

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE  
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS.**

**Autor: Oscar Mauricio Díaz Rodriguez  
Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho  
Co-orientador: Dra. Célia Maria Araujo Galvão**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
À FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS,  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
ENGENHARIA QUÍMICA.**

**Campinas – São Paulo  
Agosto – 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -UNICAMP

D543o Díaz Rodriguez, Oscar Mauricio  
Otimização da produção de celulases a partir de  
substratos alternativos / Oscar Mauricio Díaz Rodriguez.  
--Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Rubens Maciel Filho, Célia Maria  
Araujo Galvão .

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Celulase. 2. Enzimas. 3. Fermentação em estado  
sólido. 4. Biocombustíveis. 5. Bagaço de cana. I.  
Maciel Filho Rubens. II. Galvão Araujo Célia Maria.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Optimization of cellulase production from alternative  
substrates

Palavras-chave em Inglês: Cellulase, Enzymes, Solid state fermentation,  
Biofuels, Bagasse

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Juliana Teodoro, Patricia Fazzio Martins

Data da defesa: 30-08-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por OSCAR MAURICIO DÍAZ RODRIGUEZ e aprovada em 30 de Agosto de 2011, pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof. Dr. – Rubens Maciel Filho (Orientador)



---

Dr. Juliana Teodoro (titular)



---

Prof. Dr. Patricia Fazzio Martins (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado em engenharia química defendida pelo aluno OSCAR MAURICIO DÍAZ RODRIGUEZ, e orientada pelo Prof.Dr. RUBENS MACIEL FILHO.



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Orientador)

CAMPINAS, 2011

## **DEDICO**

A Deus pela vida e porque permitiu alcançar este objetivo,

À memória de meus avós Elvia, Georgina e Alfredo, sempre presentes em minhas orações

A meus pais Jorge e Luz Mery, pela vida, amor e por me motivar sempre a alcançar grandes metas,

A meus irmãos Adriana e Jorge, pela companhia e força,

A minha amada esposa Greicy, por unir sua vida com a minha, e me permitir andar esse caminho do seu lado,

Às famílias: Rodríguez Amado, Díaz Mejia e Sarria Villa, pelo apoio e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Rubens Maciel Filho, pela orientação, ensinamentos e amizade e, especialmente, pela oportunidade.

A minha co-orientadora Célia Maria Araujo Galvão, pela orientação e ensinamentos, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

A Juliana Teodoro e Liliane Pires, pela amizade e apoio, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e ao Programa de pós-graduação em Engenharia Química, área de desenvolvimento de processos biotecnológicos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), pelo apoio para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, que permitiu a realização desse trabalho.

Aos professores da Faculdade de Engenharia Química pelos ensinamentos especialmente aos professores Everson Alves Miranda, Maria Ângela Moraes e Sônia Maria Alves Bueno.

A minha esposa Greicy, por seu amor e orações que nos momentos mais difíceis neste caminho me deram a força necessária para continuar, obrigado meu amor.

A Dra Cristiane Farinas pela ajuda.

A meus colegas e amigos do laboratório LOPCA: Leonardo, Betânia, Patrícia, Guillermo, Natalia, Laura, Sergio, Jeffrey, Arturo e Luiza.

A meus amigos da área de processos biotecnológicos da FEQ, Walter, Luana, Nemaila, Yuan, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos, Melvin, Natalia, German pela amizade, ajuda e apoio.

Aos meus amigos do CTC, Nilton, Sergio, Danilo, Veridiana, Márcia, Eduardo, Dionísio, Jose Augusto e Rafael pelos cafés e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos em Piracicaba, Rodrigo, Magda, Mariana, Adriana, Leonardo, Carol, Fausto, Eduar, Miguel, Yuliet, Pedro, Boris e Esteban, pela amizade.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de celulases, a partir de substratos alternativos, entre eles o bagaço de cana de açúcar, no processo de fermentação em estado sólido, utilizando o microrganismo *Aspergillus niger*. Na primeira etapa do trabalho foi realizada a identificação dos componentes do meio de cultura que mais favorecem o aumento da produtividade das celulases, entre eles foram avaliados: substrato (bagaço de cana *in natura* ou pré-tratado por explosão a vapor); fonte de carbono (lactose e extrato de soja) e a fonte de nitrogênio (peptona e extrato de levedura). Na segunda etapa do trabalho, a partir destas variáveis foi realizada a otimização da produção de celulases de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR). Para isso foi utilizado um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, incluindo 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central. Finalmente, utilizando a técnica de regressão linear múltipla foi realizada a modelagem matemática para produção de celulases. A produção de celulases foi determinada baseada na atividade enzimática do complexo produzido nos ensaios: celulase total (FPase); carboximetilcelulase (CMCase) e β- glucosidase. Os resultados mostraram que a máxima produção de celulases, para um período de fermentação de 4 dias foi: 0,774 UI/g.s.s de FPase; 14,41 UI/g.s.s de CMCase e 26,37 UI/g.s.s de β-glucosidase. As condições nas quais a máxima produção foi atingida foram: concentração de extrato de soja de 11 g/L; concentração de extrato de levedura de 1,5 g/L e porcentagem de umidade 80%. Esses resultados são bastante promissores levando em conta a identificação do extrato de soja como indutor da produção de celulases e do extrato de levedura, componentes que seriam de fácil e baixo custo de disponibilização no Brasil, que impactariam na redução global do custo de produção de celulases.

**Palavras Chaves:** Celulase, Enzimas, Fermentação em Estado Solido, Biocombustíveis, Bagaço de cana.

## **ABSTRACT**

The objective of this work was the optimization of cellulases production, from alternatives substrates, such as sugarcane bagasse, in a process of solid state fermentation by *Aspergillus niger*. In the first project stage was identified the main components of culture medium: substrate (sugarcane bagasse *in natura* or pretreated by steam explosion); carbon source (lactose and soybean extract) and the source of nitrogen (peptone and yeast extract). In the second stage of the work, from that variables was optimized cellulases production, according to a central composite rotational design (DCCR). It used a full factorial  $2^3$ , including six axial points and 4 replications at the central point. Finally, it using the multiple linear regression was carried out the mathematical models for cellulases production. Thus, we evaluated the influence of selected variables on the production of cellulases quantified as three types of enzymatic activity: total cellulase (FPase); carboximetilcelulase (CMCase) e  $\beta$ - glucosidase. The maximum production of cellulases was: 0,774 IU/g.d.s of FPase; 14,41 IU/g.d.s of CMCase and 26,37 IU/g.d.s of  $\beta$ - glucosidase, for a period of 4 days of fermentation. And, the conditions in which maximum production was reached were: concentration of soybean extract 11 g/L, yeast extract concentration of 1,5 g/L and 80% moisture content. These results are very promising, considering the identification of the soybean extract as a inductor of cellulases production, and the least extract, these items are purchased at a low cost in Brazil, that impact in the reduction of global cost of cellulases production.

**Keywords:** Cellulase, Enzymes, Solid State Fermentation, Biofuels, Bagasse.

# ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1 CELULASES.....	5
3.1.1 ENDOGLUCANASES .....	6
3.1.2 EXOGLUCANASES .....	7
3.1.3 <i>B-GLUCOSIDASES</i> .....	7
3.2 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES.....	7
3.3 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS .....	8
3.4 PROCESSO FERMENTATIVO.....	10
3.4.1 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO .....	14
3.5. REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA. ....	20
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 MICRO-ORGANISMO .....	24
4.1.1 CRESCIMENTO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO .....	25
4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA .....	25
4.2.1 SUBSTRATOS: BAGAÇO <i>in natura</i> E BAGACO PRÉ-TRATADO .....	25
4.2.2 SOLUÇÃO DE SAIS.....	26
4.2.3 FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO .....	27
4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SEMI-SÓLIDO.....	27
4.4 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO SEMI- SÓLIDA.....	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS CALDOS ENZIMÁTICOS .....	30
4.5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART) .....	30
4.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA (FPase).....	31
4.5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CARBOXIMETILCELULASE (CMCase).....	32
4.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA <i>B-GLUCOSIDASE</i> .....	33
4.5.4.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE GLICOSE .....	33
4.5.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PELO MÉTODO GOD-PAP.....	33

4.5.4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE <i>B-GLUCOSIDASE</i> .....	34
4.5.5 CALCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	34
4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL – DCCR (2 <sup>3</sup> + 6 Pontos Axiais + 4 Pontos Centrais).....	35
4.7. MODELAGEM MATEMATICA.....	37
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1 DEFINIÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO.....	38
5.1.1 AVALIAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA <i>in natura</i> E PRÉ-TRATADO.....	38
5.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE CARBONO ADICIONAL E DA CONCENTRAÇÃO. ....	42
5.1.3 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	44
5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR <i>Aspergillus niger</i> EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA. ....	45
5.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE CELULASES .....	62
5.3.1 MODELO PARA ATIVIDADE DA CELULASE TOTAL (FPase).....	62
5.3.2 MODELO PARA ATIVIDADE DA CARBOXIMETILCELULASE (CMCase) .....	64
5.3.3 MODELO PARA ATIVIDADE DA B- GLUCOSIDASE.....	65
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual de diferentes resíduos agroindustriais.....	9
Tabela 2. Características típicas de fermentações submersa e em estado sólido.....	12
Tabela 3. Bioreatores utilizados nos processos de fermentação em estado sólido.....	13
Tabela 4. Materiais lignocelulósicos frequentemente utilizados como substrato na produção de celulasas.....	14
Tabela 5. Atividades $\beta$ -glucosidase e endoglucanase detectadas em enzimas produzidas por diferentes fungos mediante fermentação semi-sólida utilizando-se materiais lignocelulósicos no meio de cultivo.....	15
Tabela 6. Atividade FPAsa detectada em enzimas produzidas por diferentes fungos mediante fermentação semi-sólida utilizando-se materiais lignocelulósicos no meio de cultivo.....	16
Tabela 7. Condições cultivo de fungos para produção de celulasas utilizando substratos lignocelulósicos em fermentação sólida.....	18
Tabela 8. Meios de cultivo para produção de celulasas utilizando substratos lignocelulósicos em fermentações semi-sólidas por <i>Aspergillus</i> .....	19
Tabela 9. Condições de cultivo para produção de celulasas utilizando substratos lignocelulósicos em fermentações semi-sólidas por <i>Aspergillus niger</i> .....	20
Tabela 10. Composição dos bagaços de cana <i>in natura</i> e pré-tratados.....	26
Tabela 11. Composição da solução de sais minerais sugerida por MANDELS & REESE (1957).....	27
Tabela 12. Ensaio de fermentação sólida para produção de celulasas em meios de cultivo suplementados com solução de sais de Mandels.....	28
Tabela 13. Matriz codificada do planejamento delineamento central composto rotacional (DCCR); $2^3$ 6 pontos axiais+ 4 pontos centrais.....	36
Tabela 14. Faixa de valores estudados no planejamento delineamento central composto rotacional (DCCR); $2^3$ 6 pontos axiais+ 4 pontos centrais.....	37
Tabela 15. Limites definidos para as variáveis a serem investigadas no planejamento experimental (DCCR) da produção de celulasas para análise de efeitos.....	46
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA)- FPase- Tempo de Fermentação: 4 dias.....	50
Tabela 17. Análise de variância para a atividade celulolítica CMCase.....	53
Tabela 18. Análise de variância para a atividade enzimática celulolítica $\beta$ -glucosidase.....	57
Tabela 19. Resultados obtidos na validação para as atividades FPase, CMCase e $\beta$ -glucosidase.....	60

Tabela 21. Estimativas dos coeficientes da regressão e os respectivos erros padrão da atividade enzimática total FPAse. ....	63
Tabela 22. Análise de variância para o modelo da atividade enzimática total FPAse. ....	63
Tabela 23. Estimativas dos coeficientes da regressão e os respectivos erros padrão- Atividade enzimática Carboximetilcelulase (CMCase). ....	64
Tabela 24. Análise de variância para o modelo da atividade enzimática carboximetilcelulase (CMCase). ....	64
Tabela 25. Estimativas dos coeficientes da regressão e os respectivos erros padrão da atividade enzimática $\beta$ - glucosidase. ....	65
Tabela 26. Análise de variância para o modelo da atividade enzimática total $\beta$ - glucosidase. ....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo <i>in vitro</i> (A) e Microcultura (B) uma cepa nativa isolada do fungo <i>Aspergillus niger</i> ..	24
Figura 2. Partículas de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> com dimensão na faixa entre 0,5 e 1 mm. .....	25
Figura 3. Caldos enzimáticos produzidos por fermentação semi-sólida.....	29
Figura 4. (a) Atividade FPPase para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio em 14 dias de cultivo e (b) resultado do crescimento do fungo na melhor condição de cultivo ensaiada (bagaço <i>in natura</i> + extrato de soja).38	
Figura 5. Atividade enzimática do extrato produzido utilizando como substrato bagaço pré-tratado (Severidade Alta), em diferentes condições, comparado com bagaço <i>in natura</i> .....	40
Figura 6. (a) Resultados de atividade FPase em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio e extrato de soja como fonte de carbono, e (b) resultado do crescimento do fungo cultivado com bagaço pré-tratado. ....	41
Figura 7. Resultados de atividade FPase avaliando como fonte de carbono: extrato de soja; lactose e a mistura (1:1), em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio. ....	42
Figura 8. Resultados de atividade FPase avaliando extrato de soja como fonte de carbono em três concentrações (g/L): 5; 10 e 20; em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio..	43
Figura 9. Resultados de atividade FPase em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando bagaço <i>in natura</i> como substrato e extrato de soja como fonte de carbono.....	44
Figura 10. Atividade enzimática FPase, para os experimentos realizados no DCCR, em função do tempo de fermentação. ....	46
Figura 11. Atividade enzimática CMCase, para os experimentos realizados no DCCR, em função do tempo de fermentação. ....	47
Figura 12. Atividade enzimática $\beta$ -glucosidase, para os experimentos realizados no DCCR, em função do tempo de fermentação. ....	48
Figura 13. Atividade enzimática FPase, para os experimentos realizados no DCCR. Tempo de fermentação: 4 dias.....	49
Figura 14. Análise dos efeitos nos resultados de atividade FPase dos ensaios realizados no planejamento experimental em 4 dias de reação.....	49
Figura 15. Atividade enzimática CMCase, para os experimentos realizados no DCCR. ....	52

Tempo de fermentação: 4 dias. ....	52
Figura 16. Análise dos efeitos nos resultados de atividade CMCase dos ensaios realizados no planejamento experimental em 4 dias de reação.....	53
Figura 17. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da carboximetilcelulase (CMCase) em função do teor de umidade e da concentração do extrato de soja, com a concentração do extrato de levedura fixada no ponto central. ....	54
Figura 18. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da carboximetilcelulase (CMCase) em função do teor de umidade e da concentração do extrato de levedura, com a concentração do extrato de soja fixada no ponto central. ....	54
Figura 19. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade carboximetilcelulase (CMCase) em função da concentração do extrato de levedura e da concentração do extrato de soja, com o teor de umidade fixado no ponto central. ....	55
Figura 20. Atividade enzimática $\beta$ -glucosidase, para os experimentos realizados no DCCR. Tempo de fermentação: 4 dias.....	55
Figura 21. Análise dos efeitos nos resultados de atividade $\beta$ -glucosidase dos ensaios realizados no planejamento experimental em 4 dias de reação.....	56
Figura 22. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da $\beta$ - glucosidase em função da %Umidade e da concentração do extrato de soja, com a concentração do extrato de levedura fixada no ponto central. ....	57
Figura 23. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da $\beta$ - glucosidase em função da %Umidade e da concentração do extrato de levedura, com a concentração do extrato de soja fixada no ponto central.....	58
Figura 24. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da $\beta$ - glucosidase em função da concentração do extrato de levedura e da concentração do extrato de soja, com o teor de umidade fixada no ponto central.....	58

## 1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural) têm sido por centenas de anos a principal forma de energia utilizada na indústria, nos transportes e também no uso doméstico. Esta situação foi originada principalmente pelo preço acessível desses combustíveis, pela facilidade de utilização e pela aparente inesgotabilidade de tais recursos ao longo dos anos. Hoje, sabe-se que esta situação era ilusória e que durante anos o consumo foi gradualmente crescendo com pouca atenção pela procura de energias alternativas, dilapidando-se perigosamente as reservas disponíveis e provocando-se danos ambientais muito dificilmente recuperáveis.

Paralelamente, a demanda mundial por combustíveis tem crescido de forma exponencial, sobretudo nos países que são grandes consumidores de energia, deste modo, tem suscitado uma incessante busca por fontes alternativas e renováveis que permitam suprir esta necessidade de forma ambientalmente amigável.

Neste contexto, a produção de combustíveis a partir de materiais lignocelulósicos surge como uma opção bastante atraente, sobretudo no cenário nacional, uma vez que os resíduos agroindustriais como, por exemplo, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, são abundantemente disponíveis no atual sistema produtivo de açúcar e etanol no Brasil.

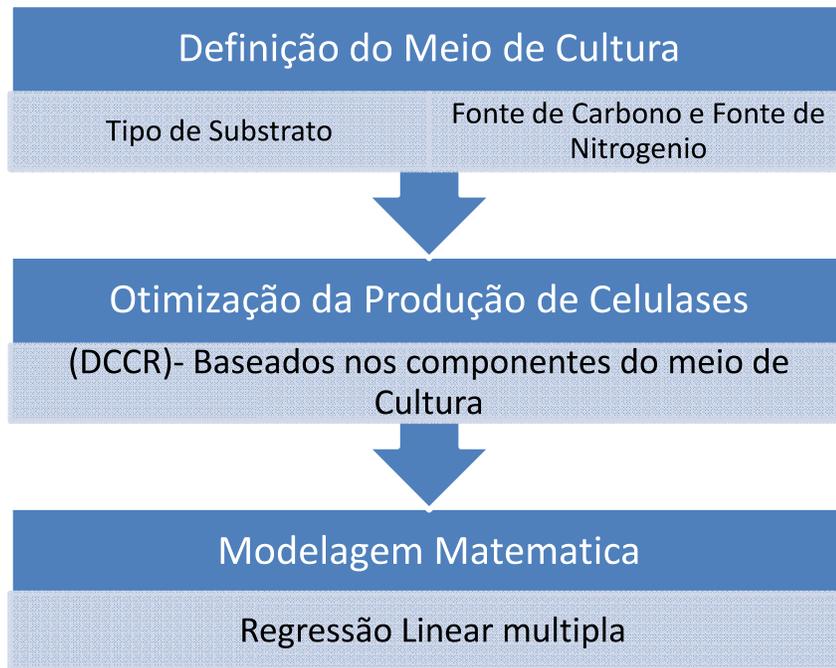
Dentre os biocombustíveis mais amplamente estudados nos últimos anos destaca-se de forma imperativa o bioetanol. A produção de bioetanol com base em biomassas lignocelulósicas pode lançar mão de processos químicos ou bioquímicos para converter a celulose em açúcares fermentescíveis. Os processos químicos têm a vantagem de envolver uma tecnologia mais madura, embora apresente desvantagens como ser muito rápidos e de difícil controle para evitar possível degradação dos açúcares e formação de inibidores. Nos processos bioquímicos, a conversão das frações de interesse, celulose/hemicelulose, em açúcares é catalisada por enzimas. A tecnologia de hidrólise enzimática apresenta grande potencial em virtude de características como elevada especificidade da reação, ausência de reações secundárias, ausência de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e operação em condições suaves de temperatura e pressão (CGEE, 2005).

Os biocatalisadores utilizados no processo hidrolítico são, na verdade, enzimas altamente específicas chamadas de celulasas. Trata-se de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulasas: *endoglucanases*, que clivam randomicamente as ligações internas da região amorfa, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres; *exoglucanases*, subdivididas em

celobiohidrolases (CBHs), que são responsáveis pela hidrólise dos terminais redutores (CBHs do tipo I) e não redutores (CBHs do tipo II), e glucanohidrolases (GHs), que são capazes de liberar moléculas de glicose diretamente dos terminais do polímero; e  $\beta$ -glucosidases, que hidrolisam a celobiose e os oligossacarídeos solúveis de baixo grau de polimerização (menor que 7) a glicose. Uma importante característica das enzimas do complexo celulásico é a forte inibição que essas moléculas sofrem pelo produto (glicose) da reação que catalisam (ARANTES & SADDLER, 2010).

Um dos fatores que mais diretamente impacta na viabilidade econômica do processo de produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas mediante hidrólise enzimática é o alto custo dos biocatalisadores (enzimas), que pode representar até 18% do custo operacional de uma planta (WINGREN *et al.*, 2003; CASTRO & PEREIRA, 2010). Os grandes produtores mundiais de enzimas estão localizados principalmente na Europa, Estados Unidos e Japão (DEMAIN, 2000), sendo o Brasil um país majoritariamente importador deste insumo.

Com base no exposto até o momento, torna-se clara a necessidade de se investir esforços no sentido de aprimorar ou desenvolver novas tecnologias para produzir enzimas (celulases) ou complexos enzimáticos adequados ao processo de produção de bioetanol, utilizando-se, principalmente, recursos de baixo custo e de ampla disponibilidade em território nacional. Deste modo, objetivou-se neste trabalho estudar a produção de celulases por *Aspergillus niger* mediante fermentação em estado sólido, avaliando-se a influência de variáveis como, por exemplo, o tipo de substrato (bagaço de cana *in natura* e pré-tratado), a fonte de carbono (extrato de soja e lactose), a fonte de nitrogênio (peptona e extrato de levedura), a umidade do meio de cultivo e o tempo de fermentação. Assim, foram consideradas basicamente três etapas para a realização deste trabalho, como é mostrado na Figura 1: identificação dos componentes do meio de cultura alternativo; a otimização da produção de celulases, e finalmente a modelagem matemática da produção de celulases, nas condições estudadas.



**Figura 1.** Etapas de desenvolvimento do projeto.

Os resultados deste projeto fazem um aporte bastante importante ao avanço na tecnologia de produção de celulases e na redução de custos da produção de etanol de segunda geração. Uma vez que foi identificado um meio de cultura alternativo, utilizando bagaço *in natura* como substrato ajudando na viabilidade desta tecnologia. Além, especial interesse gera o extrato de soja e sua função como indutor na produção de celulases, uma vez que é um composto de ampla disponibilidade y baixo custo no Brasil o que permitiria reduzir o custo das celulases.

