; GRIEBELER, N. E.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulases e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**. v.13, p. 15-24, 2015.

BRASIL. Produção brasileira de soja se aproxima da produção dos Estados Unidos. **Disponível(online)**<http://www.agricultura.gov.br/politica-gricola/noticias/2013/08/producao-brasileira-de-soja-se-aproxima-da-producao-dos-estados-unidos>. (02 de agosto de 2015).

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.

BRITO, C. C. de Q.; FARIA, F. P. de; BATAUS, L. A. Isolamento e caracterização de celulase termoestável produzida por *Streptomyces* sp do bagaço de cana de açúcar. **Anais da 63ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 2011.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. In: Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.1, p. 365-380, 2010.

BUTT M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; TAUSEEF SULTAN, M. Xylanases in Baking Industry, **Food Technology Biotechnology** . v.46 , pag 22–31, 2008.

CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Thermal Stability and Energy of Deactivation of Free and Immobilized Cellobiase. **Brazilian Journal Chemical Engineering** vol.17 n.4-7 São Paulo Dec. 2000.

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

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da Biomassa Lignocelulósica através de Pré-Hidrólise Ácida seguida por Hidrólise Enzimática: uma Estratégia de “Desconstrução” da Fibra Vegetal. **Revista Analytica**, n. 44. 2010.

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.

CASTRO, A. M. de., PEREIRA, N. Jr. Produção, Propriedades e Aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2004.

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.

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

CUNHA, J. R. B.; SANTOS, F. C. P.; ASSIS, F. G.; LEAL, P. L. Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, p.504-597, 2016.

DAL'TOÉ, A. T. O.; FIORESE, M. L. Estudo da secagem da casca de soja para utilização com fins alimentícios. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.14, p.363-372, 2012.

DAROIT, D. J.; SILVERIA, S. T.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI, A. Production of extracellular beta-glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**. 42, 904–908, 2007.

DE OLIVEIRA, S. L. **Otimização da produção de celulases de *Melanoporia* sp. por fermentação submersa**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará. 112 p. 2014.

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.

DRISS, D.; DRISS, Z.; CHAARIL, F.; CHAABOUNI, S. E. Immobilization of His-tagged recombinant xylanase from *Penicillium occitanis* on Nickel-chelate Eupergit C for increasing digestibility of poultry feed. **Bioengineered** 5:4, 274–279, 2014.

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. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos-SP, n. 22, p. 17, 2008.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo, SP, 81p, 2008.

FAUZI, N. A.; MAKKY, E. A. Avicelase enzyme from sawdust:isolation,production and optimization. **Journal of Global Biosciences**, vol 3, 299-303, 2014.

FLORENCIO, C. **Micro-organismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, 86 p, 2011.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de micro-organismos 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.

GANZER, E.; HELM, C. V.; TAVARES, L. B. B.; NUNES, H. C. A. Produção de celulases por *Trichoderma* sp e *Ganoderma lucidum* em fermentação em estado sólido utilizando resíduo de Pupunha(*Bactris gasipaes*). 8º Mostra Integrada, Universidade de Blumenau, 2014.

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 cellulose. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S67-S73. 2012.

GOMES, E.; GUES, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. da; Enzimas termoeestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30(1), p.136-145, 2007.

GONÇALVES, D. L. Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose.69p. **Dissertação** (mestrado em biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GOMATHI, D., MUTHULAKSHMI, C., GURU KUMAR, D., RAVIKAMUR, G., KALAISELVI, M., UMA, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxi methyl cellulose. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S67-S73, 2012.

HAN, Y.; CHEN, H. Z. Synergism between corn stover protein and cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 638-645, 2007.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 425-430, 2002.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. F. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.

IPPA – International PectinProducers Association. Whats is pectin? Disponível em: <http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm>. Acesso em: 27/8/2016.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.; FELBY, C. Enzymatic Conversion of of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**. v.1, p.119-134, 2007.

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

KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Review Switchgrass for bioethanol and othervalue-added applications: A review. **Department of Biological and Agricultural Engineering**. Raleigh:North Carolina State University, p.1515–1523, 2009.

