

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

PAULA ACIOLY WANDERLEY CAVALCANTE

**PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

São Cristóvão (SE)

2017

PAULA ACIOLY WANDERLEY CAVALCANTE

**PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Ferraz Silva

São Cristóvão (SE)

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C376p Cavalcante, Paula Acioly Wanderley
Produção de celulases utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato na fermentação em estado sólido / Paula Acioly Wanderley Cavalcante; orientador Roberto Rodrigues de Souza. – São Cristóvão, 2017.
107 F.: il.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Engenharia química. 2. Fungos. 3. Fermentação – Estado sólido. I. Souza, Roberto Rodrigues de, orient. II. Título.

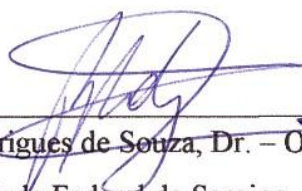
CDU: 66.095

PAULA ACIOLY WANDERLEY CAVALCANTE

**PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe em 22 de fevereiro de 2017.

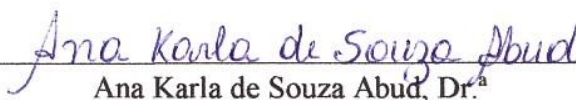
BANCA EXAMINADORA



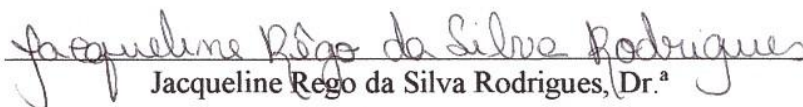
Roberto Rodrigues de Souza, Dr. – Orientador
(Universidade Federal de Sergipe – UFS)



Cristina Ferraz Silva, Dr.^a – Coorientadora
(Universidade Federal de Sergipe – UFS)



Ana Karla de Souza Abud, Dr.^a
(Universidade Federal de Sergipe – UFS)



Jacqueline Rego da Silva Rodrigues, Dr.^a
(Universidade Federal de Sergipe – UFS)

A minha Iaiá, por todo amor, carinho e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e a oportunidade de viver rodeada de pessoas que me amam e que querem o melhor para mim. Além de ter me dado forças para suportar e transpor todos os obstáculos que surgiram ao longo do caminho.

Agradeço a minha avó Lourdes (Iaiá), uma mulher de um caráter admirável e uma grande educadora, que sempre me apoiou e não mediu esforços para que meu futuro fosse brilhante. Realmente, é um exemplo a se seguir. A minha mãe Nara, uma mulher batalhadora, que me deu noção do que é certo e errado, e que nunca deixou que nada compromettesse a minha formação profissional. Ao meu padrasto Denis, que sempre me aconselhou, e também aos meus irmãos Hugo e Igor, obrigada por tudo. Ao meu Tio Paulo, que sempre acompanhou minha jornada de estudos, e que, com certeza, torce por mim. Em suma, agradeço a todos os meus entes queridos, que me deram total apoio e o suporte necessário, quando resolvi mudar de Estado, para lutar pelos meus objetivos. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu namorado Daniel pelo incentivo, pela ajuda e por ter me apoiado durante todo o período do curso. Obrigada por me mostrar que sou capaz de superar minhas inseguranças e me adaptar a mudanças, e também por me amparar nas horas de angústia.

Aos meus sogros, Daniel e Cléa Costa, pelas visitas, pelo apoio e pela preocupação com meu bem-estar durante a minha estada em Aracaju/SE.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza, pela paciência e pelo auxílio necessário para a conclusão deste trabalho. Também o agradeço pela grande e importante ajuda em um momento de adversidade. Professor, obrigada por ser um orientador compreensivo, prestativo e por toda confiança em meu potencial.

A minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Cristina Ferraz Silva, por ter se mostrado disponível para qualquer ajuda que eu precisasse.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Ana Karla de Souza Abud, que me ajudou e me apoiou durante toda a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo que fez por mim, por ter me auxiliado nos momentos de dificuldade, por todas as orientações e conversas.

Agradeço aos amigos, Rodrigo, Layse e Gerlan, que me apoiaram mesmo com a distância, seja em momentos alegres ou nos mais tristes, sempre dispostos a proferir palavras de conforto.

Aos amigos de sempre e para sempre, Ruth, Andressa, Camila, Raul e Anderson, por todas as conversas e por todos os momentos de descontração.

Ao Cadu, por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas e pelos sábios conselhos.

Aos colegas de curso, pelas madrugadas de estudos e por todas as experiências compartilhadas. Em especial a Jéssica, que esteve ao meu lado em todos os momentos, com certeza uma amiga para a vida toda, e ao Cliff, que suportou as minhas reclamações e me apoiou nos momentos difíceis. Cliff, obrigada pela minha novela mexicana.

Aos colegas do LABAM, por toda ajuda concedida. Agradeço ao Diego, por todo auxílio com a elaboração do planejamento experimental, por ter me apresentado a função de deseabilidade, que foi muito importante para os meus dados, e por todas as orientações. Também sou grata a Anita, por todas as divertidas conversas e pelos momentos de orientação.

Aos professores da Pós-graduação em Engenharia Química, que foram cruciais para o meu desenvolvimento intelectual. Muito obrigada a todos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro que possibilitou a concretização deste trabalho.