A estrutura da dissertação apresenta basicamente: no capítulo 1, a introdução do trabalho, onde é definida a importância e justificativa da realização da pesquisa. No capítulo 2, são mostrados os objetivos gerais e específicos do trabalho. No capítulo 3, é apresentada a revisão de literatura, com os conceitos básicos de produção de celulases, fermentação em estado sólido e as condições que tem sido utilizadas por outros autores para produção de celulases utilizando como substratos no meio de cultura resíduos agroindustriais. No capítulo 4, é feita a descrição dos materiais e métodos, tais como metodologia da produção de celulases, extração das enzimas, determinação da atividade enzimática, além da modelagem e análise dos dados. No capítulo 5, são mostrados os resultados e a discussão deles, no capítulo 6 e 7, são mostradas as conclusões obtidas dos trabalhos e sugestões para trabalhos futuros, respectivamente. Finalmente no capítulo 8 são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas neste trabalho em cada uma das etapas de desenvolvimento.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em estudar o processo de produção de celulasas pelo micro-organismo *Aspergillus niger* mediante fermentação em estado sólido, utilizando-se uma fonte alternativa de substrato com vistas à redução do custo global de produção da enzima.

A partir do objetivo geral, foram definidos os objetivos específicos citados a seguir:

- Definição de um meio de cultura baseado em substratos alternativos (bagaço de cana *in natura* ou pré-tratado), fonte de carbono (extrato de soja e/ou lactose) e fonte de nitrogênio (peptona e/ou extrato de levedura) que favoreça a produção de celulasas (enzimas de interesse);
- Avaliação das variáveis *umidade* do meio e *tempo de fermentação*;
- Determinação das condições de cultivo que maximizam a produção de celulase mediante a técnica de planejamento experimental (DCCR 2<sup>3</sup> com 6 pontos axiais);
- Determinação de modelo matemático para representação dos dados experimentais.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CELULASES

Durante a Segunda Guerra Mundial, militares americanos em acampamentos de guerra observaram que materiais fabricados de algodão eram surpreendentemente degradados. Este é, possivelmente, o primeiro relato da ação de enzimas celulolíticas e foi o ponto inicial para o estabelecimento de parcerias entre as forças armadas americanas e algumas organizações com vistas à elucidação dos fatos observados. Nesta época, o Dr. Elwyn T. Reese identificou como resultado de uma das suas pesquisas o fungo filamentosso *Trichoderma viride*, que tinha a capacidade de excretar enzimas capazes de degradar celulose. Desde então, significativos avanços têm sido observados nesta área como fruto dos esforços de diferentes organismos, universidades e empresas espalhadas pelo mundo, tais como: USDOE (United States Department of Energy), NREL (National Renewable Energy Laboratory), Novozymes (líder mundial do mercado de enzimas) e Genencor (atualmente uma divisão da empresa Danisco). Os esforços de todas essas instituições têm resultado em uma redução no custo final dessas enzimas (celulases) da ordem de 12 vezes, o que é extremamente significativo e aponta na direção da viabilidade econômica de processos que usam esses insumos em sua cadeia como, por exemplo, a produção de bioetanol (CASTRO & PEREIRA, 2010).

Atualmente as celulases apresentam uma grande gama de aplicações, tais como indústria de alimentos, bebidas, têxtil, papel e etc. No entanto, sua primeira aplicação industrial foi como aditivo para ração animal. Este procedimento visava o aumento da digestibilidade do alimento no rúmen de bovinos. Mais recentemente, as celulases têm despertado grande interesse na indústria dos biocombustíveis, uma vez que esses biocatalisadores podem ser utilizados no processo de conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis que, posteriormente podem ser transformados em bioetanol (KUBICEK *et al.*, 1993; TOLAN & FODDY, 1999; BHAT, 2000).

As celulases representam em torno de 20% do mercado mundial de enzimas, ocupando a terceira posição do ranking dos negócios nesta área (SINGHANIA *et al.*, 2010). No cenário nacional, considerando-se importações e exportações no ano de 2008, as celulases movimentaram USD 1,35 milhões (CASTRO & PEREIRA, 2010).

As celulases são enzimas altamente específicas formadas por um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulases: *endoglucanases*, que clivam randomicamente as ligações internas da região amorfa da celulose, liberando oligossacarídeos com terminações redutoras e não redutoras livres; *exoglucanases*, subdivididas em

celobiohidrolases (CBHs), que são responsáveis pela hidrólise dos terminais redutores (CBHs do tipo I) e não redutores (CBHs do tipo II), e glucanohidrolases (GHs), que são capazes de liberar moléculas de glicose diretamente dos terminais do polímero; e  $\beta$ -glucosidases, que hidrolisam a celobiose e os oligossacarídeos solúveis de baixo grau de polimerização (menor que 7) a glicose. Uma importante característica das enzimas do complexo celulásico é a forte inibição que essas moléculas sofrem pelo produto (glicose) da reação que catalisam (ARANTES & SADDLER, 2010). Além disso, deve-se ressaltar que a ação sinérgica das enzimas celulolíticas resulta em um processo muito mais eficiente que aquele observado quando as enzimas que constituem o complexo enzimático em questão operam individualmente (LI *et al.*, 2006).

De acordo com o sistema de nomenclatura e classificação das enzimas, adotado por acordo internacional (Enzyme Commission, EC), cada enzima recebe um número classificatório (EC) composto por quatro dígitos separados por pontos. O primeiro dígito indica uma das seis classes nas quais as enzimas estão divididas, de acordo com a reação que catalisam: 1- *Oxidoreductases* (reações de óxido-redução), 2- *Transferases* (reações de transferências de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxidoreductases ou pelas hidrolases), 3- *Hidrolases* (reações de hidrólise, nas quais a água é o receptor dos grupos transferidos), 4- *Liases* (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou rompendo ligações duplas), 5- *Isomerases* (reações de isomerização) e 6- *Ligases* (catálise de ligações de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP). O segundo e o terceiro dígitos indicam a subclasse e a sub-subclasse, respectivamente. Nas oxidoreductases, por exemplo, a subclasse indica a natureza do grupo sobre o qual as enzimas atuam (álcool, aldeído, cetona, etc) e a sub-subclasse indica o tipo de receptor envolvido (citocromo, oxigênio, etc) (TARDIOLI, 2003).

### 3.1.1 ENDOGLUCANASES

As endoglucanases são classificadas como EC 3.2.1.4, possuem o nome sistêmico de 1,4- $\beta$ -D-glucana-4-glucanohidrolases, embora também sejam referenciadas na literatura como endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases,  $\beta$ -1,4-glucanases, dentre outras. São as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e hidrolisam aleatoriamente as regiões amorfas internas da cadeia de celulose, produzindo oligossacarídeos de tamanhos variados (BOISSET *et al.*, 2000). As endoglucanases são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (LYND *et al.*, 2002).

### 3.1.2 EXOGLUCANASES

As exoglucanases são constituídas pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). As CBHs (EC 3.2.1.9.1) possuem o nome sistemático 1,4- $\beta$ -D-glucano-celobiohidrolases, mas também são relatadas na literatura como exo-celobiohidrolases,  $\beta$ -1,4-glucana celobiohidrolases, entre outras. As exoglucanases clivam gradualmente as extremidades da celulose liberando moléculas de celobiose, que funcionam como agente inibitório das CBHs (GARZON, 2009). As GHs (EC 3.2.1.7.4) possuem o nome sistemático de 1,4- $\beta$ -D-glucana-glucanohidrolases, mas também podem ser referenciadas como exo-1,4- $\beta$ -glucanases, entre outras.

### 3.1.3 B-GLUCOSIDASES

As  $\beta$ -glucosidases possuem o nome sistemático de  $\beta$ -glicosídeo-glucohidrolases (EC 3.2.1.21) e têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002; LYND & ZHANG, 2002), de modo a reduzir seu forte efeito inibitório para as exoglucanases (GARZON, 2009).

## 3.2 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

Algumas bactérias e alguns fungos são sabidamente micro-organismos que têm a capacidade de produzir enzimas celulolíticas. Dentre eles, aqueles mais amplamente utilizados para produção de celulases são *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, bactérias do gênero *Clostridium* e etc. Alguns sistemas enzimáticos produzidos por fungos não apresentam a habilidade de degradar celulose cristalina por conter um só tipo de enzima, como endo ou exo-glucanases, e não o complexo enzimático requerido para tal fim (OSMUNDSVAG & GOKSØYR, 1975).

Dentre as espécies supramencionadas, o fungo *Trichoderma reesei* produz um complexo enzimático com quantidade de  $\beta$ -glucosidase reduzida, o que é uma desvantagem para o processo de hidrólise enzimática da celulose. Por outro lado, fungos como o *Penicillium echinulatum* produzem celulases com elevada atividade  $\beta$ -glucosidase, o que promove redução considerável da concentração de celobiose no meio reacional e favorece o processo global (MARTINS *et al.*, 2008). No caso do *Aspergillus niger*, a produtividade de  $\beta$ -

glucosidases é maior que a reportada na literatura para fungos do gênero *Trichoderma*. A produção de celulases e as atividades das enzimas produzidas dependem das condições de fermentação, do meio de cultura utilizado e/ou da presença de substâncias indutoras no meio, entre outros fatores (FARINAS *et al.*, 2008).

### 3.3 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

A celulose é o biopolímero natural mais abundante no mundo e uma fonte potencial de insumos para a indústria, seja para a produção de combustíveis, produtos químicos e etc (MUTHUVELAYUDHAM & VIRUTHAGIRI, 2006). Dentre as matérias-primas lignocelulósicas, os resíduos agroindustriais se destacam principalmente pelo fato de serem produzidos em larga escala no território nacional.

Mundialmente, a produção de resíduos lignocelulósicos é significativa. São produzidos, por exemplo, cerca de  $2,9 \times 10^3$  milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos que estão disponíveis a partir dos cultivos de cereais e  $3,0 \times 10^3$  milhões de toneladas a partir de cultivos de oleaginosas (SINGHANIA *et al.*, 2010). Na safra 2008/2009, o bagaço de cana-de-açúcar contou com uma produção em torno de 142 milhões de toneladas, produto do processamento de 570 milhões de toneladas de cana produzidas no Brasil. Tendo em mente o especial interesse na produção de biocombustíveis, esse bagaço poderia aumentar significativamente a produção do bioetanol que alcançou aproximadamente 27 bilhões de litros na safra 2008/2009 (UNICA, 2011). Esta biomassa poderia, portanto, ser considerada como uma matéria-prima adequada e de baixo custo para a produção de bioetanol e outros produtos químicos no futuro (PALONEN *et al.*, 2004).

As biomassas lignocelulósicas são constituídas principalmente por três frações poliméricas: 30-45% de celulose; 25-30 % de hemicelulose e 25-30 % de lignina, que se encontram unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (CASTRO & PEREIRA, 2010; GARZON, 2009). A composição dos diferentes materiais lignocelulósicos disponíveis varia significativamente de um material para outro, como pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição percentual de diferentes resíduos agroindustriais.

<b>Componente</b>	<b>Bagaço de Cana(%)</b>	<b>Bagaço de laranja(%)</b>	<b>Bagaço de soja(%)</b>	<b>Casca de arroz(%)</b>
Celulose	36	16	3	36
Hemicelulose	28	14	4	20
Lignina	20	1	3	19
Cinzas	5	2	5	20
Proteínas	4	8	43	3

Fonte: FARINAS *et al.*, 2008.

Relatos da literatura demonstram que enzimas produzidas usando como substrato a mesma biomassa que será utilizada para bioconversão em diferentes produtos são mais eficientes do que aquelas produzidas utilizando-se um substrato celulósico diferente (SINGHANIA *et al.*, 2010). Por esta razão, as pesquisas com diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, tais como bagaço de cana, bagaço de laranja, bagaço de soja, casca de arroz, palha de trigo, entre outras, para produção de celulases têm crescido de forma bastante acelerada. A utilização dessas biomassas lignocelulósicas no processo de produção de enzimas, como fonte alternativa de substrato, auxilia na diminuição dos custos de produção dos complexos enzimáticos, contribuindo para a viabilidade econômica da produção de bioetanol de segunda geração (CAMASSOLA & DILLON, 2007).

No entanto, a utilização direta dos materiais lignocelulósicos é bastante difícil dada a significativa recalcitrância que tais materiais apresentam. Entende-se por recalcitrância a estrutura reforçada em vários níveis, incluindo cutículas rígidas, estruturas cristalinas em arranjos milimetricamente precisos e fortes ligações químicas entre as moléculas que compõem da biomassa. Esta estrutura rígida atua no sentido de resistir aos ataques de micróbios e às mordidas de animais, mas neste novo cenário de aplicações, também dificulta sobremaneira sua utilização e aproveitamento de seu potencial. Assim, faz-se necessário proceder com um pré-tratamento da biomassa de modo a aumentar a susceptibilidade ao agente de interesse e melhorar a sua utilização (XIA & CEN, 1999; MOSIER *et al.*, 2005).

Os pré-tratamentos aos quais as biomassas são geralmente submetidas podem ser classificados em químicos, físicos ou biológicos, sendo os mais tipicamente aplicados nos materiais lignocelulósicos para produção de celulases o tratamento com vapor (steam explosion), na presença ou ausência de catalisadores ácidos ou alcalinos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH)

e/ou uma combinação desses (RAMOS, 2003). Por outro lado, um pré-tratamento muito agressivo pode reduzir a produção de enzimas (AIELLO *et al.*, 1996).

CAMASSOLA & DILLON, 2007, relatam que a utilização de bagaço pré-tratado (com NaOH, a 120°C durante 20 min) na produção de celulasas a partir de *Penicillium echinulatum* permite que a enzima produzida expresse diferentes tipos de atividade como, por exemplo, 1 UI/g de atividade FPase, aproximadamente 3 UI/g.m.s de atividade CMCase e 25 UI/g.m.s de atividade  $\beta$ -glucosidase. Quando o bagaço pré-tratado foi misturado com farelo de trigo os valores de atividade enzimática aumentaram significativamente, atingindo-se 32,89 UI/g.m.s de atividade FPase; 58,95 UI/g.m.s de atividade CMCase e 282,36 UI/g.m.s de atividade  $\beta$ -glucosidase.

### 3.4 PROCESSO FERMENTATIVO

O método clássico para se produzir celulasas é mediante fermentação submersa ou fermentação em meio líquido. No entanto, nos últimos anos tem-se despertado grande interesse pela realização de fermentações em meio sólido ou semi-sólido, em função de resultados altamente promissores que vêm sendo obtidos pelos mais diversos grupos de pesquisa desta área, no que diz respeito à alta eficiência do referido processo, baixo capital de investimento e baixo custo operacional (SINGHANIA *et al.*, 2004; SUKUMARAN *et al.*, 2009). Além disso, estima-se que a produção de celulasas via fermentação em estado sólido permita reduzir os custos de produção em 10 vezes quando comparada à fermentação submersa, uma vez que a concentração final da enzima produzida por esta rota é maior, o que também reduz custos com o processo de *downstream* (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A fermentação em estado sólido é o processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos contendo umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo sem água livre. Para este fim, os resíduos agrícolas têm se mostrado adequados e de custo altamente competitivo, podendo ser utilizados como substrato neste tipo de fermentação (RAIMBAULT, 1998).

A fermentação em estado sólido é influenciada por variáveis importantes que determinam o sucesso do processo fermentativo, a saber: umidade inicial do substrato, pH do meio, temperatura de incubação, taxa de aeração, etc (DESCHAMPS *et al.*, 1985). Devido à complexidade do processo, em função da heterogeneidade dos substratos sólidos utilizados, aspectos como transferência de oxigênio, massa e energia são bastante importantes e

limitantes, pois impactam diretamente no crescimento do micro-organismo e, conseqüentemente, na produção das enzimas (CAMASSOLA & DILLON, 2007). Na Tabela 2 está apresentada uma comparação das características típicas de fermentações submersa e em estado sólido.

Diferentes micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos, têm a capacidade de crescer em substratos sólidos; entre eles os fungos filamentosos são os que melhor se adaptam à fermentação semi-sólida (SSF) devido às suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Um exemplo dessas propriedades é o crescimento das hifas que no caso dos fungos filamentosos facilitam a utilização de nutrientes e colonização dos substratos (RAIMBAULT, 1998).

As primeiras aplicações da fermentação em estado sólido (SSF) visaram principalmente à produção de alimentos, enzimas hidrolíticas, ácidos orgânicos e biopesticidas, embora nos últimos anos tenham sido realizados trabalhos de pesquisa ampliando as aplicações em indústrias farmacêuticas e de alimentos, tentando ser uma alternativa à fermentação submersa para vários produtos (RAIMBAULT, 1998).

**Tabela 2.** Características típicas de fermentações submersa e em estado sólido.

<b>Fator</b>	<b>Fermentação Submersa</b>	<b>Fermentação em Estado Sólido</b>
Substrato	Substratos solúveis (açúcares)	Substratos insolúveis: amido, celulose, pectinas, lignina
Assepsia	Esterilização e controle asséptico	Tratamento com vapor; condição não estéril
Água	Grandes volumes de água consumida e efluentes descartados	Limitado consumo de água; não geração de efluentes.
Calor Metabólico	Fácil controle de temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor
Aeração	Limitação pelo oxigênio dissolvido; necessidade de altos níveis de aeração	Fácil aeração e alta superfície de troca ar/substrato
Controle pH	Fácil controle de pH	Substratos sólidos tamponantes
Agitação Mecânica	Boa homogeneização do meio	Condição estática
Escalonamento	Equipamento industrial disponível	Novos projetos de equipamentos
Inoculação	Fácil inoculação Processo contínuo	Inoculação com esporos Processo batelada
Análise Energética	Alto consumo de energia	Baixo consumo de energia
Volume dos equipamentos	Equipamentos grandes	Equipamentos pequenos
Efluentes	Grandes volumes	Não gera efluentes

Fonte: Modificado de Raimbault, 1998.

Na Tabela 3, apresenta-se uma lista dos bioreatores utilizados em fermentação sólida e sua classificação.

**Tabela 3.** Bioreatores utilizados nos processos de fermentação em estado sólido.

<b>Grupo de Bioreatores</b>	<b>Características</b>
Batelada I (Sem aeração e sem mistura)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adequado para produção de produtos em pequenas quantidades. Reatores em bandejas e sacos</li> </ul>
Batelada II (Com aeração forçada e sem mistura)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizado em cultivos onde a mistura pode prejudicar o crescimento do micro-organismo;</li> <li>• Reator em leito empacotado, em colunas ou bandejas com dispositivos para a entrada e fluxo de ar</li> </ul>
Batelada III (Tambor rotatório e tambor agitado)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boa homogeneização e aeração; podem operar em sistema contínuo</li> </ul>
Batelada IVa (Mistura contínua e aeração forçada)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitação mecânica e dispositivos de aeração forçada</li> <li>• Utilizados em cultivos com bactérias</li> </ul>
Batelada IVb (Mistura intermitente e aeração forçada)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizado em condições nas quais o micro-organismo não tolera a mistura contínua, mas mistura intermitente em períodos de tempo curtos não o afeta negativamente</li> <li>• Evita quedas de pressão devido à altura do leito, boa distribuição de água e nutrientes</li> </ul>
Reatores em operação contínua	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Têm-se vários tipos: Tanque agitado, tambor rotatório; e com parafuso e correia transportadora. São equipamentos menores do que os reatores a batelada</li> <li>• Permite a redução do investimento nas operações <i>upstream</i> e <i>downstream</i>, mas requer maior investimento no reator</li> <li>• Produtos mais homogêneos que os obtidos em batelada</li> </ul>

Fonte: Mitchell et al., 2006.

### 3.4.1 MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

A composição dos meios de cultivo é sempre uma etapa que requer bastante critério na seleção dos componentes por razões que variam desde sua aplicabilidade ao processo em questão até o custo envolvido na sua aquisição e preparação para adequação ao processo. Alguns desses processos de adequação são, por exemplo:

- Redução de tamanho, que pode ser realizada utilizando-se moinhos, raspadores, facas, etc; e
- Hidrólise química ou enzimática, visando aumentar a acessibilidade do substrato ao micro-organismo.

Nesta incessante busca por substratos alternativos apropriados e de baixo custo para produção de enzimas, os materiais lignocelulósicos, na maioria dos casos resíduos agroindustriais, têm surgido como uma das opções mais atraentes. Na Tabela 4, apresentada a seguir está mostrada uma lista dos materiais lignocelulósicos mais amplamente utilizados na produção de celulasas.

**Tabela 4.** Materiais lignocelulósicos frequentemente utilizados como substrato na produção de celulasas.

<b>Material</b>	<b>Referência</b>
Palha de Trigo; Farelo de Trigo (Mistura)	DESCHAMPS <i>et al.</i> , 1985
Farelo de Trigo	CAMASSOLA & DILLON, 2007 SUKUMARAN <i>et al.</i> , 2009 XIA & CEN, 1999
Bagaço de Cana	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
Casca de Soja	BRIJWANI <i>et al.</i> , 2010 FARINAS <i>et al.</i> , 2008
Bagaço de Cana Pré-tratado; Farelo de trigo	CAMASSOLA & DILLON, 2007
Palha de Arroz	PICART <i>et al.</i> , 2007
Palha de Trigo	HAN <i>et al.</i> , 2009
Polpa de beterraba	OLSSON <i>et al.</i> , 2003
Bagaço de laranja	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
Casca de arroz	FARINAS <i>et al.</i> , 2008 HAN <i>et al.</i> , 2009

Na literatura há inúmeros relatos da utilização de materiais lignocelulósicos como substrato de processos fermentativos em estado sólido, utilizando diferentes micro-organismos. Têm-se observado que diferentes micro-organismos produzem complexos enzimáticos com diferentes atividades, mesmo quando se utiliza o mesmo substrato no meio de cultivo. Além disso, micro-organismos que permitem obter bons resultados para uma enzima específica, podem não resultar em valores muito satisfatórios para outra. No caso de micro-organismos das espécies *T. reesei* e *A. niger* cultivados em farelo de trigo, o *T. reesei* apresenta baixa atividade  $\beta$ -glucosidase, mas alta atividade endoglucanase e o *A. niger* comportamento exatamente contrário (SUKUMARAN *et al.*, 2009). Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados resultados de atividade enzimática endoglucanase/ $\beta$ -glucosidase e FPase identificadas em enzimas produzidas por fungos em meios de cultivo baseados em materiais lignocelulósicos mediante fermentação semi-sólida.