KIM, D. M.; JI CHO, E.; KIM, J. W.; LEE, Y. W.; CHUNG, H. J. Production of cellulases by *Penicillium* sp. in a solid-state fermentation of oil palm empty fruit bunch. **African Journal of Biotechnology**. v. 13, p.145-155, 2014.

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.

KULKAMI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23 (4), p.411–456, 1999.

KUMAR, N. S. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150-158, 2013.

KUO, H.; ZENG, K. ; WANG, P. H.; CHEN, W. C. A Novel Exo-Glucanase Explored from a *Meyerozyma* sp. Fungal Strain. **Advances in Enzyme Research**, v.3, p. 53-65, 2015.

LADEIRA, S. A.; CRUZ, E.; DELATORRE, A. B.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 110-115, 2015.

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

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, 2011.

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.

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

MAKKY, E. A. Avicelase production by a thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* isolated from soil using sugarcane bagasse. **World Acad Sci Eng Technol** v.57: 487–91, 2009.

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.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHIRSTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **BioresourceTechnology**, v.99, n.7, p.2373-2383, 2008.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology & Bioengineering Symposium** , v.6, pg. 21-33, 1976.

MANSUR, L. R. C. O. **Produção de avicelases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

MARJAMAA, K.; TOTH, K.; BROMANN, P. A.; SZADACS, G.; KRUUS, K. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 358-369, 2013.

MARTIN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O.; JONSSON, L. J. Adaptation of a recombinant xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1767- 1773, 2006.

MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimiomecanicamente**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) Universidade de São Paulo, 99 p., 2010.

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

MIHAJLOVSKI, K. R.; CAREVIC, M. B.; DEVIC, M. L. J.; SILER-MARINKOVIC, S.; RAJILIC-STOJANOVIC, M. D.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S. Lignocellulosic waste material as substrate for avicelase production by new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p.426 – 434,2015.

MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, 1293–1297, 2004.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignina on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewers spent grain. **Enzyme and microbial technology**. V. 43, pg 124-129, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NG, I. S.; LI, C. W.; CHAN, S. P.; CHIR, J. L.; CHEN, P. T.; TONG, C. G.; YU, S. M.; HO, T. H. 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, n. 4, p. 1310-1317, 2010.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, C.; ANTRANIKIAN, G. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 51, pg 711, 1999.

OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresource technology**, v.97, p.862-867, 2005.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases**. 81f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, 1999.

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

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

PEIXOTO, A. B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Dissertação (Mestrado), 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. de; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico**, 102. 1ª edição. EMBRAPA. ISSN 1679-6535, 2005.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

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

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 161-179, 2006.

RIOU, J. F; ANIZON, F.; MOREAU, P.; SANCELME, M.; VOLDIOIRE, A.; PRUDHOMME, M.; OLLIER, M.; SEVÈRE, D.; BAILLY, C.; FABBRO, D.; MEYER, T.; AUBERTIN, A. M. Syntheses, biochemical and biological evaluation of staurosporine analogues from the microbial metabolite rebeccamycin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, V. 6, n. 9, p. 1597-1604, 1999.

RESTLE, J.; FATURI, C.; FILHO, D. C. A.; BRONDANI, I. L.; SILVA, Da, J. H. S.; KUSS, F.; SANTOS, C. V. M. dos. ; FERREIRA, J. J. Substituição do Grão de Sorgo por Casca de Soja na Dieta de Novilhos Terminados em Confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1009-1015, 2004.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 506-511, 2006.

ROWELL, R. M.; PETTERSEN, R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. Cell Wall Chemistry. cap. 3. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. In: ROWELL R. M. New York, 2005.

SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n. 11, p.1290-1296, 2010.

NASEEB, S.; SOHAIL, M.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Production of xylanases and cellulases by *Aspergillus fumigatus* ms16 using crude lignocellulosic substrates. **Pakistan Journal of Botanical**, v. 47, n. 2, 779-784, 2015.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; BRITO, A. R.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 222-233, 2016.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, 1763–177, 2005.