RESUMO

A biomassa vegetal é utilizada como substrato na produção de celulases, pois a celulose presente em sua estrutura pode ser convertida a carboidratos, por meio de processos fermentativos, a combustíveis e outros produtos de alto valor agregado. Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial dos resíduos de folhas, bagaço de cana e sabugo de milho na produção de celulases a partir do fungo *A. niger* por cultivo em estado sólido, além de avaliar a influência da concentração final do inóculo, pH inicial, temperatura e umidade nas atividades enzimáticas e específicas da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase). O processo fermentativo foi realizado com três diferentes resíduos em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 7,5 g de substrato com 55% de umidade. Os frascos foram incubados a 30 °C durante 120 h. Foi realizado um planejamento fatorial 2⁴, com três repetições no ponto central, para a otimização da produção de celulases com os resíduos de folhas, a qual foi maximizada a partir da função de desejabilidade. Nessa etapa, as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 3,5 g de substrato, incubados durante 192 h. O perfil cinético foi delineado a partir das atividades enzimáticas e específicas da celulase total e da endoglucanase, dos açúcares redutores totais (ART) e do crescimento microbiano. Para as folhas, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas em 48 e 72 h, com $0,78 \pm 0,00$ U/g para FPase e $1,53 \pm 0,01$ U/g para CMCase, respectivamente. No caso do bagaço de cana, a FPase atingiu maior atividade em 120 h ($1,09 \pm 0,01$ U/g), enquanto a CMCase foi maior em 72 h ($2,40 \pm 0,02$ U/g). O sabugo de milho exibiu maior atividade em 120 h para a FPase ($1,06 \pm 0,01$ U/g) e em 96 h para CMCase ($3,37 \pm 0,02$ U/g). As atividades específicas dos resíduos de folhas apresentaram um pico máximo em 48 h ($1,29 \pm 0,01$ U/mg_{proteínas}) para a FPase e em 72h ($1,77 \pm 0,01$ U/mg_{proteínas}) para a CMCase. Para o bagaço de cana, a atividade específica máxima da FPase foi em 120 h ($1,40 \pm 0,01$ U/mg_{proteínas}) e da CMCase em 96 h ($3,44 \pm 0,04$ U/mg_{proteínas}). O sabugo de milho apresentou maiores atividades específicas em 72 h, tanto para a FPase ($1,95 \pm 0,35$ U/mg_{proteínas}) quanto para a CMCase ($5,84 \pm 0,06$ U/mg_{proteínas}). A partir da otimização do processo, os valores ótimos para as atividades enzimáticas foram de 0,84 U/g para a FPase e 1,51 U/g para a CMCase, com desejabilidade global de 0,96. Já os pontos ótimos das atividades específicas foram de 4,94 U/mg_{proteínas} para a FPase e 4,89 U/mg_{proteínas} para CMCase, com desejabilidade global de 0,63. Os resultados indicaram a capacidade do fungo de produzir celulases nos três resíduos e em curtos tempos de fermentação, principalmente para as folhas. As variáveis estudadas influenciaram as atividades enzimáticas e específicas da FPase e da CMCase, pois os seus efeitos individuais ou em conjunto interferiram no crescimento microbiano e no consumo do substrato, fornecendo uma boa produção de enzimas.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger*; fermentação em estado sólido; celulase.

ABSTRACT

Vegetable biomass is utilized as a substrate for the production of cellulases since cellulose present in its structure can be converted to a carbohydrate, through fermentation processes, fuel, and other products with high added value. The objective of this work was to study the potential of leaves residues, sugarcane bagasse and corn cob in the production of cellulases from the *A. niger* fungus by solid-state cultivation. In addition to evaluating an influence of the final concentration of inoculum, initial pH, temperature and moisture in enzymatic and specific activities of total cellulase (FPase) and endoglucanase (CMCase). The fermentation process was carried out with three different residues in Erlenmeyer of 250 mL containing 7,5 g of the substrate with 55% of moisture. The flasks were incubated at 30 °C for 120 h. A 2⁴ factorial design was made with three replications at the central point for the optimization of the cellulase production with the leaves residues, which was maximized from the desirability function. At this stage, the fermentations were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks with 3,5 g of the substrate and incubated for 192 h. The kinetic profile was delineated from the enzymatic and specific activities of total cellulase and endoglucanase, total reducing sugars and microbial growth. The highest enzymatic concentrations for leaves were obtained at 48 and 72 h with $0,78 \pm 0,00$ U/g for FPase and $1,53 \pm 0,01$ U/g for CMCase, respectively. For sugarcane bagasse, FPase reached a higher activity in 120 h ($1,09 \pm 0,01$ U/g) whereas the CMCase was higher at 72 h ($2,40 \pm 0,02$ U/g). The corn cob showed higher activity at 120 h for FPase ($1,06 \pm 0,01$ U/g) and at 96 h for CMCase ($3,37 \pm 0,02$ U/g). The specific activities of the leaves residues showed a peak at 48 h ($1,29 \pm 0,01$ U/mg_{proteins}) for FPase and at 72h ($1,77 \pm 0,01$ U/mg_{proteins}) for CMCase. The maximum specific activity of FPase for sugarcane bagasse was 120 h ($1,40 \pm 0,01$ U/mg_{proteins}) and CMCase at 96 h ($3,44 \pm 0,04$ U/mg_{proteins}). Corn cob presented higher specific activities at 72 h for both FPase ($1,95 \pm 0,35$ U/mg_{proteins}) and CMCase ($5,84 \pm 0,06$ U/mg_{proteins}). From the optimization process, the optimal values for enzyme activities were 0,84 U/g to FPase and 1,51 U/g for the CMCase with the overall desirability of 0,96. The optimal points of the specific activities were 4,94 U/mg_{proteins} for FPase and 4,89 U/mg_{proteins} for CMCase with a global desirability of 0,63. The results indicated the capacity of the fungus to produce cellulases in three residues and in short fermentation times, mainly for the leaves. Studied variables influenced the enzymatic and specific activities of FPase and CMCase since their individual or aggregate effects interfered in the microbial growth and the consumption of the substrate, providing a good production of enzymes.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*; solid-state fermentation; cellulase.

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> – Métodos de pré-tratamento para as matérias-primas lignocelulósicas antes da hidrólise enzimática da celulose	19
<i>Tabela 2</i> – Composição de alguns materiais lignocelulósicos	20
<i>Tabela 3</i> – Microrganismos para a produção de enzimas celulolíticas	27
<i>Tabela 4</i> – Exemplos de produtos gerados a partir do fungo <i>Aspergillus</i>	30
<i>Tabela 5</i> – Comparação entre a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido.....	33
<i>Tabela 6</i> – Temperatura ótima para a produção de enzimas celulolíticas	38
<i>Tabela 7</i> – Classificação das enzimas usadas nos processos industriais	44
<i>Tabela 8</i> – Algumas aplicações das celulasas nas indústrias	47
<i>Tabela 9</i> – Comparação da solução nutriente entre alguns autores.....	56
<i>Tabela 10</i> – Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da FPase	60
<i>Tabela 11</i> – Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da CMCase.....	61
<i>Tabela 12</i> – Matriz do planejamento fatorial ($2^4 + 3$) para a produção de celulasas.....	63
<i>Tabela 13</i> – Valores mais desejáveis das atividades FPase e CMCase otimizados a partir da função de desejabilidade	74
<i>Tabela 14</i> – Valores mais desejáveis das atividades específicas da FPase e da CMCase otimizados a partir da função de desejabilidade	75