**Tabela 5.** Atividades  $\beta$ -glucosidase e endoglucanase detectadas em enzimas produzidas por diferentes fungos mediante fermentação semi-sólida utilizando-se materiais lignocelulósicos no meio de cultivo.

Micro-Organismo	Substrato	Atividade $\beta$ -glucosidase (U.g <sup>-1</sup> )	Atividade Endoglucanase (U.g <sup>-1</sup> )	Referência
<i>T. reesei</i> (RUT C30)	Farelo de Trigo	4,5	299,55	SUKUMARAN <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i> (MTCC 7956)		135,44	21,39	
<i>P. echinulatum</i> (9.A02S1)	Bagaço de cana pré-tratado e Farelo de Trigo.	58,92	282,36	CAMASSOLA & DILLON, 2007
<i>T. reesei</i> (ATCC 26921)	Misturas (4:1): Casca de soja e farelo de trigo.	6,30	60,17	BRIJWANI <i>et al.</i> , 2010
<i>A. oryzae</i> (ATCC 12892)		9,45	68,36	
Co-cultivados		10,71	100,67	
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja	5,25	10	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
	Bagaço de Laranja		12,76	

**Tabela 6.** Atividade FPAse detectada em enzimas produzidas por diferentes fungos mediante fermentação semi-sólida utilizando-se materiais lignocelulósicos no meio de cultivo.

Micro-Organismo	Substrato	(FPU.g <sup>-1</sup> )	Referência
<i>T. reesei</i> (RUT C30)	Farelo de Trigo	22,8	SUKUMARAN <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i> (MTCC 7956)		4,55 (U/g)	
<i>P. echinulatum</i> (9.A02S1)	Mistura de bagaço de cana pré-tratado com farelo de trigo	32,89 (U/g)	CAMASSOLA & DILLON, 2007
<i>T. reesei</i> (ATCC 26921)	Mistura em proporção 4:1 - Casca de soja e farelo de trigo.	6,55	BRIJWANI <i>et al.</i> , 2010
<i>A. oryzae</i> (ATCC 12892)		6,70	
Co-cultura		10,78	
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja	6,65	FARINAS <i>ET AL.</i> , 2008

O tipo de material lignocelulósico utilizado como substrato na produção de celulasas impacta diretamente no rendimento global do processo fermentativo, uma vez que o crescimento do micro-organismo pode ser influenciado por esta variável, dependendo da proporção na qual os componentes são utilizados no meio (BRIJWANI *et al.*, 2010).

A fonte de nitrogênio também é um nutriente bastante relevante em todos os processos fermentativos. Esta fonte pode ser de natureza inorgânica (sais de amônio e nitratos) ou orgânica (peptona e extrato de levedura). A escolha da fonte de nitrogênio mais apropriada ao processo em questão deve também considerar aspectos econômicos, já que alguns desses materiais apresentam custo elevado, podendo, em casos extremos, inviabilizar o processo. Outros componentes que têm papel importante no processo fermentativo são os sais. Comumente, utiliza-se a tradicional solução de sais de Mandels cuja composição está descrita em detalhes no item Materiais e Métodos.

Dos componentes do meio de cultura para produção de celulasas, a fonte de carbono é a que mais impacta no custo, uma vez que os substratos utilizados são geralmente caros. Assim, visando-se a redução do custo global de produção de celulasas é determinante avaliar a possibilidade de utilização de materiais baratos e/ou alternativos. A suplementação do meio de cultura com fontes de carbono adicionais ao substrato (matérias lignocelulósicos) permite obter melhores resultados na produção de celulasas, uma vez que estas fontes adicionais de

carbono podem atuar como indutores na produção das enzimas de interesse (MUTHIVELAYUDHAM & VIRUTHAGIRI, 2006). Os mecanismos que induzem a produção dos diferentes tipos de enzima que compõem o complexo celulásico parecem não estar interligados. Um exemplo disso ocorre com o *P. echinulatum* cujo mecanismo de indução de FPAse está, sabidamente, desconectado daquele que controla a indução das  $\beta$ -glucosidases. Assim, uma substância indutora pode induzir a produção de um tipo de enzima, em detrimento de outras (SEHNEM *et al.*, 2006).

A produção de celulasas pela maioria dos fungos está sujeita à indução pelo substrato celulose, que é o maior componente dos materiais lignocelulósicos. Por esta razão, o uso de uma concentração adequada deste componente no meio reacional e sua proporção com relação aos demais componentes pode definir o sucesso da produção das enzimas de interesse (CAMASSOLA & DILLON, 2007).

SEHNEM *et al.*, (2006), observaram que para *Penicillium echinulatum* 9A 02S1, a lactose induz a produção de  $\beta$ -glucosidases, mas não a produção de FPAse. Esta última é normalmente induzida quando estão presentes no meio de cultura celulose e lactose. Para *Trichoderma reesei*, a lactose age como indutor na produção de celulasas (SEIBOTH *et al.*, 2002).

CASTRO, (2006), observou que a cinética de produção de endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase por *Trichoderma reesei* utilizando substratos insolúveis (celulignina de bagaço de cana-de-açúcar e Avicel®) é mais lenta do que quando se utiliza substratos solúveis (carboximetilcelulose e celobiose), como esperado. Além do tipo e da forma como os componentes são utilizados no meio de cultivo semi-sólido, outros fatores como umidade, pH e temperatura também influenciam no crescimento do micro-organismo e, conseqüentemente, no processo de produção das enzimas (MUTHIVELAYUDHAM & VIRUTHAGIRI, 2006).

Em geral, o teor de umidade nos processos de fermentação semi-sólida varia na faixa de 30% a 85%. A água nestes processos apresenta múltiplas funções tais como, difusão de nutrientes no meio reacional e absorção destes pelos agentes microbianos, remoção de metabólitos, manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, entre muitas outras funções (CASTRO & PEREIRA, 2010).

Um exemplo do efeito da umidade na produção de celulasas pelo fungo *Trichoderma reesei* QM9414 em farelo de arroz foi demonstrado por LATIFIAN e colaboradores, 2007. Os autores testaram diferentes níveis de umidade (40, 55, 70%) e os melhores resultados de atividade de celulase foram obtidas com 70% de umidade. Similarmente, XIA & CEN, 1999,

determinaram que produção de celulases por *Trichoderma reesei* usando farelo de trigo como substrato resultava no favorecimento da atividade FPase quando o teor de água no meio era de 70%. Umidades inferiores a este valor acarretaram diminuição na atividade enzimática do extrato produzido. Além da umidade, o pH também tem papel definitivo no processo de fermentação em estado semi-sólido, pois cada enzima do complexo celulolítico tem sua produção maximizada em uma faixa específica de pH. Por exemplo, *T. reesei* produz satisfatoriamente  $\beta$ -glucosidase na faixa de pH que varia de 5 a 6, enquanto CMCase e FPase apresentam produção máxima em pH 4 (MUTHUVELAYUDHAM & VIRUTHAGIRI, 2006). Com relação à temperatura, fermentações semi-sólidas com fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* visando à produção de enzimas são normalmente conduzidas em uma faixa estreita e bem definida, de 28°C a 32°C (SUKUMARAN *et al.*, 2009; CAMASSOLA & DILLON, 2007; BRIJWANI *et al.*, 2010). Na Tabela 7 estão apresentadas algumas condições de cultivo de fungos para produção de celulases em fermentação semi-sólida.

**Tabela 7.** Condições cultivo de fungos para produção de celulases utilizando substratos lignocelulósicos em fermentação sólida.

Micro-organismo	Temperatura (°C) / pH	Umidade (%)	Fonte de Nitrogênio	Referência
<i>T.reesei</i> (RUT C30) <i>A. niger</i>	30 / 4,8	40-57	Peptona; Extrato de levedura	SUKUMARAN <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium echinulatum</i> (9.A02S1)	28 / 4,8	67	--	CAMASSOLA & DILLON, 2007
<i>T. reesei</i> (ATCC 26921) <i>A. oryzae</i> (ATCC 12892)	30 / 5	70	--	BRIJWANI, <i>et al.</i> , 2010
<i>T. reesei</i> (ZU-02)	30 / 4,5	75	--	XIA & CEN, 1999
<i>Aspergillus niger</i>	32 / 4,5	--	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
<i>T. reesei</i> (QMY-1) <i>T. reesei</i> (Rut C30)	30 / 5,8	80	Extrato de Levedura	CHAHAL, 1985

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados meios de cultura e condições de cultivo para fermentações semi-sólidas usando *Aspergillus niger*, respectivamente. Vale a pena mencionar, que as condições experimentais colocadas nestas tabelas foram a base para definir as condições experimentais utilizadas neste trabalho.

**Tabela 8.** Meios de cultivo para produção de celulasas utilizando substratos lignocelulósicos em fermentações semi-sólidas por *Aspergillus*.

Micro-organismo	Substrato	Fonte de Nitrogênio	Referência
<i>A. niger</i> (MTCC 7956)	Farelo de Trigo	Peptona (0,75 g/L) Extrato de levedura (0,25 g/L)	SUKUMARAN <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i>	Bagaço de cana e de laranja; casca de arroz e farelo de soja	--	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> (ATCC 10864)	Lactose	Peptona (1 g/L)	GAMARRA <i>et al.</i> , 2010
<i>A. terreus</i> (M11)	Palha de Milho	Extrato de Levedura (0,8%)	GAO <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> ; <i>A. niveus</i> ; <i>A. ochraceus</i>	Trigo e Milho	Extrato de Levedura	BETINI <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i> (3T5B8)	Manga e Trigo	Pectina cítrica (10 g/L)	COURI <i>et al.</i> , 2000
<i>A. niger</i> (ATCC 10864) <i>T. reesei</i> (LMUC4)	Bagaço de Cana Farelo de Soja	Sulfato de amônio (0,14 g); Uréia (0,02g)	GUTIERRES-CORREA, 1999
<i>A. niger</i>	Caroço de açaí	Peptona (14 g/L) Extrato de Levedura (9g/L)	FARINAS <i>et al.</i> , 2008

**Tabela 9.** Condições de cultivo para produção de celulases utilizando substratos lignocelulósicos em fermentações semi-sólidas por *Aspergillus niger*.

Micro-organismo	Temp. (°C)	Umidade (%)	Tempo (h)	Referência
<i>A. niger</i> (MTCC 7956)	30	40-57	96	SUKUMARAN <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i>	32	72	72	FARINAS <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> (ATCC 10864)	28	74	72	GAMARRA <i>et al.</i> , 2010
<i>A. terreus</i> (M11)	45	80	-----	GAO <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> ; <i>A. niveus</i> ; <i>A. ochraceus</i>	30	70-80	96	BETINI <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i> (3T5B8)	32	60	78	COURI <i>et al.</i> , 2000
<i>A. niger</i> (ATCC 10864); <i>T. reesei</i> (LMUC4)	30	80		GUTIERRES-CORREA, 1999
<i>A. niger</i>	32	72	72	FARINAS <i>et al.</i> , 2008

### 3.5. REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA.

É uma técnica de regressão global que tem sido utilizada com bastante frequência na análise estatística de series de dados. Os coeficientes de regressão da forma de equação linear são obtidos utilizando o método de mínimos quadrados (MYERS, 1994).

Segundo OLIVEIRA, (2010), o objetivo de uma análise de regressão linear múltipla é obter a melhor descrição possível da variável dependente (Y), em função das variáveis regressoras (X). Um número muito grande de variáveis regressoras pode levar a um modelo que explique bem os dados, mas de difícil interpretação. Por outro lado, um número pequeno de variáveis regressoras pode facilitar a interpretação, porém, o ajuste pode não ser adequado. O ideal é um modelo que produza um bom ajuste aos dados e com o menor número possível de parâmetros.

Este tipo de modelo tem sido aplicado amplamente em diferentes áreas de pesquisa. Vários trabalhos têm considerado esta abordagem também para o desenvolvimento de modelos que relacionam a produção de bioprodutos em função de variáveis operativas ou meio de cultura (TOKATLI *et al.*, 2009; MESHARAM *et al.*, 2008).

A regressão linear múltipla foi utilizada para modelar a produção da enzima poligalacturonase e biomassa por *Aspergillus sojae* ATCC 20235, utilizando como critério de seleção do modelo o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), foram obtidos valores de  $R^2$  para predição da atividade enzimática de 0,84 e de 0,69 para produção de biomassa (TOKATLI *et al.*, 2009).

Mais um exemplo foi um modelo desenvolvido por MESHARAM *et al.*, (2008), que relaciona a produção de xilanase e o crescimento celular pelo micro-organismo *Penicillium janthinellum* NCIM 1169, onde foram consideradas as variáveis independentes de temperatura e conteúdo de água, os valores de  $R^2$  foram satisfatórios, representando adequadamente o comportamento dos dados experimentais.

Ochratoxin é um metabolito secundário produzido pelo *Aspergillus ochraceum*, a produção deste metabolito e o crescimento do micro-organismo foi modelado em função da temperatura e atividade de água em processo de fermentação sólida (PARDO *et al.*, 2004). Os modelos obtidos foram satisfatórios, os valores de  $R^2$  dos modelos estiveram na faixa de 0,45 – 0,92.

A relação da atividade enzimática lignocelulósica e os nutrientes (fonte de carbono e nitrogênio) do meio de cultura, foi modelada utilizando a regressão múltipla, produzidas pelo micro-organismo *Trametes trogii* MYA 28-11 (LEVINA *et al.*, 2005).

MUKHERJEE *et al.*, (2009), estudou a síntese de amilase por *Bacillus subtilis* DM-03 em fermentação em estado sólido aproveitando como substrato resíduos agroindustriais, geraram um modelo matemático utilizando regressão linear múltipla para descrever a produção de amilase em função dos componentes do meio de cultura, apresentando valores de  $R^2$  satisfatórios para representar o processo.

O modelo estatístico para a regressão linear múltipla com  $k$  variáveis regressoras é dado por:

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \dots + \beta_k X_{ik} + \varepsilon_i$$

Onde os parâmetros  $\beta$  são os coeficientes de regressão. O modelo estatístico para a regressão linear múltipla, com as variáveis centradas, foi o modelo na forma reparametrizada (OLIVEIRA, 2010) dado por:

$$y_i = \alpha + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} + \varepsilon_i$$

Em que  $\alpha = \beta_0 + \beta_1 \bar{X}_1 + \beta_2 \bar{X}_2 + \dots + \beta_k \bar{X}_k$  e  $x_{ij} = X_{ij} - \bar{X}_j$ , sendo  $\bar{X}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_{ij}$ ,  $j = 1, \dots, k$ ,  $y_i$  é a variável resposta, isto é,  $y_i = Y_i - \bar{Y}$ , sendo  $\bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i$ ;

$\beta_i$  ( $i = 1, \dots, k$ ) são os parâmetros da regressão do modelo;

$x_{ij}$  ( $j = 1, \dots, k$ ) são as variáveis regressoras;

$\varepsilon_i$  é o erro aleatório.

Utilizando notação matricial, o modelo de regressão linear múltipla apresenta-se como:

$$y = X\theta + \varepsilon = \mu + \varepsilon$$

Ou seja,

$$y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \dots \\ y_3 \end{bmatrix}, X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2k} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix}, \theta = \begin{bmatrix} \alpha \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \\ \beta_4 \end{bmatrix} \text{ e } \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \varepsilon_3 \\ \varepsilon_4 \end{bmatrix},$$

Em que:

$y$  é o vetor de observações ( $n \times 1$ ) da variável aleatória  $Y$ ;

$X$  é a matriz ( $n \times p$ ) de variáveis regressoras;

$\theta$  é o vetor ( $p \times 1$ ) dos coeficientes de regressão;

$\varepsilon$  é o vetor ( $n \times 1$ ) de erros aleatórios.

As suposições para o modelo de regressão linear múltipla são:

- i) A variável resposta  $y$  é função linear das variáveis regressoras  $X_j, j = 1, 2, \dots, k$ ;
- ii) As variáveis  $X_j$  são fixas;
- iii)  $E(\varepsilon_i) = 0$  e  $Var(\varepsilon_i) = \sigma^2$  ;
- v) Os erros têm distribuição normal.

Combinando (iii) e (iv) têm-se  $Var(\varepsilon) = E(\varepsilon\varepsilon') = \mathbf{I}\sigma^2$ , sendo  $\mathbf{I}$  uma matriz identidade, de dimensões  $n \times n$ . Assim, considerando, também, (v) têm-se que  $\varepsilon \sim N(0, \mathbf{I}\sigma^2)$  e  $y \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\theta}, \mathbf{I}\sigma^2)$ , pois  $E(y) = \mu = \mathbf{X}\boldsymbol{\theta}$  e  $Var(y) = \mathbf{I}\sigma^2$ .

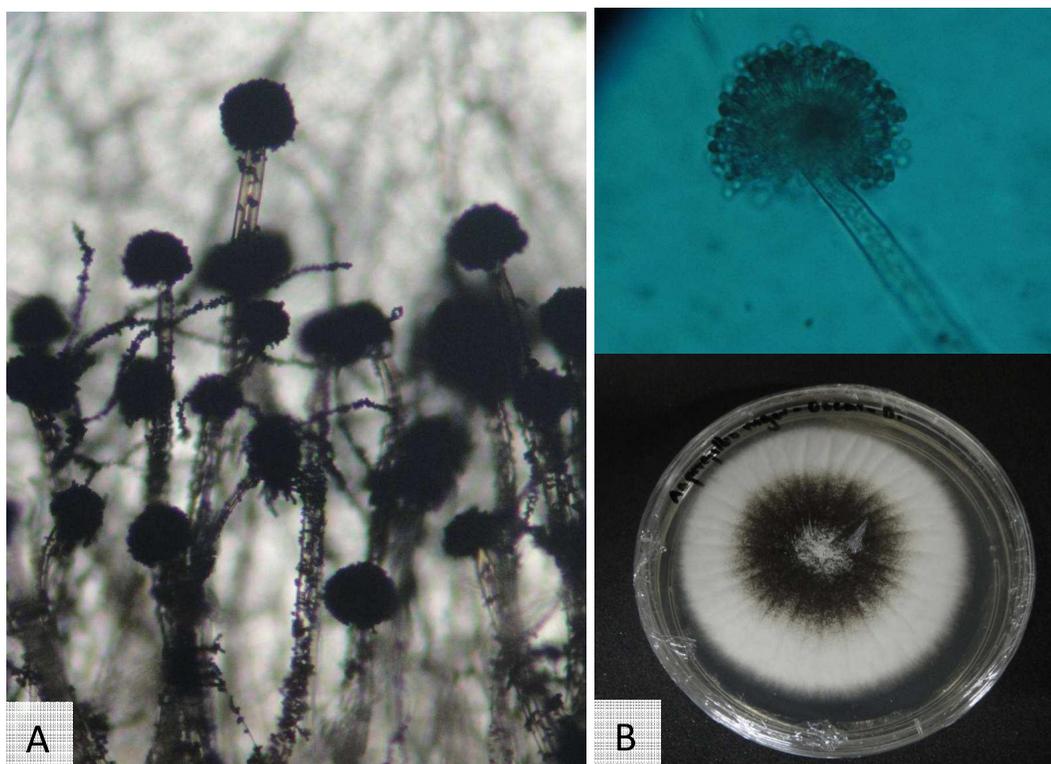
Diante do exposto até o momento, pode-se afirmar que a fermentação semi-sólida aparece como uma tecnologia promissora para produção de enzimas, pois além de usar substratos de baixo custo como resíduos agroindustriais, o biocatalisador pode ser produzido em sua forma mais concentrada, o que pode facilitar a sua recuperação do meio de fermentação, quando for o caso. Nesses sistemas, o micro-organismo cresce em partículas de um substrato orgânico sólido, com um mínimo de água livre nos espaços entre as partículas de substrato. Assim, este trabalho pretendeu contribuir para o conhecimento dos processos fermentativos usando materiais sólidos, estudando a produção de celulases por *Aspergillus niger*, vislumbrando uma aplicação futura desta tecnologia no cenário da produção dos biocombustíveis.

## 4. MATERIAIS E METÓDOS

Neste item serão apresentados os materiais utilizados e as metodologias empregadas no desenvolvimento experimental deste trabalho. Serão apresentados a linhagem do microorganismo utilizado no processo fermentativo semi-sólido para produção de celulases, os materiais utilizados na composição do meio de cultivo (substrato lignocelulósico, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, solução de sais), as condições de cultivo (temperatura, pH, tempo de fermentação e umidade do meio), a metodologia para extração das enzimas produzidas na fermentação e, finalmente, a metodologia para determinação das atividades enzimáticas detectadas no caldo extraído (FPAse, CMCase e  $\beta$ -glucosidase).

### 4.1 MICRO-ORGANISMO

Neste trabalho foi utilizada uma cepa nativa isolada do fungo *Aspergillus niger* (Figura 2), pertencente à coleção do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP).



**Figura 2.** Cultivo *in vitro* (A) e Microcultura (B) uma cepa nativa isolada do fungo *Aspergillus niger*.

#### 4.1.1 CRESCIMENTO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Inicialmente, o micro-organismo foi cultivado em Batata Dextrose Ágar (BDA) por 7 dias, à 30 °C. Em seguida, o inóculo da fermentação semi-sólida foi preparado adicionando-se 4 mL de água destilada às placas de Petri onde foi cultivado o micro-organismo e procedendo-se com a raspagem das mesmas de modo a se obter uma suspensão com concentração de esporos de  $10^8$  esporos/mL. A inoculação do meio de cultura para realizar o processo fermentativo foi realizada com 1 ml da suspensão de esporos.

#### 4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

##### 4.2.1 SUBSTRATOS: BAGAÇO *in natura* E BAGACO PRÉ-TRATADO

Bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente doado por uma Usina de Álcool e Açúcar localizada na região de Piracicaba/SP e neste trabalho utilizado como substrato integrante do meio de cultura. Foram preparados meios de cultura utilizando bagaço de cana em duas diferentes formas: *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor.

O bagaço de cana *in natura* coletado na usina apresentava umidade típica de 50%. Nos ensaios de fermentação utilizando bagaço *in natura* como substrato, procedeu-se inicialmente com o processo de secagem deste material (ao ambiente) até que umidade de 9% fosse atingida. Depois disso, o bagaço seco foi classificado por tamanho utilizando-se peneiras, de modo a separar a faixa retida entre 0,5 e 1 mm (Figura 3).