SHARMA, R. K.; ARORA, D. S. Solid state degradation of paddy straw by *Phlebia floridensis* in the presence of different supplements for improving its nutritive status. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 990-996, 2011.

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.

SINGHVI, M. S.; ADSUL, M. G.; GOKHALE, D. V. Comparative production of cellulase by mutant of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6569-6572, 2011.

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, n.2, p.277- 283, 2010.

SOUZA R. L. A. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato**, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Campina Grande, 2008.

SOUZA, A. C. Utilização de Celulases de Leveduras para Produção de Bioetanol de Segunda Geração. **(Dissertação)**, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011. 90 p.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases-production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 832-844, 2005.

TATTINI JUNIOR, V., PARRA, D. F., PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 127-136, 2006.

TEIXEIRA, A. J. **Aplicação de celulasas e pectinases na hidrólise de resíduos lignocelulósicos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 145p. 2016.

TORRES, N. H.; SARTORI, S. B.; AMÉRICO, J. H. P.; FERREIRA, L. F. R. Indústria sucroalcooleira: Gestão de subprodutos- Revisão bibliográfica. **Revista de Ciencias Agro-Ambientais**, v. 10, p. 225-236, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

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.; BHAT, K. M., Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-117, 1988.

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.

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo**. 118 f. Dissertação (Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências). Universidade Estadual Paulista. Campus São José do Rio Preto/SP, 2011.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, 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.

ZHANG, Y. H. P; LYND, L. R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.88, p. 797-824, 2004.

ZHONG, Y.; WANG, X.; YU, H.; LIANG, S.; WANG, T. Application of T-DNA insertional mutagenesis for improving cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 572-577, 2012.

ZUÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; GONÇALVES, F. M. N.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Influência do meio nutricional na produção de celulasas em fermentação semi-sólida do bagaço de cana-de-açúcar por *Aspergillus niger*. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal-RN, 2009.

ZUÑIGA, U. F. R; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.912-919, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela I – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de FPase.

7 dias	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	P
Média	0,79	0,04	18,96	0,001
(1)[] esporos(L)	-0,04	0,02	-1,42	0,29
[] esporos(Q)	-0,18	0,03	-5,78	0,03
(2)Umidade (%) (L)	0,39	0,02	15,15	0,001
Umidade (%) (Q)	-0,07	0,03	-2,36	0,14
1L by 2L	-0,07	0,03	-1,87	0,20
14 dias	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	0,71	0,001	107,00	0,001
(1)[] esporos(L)	-0,05	0,001	-11,78	0,001
[] esporos(Q)	-0,19	0,001	-40,02	0,001
(2)Umidade (%) (L)	0,23	0,001	56,07	0,001
Umidade (%) (Q)	-0,08	0,001	-16,56	0,001
1L by 2L	-0,01	0,01	-2,16	0,16

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE B

Tabela II – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de xilanase.

7 dias	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	210,09	5,01	41,90	0,001
(1)[] esporos(L)	0,80	3,07	0,26	0,82
[] esporos(Q)	-26,01	3,67	-7,09	0,02
(2)Umidade (%) (L)	56,32	3,07	18,32	0,001
Umidade (%) (Q)	-54,46	3,67	-14,84	0,001
1L by 2L	6,23	4,34	1,43	0,29
14 dias	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	218,48	4,46	48,98	0,001
(1)[] esporos(L)	18,44	2,73	6,74	0,02
[] esporos(Q)	-0,89	3,26	-0,27	0,81
(2)Umidade (%) (L)	132,82	2,73	48,55	0,001
Umidade (%) (Q)	-28,10	3,26	-8,61	0,01
1L by 2L	5,01	3,86	1,30	0,32

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE C

Tabela III – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de CMCase em 7 dias.