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> – Estrutura molecular da celulose	21
<i>Figura 2</i> – Estrutura molecular da hemicelulose (xilana).....	22
<i>Figura 3</i> – Unidades estruturais da lignina	22
<i>Figura 4</i> – Estrutura do fungo <i>Aspergillus niger</i>	29
<i>Figura 5</i> – Diagrama do processo de produção de enzimas celulolíticas	52
<i>Figura 6</i> – Fungo <i>Aspergillus niger</i>	53
<i>Figura 7</i> – Curvas de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> , teores de açúcares redutores totais, atividades da celulose total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) em função do tempo de fermentação, utilizando resíduos de folhas como fonte de carbono	66
<i>Figura 8</i> – Curvas de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> , teores de açúcares redutores totais, atividades da celulose total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) em função do tempo de fermentação, utilizando bagaço de cana como fonte de carbono	68
<i>Figura 9</i> – Curvas de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> , teores de açúcares redutores totais, atividades da celulose total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) em função do tempo de fermentação, utilizando sabugo de milho como fonte de carbono	70
<i>Figura 10</i> – Perfis de atividade específica das enzimas FPase produzidas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> , utilizando resíduos de folhas, bagaço de cana e sabugo de milho como fonte de carbono	71
<i>Figura 11</i> – Perfis de atividade específica das enzimas CMCase produzidas pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> , utilizando resíduos de folhas, bagaço de cana e sabugo de milho como fonte de carbono	72
<i>Figura 12</i> – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade da FPase para o fungo <i>Aspergillus niger</i> utilizando resíduos de folhas como substrato.....	76

<i>Figura 13</i> – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade da CMCase para o fungo <i>Aspergillus niger</i> utilizando resíduos de folhas como substrato	77
<i>Figura 14</i> – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade específica da FPase para o fungo <i>Aspergillus niger</i> utilizando resíduos de folhas como substrato	78
<i>Figura 15</i> – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade específica da CMCase para o fungo <i>Aspergillus niger</i> utilizando resíduos de folhas como substrato	79
<i>Figura 16</i> – Curvas de contorno com a influência das variáveis independentes nas atividades da FPase e da CMCase a partir da otimização com a função de desejabilidade	80
<i>Figura 17</i> – Perfis da função de desejabilidade com os valores otimizados para as atividades da FPase e da CMCase	84
<i>Figura 18</i> – Curvas de contorno com a influência das variáveis independentes nas atividades específicas da FPase e da CMCase a partir da otimização com a função de desejabilidade ...	85
<i>Figura 19</i> – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes no teor de proteínas totais para o fungo <i>Aspergillus niger</i> utilizando resíduos de folhas como substrato.....	86
<i>Figura 20</i> – Perfis da função de desejabilidade com os valores otimizados para as atividades específica da FPase e da CMCase.....	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	18
2.1.1	Celulose	20
2.1.2	Hemicelulose	21
2.1.3	Lignina	22
2.1.4	Resíduos agroindustriais e produção de biocombustíveis	23
2.2	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS.....	26
2.2.1	Fungos filamentosos	28
2.2.2	O gênero <i>Aspergillus</i>	28
2.3	PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DE ENZIMAS.....	31
2.3.1	Fermentação submersa	34
2.3.2	Fermentação em estado sólido	35
2.4	FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .	37
2.4.1	Temperatura	37
2.4.2	Umidade e atividade da água	38
2.4.3	pH	39
2.4.4	Substrato e concentração de nutrientes	39
2.4.5	Tamanho da partícula	40
2.4.6	Aeração e agitação	41
2.4.7	Outros fatores	42
2.5	ENZIMAS	43
2.5.1	Celulase	45

2.6	MERCADO DE ENZIMAS	48
2.7	PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1	SUBSTRATOS.....	52
3.2	MICROORGANISMOS	53
3.3	PREPARO DO INÓCULO	53
3.3.1	Contagem de esporos	54
3.3.2	Crescimento celular	54
3.4	PROCESSO FERMENTATIVO	55
3.4.1	Solução nutriente	55
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	55
3.6	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	57
3.6.1	Atividade enzimática total em papel filtro (FPase)	57
3.6.2	Atividade enzimática da endo- β -1,4-glucanase (CMCase)	58
3.6.3	Curva padrão de glicose	60
3.7	QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	61
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	62
3.9	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS	62
3.9.1	Planejamento fatorial completo ($2^4 + 3$)	62
3.9.2	Função de desejabilidade	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	65
4.1.1	Resíduos de folhas	65

4.1.2	Bagaço de cana-de-açúcar	67
4.1.3	Sabugo de milho	69
4.1.4	Comparação entre os substratos a partir das suas atividades específicas	70
4.2	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES	73
4.2.1	Análise estatística dos valores otimizados pela função de desejabilidade	76
4.2.2	Influência das variáveis independentes na atividade enzimática	79
4.2.3	Influência das variáveis independentes na atividade específica	84
5	CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Recurso orgânico renovável e abundante, a biomassa lignocelulósica tem como componentes principais os biopolímeros celulose, hemicelulose e lignina. Os resíduos agroindustriais, tais como palha de milho, palha de trigo e bagaço de cana são exemplos deste tipo de material, cujo potencial consiste na sua conversão em vários produtos de maior valor agregado através da hidrólise da lignocelulose em açúcares solúveis quando, então, os açúcares são metabolizados por vias naturais ou modificados de acordo com a sua finalidade. No entanto, a biomassa lignocelulósica é resistente à biodegradação pelos microrganismos devido as suas propriedades estruturais e químicas, sendo fundamental o uso de enzimas (BISWAS *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2014).

Dessa forma, a eficiência da bioconversão desse material em açúcares fermentescíveis depende da facilidade com que os microrganismos agem na estrutura da celulose. Os fatores que dificultam essa acessibilidade são divididos em diretos, os quais se referem à área superficial acessível da celulose, e indiretos, relativos a sua composição química, tais como o conteúdo de lignina e hemicelulose, já que atuam como uma barreira física, e os relacionados a sua estrutura, ou seja, o tamanho das partículas e a porosidade (MENG e RAGAUSKAS, 2014).

O bagaço de cana-de-açúcar é o principal subproduto da indústria de cana-de-açúcar, sendo composto por cerca de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Em virtude da sua abundante disponibilidade, pode ser considerado como um substrato ideal para a produção de produtos de valor agregado. Vários processos utilizam o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima, a exemplo da geração de eletricidade e da produção de celulose e papel, além dos produtos baseados na fermentação, tais como enzimas, bioetanol, ácidos orgânicos, alcalóides, ração para animais enriquecida com proteínas, antibióticos, entre outros. Um dos processos utilizados para essas bioconversões é a fermentação em estado sólido (PANDEY *et al.*, 2000; SINDHU *et al.*, 2016).