**Figura 3.** Partículas de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* com dimensão na faixa entre 0,5 e 1 mm.

Uma fração do bagaço *in natura* coletado na usina foi inicialmente pré-tratado por explosão a vapor (processo auto-catalítico) na Unidade de Desenvolvimento de Processos do

Centro de Tecnologia Canavieira (CTC/Piracicaba), sob severidades de 3,4 (considerada baixa) e 4,0 (considerada alta), calculadas mediante a equação 1 (OVEREND & CHORNET, 1987):

$$\text{Log}(R_0) = \text{Log} \left( t \times \exp \left( \frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:  $R_0$  é o fator de severidade;  $t$  é o tempo de residência da biomassa no interior do reator de explosão,  $T$  é a temperatura desejada para o sistema e  $T_{ref}$  é a temperatura referência, considerada 100°C.

O pré-tratamento do bagaço foi realizado pela equipe do etanol de segunda geração do CTC/Piracicaba sob as condições requeridas para os ensaios deste trabalho.

Na Tabela 10 são apresentadas as composições dos bagaços *in natura* e pré-tratados por explosão a vapor utilizados neste trabalho.

**Tabela 10.** Composição dos bagaços de cana *in natura* e pré-tratados.

<b>Componente</b>	<b>Bagaço <i>in natura</i></b>	<b>Bagaço Pré-tratado (Baixa severidade)</b>	<b>Bagaço Pré-tratado (Alta severidade)</b>
<b>Celulose (%)</b>	42,95	64,0	61,97
<b>Hemicelulose (%)</b>	25,35	9,40	3,78
<b>Lignina (%)</b>	25,48	27,61	31,48
<b>Cinzas (%)</b>	3,18	2,67	3,50

#### 4.2.2 SOLUÇÃO DE SAIS

No presente trabalho foi utilizada a solução de sais minerais sugerida por MANDELS & REESE (1957) para suplementar o meio de cultura. Após preparação da solução, esta foi autoclavada (121°C por 15 minutos) e mantida sob refrigeração (4°C) para usos posteriores. A composição desta solução encontra-se detalhada na Tabela 11.

**Tabela 11.** Composição da solução de sais minerais sugerida por MANDELS & REESE (1957).

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
<b>CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub></b>	0,3
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,4
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,3
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,4
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,005
<b>MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,0016
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,0014
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0,002

#### **4.2.3 FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO**

As duas principais fontes de carbono testadas neste trabalho foram lactose e extrato de soja em pó. Na composição do meio de cultura, a fonte de carbono estava presente na faixa de concentração de 5-20 g/L. Como fontes de nitrogênio foram testadas peptona, extrato de levedura e uma mistura peptona/extrato de levedura. Quando peptona e extrato de levedura foram testados individualmente, a concentração destes componentes era de 1,5 g/L. Quando a mistura desses componentes foi testada, utilizou-se uma proporção de 3:1 de peptona:extrato de levedura. Após preparação das soluções contendo as fontes de carbono e nitrogênio, estas foram autoclavadas à 121°C por 20 minutos e reservadas.

#### **4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SEMI-SÓLIDO**

O processo de fermentação semi-sólida foi iniciado adicionando-se a Erlenmeyers de 250 mL uma massa de substrato (bagaço de cana *in natura* ou pré-tratado) de 2,5 g (base seca). Os frascos contendo o substrato foram autoclavados por 20 minutos à 121 °C e, em seguida, adicionados de 1mL da solução da fonte de carbono adicional, 1,5 mL da solução da fonte de nitrogênio e 0,9 mL da solução de sais, todas devidamente autoclavadas antes do uso. O meio de cultura apresentava pH entre 5,5 e 6 e temperatura na faixa de 30°C a 32°C. Os

cultivos foram mantidos estáticos em *shaker*, no qual foram colocados béqueres com água para manter alta umidade no ambiente de fermentação por um período de até 14 dias.

Durante o processo de fermentação, dadas as características do processo (semi-sólido), não era possível proceder com a amostragem típica de fermentações submersas. Assim, para cada cultivo realizado, preparava-se uma quantidade de frascos idênticos equivalente ao número de amostras que se desejava retirar e dado o tempo de amostragem, o frasco era retirado da incubação e o processo de extração das enzimas produzidas iniciado.

Na Tabela 12, encontra-se descrito o planejamento de experimentos da primeira fase do trabalho, que pretendia definir os principais componentes do meio de cultura: substrato, fonte de carbono e de nitrogênio, que mais favorecem a produção de celulases.

**Tabela 12.** Ensaio de fermentação sólida para produção de celulases em meios de cultivo suplementados com solução de sais de Mandels.

<b>Substrato (Bagaço de Cana)</b>	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Fonte de Nitrogênio</b>	<b>Tempo</b>
<i>in natura</i>	Lactose (10 g/L)	peptona + extrato de levedura (3:1)	14 dias
	Extrato de Soja (10 g/L)		
	Lactose+Ext. Soja (10 g/L)		
	Extrato de Soja (5 g/L)		8 dias
	Extrato de Soja (10 g/L)		
	Extrato de Soja (20 g/L)		
	Extrato de Soja (10 g/L)	peptona (1,5g/L)	8 dias
	Extrato de Soja (10 g/L)	extrato de levedura 1,5g/L)	8 dias
	Extrato de Soja (10 g/L)	peptona + extrato de levedura (3:1)	8 dias
Pré-tratado (*sev. 4,0)	Lactose (10 g/L)	peptona + extrato de levedura (3:1)	14 dias
	Extrato de Soja (10 g/L)		
	Lactose+Ext. Soja (10 g/L)		
Pré-tratado (*sev. 3,4)	Extrato de Soja (10 g/L)	peptona + extrato de levedura (3:1)	14 dias

\*Severidade do pré-tratamento.

Para alguns ensaios realizados com bagaço pré-tratado com severidade 4.0 foram realizados pós-tratamentos da biomassa, a saber: lavagem, moagem e ajuste de pH. O processo de lavagem foi executado, com 1000 mL de água destilada, a 80°C. Após a lavagem foi realizada uma filtração à vácuo para separar o bagaço pré-tratado-lavado. A moagem do bagaço pré-tratado foi realizada para eliminar os “grumos” formados durante o pré-tratamento, utilizando um micro-moinho de folhas (MARCONI). O bagaço pré-tratado apresentou um valor de pH de 4,4; o ajuste do pH, consistiu em aumentar esse valor até 5,5 e 6,0 utilizando solução de citrato de sódio, 1 M.

Para este conjunto de experimentos os resultados de atividade enzimática FPAse são apresentados normalizados, em função do máximo valor de cada grupo de ensaios segundo seja realizado e mostrado no capítulo 5 de resultados.

#### **4.4 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA**

Após amostragem ou conclusão do processo de fermentação procedeu-se com a etapa de extração das enzimas celulolíticas produzidas. Esta etapa consistia em se adicionar aos frascos resultantes do processo de fermentação 50 mL de solução tampão citrato de sódio 50mM (pH 4,8) sob agitação (180 rpm), em mesa incubadora rotativa (*Shaker*), por 1 hora à 30°C. A extração da enzima com solução tamponante visava manter a enzima produzida em condições favoráveis à manutenção de sua atividade e estabilidade. Em seguida, a suspensão era centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos. O extrato enzimático (solúvel) finalmente obtido era, então, estocado à 4°C. A Figura 4 mostra a aparência dos caldos enzimáticos obtidos neste trabalho.



**Figura 4.** Caldos enzimáticos produzidos por fermentação semi-sólida.

## **4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS CALDOS ENZIMÁTICOS**

Três tipos de atividade foram avaliados nas enzimas produzidas: atividade celulolítica total (FPase), atividade carboximetilcelulase (CMCase) e atividade *β*-glucosidase.

A atividade celulolítica total (FPase) foi determinada como atividade papel de filtro por volume de caldo enzimático original (GHOSE, 1987). Para a atividade carboximetilcelulase (CMCase), foi determinada através de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) com concentração 4% (GHOSE, 1987). Para a *β*-glucosidase, a medida da atividade foi realizada utilizando uma solução de celobiose 15 mmol/L. A atividade final obtida foi expressa em unidades de celobiose por volume de enzima original (WOOD & BHAT, 1988).

### **4.5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)**

A concentração de ART foi determinada pelo método do DNS descrito por MILLER (1959). Este método baseia-se na redução do ácido dinitro-3,5-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada. Os produtos desta reação foram quantificados mediante leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de 540 nm.

#### **1. Preparo da solução de DNS**

O reagente utilizado foi preparado através da adição de 10,6 g de ácido dinitro- 3,5-salicílico, 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água destilada. Após dissolução total dos sólidos, adicionou-se 306 g de tartarato de sódio e potássio; 7,6 mL de fenol (fundido) e 8,3 g de metabissulfito de sódio, sendo o volume aforado para 1416 mL com água destilada.

#### **2. Procedimento método do DNS**

Experimentalmente, adicionou-se 1 mL de cada amostra, em tubos de ensaio independentes previamente identificados e foi adicionado 1 mL de reagente DNS a cada tubo; para obter a linha base do espectrofotômetro foi utilizada uma mistura de 1mL de tampão citrato, 50 mM com 1 mL de reagente DNS. Os tubos contendo a mistura foram aquecidos durante 5 minutos em banho termostatizado a 100 °C. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas em banho de gelo. Posteriormente, adicionou-se 16 mL de solução de tartarato

duplo de sódio e potássio. Finalmente, foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda. Para realizar o cálculo da concentração de açúcares, foi preparada uma curva padrão (concentração glicose - absorvância), considerando soluções com diferentes concentrações, realizadas a partir de uma solução de 0,5 mg/mL de glicose.

### **3. Construção da curva padrão de glicose (RABELO, 2010)**

Para construção de uma curva padrão, amostras com concentrações conhecidas de glicose foram preparadas e após aplicação do método DNS, lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Partiu-se de uma solução de 4,0 mg/mL, preparada em tampão citrato de 50 mM, pH 4,8, sendo realizadas diluições de 0 a 4,0 mg/mL. As reações com DNS foram realizadas adicionando em cada tubo de ensaio 1,0 mL de cada uma das diluições de glicose previamente diluídas em tampão citrato. e 1 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos e, posteriormente, transferidos para um banho de gelo fundente para parar a reação. Em seguida, a medida da absorvância era realizada em espectrofotômetro à  $\lambda$ :540 nm.

### **4.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA (FPase)**

Esta análise foi realizada de acordo com recomendações da IUPAC (GHOSE, 1987). O objetivo foi determinar a atividade celulolítica do coquetel enzimático como atividade papel de filtro expressa em FPU, ou seja, filter paper unit. Uma unidade de atividade FPA corresponde a 1  $\mu$ mol de glicose liberado por minuto de reação em pH 4,8 e 50 °C. A quantificação dos açúcares liberados no meio reacional foi determinada de acordo com o método DNS descrito por MILLER (1959).

O procedimento experimental para determinação da atividade consistia em adicionar a cada tubo de ensaio, foram colocadas tiras de papel de filtro (Whatman n°1) de 50 mg, previamente cortadas nas medidas de 1cm x 6cm, e em seguida adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho termostaticado a 50°C por 5 minutos, para equilibrar a temperatura, antes de adicionar o extrato enzimático. Após, foram adicionados 0,5 mL da enzima em cada tubo de ensaio para reagir durante 60 minutos. Ao final desse período, os tubos foram removidos e 1,0 mL da reação de cada tubo, foi colocado em tubos de ensaio para iniciar o procedimento de determinação de açúcares pelo método DNS (MILLER, 1959).

Paralelamente, também foram realizados experimentos controle, ou seja, tubos de ensaio contendo enzima sem substrato e substrato sem enzima. Os valores de absorvância obtidos nestes ensaios eram subtraídos dos valores das absorvâncias lidas em cada um dos tubos reacionais (RABELO, 2010).

Assim, a quantificação da glicose através do método DNS envolve três categorias de reações: tubos de amostras a serem quantificadas; tubos do branco reacional, para zerar o espectrofotômetro, e os tubos controle da enzima e substrato.

#### **4.5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)**

Esse método permite determinar a atividade conhecida como CMCase, nos extratos enzimáticos produzidos, através da determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboximetilcelulose (CMC) (GHOSE, 1987).

Para determinar esta atividade enzimática o substrato utilizado foi a carboximetilcelulose (CMC) (Sigma). Uma unidade de CMCase corresponde a 1 $\mu$ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação em pH 4,8, a 50°C.

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se do caldo enzimático produzido e extraído em cada experimento de produção de celulasas. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de CMC 4% preparados em tampão citrato, 50 mM e pH 4,8. Os tubos de ensaio contendo a solução de CMC foram colocados durante 1 min, em banho termostaticado a 50°C para equilibrar a temperatura e após este tempo, adicionou-se 0,5 mL do extrato enzimático diluído. Esta reação foi mantida durante 10 minutos no banho a 50 °C. De cada tubo de ensaio foi tomada uma alíquota de 1,0 mL e colocada em tubo de ensaio para aplicar a metodologia do DNS (MILLER, 1959) para determinação dos açúcares redutores liberados, por espectrofotometria na faixa do visível.

Pelas mesmas razões descritas no procedimento para determinar atividade FPAse, para determinação de CMCase é necessário incluir tubos do branco reacional para zerar o espectrofotômetro; e os tubos controle, da enzima e do substrato.

Para o preparo do tubo do branco reacional, adicionou-se 1 mL do tampão citrato e após de 10 minutos de reação aplicou-se o método DNS como descrito anteriormente. Para o preparo dos tubos controle da enzima, adicionou-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada um dos extratos enzimáticos, após do tempo reacional os conteúdos destes tubos foram analisados pelo método do DNS. O tubo controle do substrato foi preparado adicionando 0,5

mL da solução de carboximetilcelulose, concentração 4%, que ao final de 10 minutos, também foi analisado pelo método DNS.

#### **4.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA *B-GLUCOSIDASE***

A atividade *B-glucosidase* foi determinada, utilizando-se como substrato uma solução 15mmol/L de celobiose (Sigma). A glicose liberada nesta reação por ação do coquetel enzimático produzido foi quantificada aplicando a metodologia baseada no uso do reagente enzimático GOD-PAD (Labcenter, Brasil).

##### **4.5.4.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE GLICOSE**

Para construção da curva padrão, soluções de glicose com concentrações conhecidas foram preparadas. Após aplicação do método Glicose GOD-PAP estas foram lidas espectrofotometricamente em comprimento de onda de 505 nm.

Foram preparadas, a partir de uma solução estoque de glicose 3 mg/mL, soluções de glicose de 0,5 a 3 mg/mL, com espaçamento de 0,5 mg/mL, que após reação foram lidas no espectrofotômetro.

##### **4.5.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PELO MÉTODO GOD-PAP**

A concentração de glicose foi determinada utilizando o método enzimático Glicose GOD-PAP, descrito por HENRY *et al.*, (1974). O método é baseado na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando em peróxido de hidrogênio, o qual é usado na geração da coloração rosada pela peroxidase (PAP).

Para quantificação da glicose, adicionou-se 20µL de cada uma das amostras em tubos de ensaio, previamente identificados e contendo 2,0 mL do reagente (kit enzimático GOD PAP), Os tubos foram colocados para reagir em banho termostatizado durante 10 minutos a 37°C. A reação foi interrompida colocando os tubos de ensaio em banho de água gelada por 5 minutos. Ao término desse tempo foi efetuada a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 505 nm. Para zerar ou obter a linha base do espectrofotômetro, foi utilizado um tubo de reação “branco” com o reagente.

#### 4.5.4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE *B-GLUCOSIDASE*

Para a determinação da atividade *β-glucosidase*, partiu-se do caldo enzimático extraído, diluindo-o três vezes com tampão citrato 50 mM, pH 4,8.

Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 1,0 mL de cada um dos extratos enzimáticos diluídos. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50 °C para que a temperatura fosse equilibrada. Após 10 minutos, adicionou-se em cada tubo, 1,0 mL da solução de celobiose 15 mmol/L e os tubos foram encubados por 30 minutos. A reação foi finalizada por imersão dos tubos em água fervente por 5 minutos e posteriormente transferidos para um banho de gelo. Para a determinação da concentração de glicose liberada por cada solução de enzima diluída, utilizou-se o método GOD-PAP.

Foram preparados 4 tubos controle da enzima, onde adicionou 1,0 mL de cada extrato enzimático e 1,0 mL do tampão citrato. Ao final do tempo reacional, aplicou-se o método GOD-PAP. Ao tubo controle do substrato adicionou 1,0 mL do substrato celobiose e 1,0 mL do tampão citrato que ao final de 30 minutos de reação também foi analisado pelo método GOD-PAP.

#### 4.5.5 CALCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O cálculo de atividade enzimática apresentado à continuação, foi aplicado para os três tipos de atividade avaliados nos experimentos realizados, FPAse, CMCse e *β*-glicosidase. Os valores de atividade enzimática foram expressos em relação à massa de substrato seco (g.s.s) utilizado no meio de cultura de produção das enzimas.

A atividade enzimática é expressa em UI (μmol de produto liberado/minuto), calculada aplicando-se a equação (2):

$$Ati. Enzimática\left(\frac{UI}{g.s.s}\right) = \frac{diluição * conc. açúcares * vol. enzima}{tempo * massa substrato} \quad Eq. (2)$$

Onde: o termo diluição corresponde ao fator de diluição do extrato enzimático; a concentração de açúcares ou glicose é aquela determinada pelos métodos DNS ou GOD PAP, expresso em μmol/mL; o volume da enzima corresponde ao volume do extrato enzimático (mL), a massa de substrato é a quantidade de bagaço em base seca, utilizada no meio de cultivo (g.s.s) e tempo é a duração da reação em minutos. A atividade enzimática é expressa por unidades de massa de substrato em base seca (UI/g.s.s).

#### **4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL – DCCR (2<sup>3</sup> + 6 Pontos Axiais + 4 Pontos Centrais)**

O planejamento experimental realizado neste trabalho teve por objetivo definir a melhor condição de operação para as três variáveis de interesse (umidade do meio e concentrações das fontes de carbono e nitrogênio), a partir de faixas pré-definidas e com base em estudos realizados na primeira fase deste projeto, com vistas à maximização da produção de enzimas celulolíticas e, conseqüentemente, detecção dos maiores níveis de atividade FPase, CMCase e  $\beta$ -glucosidase, para o complexo produzido. O tempo de fermentação, uma variável importante no processo que aqui se estuda, foi verificado de forma indireta tanto nos ensaios preliminares quanto nos ensaios no escopo do DCCR. Isto foi possível devido às características particulares do sistema de fermentação (semi-sólida) que não permitem amostragem convencional, ou seja, retirada de alíquotas ao longo do ensaio. Por esta razão, cada frasco referente a um tempo específico de amostragem pôde ser considerado como um experimento independente, o que possibilitou a avaliação da influência desta variável no processo como um todo. O tipo de substrato (bagaço de cana *in natura* ou pré-tratado) a ser utilizado nos meios de cultivo dos experimentos do DCCR também foi definido durante a realização dos experimentos na fase inicial do presente trabalho. Nas Tabelas 13 e 14, são apresentadas as matrizes do planejamento experimental e a faixa de valores utilizados, respectivamente.

**Tabela 13.** Matriz codificada do planejamento delineamento central composto rotacional (DCCR);  $2^3$  6 pontos axiais+ 4 pontos centrais.

<b>Ensaio</b>	<b>Conc. Extrato de Soja (X<sub>1</sub>)</b>	<b>Conc. Extrato de Levedura (X<sub>2</sub>)</b>	<b>%Umidade (X<sub>3</sub>)</b>
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

**Tabela 14.** Faixa de valores estudados no planejamento delineamento central composto rotacional (DCCR);  $2^3$  6 pontos axiais+ 4 pontos centrais.

Ensaio	Conc. Extrato de Soja (g/L)	Conc. Extrato de Levedura (g/L)	%Umidade
1	8	1	65
2	12	1	65
3	8	2	65
4	12	2	65
5	8	1	85
6	12	1	85
7	8	2	85
8	12	2	85
9	6,64	1,5	75
10	13,36	1,5	75
11	10	0,66	75
12	10	2,34	75
13	10	1,5	58,2
14	10	1,5	91,8
15	10	1,5	75
16	10	1,5	75
17	10	1,5	75
18	10	1,5	75

As condições ótimas obtidas a partir dos modelos foram validadas experimentalmente, assim, foram realizados em triplicata ensaios de fermentação nas condições definidas a partir da otimização e comparados os resultados de atividade enzimática com os valores gerados pelos modelos.

#### 4.7. MODELAGEM MATEMÁTICA

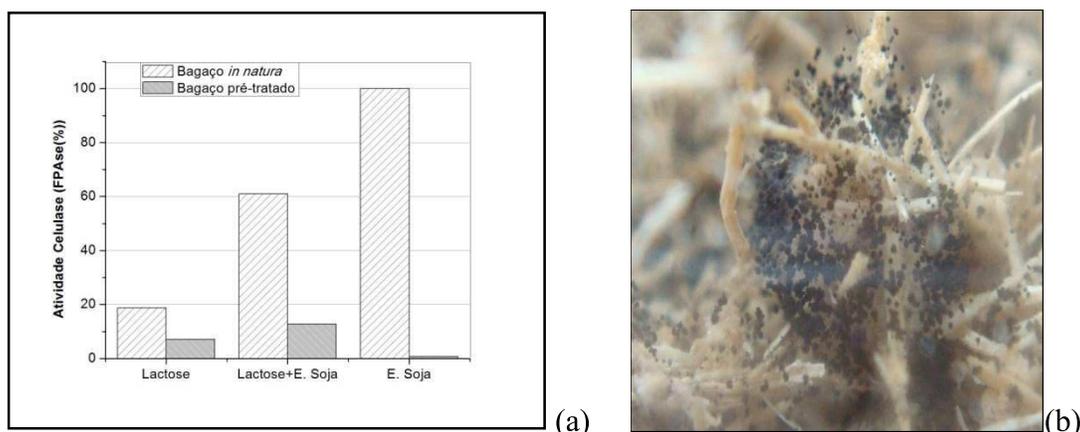
A modelagem matemática foi realizada utilizando regressão linear múltipla, sendo determinado um modelo para cada uma das atividades enzimáticas avaliadas, os dados utilizados corresponderam aos gerados pelos ensaios realizados no DCCR. Foi utilizado o software Statistica 7.0 para obter os modelos: os parâmetros, os coeficientes dos termos, coeficiente de determinação e a ANOVA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DEFINIÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO.