7 dias	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	11,10	0,59	18,75	0,001
(1)[] esporos(L)	0,70	0,36	1,94	0,19
[] esporos(Q)	0,24	0,43	0,56	0,63
(2)Umidade (%) (L)	3,75	0,36	10,32	0,001
Umidade (%) (Q)	-1,90	0,43	-4,38	0,05
1L by 2L	-1,02	0,51	-1,99	0,18
14 dias	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	10,37	0,46	22,26	0,001
(1)[] esporos(L)	0,43	0,28	1,52	0,27
[] esporos(Q)	-0,35	0,34	-1,03	0,41
(2)Umidade (%) (L)	1,81	0,28	6,33	0,02
Umidade (%) (Q)	-3,14	0,34	-9,23	0,01
1L by 2L	0,01	0,40	0,02	0,98

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE D

Tabela IV – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de avicelase em 7 dias.

7 dias	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	10,90	0,14	80,02	0,001
(1)[] esporos(L)	0,16	0,08	1,88	0,20
[] esporos(Q)	1,46	0,10	14,66	0,001
(2)Umidade (%) (L)	4,91	0,08	58,92	0,001
Umidade (%) (Q)	3,29	0,10	33,04	0,001
1L by 2L	-0,03	0,12	-0,23	0,84
14 dias	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	P
Média	14,29	0,35	40,90	0,001
(1)[] esporos(L)	0,77	0,21	3,60	0,07
[] esporos(Q)	-1,96	0,25	-7,67	0,02
(2)Umidade (%) (L)	3,84	0,21	17,95	0,001
Umidade (%) (Q)	-0,14	0,25	-0,56	0,63
1L by 2L	0,51	0,30	1,70	0,23

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE E

Tabela V – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de FPase.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	3,220	0,038	85,059	0,0001
(1) Temperatura (°C) (L)	0,338	0,023	14,559	0,0046
Temperatura (°C) (Q)	-1,287	0,0278	-46,454	0,0004
(2) Agitação (rpm)(L)	0,261	0,023	11,2476	0,0078
Agitação (rpm) (Q)	-0,932	0,028	-33,654	0,0009
1L by 2L	-0,052	0,033	-1,601	0,2505

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE F

Tabela VI – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2² para atividade de avicelase.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média	25,49	0,757	33,67	0,0009
(1) Temperatura(°C)(L)	0,01	0,464	0,03	0,9760
Temperatura (°C) (Q)	-10,44	0,554	-18,85	0,0028
(2) Agitação (rpm)(L)	1,02	0,464	2,18	0,1601
Agitação (rpm) (Q)	-11,01	0,553	-19,86	0,0025
1L by 2L	0,93	0,655	1,44	0,2861

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE G

Tabela VII – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de pH e temperatura do planejamento fatorial completo 2² para atividade de xilanase e avicelase.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	P
Xilanase				
Média	444,43	10,8482	40,968	0,00059
(1)pH (L)	78,36	6,6531	11,778	0,00713
pH (Q)	-117,73	7,9389	-14,83	0,0045
(2)temperatura (°C)(L)	-42,34	6,6531	-6,364	0,02381
temperatura (Q)	-112,66	7,9389	-14,191	0,00492
Avicelase				
Média	25,0847	1,155702	21,7052	0,002116
pH (Q)	-12,0281	0,845763	-14,2215	0,004908
(2)temperatura (°C)(L)	-9,3169	0,845763	-11,0160	0,008140

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

APÊNDICE H

Tabela VIII – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de pH e temperatura do planejamento fatorial completo 2² para atividade de FPase e CMCase.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	P
FPase				
Média	2,88	0,02	142,19	0,000049
(1)pH (L)	0,38	0,01	30,80	0,001053
pH (Q)	-0,79	0,01	-53,45	0,000350
(2)temperatura (°C)(L)	-0,30	0,01	-24,47	0,001666
temperatura (Q)	-1,27	0,01	-85,31	0,000137
pH x temperatura	-0,22	0,02	-12,24	0,006604
CMCase				
Média	21,74	0,16	136,33	0,000054
(1)pH (L)	-1,51	0,10	-15,46	0,004160
pH (Q)	-5,57	0,12	-47,72	0,000439
(2)temperatura (°C)(L)	-0,72	0,10	-7,37	0,017922
temperatura (Q)	-6,39	0,12	-54,73	0,000334
pH x temperatura	0,60	0,14	4,31	0,049883

*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)