No Brasil, a quantidade de cana-de-açúcar processada pelas unidades produtoras na safra 2015/2016 totalizou 666.824 milhões de toneladas, sendo 49.115 milhões de toneladas na região norte-nordeste (UNICA, 2017). O excedente de bagaço disponível para a conversão da biomassa em açúcares redutores e produção de etanol, além de outros usos, situa-se entre 7 e 10% do bagaço total, ou seja, aproximadamente 280 kg de bagaço por tonelada de cana-de-açúcar (SOARES e ROSSELL, 2004).

Outro material que pode ser aproveitado como substrato em bioconversões é o sabugo de milho, resíduo da produção de milho. Além de ser utilizado na produção de celulases, uma vez que apresenta um elevado teor de celulose, assim como o bagaço de cana, também pode ser uma fonte significativa de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis devido ao seu baixo teor de lignina ($\approx 10\%$) e alto teor de carboidratos ($\approx 70\%$), apresentando baixa recalcitrância para a enzima e a atividade microbiana (WANG *et al.*, 2011; HARINI e KUMARESAN, 2014). Os dados do décimo segundo levantamento da produção (safra 2015/2016) mostraram que foram produzidas 66.979,5 milhões de toneladas de milho, juntando todas as regiões brasileiras (CONAB, 2016), onde para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são formados por sabugo (ZIGLIO *et al.*, 2007).

Os resíduos de plantas, como as folhas, também podem ser empregados na produção de celulases. Folhas de palmeira, por exemplo, podem ser uma boa fonte de celulose e outros fatores de crescimento para a produção de celulase e, em uma base peso-substrato, parecem ser melhores que a celulose pura (ABULNAJA e ABOU-ZEID, 1993). Além disso, esses resíduos são abundantes e o seu uso como substrato pode diminuir os possíveis impactos negativos ao meio ambiente e potencializar a redução de custos do processo.

O interesse em estudar a produção de enzimas se deve ao fato que, em comparação aos catalisadores químicos, as enzimas são mais eficientes, pois oferecem processos muito mais competitivos. Atualmente, o número de aplicações industriais das enzimas é elevado, principalmente devido aos avanços na tecnologia de engenharia de proteínas e das necessidades econômicas e ambientais. A celulase, formada por três componentes enzimáticos, endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, apresenta uma vasta utilização nas indústrias de biocombustíveis, de celulose e papel, de detergente e têxtil. Esta enzima é capaz de despolimerizar as cadeias de celulose no substrato lignocelulósico para produzir menores unidades de açúcar, que consistem em celobiose e glicose (YOON *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2015).

A celulase pode ser produzida por diversos microrganismos, como fungos e bactérias, sendo dada ênfase à produção pelos fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Embora também seja produzida por fermentação submersa, a maioria dos estudos relatam sua produção pela fermentação em estado sólido, já que apresenta um processamento mais simples e com baixo risco de contaminação (CASTRO e SATO, 2015).

A fermentação em estado sólido (FES) envolve a matriz sólida (substrato), que pode ser a fonte de nutrientes ou apenas um suporte impregnado pelos nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos. Trata-se de um processo realizado na ausência ou quase

ausência de água livre. Para obter fermentações com altos rendimentos, deve-se levar em consideração a relação entre a fisiologia dos microrganismos e os fatores físico-químicos do processo. Estes fatores incluem a temperatura, o pH, a aeração, a atividade de água e a umidade, a natureza do substrato sólido, entre outros (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A finalidade deste trabalho foi estudar a utilização dos resíduos lignocelulósicos, tais como, bagaço de cana, resíduos de folhas e sabugo de milho, na produção de celulases a partir do fungo filamentoso *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. Também se buscou avaliar a influência da concentração final do inóculo, pH inicial, temperatura e umidade do substrato nas atividades enzimática e específica da celulase total e da endoglucanase. Para alcançar esta finalidade, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o potencial dos resíduos lignocelulósicos na produção da celulase total (FPase) e endoglucanase (CMCase);
- Determinar as atividades enzimáticas da celulase total e da endoglucanase no extrato enzimático proveniente da fermentação em estado sólido;
- Determinar as atividades específicas da celulase total e da endoglucanase a partir do teor de proteínas totais do extrato enzimático;
- Analisar o consumo do substrato pelo microrganismo;
- Identificar quais as variáveis que influenciam as atividades enzimática e específica da celulase total e da endoglucanase por meio do planejamento fatorial no melhor resíduo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A parede celular das plantas é uma estrutura caracterizada por uma malha de polissacarídeos, proteínas estruturais e compostos fenólicos, que tem a função de proteger a célula vegetal contra tensões externas, além de fornecer suporte estrutural e mecânico para os tecidos da planta. Apesar disso, sua estrutura, bem como sua composição, pode variar entre as diversas espécies de plantas, tecidos e células e, até mesmo, nas suas paredes primária e secundária. A biomassa lignocelulósica, derivada das paredes celulares, é uma rica fonte de biopolímeros, produtos químicos e açúcares, servindo como inspiração para as indústrias de biotecnologia, biocombustíveis e biomateriais, já que é um material amplamente disponível e barato (WEI *et al.*, 2009; GUERRIERO *et al.*, 2016).

O principal componente da biomassa é a lignocelulose, que compreende cerca da metade da matéria vegetal produzida por fotossíntese, sendo o recurso orgânico renovável mais abundante no solo. As plantas desenvolveram a capacidade de sintetizar a lignocelulose como um meio para resistir ao estresse biótico e abiótico e, com isso, permitir que a parede celular seja reforçada contra patógenos, mantendo sua arquitetura dinâmica. Isto foi possível devido a sua composição heterogênea, que apresenta uma variedade de ligações químicas entre diferentes polímeros (SÁNCHEZ, 2009; DAMM *et al.*, 2016).

Normalmente, a parede celular vegetal é composta por celulose (20 – 50%), hemicelulose (15 – 35%) e lignina (10 – 30%). A celulose encontra-se cercada pelos outros dois polímeros, sendo a lignina o polímero que une o conjunto. A porcentagem de celulose e hemicelulose na biomassa lignocelulósica corresponde a carboidratos, os quais pode ser convertidos em combustíveis e produtos químicos por fermentação. A hidrólise da lignocelulose, por exemplo, libera açúcares redutores, que são usados para a produção de biogás, bioetanol, ácidos orgânicos, enzimas e bio sorventes (KIM, 2013; MORRELL, 2014; PAYNE *et al.*, 2015; RAVINDRAN e JAISWAL, 2016).