#### 5.1.1 AVALIAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA *in natura* E PRÉ-TRATADO

A primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar a aplicabilidade de substratos alternativos e fontes de carbono no processo de produção de celulases através do processo de fermentação em estado sólido. Foram testados bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado por explosão à vapor (alta severidade – 4,0) como substrato, e lactose, extrato de soja ou uma mistura deles (1:1) como fontes de carbono. Além disso, utilizou-se como fonte de nitrogênio nesses ensaios uma mistura de peptona e extrato de levedura, na proporção 3:1, e solução de Mandels como fonte de sais, para tempo total de fermentação de 14 dias. Os valores de atividade enzimática para este primeiro item são apresentados normalizados, em função do máximo valor obtido em cada ensaio. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5 (a). A Figura 5 (b) mostra o resultado do crescimento do fungo na melhor condição de cultivo ensaiada (bagaço *in natura* + extrato de soja).



**Figura 5.** (a) Atividade FPPase (valores normalizados) para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio em 14 dias de cultivo e (b) resultado do crescimento do fungo na melhor condição de cultivo ensaiada (bagaço *in natura* + extrato de soja).

Na Figura 5 (a), pode-se observar que o melhor meio de cultivo testado foi aquele que combinou bagaço *in natura* como substrato e extrato de soja como fonte de carbono, uma vez que significativa atividade no coquetel enzimático produzido pôde ser detectada nessas condições. Além disso, nestas condições de cultivo foi possível observar um melhor

crescimento do micro-organismo. Em função dos resultados obtidos, selecionou-se o extrato de soja como a fonte de carbono do presente trabalho.

Nos ensaios realizados com bagaço pré-tratado, é possível que compostos gerados durante o pré-tratamento com alta severidade (compostos orgânicos, aromáticos e/ou fenólicos) estejam promovendo algum tipo de inibição no processo fermentativo e, assim, desfavorecendo o crescimento do micro-organismo e, conseqüentemente, a produção da enzima (ANDO *et al* 1986; SENDELIUS, 2005). Observa-se que a produção de celulase e o crescimento do micro-organismo foram insignificantes, o qual foi uma resposta não esperada com o bagaço pré-tratado, dado que resultados da literatura mostraram que a produção de celulases aumenta utilizando bagaço pré-tratado. Assim, foi proposta uma série de ensaios em diferentes condições do bagaço pré-tratado com severidade 4.0 para tentar melhorar os resultados obtidos:

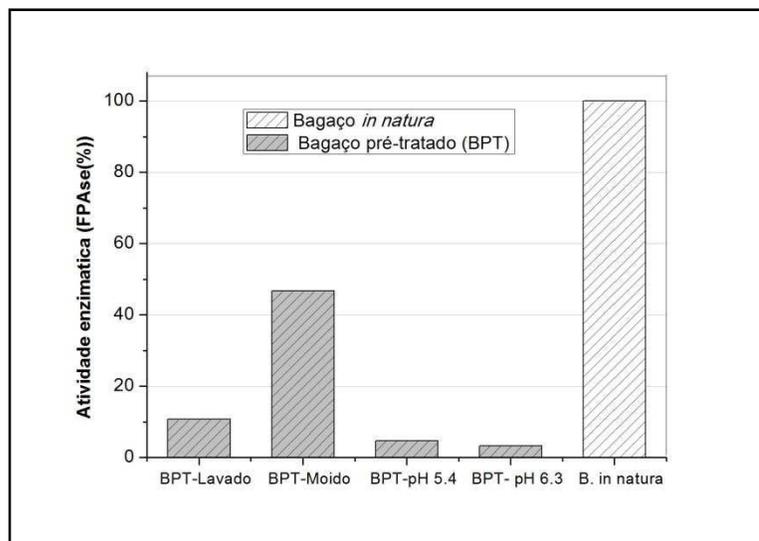
- *Lavagem do Bagaço pré-tratado*: Foi realizada uma lavagem, com 1000 mL de água destilada, 80°C para retirar as possíveis substâncias inibidoras. Em seguida, o material era filtrado à vácuo para separar a fase líquida da sólida, que correspondeu ao bagaço pré-tratado lavado.
- *Moagem do Bagaço pré-tratado*: Levando em conta que o material após do pré-tratamento forma “grumos”, foi realizada uma moagem.
- *Ajuste pH do Bagaço pré-tratado*: o pH do bagaço pré-tratado com severidade alta apresentou um valor de 4,4. O ajuste proposto considerou aumentar o pH entre 5,5 e 6,0.

Os cultivos foram realizados para um período de fermentação de 6 dias e como controle foi utilizado bagaço de cana *in natura* suplementado com extrato de soja.

Os resultados desses experimentos estão apresentados na Figura 6. Os valores normalizados de atividade enzimática do extrato produzido por cada tratamento mostram que os tratamentos realizados nos bagaços de cana pré-tratados com severidade alta (4.0) não aumentaram a produção de enzimas quando estes materiais foram usados como substrato.

Das modificações realizadas, o bagaço pré-tratado moído foi a que apresentou um incremento significativo na produção de enzimas, evidenciado pela atividade enzimática

FPase normalizada, embora o tratamento no qual foi utilizado bagaço de cana *in natura* ainda tenha apresentado a maior produção de enzimas.



**Figura 6.** Atividade enzimática (Valores normalizados) do extrato produzido utilizando como substrato bagaço pré-tratado (Severidade Alta), em diferentes condições, comparado com bagaço *in natura*.

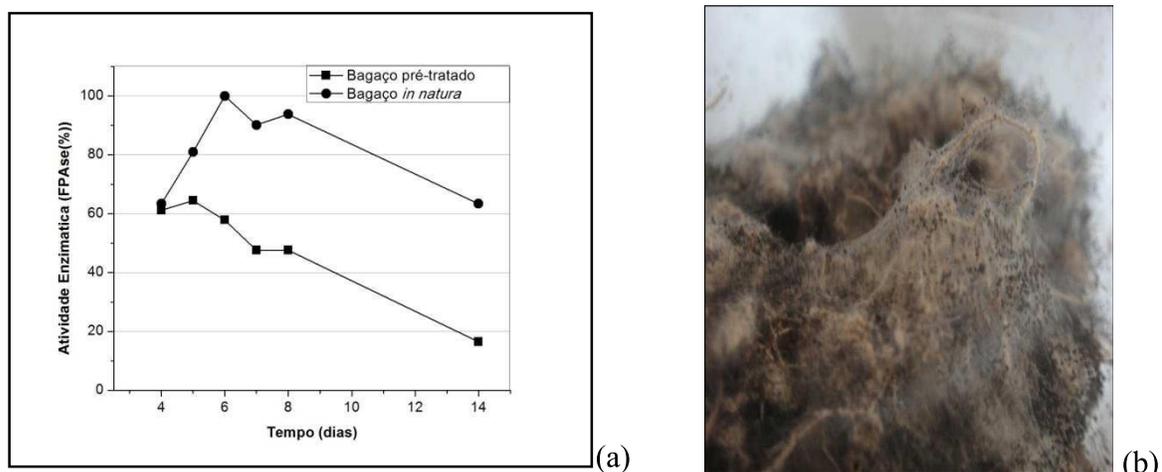
Para o caso dos tratamentos de bagaço pré-tratado moído e lavado houve crescimento do fungo, porém inferior ao observado para bagaço *in natura*. Para os tratamentos nos quais foi realizado ajuste de pH, o crescimento do fungo foi insignificante; isso é evidenciado na atividade enzimática, conforme mostrado na Figura 6.

Como o bagaço pré-tratado com alta severidade não foi promissor, decidiu-se avaliar o uso de bagaço pré-tratado com severidade inferior de 3,4, de modo a minimizar os possíveis efeitos negativos ao micro-organismo.

Neste caso, não era esperado que possíveis compostos inibidores fossem gerados em concentrações que prejudicassem o processo fermentativo. Adicionalmente, novos ensaios com bagaço *in natura* foram realizados, visando-se confirmar os resultados previamente obtidos.

Neste ponto do trabalho, embora se tenha realizado os ensaios anteriores utilizando-se tempo total de cultivo de 14 dias, decidiu-se acompanhar o processo de produção de celulase em períodos intermediários (dias 4, 5, 6, 7 e 8), de modo a elucidar qual o tempo que maximizava a produção. Nesses ensaios, manteve-se a mistura de peptona/extrato de levedura como fonte de nitrogênio e demais condições experimentais. Na Figura 7 (a) estão

apresentados os resultados obtidos nos cultivos e a Figura 7 (b) mostra o resultado do crescimento do fungo na presença de bagaço pré-tratado.



**Figura 7.** (a) Resultados de atividade FPase (valores normalizados) em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio e extrato de soja como fonte de carbono, e (b) resultado do crescimento do fungo cultivado com bagaço pré-tratado.

Na Figura 7 (a) é possível confirmar o resultado obtido na primeira batelada de ensaios. Utilizando-se bagaço *in natura* como substrato e extrato de soja como fonte de carbono, obteve-se, de fato, uma considerável produção de celulase ao longo de todo o período de cultivo, em comparação ao resultado obtido com bagaço pré-tratado. Observa-se ainda um pico de produção de enzima para um tempo de 6 dias de fermentação. Este fato pode estar associado a uma possível restrição de nutrientes no meio de cultivo, a partir do sexto dia de fermentação.

Picos de maior produção de celulases como os apresentados nos resultados neste estudo (Figura 7 (a)), têm-se apresentado em outras pesquisas utilizando bagaço de cana como substrato, tais como: CAMASSOLA & DILLON, (2007), com *P. echinulatum*, quando usado bagaço pré-tratado 100% como substrato, apresentou a máxima atividade FPase no 4º dia; a produção de celulases por *Aspergillus phoenicis*, apresentou a maior atividade FPase no 5º dia de fermentação, e para *Aspergillus aculeatus*, o pico de produção foi ao 7º dia de fermentação (SALES *et al.*, 2010).

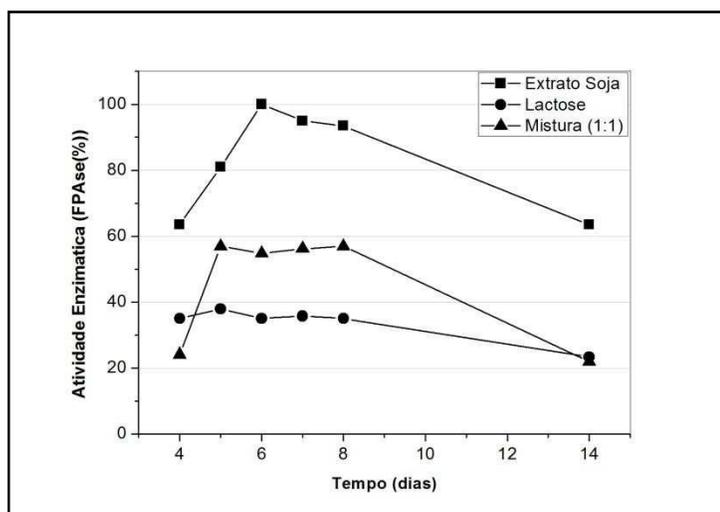
A Figura 7 (b) mostra que a utilização de bagaço pré-tratado com baixa severidade permitiu crescimento satisfatório do fungo, conforme esperado. No entanto, quando se compara os resultados finais obtidos com os dois diferentes substratos, fica claro que a utilização do bagaço *in natura* conduz a uma produção de celulase significativamente superior

àquela observada quando bagaços pré-tratados (independentemente da severidade do processo de pré-tratamento) são empregados no processo fermentativo. Deste modo, como variável de interesse neste estudo foi definida: bagaço *in natura* como substrato.

### 5.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE CARBONO ADICIONAL E DA CONCENTRAÇÃO.

Foi realizado um experimento para definir qual é a fonte de carbono que favorece a produção de celulases, lactose ou extrato de soja, ou a mistura deles, considerando como substrato o bagaço de cana *in natura*. O tempo total de cultivo foi 14 dias, e foi acompanhado o processo de produção de celulase com ensaios intermédios em períodos de 4, 5, 6, 7 e 8 dias, de modo a observar em que momento e com qual fonte de carbono se obtém a maior produção de celulases. O meio foi suplementado com solução de sais de Mandels e da mistura (3:1) de peptona e extrato de levedura, como fonte de nitrogênio.

Os resultados destes experimentos (Figura 8), confirmaram que o extrato de soja (100%) induz a produção de celulases, obtendo-se valores de atividade enzimática mais elevados ao longo do tempo, quando comparado aos ensaios com lactose e a mistura de lactose com extrato de soja.



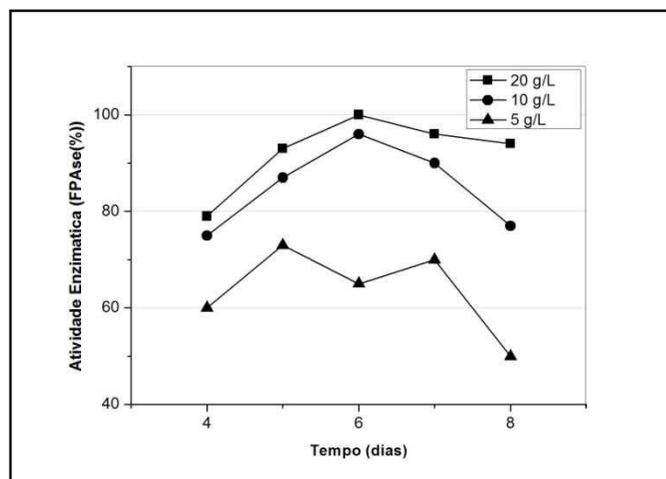
**Figura 8.** Resultados de atividade FPase (valores normalizados) avaliando como fonte de carbono: extrato de soja; lactose e a mistura (1:1), em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio.

Como resultado na Figura 8, a máxima produção foi observada em um período de fermentação de 6 dias (Figura 8), no caso do meio de cultura suplementado com extrato de

soja (100%). Este resultado pode ser atribuído aos múltiplos componentes que o extrato de soja tem, tais como carboidratos e proteínas, de tal forma que é fornecida uma quantidade de nutrientes, mais adequada para o micro-organismo (CHAUHAN *et al.*, 1998). No entanto, o extrato de soja, não tem sido usado como nutriente nos meios de cultura para produção de celulases por fermentação em estado sólido.

Após definição do extrato como fonte de carbono, era importante definir em que concentração este componente será utilizado de modo a maximizar a produção das enzimas de interesse. Como nos experimentos realizados até o momento tinha-se utilizado concentração de 10 g/L, decidiu-se dobrar este valor (20 g/L) e também reduzi-lo à metade (5 g/L) como tratamentos para avaliar. Em todas as condições foi utilizado como substrato o bagaço de cana *in natura*.

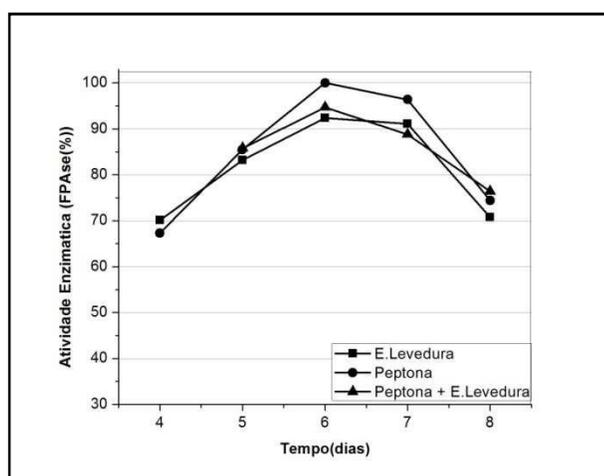
Os resultados obtidos nestes ensaios estão apresentados na Figura 9. Observa-se que a concentração do extrato de soja tem uma influência considerável no resultado do processo, ou seja, na atividade da enzima produzida. Os ensaios em relação ao tempo com concentração de 5 g/L de extrato de soja, valores baixos de atividade enzimática foram obtidos. Por outro lado o melhor ensaio foi com concentração 20 g/L. Para 10 g/L excelentes resultados também foram obtidos, assim, em consideração que duplicar a concentração de extrato de soja implica duplicar o custo por este item na produção de celulases, concentração de 10 g/L, definiu-se como concentração ótima a ser empregada no processo fermentativo.



**Figura 9.** Resultados de atividade FPAse (valores normalizados) avaliando extrato de soja como fonte de carbono em três concentrações (g/L): 5; 10 e 20; em função do tempo de cultivo para celulases produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando peptona+extrato de levedura (3:1) como fonte de nitrogênio.

### 5.1.3 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Após definição do substrato e da fonte de carbono, iniciou-se uma investigação para seleção da fonte de nitrogênio: peptona (100%), peptona e extrato de levedura (75%:25%) e extrato de levedura (100%). Em função dos resultados anteriormente obtidos, optou-se aqui por conduzir os atuais ensaios de fermentação por um período total de 8 dias. Deste modo, seria possível confirmar se 6 dias é, de fato, o tempo no qual se obtêm máxima produção ou se este tempo poderia mudar em função da fonte de nitrogênio. Os resultados dos ensaios realizados estão apresentados na Figura 10.



**Figura 10.** Resultados de atividade FPase (valores normalizados) em função do tempo de cultivo para celulasas produzidas por fermentação semi-sólida, utilizando bagaço *in natura* como substrato e extrato de soja como fonte de carbono (10 g/L).

Os resultados mostrados na Figura 10 confirmam que o pico de produção de enzima ocorre no sexto dia de cultivo, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada. Ainda observando-se os dados apresentados na Figura 10, percebe-se que o meio suplementado com peptona apresentou os maiores valores de atividade enzimática, porém as diferenças não foram consideráveis a respeito ao uso de extrato de levedura. NARASIMHA *et al.*, (2006) determinou também maior atividade enzimática FPase quando o meio foi suplementado com peptona, e não com extrato de levedura para *Aspergillus niger*. Porém, levando em conta que o incremento de atividade pelo uso de peptona não foi significativo (Figura 10), foi escolhido o extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Assim, a seleção definitiva deverá considerar aspectos econômicos relacionados ao custo de cada um desses insumos. Neste sentido, o extrato de levedura figura como uma fonte

de nitrogênio promissora para o processo de produção de celulases mediante fermentação semi-sólida, uma vez que esta fonte de nitrogênio apresentaria um custo baixo, uma vez que poderia ser disponibilizada nas usinas sucroalcooleiras, onde de igual forma seria realizado o processo de hidrólise enzimática, impactando consideravelmente os custos de produção da enzima.

## **5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA.**

O meio de cultura para a produção de celulases por *Aspergillus niger* foi definido: bagaço de cana *in natura* como substrato; extrato de soja como fonte de carbono adicional e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. No entanto, neste ponto do trabalho era necessário conhecer as concentrações ideais desses nutrientes durante o processo fermentativo. Além disso, era preciso definir o teor de umidade do meio reacional, que em conjunto com as demais variáveis permitiria uma maior produção enzimática.

Para tanto, um planejamento experimental completo – DCCR (Delineamento central composto rotacional) foi realizado, com o objetivo de determinar as condições que permitiriam maximizar a produção enzimática em função das variáveis: concentração de extrato de soja, concentração de extrato de levedura e teor de umidade do meio reacional, sendo definido o tempo de fermentação em seis dias. A avaliação da produção de celulases por *Aspergillus niger* foi quantificada pela determinação das atividades enzimáticas (FPase, CMCase e  $\beta$ -glucosidase) do complexo produzido.

Neste contexto, identificou-se ainda a oportunidade de avaliar, independentemente, a variável tempo. A relevância desta variável está diretamente relacionada com a possibilidade que a combinação das variáveis independentes estudadas implicasse na possibilidade de redução do tempo com máxima produção da enzima de interesse. Deste modo, foram retiradas alíquotas dos experimentos também para os dias 4 e 5.

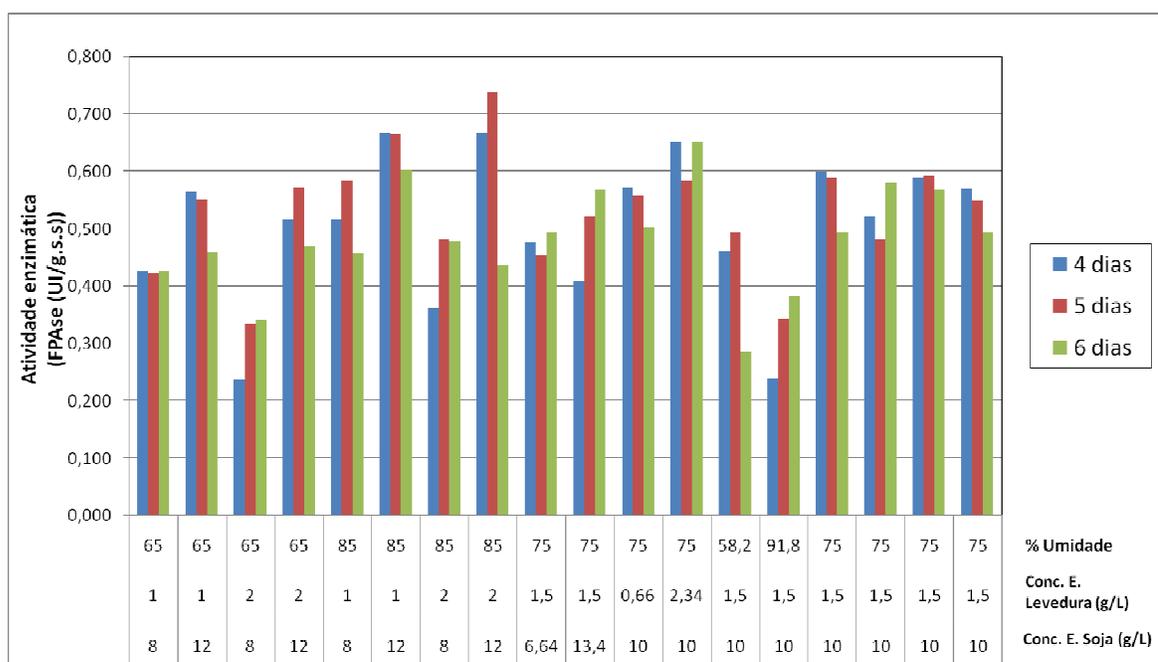
O design dos experimentos de fermentação sólida está apresentado na Tabela 15.

**Tabela 15.** Limites definidos para as variáveis a serem investigadas no planejamento experimental (DCCR) da produção de celulases para análise de efeitos.

Variáveis \ Níveis	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Concentração de Extrato de Soja (g/L)	6,64	8	10	12	13,36
Concentração de Extrato de Levedura (g/L)	0,66	1	1,5	2	2,34
Teor de Umidade (%)	58,2	65	75	85	91,8

É importante destacar que este planejamento experimental foi realizado de forma independente para cada dia estudado, uma vez que não é possível a retirada de alíquotas em fermentação sólida, e que os limites de operação de cada uma das variáveis estudadas foram definidos tendo-se em mente sempre a questão da viabilidade técnico-econômica do processo.

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos de atividade FPase para o planejamento experimental proposto, em função do tempo.

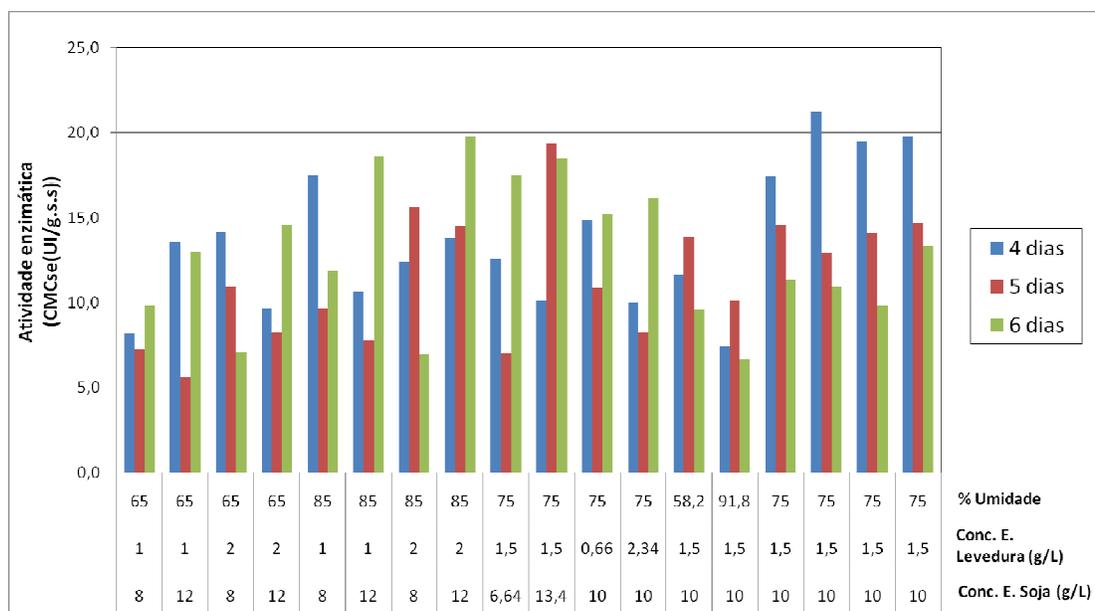


**Figura 11.** Atividade enzimática FPase, para os experimentos realizados no DCCR, em função do tempo de fermentação.

Na Figura 11, observa-se que o tempo realmente apresentou-se como uma variável importante, exercendo influência na expressão da atividade FPase, uma vez que, melhores resultados são alcançados com 4 e 5 dias de fermentação. Esses dados corroboram com a hipótese de que melhores ou similares valores de atividade enzimática poderiam ser obtidos

em tempo de fermentação menor que 6 dias, devido as combinações das variáveis estudadas. O melhor resultado foi obtido para o oitavo ensaio da matriz (12g/L de extrato de soja; 2g/L de extrato de levedura e 85% de umidade) com cinco dias de ensaio.

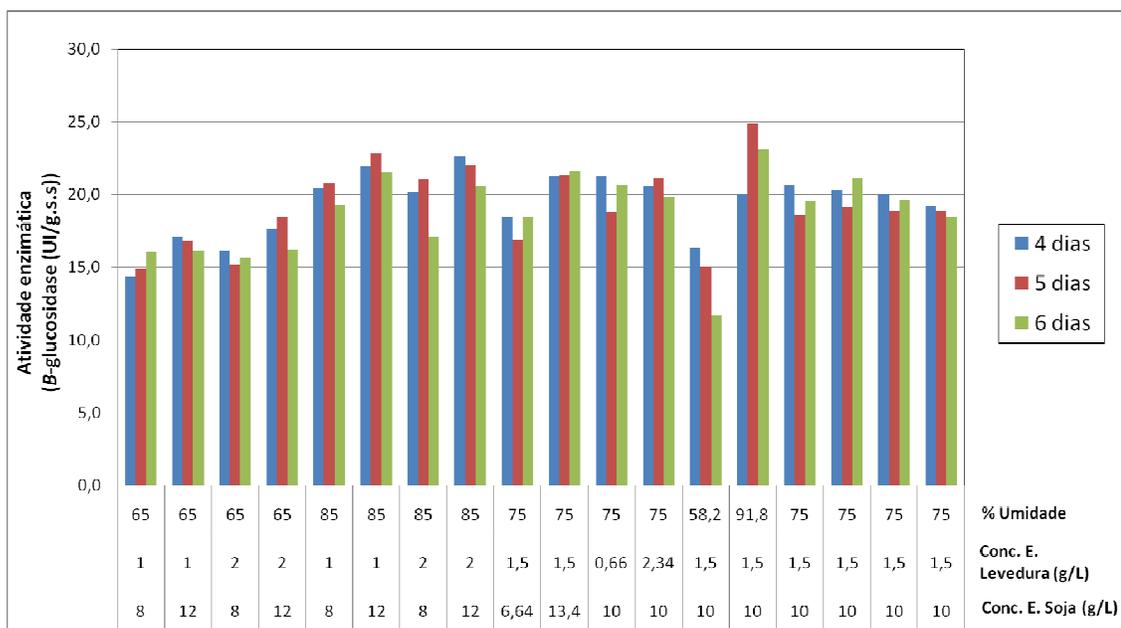
Na Figura 12 são apresentados os resultados de atividade CMCse obtidos para os ensaios avaliados em função do tempo de reação.



**Figura 12.** Atividade enzimática CMCse, para os experimentos realizados no DCCR, em função do tempo de fermentação.

A Figura 12 confirma que a combinação das variáveis estudadas pode reduzir o tempo de reação, uma vez que os resultados alcançados para a atividade CMCse, apresentaram-se melhores para os dias quatro e cinco. Os melhores resultados são os obtidos para os experimentos do ponto central para o quarto dia de ensaio. Indicando que, possivelmente, a produção do coquetel celulolítico poderia ser maximizada para um tempo menor que seis dias de fermentação.

A Figura 13 apresenta os resultados de atividade enzimática  $\beta$ -glucosidase dos experimentos realizados em função do tempo.



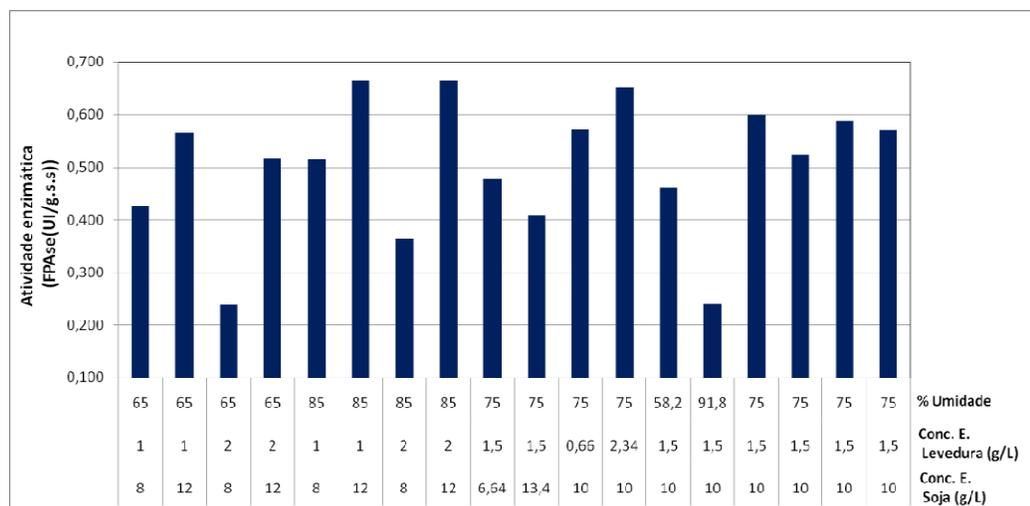
**Figura 13.** Atividade enzimática  $\beta$ -glucosidase, para os experimentos realizados no DCCR, em função do tempo de fermentação.

Na Figura 13, pode-se observar que, novamente, os melhores resultados foram obtidos para tempos menores que seis dias de ensaio. Sendo que 50% dos experimentos apresentaram a maior atividade  $\beta$ -glucosidase no quarto dia de reação, e nos casos em a maior atividade foi alcançada para o quinto dia de fermentação, os resultados não se diferenciaram de forma significativa para o obtido no quarto dia.

Em posse dos dados apresentados anteriormente para as atividades enzimáticas avaliadas, neste momento, determinou-se o novo tempo de fermentação para a produção de celulasas em 4 dias entre as condições estudadas. Esta escolha está diretamente relacionada com menores custos de produção, menor consumo de energia e maior produtividade.

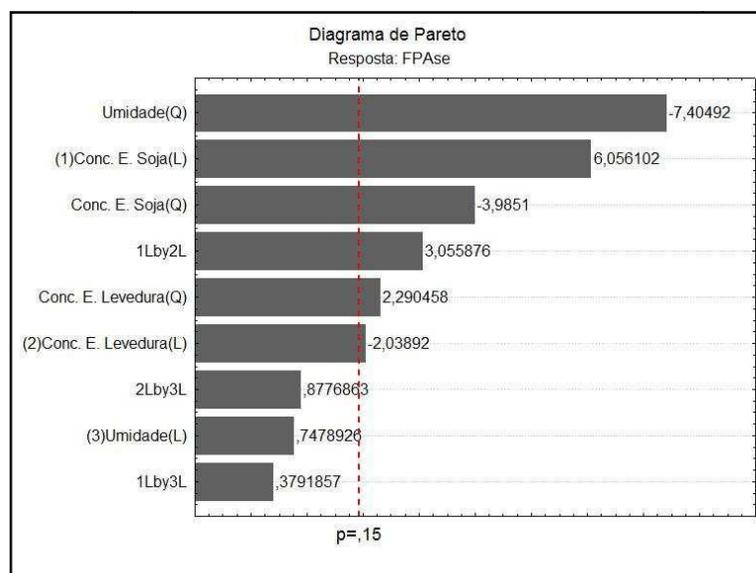
Logo, a análise estatística do DCCR será realizada para os resultados obtidos para um tempo de 4 dias de fermentação. Vale ressaltar que, a análise será realizada para cada atividade de forma independente, entretanto, a condição escolhida será avaliada pelos resultados combinados das atividades FPAse, CMCase e  $\beta$ -glucosidase, de modo a garantir a obtenção de um coquetel celulolítico que tenha a expressão das três atividades maximizadas.

Na Figura 14, apresentam-se os resultados para a atividade enzimática FPAse dos experimentos realizados para quatro dias de fermentação.



**Figura 14.** Atividade enzimática FPase, para os experimentos realizados no DCCR. Tempo de fermentação: 4 dias.

Podemos observar na Figura 14 que, para os ensaios nos quais a concentração de soja esteve entre 10 e 12 g/L, com teor de umidade entre 75 e 85%, apresentaram maiores valores de atividade FPase. A Figura 15 é apresentado o *Diagrama de Pareto* relacionando o efeito das variáveis sobre a produção enzimática, considerando-se como resposta a FPase e nível de confiança de 85%.



**Figura 15.** Análise dos efeitos nos resultados de atividade FPase dos ensaios realizados no planejamento experimental em 4 dias de reação.

Na Figura 15 é possível observar que a umidade representa o efeito mais significativo sobre o sistema, e o sinal negativo do termo quadrático implica em existência de ponto de máxima expressão desta atividade. O termo de concentração de extrato de soja linear apresentou efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração maior será a expressão de

atividade, e o termo quadrático apresentou a mesma tendência observada para o teor de umidade. A interação entre a concentração de extrato de soja e a umidade do meio tem resultado positivo. Enfim, a influência do termo linear da concentração de extrato de levedura foi negativa e quadrática, indicando a existência de um mínimo de produção enzimática.

A Equação (3) apresenta o modelo codificado proposto levando-se em consideração os parâmetros estatisticamente significativos.

$$FPase_{4\text{ dias}} = 0,568297 + 0,055432 X_1 - 0,037940 X_1^2 - 0,018663 X_2 + 0,021806 X_2^2 - 0,070499 X_3^2 + 0,036530 X_1 X_2 \quad \text{Eq. (3)}$$

Sendo: A Equação 3, é apresentada em variáveis codificadas: Concentração de extrato de soja: ( $X_1$ ); concentração de extrato de levedura: ( $X_2$ ) e %Umidade: ( $X_3$ ).

Para que o modelo anterior possa ser usado para fins preditivos é necessário realizar a análise de variância (ANOVA) e que as duas condições do teste F (regressão e falta de ajuste) sejam cumpridas. O valor de  $F_{\text{regressão}}$  calculado deve ser maior, no mínimo 3 vezes, do que o valor tabelado ( $F_{\text{regressão}}: F_{\text{Calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$ ), para verificar a significância da regressão. Para se verificar a falta de ajuste, o teste  $F_{\text{faj}}$  calculado pelo modelo deve apresentar um valor menor que o valor tabelado ( $F_{\text{faj}}: F_{\text{calculado}} < F_{\text{Tabelado}}$ ). Se estas duas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado apropriado para fins preditivos.

Na Tabela 16, encontra-se a análise de variância para a atividade enzimática (FPase), para o modelo apresentado na Equação (3).

**Tabela 16.** Análise de variância (ANOVA)- FPase- Tempo de Fermentação: 4 dias.

Fonte de Variação	Soma Quadrático	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F calculado	F Tabelado
<b>Regressão</b>	0,144189	6	0,024	2,00 <sup>a</sup>	2,01 <sup>a</sup>
<b>Resíduo</b>	0,142736	11	0,012		
<b>Falta de ajuste</b>	0,128557	8	0,016	14,06 <sup>b</sup>	3,80 <sup>b</sup>
<b>Erro puro</b>	0,003429	3	0,001		
<b>Total</b>	0,276176	17			

<sup>a</sup> $F_{\text{regressão}}$ ; <sup>b</sup> $F_{\text{faj}}$ ;  $R^2=52,21$

A análise de variância não foi significativa, dado que o valor do  $F_{\text{regressão}}$  (calculado) (2,0) para a regressão foi igual ao  $F_{\text{regressão}}$  (Tabelado) (2,01), de igual forma, o teste de falta de ajuste não foi satisfeito dado que o valor  $F_{\text{faj}}$  (Calculado) (14,06) foi maior do que  $F_{\text{faj}}$  (Tabelado) (3,80). Deste modo, determinou-se nesta análise que a equação do modelo proposto pela Equação (3) não pode ser utilizada para descrever o comportamento deste sistema dentro dos níveis estudados. Logo, não foram geradas superfícies de resposta para este modelo.

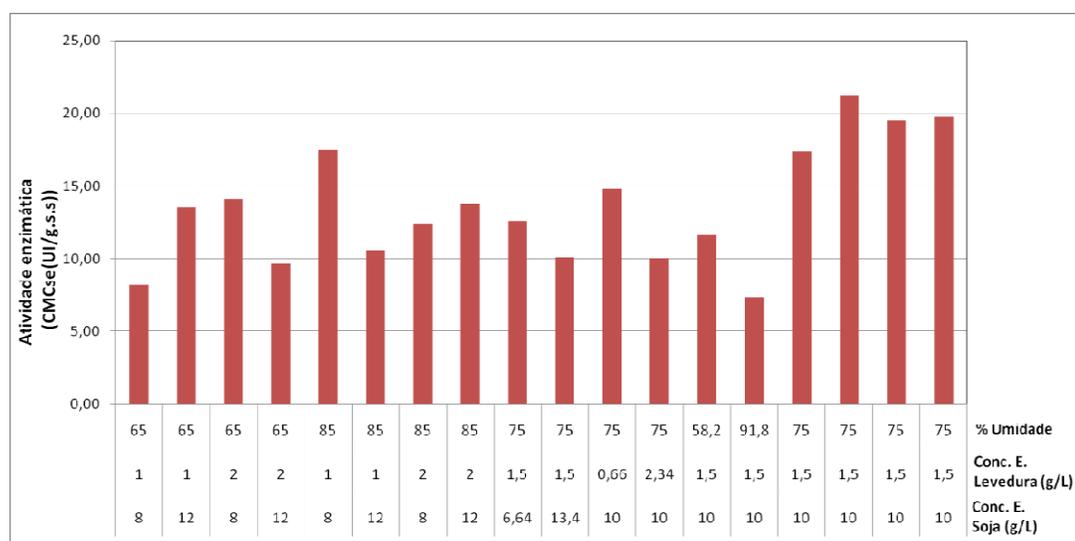
Embora o modelo não represente o sistema e não seja possível gerar as superfícies de resposta para a atividade FPAse, é razoável fazer algumas estimativas quanto a influência de cada variável na produção enzimática, de acordo com os efeitos que cada variável aplicou sobre a expressão da atividade FPAse.

- *Umidade do meio reacional:* o termo quadrático deste efeito apresentou-se com um sinal negativo para a atividade FPAse, este resultado indica a existência de um ponto de máximo para essa variável. Sendo assim, para a umidade do meio reacional deve ser evitado os valores nos extremos definidos neste estudo, ou seja, umidades muito altas ou muito baixas apresentam-se como condições desfavoráveis para a produção de celulasas, uma vez que a expressão dessa atividade não encontra-se em sua região de ótimo.
- *Concentração de extrato de soja:* este efeito apresentou-se como significativo em ambos os termos. Para o termo linear a influência positiva sobre a variação da FPAse implica em uma relação proporcional à concentração do extrato de soja. Entretanto, como o termo quadrático é negativo indica que o aumento da concentração do extrato de soja favorece a produção de celulasas até determinada concentração, onde a máxima atividade FPAse é alcançada, após este valor o acréscimo de extrato de soja pode inibir esta atividade.
- *Concentração de extrato de levedura:* assim como para a concentração do extrato de soja, esta variável mostrou-se significativa nos termos linear e quadrático. O termo linear tem relação inversamente proporcional à atividade, ou seja, quanto maior a concentração de extrato de levedura menor será a atividade apresentada pelo coquetel. O termo quadrático tem maior influencia sobre o sistema, e apresenta sinal positivo, indicando a existência de um valor mínimo de atividade FPAse. Esses resultados

sugerem que provavelmente concentrações em torno do ponto central não favoreçam a expressão de FPase, assim como valores muito altos, devido ao efeito linear.

Com base nos dados apresentados, para favorecer a atividade FPase, a umidade e a concentração de extrato de soja deve se manter em níveis próximos ao ponto central (75% e 10 g/L), e a concentração do extrato de levedura deve ser preferivelmente abaixo ao valor do ponto central (1,5 g/L).

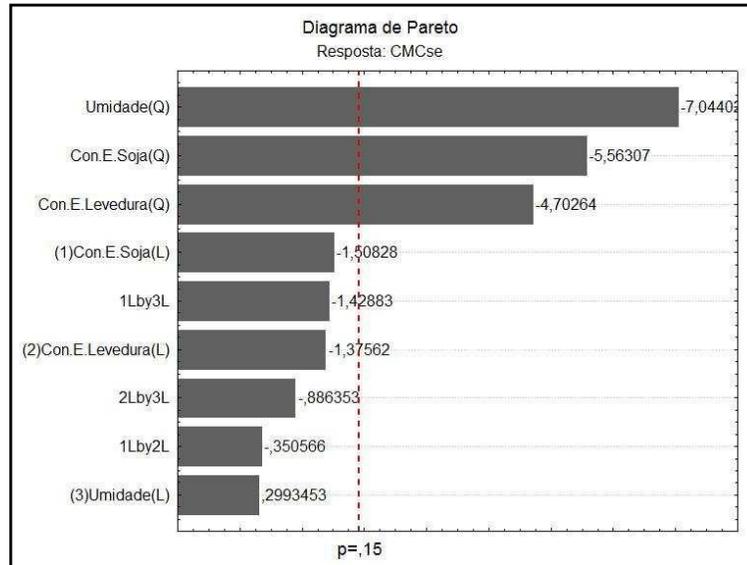
Os resultados de produção de CMCase para um período de fermentação de 4 dias, são apresentados na Figura 16, de acordo com o exposto no DCCR.



**Figura 16.** Atividade enzimática CMCase, para os experimentos realizados no DCCR. Tempo de fermentação: 4 dias.

Observa-se que a condição do ponto central (concentração extrato de soja, 10g/L; concentração de extrato de levedura 1,5 g/L e Umidade 75%) apresenta os melhores resultados na produção de CMCase, desse modo, espera-se que próximo desta condição possa maximizar da produção de celulasas que expressam atividade CMCase. Essa condição de meio de cultura que maximiza a atividade CMCase é similar à encontrada para FPase conforme discutido anteriormente.

O *diagrama de pareto* para a atividade enzimática carboximetilcelulase (CMCase) (Figura 17) apresenta os efeitos significativos sobre esta resposta e nível de confiança de 85%.



**Figura 17.** Análise dos efeitos nos resultados de atividade CMCse dos ensaios realizados no planejamento experimental em 4 dias de reação.

Com base no *diagrama de Pareto*, a equação (4) representa o modelo codificado proposto para a atividade CMCse. Além de considerar os efeitos estatisticamente significativos, no modelo foram considerados os termos lineares de concentração de extrato de soja, concentração de extrato de levedura e a interação entre concentração de extrato de soja e o teor de umidade, uma vez estas variáveis atuam no processo de fermentação em estado sólido, embora não seja possível precisar a ordem da sua influência.

$$\begin{aligned}
 CMCse_{4 \text{ dias}} = & 19,36466 - 0,64057 X_1 - 2,45752 X_1^2 - 0,58423 X_2 \\
 & - 2,07742 X_2^2 - 3,11174 X_3^2 - 0,79252 X_1 X_3 \quad \text{Eq. (4)}
 \end{aligned}$$

A análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática CMCse encontra-se na Tabela 17.