Alguns fatores afetam a conversão biológica da biomassa e estes incluem barreiras químicas e físicas que inibem a hidrólise enzimática. Os carboidratos, em especial a celulose da planta, têm uma estrutura recalcitrante, altamente cristalina, que dificulta bastante a sua hidrólise enzimática. A presença de lignina é outro fator que dificulta a reação enzimática e a fermentação microbiana. Logo, reduzir o conteúdo de lignina é desejável durante o pré-

tratamento, que tem como objetivo tornar a biomassa lignocelulósica passível de reações enzimáticas (sacarificação), com custo de processamento razoável. Alguns resultados, frequentemente observados do pré-tratamento incluem: (1) a diminuição do teor de lignina, hemicelulose e outros componentes; (2) o aumento da área de superfície, porosidade e tamanho do poro; (3) a diminuição da cristalinidade da biomassa. Estes tratamentos proporcionam melhores taxas e rendimentos de hidrólise (KIM, 2013; KIM *et al.*, 2016). Algumas técnicas de pré-tratamento estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Métodos de pré-tratamento para as matérias-primas lignocelulósicas antes da hidrólise enzimática da celulose

Método de pré-tratamento	Principais efeitos	Produtos químicos	Formação de subproduto
Ácido-base	Hidrólise de hemiceluloses a monossacarídeos	Envolve catalisadores, como: H_2SO_4 , SO_2 , HCl , H_3PO_4	Ácidos carboxílicos alifáticos, compostos fenólicos, furanos, entre outros
Hidrotermal	Solubilização de hemiceluloses sem hidrólise completa	Sem aditivos	Ácido acético, pequenas quantidades de aldeídos furânicos
Alcalino	Remoção da lignina e uma parte menor de hemiceluloses	Envolve álcalis, tais como: $NaOH$, $Ca(OH)_2$, NH_3	Ácido acético, hidroxiácidos, ácidos dicarboxílicos, compostos fenólicos
Oxidativo	Remoção de lignina e parte das hemiceluloses	Envolve oxidantes, como: H_2O_2 e O_2 (condições alcalinas), e O_3	Ácidos aldônico, aldárico, furoico, fenólicos, acético
Processos de polpação química	Métodos que visam lignina e, até certo ponto, hemiceluloses	Polpação Kraft, sulfito, soda, organossolve	Ácidos alifáticos
Solventes alternativos	Dissolução de componentes lignocelulósicos específicos ou de toda biomassa	Líquidos iônicos	Dependente do solvente e condições

Fonte: Adaptado de Jönsson e Martín (2016)

Muitas indústrias geram resíduos vegetais como subprodutos, os quais apresentam celulose, hemicelulose e lignina em sua composição, como: resíduos de trigo e arroz, cascas e bagaço de frutas e vegetais, resíduos de soja e algodão, resíduos de pão, grãos de cervejaria, entre outros (EL-BAKRY *et al.*, 2015). Estes materiais são bastantes estudados por

pesquisadores, sendo aproveitados como substrato na produção de enzimas celulolíticas. Ressaltam-se trabalhos com farelo de trigo e palha de arroz (NARRA *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2013), bagaço de cana (CUNHA *et al.*, 2012a; GASPAROTTO *et al.*, 2015), sabugo de milho, grama, cascas de abacaxi e cascas de batata (BANSAL *et al.*, 2012), resíduos de coco (MRUDULA e MURUGAMMAL, 2011), entre outros. Na Tabela 2, são apresentados algumas biomassas com a sua composição.

Tabela 2 – Composição de alguns materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico	Composição (%)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Fibra de coco	36 – 43	0,15 – 0,25	41 – 45	VARMA <i>et al.</i> (1984)
Gramíneas	30 – 50	10 – 40	5 – 20	McKENDRY (2002)
Casca de nozes	25 – 30	25 – 30	30 – 40	SUN e CHENG (2002)
Jornal	40 – 55	25 – 40	18 – 30	SUN e CHENG (2002)
Folhas	15 – 20	80 – 85	0,00	HOWARD <i>et al.</i> (2003)
Papel	85 – 99	0,00	0 – 15	HOWARD <i>et al.</i> (2003)
Sabugo de milho	45,0	35,0	15,0	HOWARD <i>et al.</i> (2003)
Fibra de milho	15,0	35,0	8,00	SAHA (2003)
Palha de arroz	35,0	25,0	12,0	SAHA (2003)
Palha de trigo	30,0	50,0	20,0	SAHA (2003)
Casca de banana	13,2	14,8	14,0	MONSALVE G. <i>et al.</i> (2006)
Palha de milho	40,0	25,0	17,0	WANG <i>et al.</i> (2013)
Bagaço de cana	45,4	28,7	23,4	TYE <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Autora (2016)

2.1.1 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um polissacarídeo linear, semi-flexível, unido por ligações β-1,4-glicosídicas (Figura 1) e, por apresentar moléculas de cadeias longas, é auto-organizado em estruturas cristalinas e não cristalinas (amorfos). Isto ocorre quando a mesma é biossintetizada em plantas ou outros organismos ou quando é coagulada, ou regenerada a partir de uma solução (BUDTOVA e NAVARD, 2015; GUERRIERO *et al.*, 2016).

Suas cadeias são embaladas em microfibrilas, isto é, em polímeros não-ramificados, com cerca de 15.000 moléculas de glicose anidra, que se organizam em ligações β-1,4, as quais

são estabilizadas por ligações de hidrogênio. Estas fibrilas são ligadas umas às outras por hemiceluloses e por polímeros amorfos de diferentes açúcares, além de outros polímeros, tais como a pectina, e são cobertas por lignina. As regiões cristalinas de celulose são mais resistentes à biodegradação do que as partes amorfas, já que são empacotadas com tanta força que moléculas pequenas, como a água, não conseguem entrar em sua estrutura complexa. A completa despolimerização da celulose produz apenas um produto, a glicose (STICKLEN, 2008; HORN *et al.*, 2012; MENON e RAO, 2012).