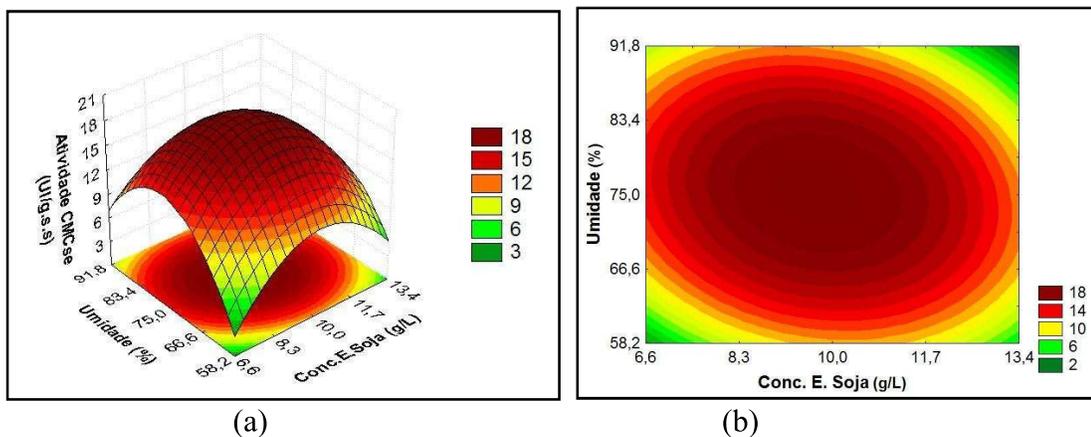
**Tabela 17.** Análise de variância para a atividade celulolítica CMCse.

Fonte de Variação	Soma Quadrático	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F calculado	F Tabela
Regressão	267,9969	6	44,666	5,58	2,01 <sup>a</sup>
Resíduo	87,9870	11	7,999		
Falta de ajuste	80,6035	8	10,075	4,09	3,80 <sup>b</sup>
Erro puro	7,3835	3	2,461		
<b>Total</b>	<b>355,9839</b>	<b>17</b>			

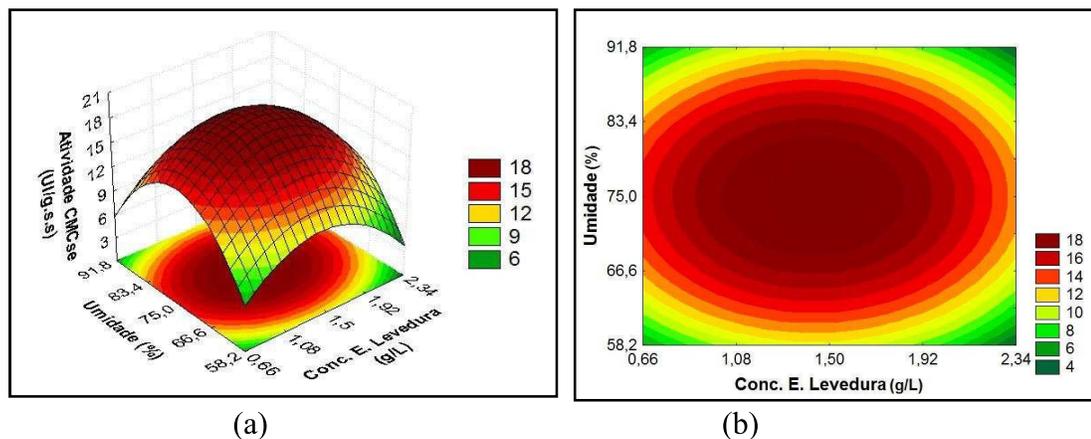
<sup>a</sup>F<sub>regressão</sub>; <sup>b</sup>F<sub>faj</sub>; R<sup>2</sup>=75,28%.

A análise de variância foi significativa, dado o valor do  $F_{\text{regressão}} \text{ (Calculado)}$  (5,58), maior que o valor do  $F_{\text{regressão}} \text{ (Tabelado)}$  (2,01) para a regressão, e apesar de não ter satisfeito o teste de falta de ajuste, dado que o valor  $F_{\text{faj}} \text{ (Calculado)}$  (4,09) foi maior do que  $F_{\text{faj}} \text{ (Tabelado)}$  (3,80), o erro puro tem uma pequena representatividade frente ao peso do valor da regressão. O coeficiente de determinação foi 75,28%, o que indica que o modelo de segunda ordem, mostrou-se adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta.

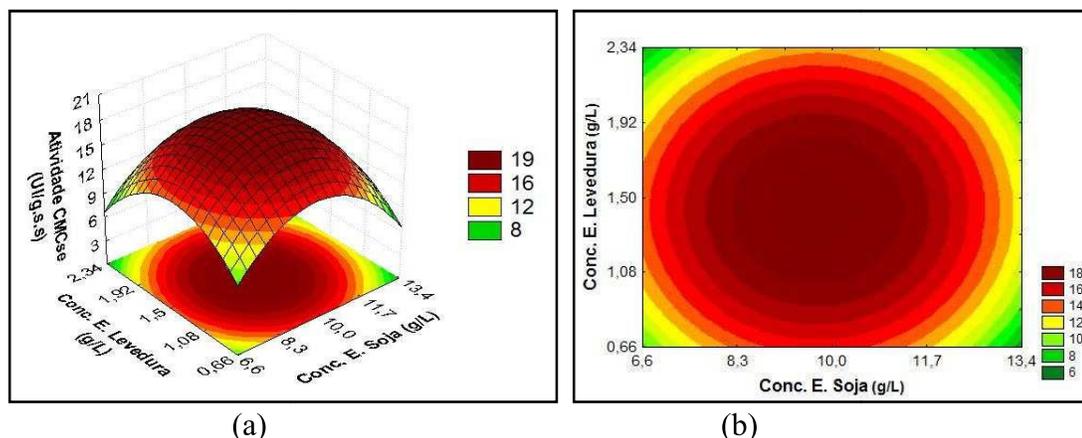
As superfícies de resposta traçadas com o modelo descrito pela equação 6 estão apresentadas nas Figuras de 18 à 20.



**Figura 18.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da carboximetilcelulase (CMCase) em função do teor de umidade e da concentração do extrato de soja, com a concentração do extrato de levedura fixada no ponto central.



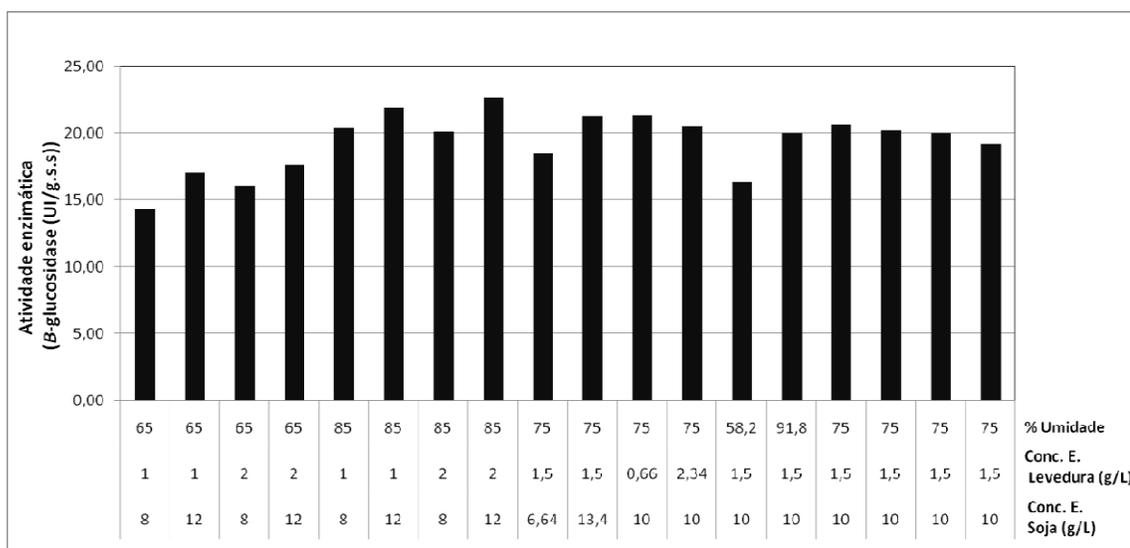
**Figura 19.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da carboximetilcelulase (CMCase) em função do teor de umidade e da concentração do extrato de levedura, com a concentração do extrato de soja fixada no ponto central.



**Figura 20.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade carboximetilcelulase (CMCase) em função da concentração do extrato de levedura e da concentração do extrato de soja, com o teor de umidade fixado no ponto central.

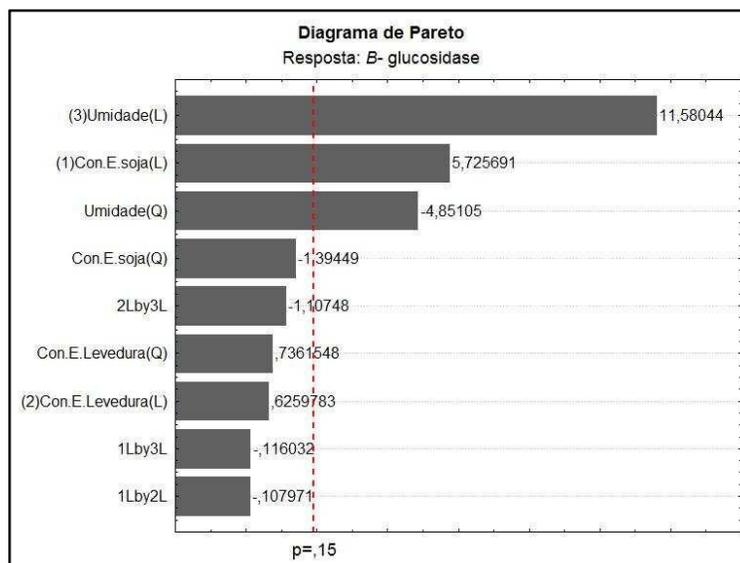
Nas Figuras de 18 à 20, está claro que conforme mencionado anteriormente a atividade carboximetilcelulase é maximizada quando a concentração de extrato de soja, concentração de extrato de levedura e o teor de umidade encontram-se no ponto central ou próximas a este. Entretanto, vale ressaltar que o objetivo deste trabalho é a obtenção de um coquetel celulolítico que expresse as três atividades maximizadas (FPase, CMCase,  $\beta$ glucosidase). Para a escolha do melhor meio de cultura é necessário ainda avaliar a expressão de atividade  $\beta$ -glucosidase.

Na Figura 21, são apresentados os resultados de atividade  $\beta$ -glucosidase.



**Figura 21.** Atividade enzimática  $\beta$ -glucosidase, para os experimentos realizados no DCCR. Tempo de fermentação: 4 dias.

Para a atividade  $\beta$ -glicosidase, ao contrário do apresentado para as atividades FPAse e CMCase, apresentou uma menor variação de expressão de atividade a partir das diferentes condições ensaiadas. Na Figura 22, apresenta-se o *diagrama de Pareto* com os efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade  $\beta$ -glucosidase e nível de confiança de 85%.



**Figura 22.** Análise dos efeitos nos resultados de atividade  $\beta$ -glucosidase dos ensaios realizados no planejamento experimental em 4 dias de reação.

Como observado no *diagrama de Pareto* (Figura 22), a ordem de importância dos efeitos para a atividade  $\beta$ - glucosidase é dado pelo termo linear da umidade seguido pelo da concentração do extrato de soja e o termo quadrático da umidade. Os termos lineares apresentam efeito proporcional a resposta, ou seja, quanto maior a umidade e a concentração de extrato de soja maior será a atividade enzimática, e o termo quadrático da umidade remete a existência de um valor de máximo.

A equação (5) representa o modelo codificado para  $\beta$ - glucosidase a partir dos dados gerados. No modelo além dos efeitos significativos, foi considerado o termo quadrático da concentração do extrato de soja.

$$\beta\text{glucosidase}_{4\text{ dias}} = 20,07296 + 0,94879 X_1 - 0,24035 X_1^2 + 1,91896 X_3 - 0,83613 X_3^2 \quad \text{Eq. (5)}$$

A análise de variância (ANOVA) para a atividade  $\beta$ -glucosidase encontra-se na Tabela 18.

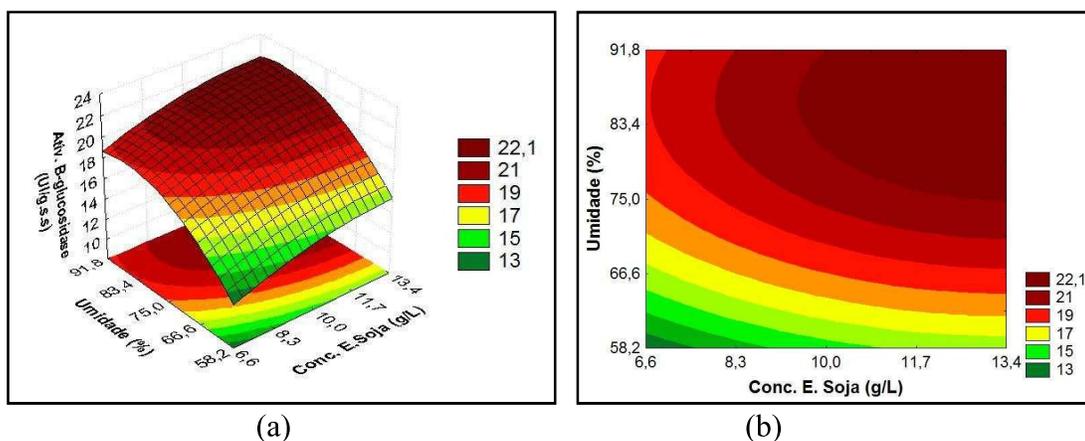
**Tabela 18.** Análise de variância para a atividade enzimática celulolítica  $\beta$ -glucosidase.

Fonte de Variação	Soma Quadrático	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F calculado	F Tabelado
<b>Regressão (R)</b>	73,27686	4	18,319	19,02 <sup>a</sup>	2,03 <sup>a</sup>
<b>Resíduo (r)</b>	12,52095	13	0,963		
<b>Falta de ajuste (faj)</b>	11,39693	10	1,140	3,04 <sup>b</sup>	3,79 <sup>b</sup>
<b>Erro puro</b>	1,12401	3	0,375		
<b>Total</b>	85,79781	17			

<sup>a</sup>F<sub>regressão</sub>; <sup>b</sup>F<sub>faj</sub>; R<sup>2</sup>=85,41%

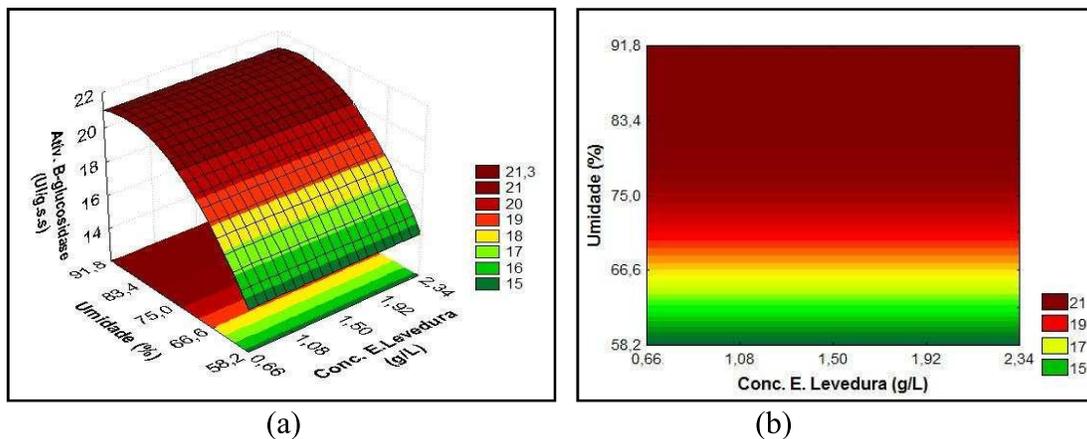
As condições do teste F foram preenchidas tanto para o teste de regressão quanto para o da falta de ajuste, logo, o modelo é adequado para descrever os resultados através de superfícies de resposta. O coeficiente de determinação foi de 85,41%.

As superfícies de resposta traçadas com o modelo descrito pela equação (5) são apresentadas da Figura 23 a 25.



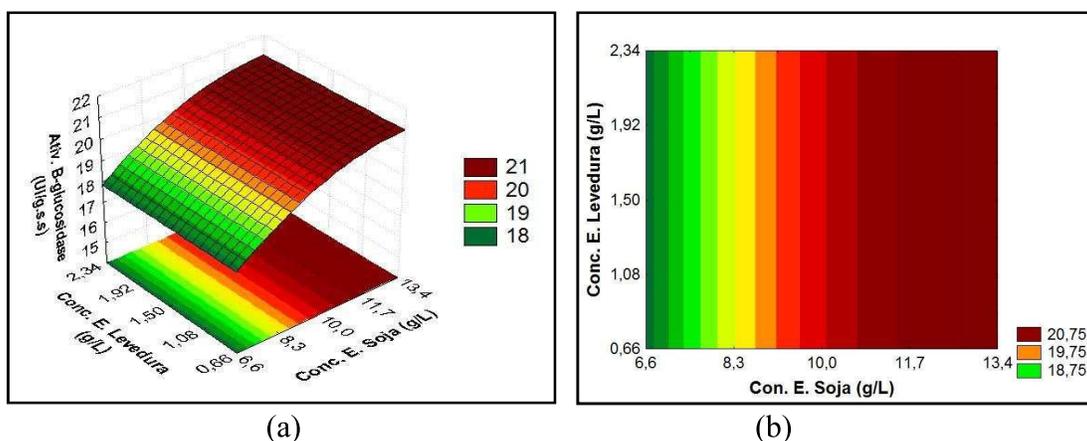
**Figura 23.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da  $\beta$ -glucosidase em função da %Umidade e da concentração do extrato de soja, com a concentração do extrato de levedura fixada no ponto central.

A Figura 23(b) mostra que os maiores valores de atividade da  $\beta$ -glucosidase são alcançados quando o meio de cultura apresenta as seguintes condições: maior teor de umidade e elevada concentração de extrato de soja, dentro da faixa estudada. Entretanto, meios de cultura com um teor de umidade elevado produz extratos enzimáticos consideravelmente diluídos, sendo necessário um custo adicional de concentração desse extrato enzimático.



**Figura 24.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da  $\beta$ -glucosidase em função da %Umidade e da concentração do extrato de levedura, com a concentração do extrato de soja fixada no ponto central.

Observa-se na Figura 24(b) que, a concentração de extrato de levedura não influencia no processo de produção enzimática, e que há forte influência do termo linear do teor de umidade. Entretanto, na Figura 24(a), fica clara a existência de um teor de umidade que implica na expressão de  $\beta$ -glucosidase máxima. Vale ressaltar que, próximo ao ponto central de teor de umidade (75%) a atividade  $\beta$ - glucosidase já se encontra na faixa ótima de operação.



**Figura 25.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a atividade da  $\beta$ -glucosidase em função da concentração do extrato de levedura e da concentração do extrato de soja, com o teor de umidade fixada no ponto central.

Nas Figuras 25 (a) e (b) podemos notar para a concentração de extrato de soja o mesmo comportamento observado para as Figuras 24 (a) e (b) para o teor de umidade. Entretanto, para a concentração de extrato de soja, a produção é maximizada para concentrações em torno de 12g/L (nível +1 do planejamento).

Como o objetivo deste trabalho é a obtenção de um coquetel celulolítico composto pelas atividades FPAse, CMCCase e  $\beta$ -glucosidase, de modo maximizado, para utilização na etapa de hidrólise enzimática no processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana, deve-se definir um meio de cultura no qual esses resultados possam ser encontrados. Logo, foi realizado o DCCR e os resultados simplificados da análise estatística são apresentados a seguir.

- FPAse – A umidade e a concentração de extrato de soja devem estar próximas ao nível definido para o ponto central, 75% e 10 g/L, enquanto a concentração do extrato de levedura deve estar abaixo de 1,5 g/L;
- CMCCase – O ponto central é o meio de cultura que favorece esta atividade, ou seja, 75% de umidade, 10g/L de extrato de soja e 1,5g/L de extrato de levedura;
- $\beta$ -glucosidase – A concentração do extrato de levedura não influencia a expressão desta atividade. A concentração de extrato de soja e o teor de umidade do meio, devem estar ligeiramente acima ao nível do ponto central, 11g/L e 80%, respectivamente.

Pelas razões apresentadas e discutidas até o momento, em busca de obter coquetéis que expressem maiores atividades, foi definido o novo meio de cultura 11g/L de extrato de soja; 1,5g/L de extrato de levedura e 80% de umidade, para um período de atividade de 4 dias.

Para validar esta hipótese foi realizado um experimento nessas condições, em triplicata, e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19 junto com os valores preditos pelo modelo.

**Tabela 19.** Resultados obtidos na validação para as atividades FPase, CMCase e  $\beta$ -glucosidase.

Atividade	Atividade Enzimática (UI/g.s.s)	
	Predito (Modelo)	Validação (Experimental)
FPase	N.D.	0,774 (D.P. 0,1)
CMCase	17,45	14,41(D.P. 3,6)
<i>B</i> -glucosidase	21,24	26,37 (D.P. 2,1)

Para a atividade FPase não se tinha resultado predito porque o modelo não foi válido. Para a CMCase o resultado foi menor ao predito em 17,4%, e o valor da atividade  $\beta$ -glucosidase foi maior para os ensaios do que o predito pelo modelo em 19,4 % . Observa-se por tanto imprecisão do modelo na predição dos dados experimentais, no entanto, apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios levando em conta a ampla variação associada aos processos biotecnológicos.

Na Tabela 19, observa-se que o micro-organismo *Aspergillus niger* semelhantemente à maioria dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, apresenta uma produção relativamente maior de  $\beta$ -glucosidase em relação com as outras enzimas do complexo, FPase e CMCase (FARINAS *et al.*, 2008).