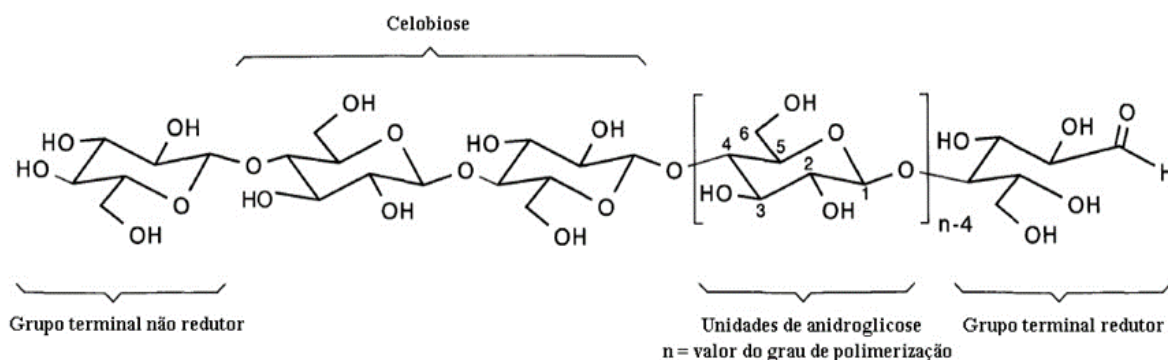


Figura 1 – Estrutura molecular da celulose

Fonte: Adaptado de Klemm *et al.* (1998)

2.1.2 Hemicelulose

Depois da celulose, as hemiceluloses são os polissacarídeos mais abundantes na parede celular das plantas. Entretanto, diferente da celulose, que é um homopolissacarídeo, a hemicelulose é um heteropolissacarídeo de estrutura complexa, composta por seis açúcares principais: glicose, xilose, manose, galactose, arabinose e ramnose, e pequenas quantidades de ácidos glicurônico e galacturônico, dependendo da fonte. Destaca-se a xilose como o principal componente em um grande número de espécies de biomassa lignocelulósica (PENG *et al.*, 2012; KIM, 2013; JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

Geralmente, as hemiceluloses são ligadas a outros componentes da parede celular, como celulose, proteínas, lignina e compostos fenólicos, por ligações covalentes e de hidrogênio, e por interações hidrofóbicas e iônicas. Ainda apresentam baixo grau de polimerização e são menos ordenadas, ou seja, mais amorfas do que as celuloses. Em consequência, são mais fáceis de serem degradadas, condição que não impede que as hemiceluloses passem por um pré-tratamento antes da sua hidrólise (PENG *et al.*, 2012; KIM, 2013). Sua degradação produz uma mistura de diferentes açúcares, que pode conter quantidades substanciais de pentoses, difíceis de fermentar por leveduras tradicionais. As xilanas são o tipo

mais abundante de hemiceluloses, sendo o componente mais comum da grama e da madeira (MALHERBE e CLOETE, 2002; SAHA, 2003; HORN *et al.*, 2012). As hemiceluloses apresentam uma estrutura altamente ramificada, como mostrado na Figura 2.

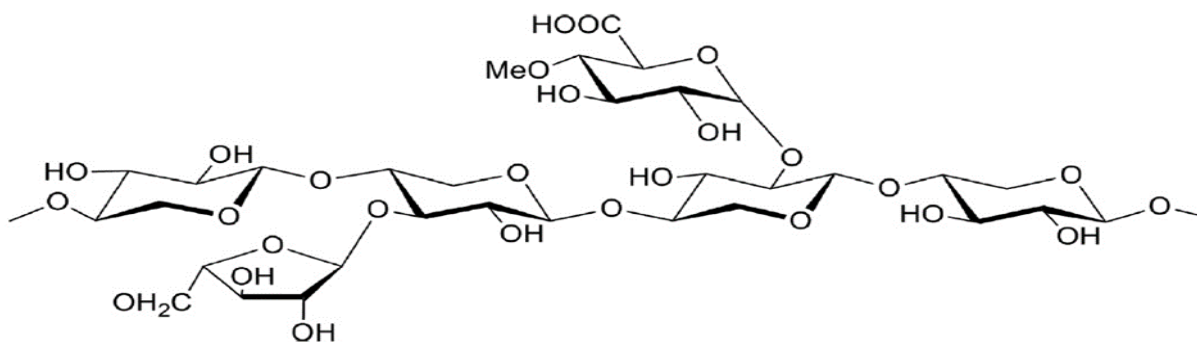


Figura 2 – Estrutura molecular da hemicelulose (xilana)

Fonte: Chen *et al.* (2014)

2.1.3 Lignina

A lignina é um dos biopolímeros aromáticos mais abundantes e um dos principais componentes da parede celular das plantas. Ela é formada pela ligação oxidativa de monolignóis (derivados do álcool hidroxicinamil), que são sintetizados na via dos fenilpropanóides. Os principais monolignóis são os álcoois coniferil, sinapil e *p*-cumaril, formados por unidades monoméricas de guaiacil (G), siringil (S), e *p*-hidroxifenil (H), respectivamente (Figura 3) (DIXON *et al.*, 2001; EUDES *et al.*, 2014; CHATTERJEE e SAITO, 2015).

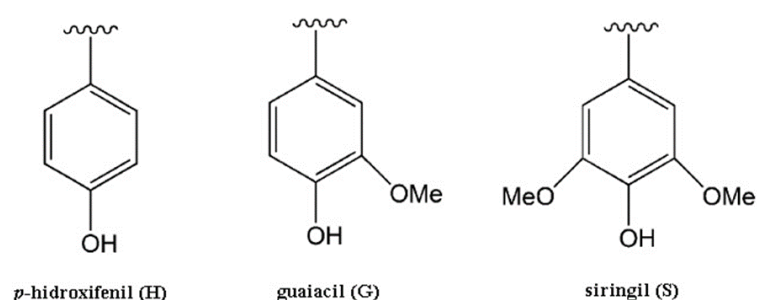


Figura 3 – Unidades estruturais da lignina

Fonte: Adaptado de Chatterjee e Saito (2015)

Estes três monolignóis representam a maior parte das unidades de repetição, que formam as moléculas deste polímero. Todavia, outros monolignóis podem estar presentes, em pequenas quantidades, na macromolécula de lignina. A proporção depende do material da planta, além de haver vários padrões de interligação possíveis entre as unidades individuais, adicionando uma complexidade para a molécula final (NORGREN e EDLUND, 2014).

Além disso, a lignina está ligada covalentemente à hemicelulose e, por esta razão, fornece resistência e rigidez à parede celular do material vegetal, propiciando uma difícil degradação. Também, mune o sistema vascular com a hidrofobia necessária para o transporte de água e solutos (VANHOLME *et al.*, 2008).

2.1.4 Resíduos agroindustriais e produção de biocombustíveis

Os resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, sabugo de milho, palha de arroz, gramíneas, cascas de frutas e vegetais são abundantes no meio ambiente, e seu descarte inadequado aumenta a carga biodegradável, levando à poluição ambiental. Portanto, a utilização adequada desses resíduos não só diminui os impactos ambientais negativos, impedindo a sua acumulação e seu potencial de contaminação de rios e águas subterrâneas, mas também os transforma em matérias-primas úteis para a obtenção de produtos de valor agregado, com importância industrial e comercial. Estes resíduos se destacam como substratos potenciais para a produção de combustíveis renováveis, produtos químicos e energia. Sua utilização é vantajosa, visto que sua disponibilidade não é prejudicada pela exigência de terras aráveis para a produção de alimentos para consumo humano e animal (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010; BHOSALE *et al.*, 2011). O bagaço de cana e o sabugo de milho são brevemente discutidos neste tópico.

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi cultivada inicialmente no sudeste da Ásia e na Índia Ocidental. Em seguida, seu cultivo se estendeu a todas as regiões tropicais e subtropicais, sendo cultivada em cerca de 200 países, com diferenças de área e produtividade. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e contribui com 25% da produção total (SINDHU *et al.*, 2016).

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos maiores subprodutos agroindustriais celulósicos, obtido após a trituração e extração do caldo da cana. A maior parte deste resíduo é utilizada pelas fábricas de açúcar como combustível para as caldeiras. Este resíduo é considerado um excelente substrato para a produção de vários bioquímicos e enzimas por fermentação, e seu alto teor de celulose e hemicelulose viabiliza sua utilização na produção de bioetanol e outros combustíveis. A escolha do bagaço de cana como matéria-prima ideal na produção de novos produtos é devido ao seu baixo custo de fabricação e por fornecer produtos de alta qualidade mais sustentáveis. É considerado ideal em virtude da sua facilidade de obtenção, dada a extensa cultura de cana-de-açúcar, tornando sua oferta constante e estável, além de ser biodegradável, reciclável e reutilizável (PANDEY *et al.*, 2000; LOH *et al.*, 2013; SINDHU *et al.*, 2016).

A produção de etanol de segunda geração a partir da cana-de-açúcar é favorecida no Brasil, já que o processo pode ser anexado às unidades de etanol/açúcar existentes, requerendo menor investimento, infraestrutura, logística e fornecimento de energia. Além disso, como estariam disponíveis para a produção deste etanol 12% de bagaço e 50% de palha (folhas), considerando o teor médio de celulose da biomassa de 30%, seria produzida uma quantidade razoável de biocombustível (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010).

O milho (*Zea mays* L.) é uma das plantas mais cultivadas, uma vez que seu cultivo é possível desde o Equador até o limite das terras temperadas, e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3.600 m. Essa adaptabilidade, representada por genótipos variados, é paralela à variedade de sua utilização como alimento, forragem ou na indústria. No Brasil, a cultura do milho encontra-se amplamente disseminada, em virtude da sua multiplicidade de usos na propriedade rural e da tradição de cultivo desse cereal pelos agricultores. Geralmente, é utilizado como alimento ou ração, produzindo cerca de 46 milhões de toneladas de resíduos, entre palha, caules e folhas. Mesmo considerando que 50% da quantidade total de resíduos lignocelulósicos devem ser deixados no campo, mais de 4,4 bilhões de litros de etanol celulósico podem ser produzidos a partir da biomassa excedente (MAGALHÃES *et al.*, 2002; FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010).

O sabugo de milho é o núcleo central de uma espiga de milho, sendo um resíduo agroindustrial abundante em muitas regiões produtoras de milho no mundo. Trata-se de um substrato lignocelulósico usado, principalmente, como combustível em fornos ou como estrume no solo. Porém, a biotecnologia moderna permite a sua utilização como matéria-prima na produção de produtos químicos e combustíveis a partir de microrganismos (LATIF e RAJOKA, 2001; WANG *et al.*, 2012).

Os biocombustíveis são uma alternativa atraente aos combustíveis derivados do petróleo, já que podem ser usados como combustíveis de transporte com pouca mudança em comparação com as tecnologias atuais, e têm um potencial significativo para melhorar a sustentabilidade e reduzir as emissões de gases do efeito estufa. Os biocombustíveis líquidos (etanol, biodiesel) ou gasosos (metano, hidrogênio) são derivados de materiais orgânicos como amido, sementes oleaginosas e gorduras animais, ou celulose (CARERE *et al.*, 2008).

A conversão de celulose em etanol consiste na hidrólise da celulose e na fermentação dos hidrolisados em etanol. As fibras de celulose são agrupadas em uma matriz de pectina, lignina e hemicelulose, unida por ligações covalentes. Cada macrofibra de celulose é composta por feixes cristalinos de cadeias individuais de celulose. Uma forma ideal para liberar os açúcares solúveis da lignocelulose é utilizar enzimas celulasas (CHENG e TIMILSINA, 2011).

Segundo Lynd *et al.* (2008), são estudadas duas abordagens para a produção de biocombustíveis a partir da biomassa usando celulases: (1) processo de SHF (fermentação e hidrólise separadas), no qual os polímeros da parede celular das plantas são hidrolisados por enzimas livres em uma etapa e os açúcares resultantes são fermentados em uma segunda etapa; (2) bioprocessamento consolidado (CBP), onde a biomassa será convertida em biocombustível em uma única etapa, utilizando uma bactéria anaeróbia, que pode hidrolisar a parede celular das plantas e fermentar os açúcares resultantes em etanol, ou seja, a hidrólise e a fermentação ocorrem em um único processo. O bioprocessamento consolidado pode ser considerado o processo mais eficiente, uma vez que é realizado em um único recipiente e não necessita de adição de enzimas. Também não há acúmulo de açúcares, para que não ocorra a inibição das celulases. Ainda assim, apresenta alguns problemas que afetam a alta eficiência do processo, como a diferença entre as temperaturas ótimas da hidrólise e da fermentação, o tamanho do recipiente e a quantidade de fonte de carbono exigida pelas bactérias anaeróbias para produzirem uma determinada quantidade de proteína (WILSON, 2009).

O etanol de primeira geração no Brasil (cana-de-açúcar) e nos Estados Unidos (milho) possui tecnologias e mercados comerciais bem estabelecidos. Em ambos os casos, a produção gera uma quantidade significativa de resíduos, seja palha e sabugo de milho ou palha e bagaço de cana-de-açúcar, os quais são considerados como matérias-primas potenciais para a produção de etanol de biomassa (segunda geração – 2G), sendo uma alternativa para o aproveitamento consciente desses resíduos. Embora a produção de etanol de biomassa seja considerada vantajosa e promissora, ainda apresenta alguns desafios técnicos e econômicos. O processo de conversão necessita de diferentes etapas, como pré-tratamento, destoxificação, hidrólise e fermentação, as quais o tornam mais complicado e economicamente não competitivo, limitando-o em plantas piloto ou de demonstração (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010; ZABED *et al.*, 2016).