#### **Atividade Enzimática FPase**

O resultado de FPase, 0,774 UI/g.s.s, apresentado na Tabela 19, é bastante interessante uma vez, quando comparado com estudos em condições experimentais similares. Por exemplo, uma primeira comparação deste resultado pode ser feita com o estudo realizado por FARINAS *et al.*, (2008), utilizando bagaço de cana *in natura* como substrato e *Aspergillus niger* como agente de fermentação. Nesse estudo a produção de FPase foi inferior a 0,5 UI/g.

### **Atividade Enzimática CMCCase**

Em relação à enzima CMCCase, a atividade enzimática para as condições ótimas foi de 14,41 UI/g, valor muito superior ao determinado por FARINAS *et al.*, (2008), também com *Aspergillus niger* em fermentação sólida com bagaço de cana *in natura* como substrato (aprox. 2,0 UI/g). Igualmente, esse resultado mostrou-se superior a valores relatados para fungos do gênero *Trichoderma* cultivados em bagaço de cana (5,7 UI/g CMCCase) (BASSO *et al.*, 2010).

Por outro lado, o resultado de 14,41 UI/g de CMCCase foi inferior em 27% comparado com os relatados para *Penicillium echinulatum*, (20 UI/g) por CAMASSOLA & DILLON (2007), utilizando bagaço de cana pré-tratado com solução de NaOH. O resultado atingido neste trabalho torna-se bastante interessante uma vez que o pré-tratamento do bagaço geraria um incremento no custo de produção das celulases.

Os resultados de CMCCase obtidos neste estudo foram superiores quando comparados com os relatados por outros autores utilizando o fungo *Aspergillus niger*, em diferentes substratos, bagaço de laranja (12,76 UI/g), farelo de soja (10 UI/g) e farelo de trigo, 3,24 UI/g (CHANDRA *et al.*, 2010).

### **Atividade enzimática $\beta$ - glucosidase**

A atividade de  $\beta$ - glucosidase alcançada nas condições ótimas deste trabalho apresentou um valor de 26,37 UI/g. Sendo um valor bastante alto quando comparado com resultados obtidos, em outros trabalhos, para este mesmo micro-organismo também cultivado em bagaço de cana, FARINAS *et al.*, (2008), por exemplo reportou um valor de 1 UI/g de  $\beta$ -glucosidase igualmente para *Aspergillus niger*.

Quando foi utilizado bagaço de cana pré-tratado (solução de NaOH), foram relatados valores de  $\beta$ -glicosidase de 25 UI/g, por *Penicillium echinulatum*, esse valor é inferior ao reportado neste estudo, mostrando a importância deste trabalho, já que isso pode representar uma diminuição no custo de produção de celulases pois eliminaria a etapa de pré-tratamento. (CAMASSOLA & DILLON, 2007).

Quando comparados os resultados de  $\beta$ - glucosidase, de extratos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em substratos diferentes do bagaço, encontrou-se valores de

5,25 UI/g quando cultivado em farelo de soja e cerca de 3UI/g em farelo de trigo (FARINAS *et al.*, 2008), mais uma vez ressaltando a importância deste estudo.

Os resultados encontrados confirmam a elevada produção de  $\beta$ -glucosidase, por *Aspergillus niger*, o que representa uma vantagem da utilização deste micro-organismo sobre o fungo *Trichoderma reesei*, que apesar de ser um dos fungos mais estudados em relação à produção de celulases, produz uma quantidade de  $\beta$ - glucosidase relativamente baixa (KIM *et al.*, 1997).

Por exemplo, para *T. reesei* LM-UC4 por fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana, foram obtidos valores de atividade  $\beta$ - glucosidase de 7,7 UI/g (GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999).

Em geral, os resultados de atividade enzimática obtida para a melhor condição exposta y validada anteriormente, é bastante promissória uma vez que foi possível identificar um meio de cultura baseado no bagaço de cana *in natura*, que seria disponibilizado a custos baixos no Brasil o qual permitira reduzir os custo globais de produção de celulase. O extrato de soja, mostrou-se como uma fonte de carbono muito interessante dado seu efeito indutor na produção de celulases.

### 5.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE CELULASES

Utilizando a ferramenta de regressão linear múltipla, através do software Statistics 7.0, foram determinados os parâmetros de ajuste dos dados a um modelo que relaciona a atividade enzimática (FPase, CMCase e  $\beta$ - glucosidase) em função da concentração de extrato de soja ( $X_1$ ), concentração de extrato levedura ( $X_2$ ), umidade ( $X_3$ ) e tempo ( $X_4$ ). A seguir são apresentados três modelos correspondentes a cada uma das enzimas estudadas. Os dados utilizados para o modelo correspondem aos obtidos nos ensaios do planejamento experimental DCCR.

#### 5.3.1 MODELO PARA ATIVIDADE DA CELULASE TOTAL (FPase)

Na Tabela 21 se apresentam os coeficientes de regressão do modelo produção de celulases, em termos de atividade enzimática FPase, que correspondem à equação 6,

$$FPase(UI/g.s.s) = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_3 + \beta_3 X_4 + \beta_4 X_1^3 + \beta_5 X_3^3 + \beta_6 X_3^{-1} + \beta_7 X_1^2 X_2 + \beta_8 X_1 X_2^{0,5} + \beta_9 X_1 X_2^{-2} + \beta_{10} X_1^2 X_2^2 + \beta_{11} X_4^3 \quad \text{Eq. (6)}$$

**Tabela 21.** Estimativas dos coeficientes da regressão e os respectivos erros padrão da atividade enzimática total FPase.

<b>Parâmetro</b>	<b>Estimativa (β)</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>T</b>	<b>p-level</b>
Intercept. (α)	-27,5193	8,1074	-3,39435	0,001224
X <sub>1</sub>	0,2799	0,0618	4,52911	0,000029
X <sub>3</sub>	0,3027	0,0826	3,66352	0,000528
X <sub>4</sub>	0,1673	0,0084	19,84764	0,0000
(X <sub>1</sub> ) <sup>3</sup>	-0,0009	0,0002	-4,42343	0,000042
(X <sub>3</sub> ) <sup>3</sup>	-1,0058E-05	2,4699E-06	-4,07218	0,000138
(X <sub>3</sub> ) <sup>-1</sup>	705,9439	222,3082	3,17552	0,002362
(X <sub>1</sub> ) <sup>2</sup> *X <sub>2</sub>	0,0110	0,0027	4,10489	0,000124
X <sub>1</sub> *(X <sub>2</sub> ) <sup>0,5</sup>	-0,3113	0,0762	-4,08438	0,000133
X <sub>1</sub> *(X <sub>2</sub> ) <sup>-2</sup>	-0,1403	0,0377	-3,72444	0,000435
(X <sub>1</sub> ) <sup>2</sup> *(X <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	0,0121	0,0033	3,62815	0,000591
(X <sub>4</sub> ) <sup>3</sup>	-0,0023	0,0002	-9,84950	0,00000

A análise de variância que corresponde ao modelo da atividade da FPase é apresentada na Tabela 22.

**Tabela 22.** Análise de variância para o modelo da atividade enzimática total FPase.

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Fcalculado</b>
<b>Regressão</b>	3,796089	11	0,345	78,18
<b>Resíduos</b>	0,264866	60	0,004	
<b>Total</b>	4,060955	71		

O valor de F<sub>tabelado</sub> é de 1,95, para significância 0,05 (95%), que é muito menor do F<sub>calculado</sub>, além disso, o coeficiente de determinação R<sup>2</sup> é 93,48% por tanto o modelo satisfaz as condições e representa satisfatoriamente os dados.

### 5.3.2 MODELO PARA ATIVIDADE DA CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)

Na Tabela 23 se apresentam os coeficientes de regressão do modelo produção de celulases, em termos de atividade enzimática CMCase, que correspondem à equação (7),

$$CMCse(UI/g.s.s) = \alpha + \beta_1 X_3 + \beta_2 X_4 + \beta_3 X_3^3 + \beta_4 X_3^{-1} + \beta_5 X_1 X_4^{-1} + \beta_6 X_1^2 X_4^2 + \beta_7 X_4^3 \quad \text{Eq. (7)}$$

**Tabela 23.** Estimativas dos coeficientes da regressão e os respectivos erros padrão- Atividade enzimática Carboximetilcelulase (CMCase).

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	t	p-level
Intercet. ( $\alpha$ )	-735,95	342,469	-2,14896	0,034586
$X_3$	7,80	3,486	2,23708	0,027995
$X_4$	5,91	0,644	9,17184	3,27E-14
$(X_3)^3$	-2,52E-04	1,0421E-04	-2,42434	0,017535
$(X_3)^{-1}$	18871,21	9375,281	2,01287	0,047410
$X_1*(X_4)^{-1}$	0,12	0,067	1,85966	0,066520
$(X_1)^2*(X_4)^2$	-6,041E-04	0,001	-1,16477	0,247490
$(X_4)^3$	-0,08	0,014	-5,65248	2,2306E-07

Na Tabela 24 é apresentada a análise de variância que corresponde ao modelo da atividade da CMCase.

**Tabela 24.** Análise de variância para o modelo da atividade enzimática carboximetilcelulase (CMCase).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Fcalculado
<b>Regressão</b>	3474,264	7	496,323	50,37
<b>Resíduos</b>	808,017	82	9,854	
<b>Total</b>	4282,281	89		

O valor de F tabelado é de 2,12, para significância 0,05 (95%), que é muito menor do F calculado, além disso, o  $R^2$  é 81,13% por tanto o modelo satisfaz as condições e representa satisfatoriamente os dados.

### 5.3.3 MODELO PARA ATIVIDADE DA B- GLUCOSIDASE

Na Tabela 25 se apresentam os coeficientes de regressão do modelo produção de celulasas, em termos de atividade enzimática  $\beta$ - glucosidase, que correspondem à equação 8,

$$\beta - glucosidase(UI/g.s.s) = \alpha + \beta_1 X_4 + \beta_2 X_3^3 + \beta_3 X_3^{-1} + \beta_4 X_1 X_2^{0,5} + \beta_5 X_4^3 + \beta_6 X_3^2 X_4^{-1} \quad \text{Eq. (8)}$$

**Tabela 25.** Estimativas dos coeficientes da regressão e os respectivos erros padrão da atividade enzimática  $\beta$ - glucosidase.

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	t	p-level
Intercept. ( $\alpha$ )	-734,94	344,559	-2,13298	0,035916
$X_3$	7,78	3,507	2,21954	0,029212
$X_4$	5,46	0,566	9,64693	3,7311E-15
$(X_3)^3$	-2,534E-04	1,048E-04	-2,41659	0,017887
$(X_3)^{-1}$	18877,14	9432,446	2,00130	0,048668
$X_1 * (X_2)^{0,5}$	0,15	0,118	1,24066	0,218268
$(X_4)^3$	-0,07096	0,013	-5,43053	0,000001
$(X_3)^2 * (X_4)^{-1}$	7,8764E-05	2,48E-05	3,17505	0,002111

Na Tabela 26 é apresentada a análise de variância que corresponde ao modelo da atividade da  $\beta$ - glucosidase.

**Tabela 26.** Análise de variância para o modelo da atividade enzimática total  $\beta$ - glucosidase.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Fcalculado
Regressão	3464,3680	7	494,91	49,62
Resíduos	817,913	82	9,975	
Total	4282,281	89		

O valor de F tabelado é de 2,12, para significância ( $\alpha < 0,05$ ) (95%), que é muito menor do F calculado, além disso, o  $R^2$  é 80,90% por tanto o modelo satisfaz as condições e representa satisfatoriamente os dados.

## 6. CONCLUSÕES

- Determinou-se que: o bagaço de cana *in natura*, como substrato, o extrato de soja como fonte adicional de carbono e o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, foram um meio de cultura alternativo na produção de celulases, para fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*. O extrato de soja é um material bastante promissor como componente dos meios de cultura para produção de celulases.
- O bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor de severidade alta inibe o crescimento do micro-organismo *Aspergillus niger* e por tanto não permite a produção de celulases, mesmo mudando condições como produto de operações como: moagem, lavagem e ajuste de pH.
- O bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor de baixa severidade, permite o crescimento do *Aspergillus niger*, e a produção de celulases, porém a atividade enzimática FPase do complexo enzimático obtido é inferior ao determinado quando as celulases são produzidas utilizando bagaço de cana *in natura*.
- As condições ótimas de produção de celulases foram determinadas utilizando um DCCR, dando como resultado, um teor de 11 g/L de concentração de extrato de soja; 1,5 g/L de concentração de extrato de levedura e 80% de teor de umidade, para um período de fermentação de 4 dias. Estas condições permitiram atingir valores de atividade enzimática de: 0,774 UI/g.s.s para FPase, 14,41 UI/g.s.s para CMCase e 26,37 UI/g.s.s no caso de  $\beta$ -glucosidase.
- O tempo no qual se apresenta o pico de produção das celulases muda em função da composição do meio de cultura, é assim como foi possível passar de um período determinado inicialmente de 14 dias até 4 dias de tempo de fermentação.
- Ratificando outros estudos foi confirmada a influencia do conteúdo de umidade no cultivo em fermentação em estado sólido, na produção de celulases.

- O modelo matemático determinado a partir dos dados deste estudo permite relacionar as variáveis de concentração de extrato de soja, fonte de carbono adicional; concentração do extrato de levedura, como fonte de nitrogênio e teor de umidade, com a atividade enzimática FPAse, CMCase,  $\beta$ - glucosidase, produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana *in natura* como substrato.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É clara a importância de continuar pesquisando na produção de celulases, utilizando materiais lignocelulósicos, especialmente o bagaço dada a alta disponibilidade desse material no Brasil. É por isso que seria importante em trabalhos futuros considerar os seguintes aspectos:

- ✓ Integrar o processo de produção de celulases utilizando bagaço de cana *in natura* com a hidrólise desse mesmo bagaço. Levando em conta, possibilidade de que se esteja apresentando um pré-tratamento biológico, além da afinidade das enzimas pela biomassa onde elas são produzidas.
- ✓ Aprofundar o estudo e aplicação do extrato de soja como componente no meio de cultura para produção de celulases, sendo avaliado como suplemento em culturas como outros substratos e com outros micro-organismos.
- ✓ Considerando o conceito de biorrefinarias, seria importante avaliar resíduos da agroindústria sucroalcooleira, tais como: palha de cana entre outros, como componentes do meio de cultura para produção de celulases.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIELLO, C., FERRER A., LEDESMA A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulose and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM9414. *Bioresource Technology*, v. 57, p.13-18, 1996.

ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K. e HANAI,S. Identification of aromatic monomers in steam-explode Poplar and their Influence on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.*, 64: 567-570, 1986.

ARANTES V, SADDLER JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3:4, 2010.

BASSO, T.P., GALLO, C.R., BASSO, L.C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana de açúcar e madeira em decomposição. *Pesq. Agropec. Brás.*v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

BETINI, J.H.A., MICHELIN, M., PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.,JORGE, J.A., TERENCEI, H.F., POLIZELI, M.L.T.M. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng*, v.32, p.819-824, 2009.

BHAT, M.K. Research review papers: Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BOISSET, C., FRASCHINI, C., LEIN, M., HENRISSAT, B., CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and environmental microbiology*. v.66, p.1444-1452, 2000.

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 Biochem*, v. 45, p.120-128, 2010.

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. *J. Appl. Microbiol*, v.103, p. 2196-2204, 2007.

CASTRO, A.M. Produção e propriedades de celulase de fungo filamentosos, obtidas a partir de celugnina de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum spp*). Dissertação de mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

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

CGEE. (2005), Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando a substituição parcial de gasolina no mundo, Relatório Final, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE).

CHANDRA, M., KALRA, A., SHARMA, P.K., KUMAR, H., SANGWAN, R.S., Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass & bioenergy*, v. 34, p. 805-811, 2010.

CHAHAL, D.S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 49, p. 205-210, 1985.

CHAUHAN, S.K., SINGH, J.D., TOMAR, N.S. Nutritional changes in soymilk subjected to different physical and chemical treatments. *Journal of Food Science and Technology*, v.35, n. 3, p. 271-273, 1998.

COURI, S., TERZI, S.C., PINTO, G. A. S., FREITAS, S.P., DA COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, v.36, p.255-261, 2000.

DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. *Trends in biotechnology*, Amsterdam, v.18, p.26-31, 2000.

DESCHAMPS, F., GIULIANO, C., ASTHER, M., HUET, M.C., ROUSSOS, S. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnol. Bioeng*, v.27, p.1385-1388, 1985.

FARINAS, C.S., LEMO, V., RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U.F., NETO, V.B., COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólido. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento –EMBRAPA 22*, 2008.

GAMARRA, N.N., VILLENA, G.K., GUTIÉRREZ-CORREA, M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, p. 545-551, 2010.

GAO, J., WENG, H., ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F., XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, v. 99, p.7623-7629, 2008.

GARZÓN, L.L. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana de açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Dissertacao de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

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

GUTIERREZ-CORREA, M., PORTAL, L., MORENO, P. TENDERDY, R.P. Mixed cultura solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 173-178, 1999.

HAN, L., FENG, J., ZHU, C., ZHANG, X. Optimizing cellulose production of *Penicillium waksmanii* F10-2 with response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 16, p. 3879-3886, 2009.

HENRY, R.J., CANNON, D.C., WINKELMAN, J. Clinical chemistry principles and techniques, 2 ed. *Harper and Row Publishers Inc. N.Y.* p. 1288, 1974.

KIM, S.W., KANG, S.W., LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 3634-3637, 1997.

KUBICEK, C.P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.L. E KUBICEK-PRANZ, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v.15, p.90-99, 1993.

LATIFIAN, M.M HAMIDI-ESFAHANI, Z., BARZEEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulose production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, v.98, p. 3634-3637, 2007.

LEVINA, L., FORCHIASSIN, F., VIALE, A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry*, v.40, p. 1381–1387, 2005.

LI Y.H., DING, M., WANG, J., XU, G.J., ZHAO, F. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.70, p. 430-436, 2006.

LYND, L. R, WEIMER, P. J, ZYLWH, V, PRETORIUS I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* v.66, p.506-577, 2002.

LYND, L., ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulose concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. *Biotechnol. Bioeng.* v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MANDELS, M., REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *Journal of Bacteriology*, v. 73, p. 269-278, 1957.

MARTINS, L.F., KOLLING, D., CAMASSOLA, M., DILLON, A.J.P., RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.*, v.99, p.1417-1424, 2008.

MESCHRAM, M., KULKARNI, A., JAYARAMAN A.K., KULKARNI, B.D., LELE S.S. Optimal xylanase production using *Penicillium janthinellum* NCIM 1169: A model based approach. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p348-356, 2008.

MILLER, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D.A., KRIEGER, N., BEROVIC, M. *Solid-State fermentation bioreactors*. Berlin: Springer Germany, p.65-158, 2006.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M. LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* v. 96, 673–686, 2005.

MUKHERJEE, A.K., BORAH, M., RAI, S.K. To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular  $\alpha$ -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of  $\alpha$ -amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, p. 149-156, 2009.

MUTHUVELAYUDHAM, R., VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. *Afr. J. Biotechnol*, v.5, p.1873-1881, 2006.

MYERS, R.H., Classical and Modern Regression with Applications, second ed., PWS-KENT Publishing company, Boston, MA, 1994.

NARASIMHA, G., SRIDEVI, A., VISWANATH, B., CHANDRA, S., REDDY, R. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, v.5,n.5, p. 472-476, 2006.

OLIVEIRA, WILSON ALVES DE. Modelos estatísticos integrados à metodologia Lean Seis Sigma visando ao aumento da produtividade na obtenção do etanol/Wilson Alves de Oliveira. Piracicaba, 2010. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

OLSSON, L., CHRISTENSEN, T.M.I.E., HANSEN, K.P., PALMQVIST, E.A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol*, v.33,p. 612-619, 2003.

OSMUNDSVAG, K., GOKSØYR, J. Cellulases from *Sporocytophaga myxococcoides*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem*, v.57, p.405-409, 1975.

OVEREND, R.P. & CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 321, n.1561, p. 523-536, 1987.

PALONEN, H., TJERNELD, F., ZACCHI, G., TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol*, v.107, p.65-72, 2004.

PARDO, E., MARIN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A.J. Prediction of fungal growth and ochratoxin a production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperatura and wáter activity. *International journal of food Microbiology*, v. 95, p. 79-88, 2004.

PICART, P., DIAZ, P., PASTOR, F.I.J. Cellulases from two *Penicillium sp.* Strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Lett. Appl. Microbiol*, v.45, p.108-113, 2007.

RABELO, SARITA CÂNDIDA. Avaliação de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol de segunda geração, Teses de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.1. n. 3, p.174-188, 1998.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quím. Nova.*, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

SALES, M.R., MOURA, R.B., PORTO, T.S., MACEDO, G.R., PORTO, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. *Pesq. Agropec. Bras.* v.45. n.11, p. 1290-1296, 2010.

SEHNEM, N., BITTENCOURT, L., CAMASSOLA, M., DILLON, A. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.72, p.163-167, 2006.

SEIBOTH, B., HOFFMAN, C.P., KUBICEK C.P. Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the gal7 gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol Genet Genomics*, v.267, p.124-132, 2002.

SENDELIUS, J. Steam pretreatment optimization for sugarcane bagasse in bioethanol production. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Lund University, Sweden, Master of science thesis, 2005.

SINGHANIA, R.R., PATEL, A.K., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Recent advances of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 64, p.175-186, 2004.

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

SUKUMARAN, R.K., SINGHANIA, R.R., MATHEW, G.M., PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renew. Energy*, v.34, p.421-424, 2009.

TOLAN, J.S., FODDY, B. Cellulase from submerged fermentation. *Adv. Biochemical Eng. Biotechnol.* v.65, p. 41-67, 1999.

TOKATLI, F., TARI, C., UNLUTURK, S.M., BAYSAL, N.G. Modeling of polygalacturonase enzyme activity and biomass production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J Ind Microbiol Biotechnol* , v.36, p. 1139-1148, 2009.

UNICA. Produção de Cana de açúcar do Brasil Safra 2008/09. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: Março 2011.

WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G., Techno-Economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*, v.19, n. 4, p. 1109-1117, 2003.

WOOD, T.M., BHAT, K.M. Methods for measuring cellulase activities. In W.A. WOOD, S. T.; KELLOG. *Methods in enzymology*. California: Academic Press, v.160, p. 87-116, 1988.

XIA, L., CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochem.*, v.34, p.909-912, 1999.