As principais desvantagens da produção de etanol de segunda geração, em relação à produção de etanol de primeira geração, incluem: a baixa acessibilidade da celulose e hemicelulose em virtude da estrutura complexa das lignoceluloses, as baixas atividades das enzimas celulase e a dificuldade para fermentar os açúcares de 5 C, obtidos da hidrólise das hemiceluloses em etanol. As pesquisas sobre a produção de etanol 2G são focadas no desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento com bom custo-benefício, nas atividades melhoradas da enzima celulase e na cofermentação de açúcares de 6 C (glicose) e de 5 C (xilose) em etanol (CHENG e TIMILSINA, 2011).

Apesar disso, o bioetanol produzido a partir de biomassa é considerado uma fonte de energia atraente e sustentável, e o uso de substratos baratos em sua produção, como os resíduos de cana-de-açúcar e milho, corrobora com o conceito de sustentabilidade, contribuindo para um ambiente mais limpo (ZALDIVAR *et al.*, 2001).

2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS

Os microrganismos são seres onipresentes, extraordinariamente diversificados e que realizam funções específicas no ambiente. Eles podem causar efeitos prejudiciais, como danos à saúde, mas também podem ser benéficos em outras ocasiões, como na produção de agentes antimicrobianos e compostos bioativos, na biorremediação de produtos tóxicos e nas indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas. A taxonomia é fundamental para definir sua biodiversidade, sua relação com outros organismos no ecossistema e seus aspectos funcionais. Dessa maneira, o isolamento e a identificação são cruciais antes de deduzir as novas características de qualquer cultura microbiana (DAS *et al.*, 2014).

As enzimas celulolíticas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, insetos e microrganismos. Diferentes formas de microrganismos, incluindo fungos, bactérias, actinomicetos e leveduras são usados para a produção de celulases, com vasta aplicação em várias indústrias, apesar dos dois primeiros serem os mais empregados com esta finalidade. Estes microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbios, mesófilos ou termófilos. Grande parte das celulases para aplicações industriais é obtida a partir de fungos filamentosos, pois eles têm a capacidade de produzir quantidades consideráveis de celulases e hemicelulases, que são secretadas para o meio a fim de facilitar a extração e a purificação. Vários fungos são cultivados para tal feito, como *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Trichoderma reesei*, *Fusarium solani*, *Penicillium brasilianum*, *Chaetomium cellulyticum*, entre outros (KUHAD *et al.*, 2011; BEHERA e RAY, 2015; KUHAD *et al.*, 2016).

Os fungos ascomicetos, pertencentes ao filo *Ascomycota*, apresentam um alto potencial para a produção de enzimas celulolíticas. As estirpes de ascomicetos têm sido isoladas a partir de nichos ecológicos ricos em resíduos agrícolas, como trigo, arroz, milho e cana-de-açúcar, já que eles possuem celulose e hemicelulose em sua composição. Eles abragem outros organismos, como as leveduras, incluindo a *Saccharomyces cerevisiae*, além do agente patogênico humano *Candida albicans*, entre outros. Também contêm padrões de crescimento estritamente filamentosos, como mostrado pelo *Aspergillus*, que integra uma série de patógenos

humanos (*A. fumigatus*) a laboriosos industriais (*A. oryzae*) (HANSEN *et al.*, 2015; WHITEWAY *et al.*, 2015).

Tendo em vista o grande interesse por fungos, conhecidos como os melhores produtores, as celulasas de origem bacteriana são menos estudadas. As bactérias aeróbias e anaeróbias diferem em relação ao seu sistema de celulase, rendimento de massa celular e produtos de degradação da biomassa (KUHAD *et al.*, 2016). Usualmente, para a produção de enzimas celulolíticas, muitas pesquisas se relacionam ao gênero *Bacillus*, como pode ser observado na sacarificação enzimática da palha de arroz por celulase produzida a partir de *Bacillus carboniphilus* CAS 3 (ANNAMALAI *et al.*, 2014), na produção de endo-1,4- β -D-glucanase por *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, utilizando como substrato o bagaço de cana (BANO *et al.*, 2013), e na obtenção de xilanase alcalina por meio da bactéria *Bacillus* sp. PKD-9, usando farelo de trigo, como material lignocelulósico (PANWAR *et al.*, 2014).

Contudo, é difícil fazer uma comparação entre as estirpes microbianas para a produção de celulasas devido às diferenças nas condições de fermentação, composição dos meios e dos substratos (KUHAD *et al.*, 2016). Na Tabela 3, são mostrados alguns fungos e bactérias que sintetizam tais enzimas.

Tabela 3 – Microrganismos para a produção de enzimas celulolíticas

Fungos		Bactérias	
Gênero	Espécie	Gênero	Espécie
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. terreus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. flexus</i>
<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i>	<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i> , <i>C. cellulolyticum</i>
<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i> , <i>H. grisea</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. junii</i> , <i>A. amitatus</i>
<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulosa</i>
<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i> , <i>P. occitanis</i> , <i>P. decumbans</i>	<i>Microbispora</i>	<i>M. bispora</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	<i>Fibrobacter</i>	<i>F. succinogenes</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>C. cellulyticum</i> , <i>C. thermophilum</i>	<i>Acetivibrio</i>	<i>A. cellulolyticus</i>
<i>Thermoascus</i>	<i>T. aurantiacus</i>	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>
<i>Coniophora</i>	<i>C. puteana</i>	<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>
<i>Tyromyces</i>	<i>T. palustris</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>B. fibrisolvens</i>
<i>Pleurotus</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. curdolanolyticus</i>

Fonte: Kuhad *et al.* (2011)

2.2.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos morfologicamente complexos, exibindo diferentes formas estruturais durante seu ciclo de vida. Sua estrutura vegetativa básica de crescimento consiste de um filamento tubular, conhecido como hifa. Estas hifas são estruturas longas e ramificadas que se organizam para dar suporte aos esporos para a reprodução e disseminação. Elas se estendem e ramificam dentro do substrato como uma rede, designada micélio, a partir do qual as hifas em crescimento apical procuram, exploram e translocam os nutrientes disponíveis. O micélio não é apenas um conjunto de hifas que se estende homogeneamente, mas também exibe considerável plasticidade de desenvolvimento. Estes fungos podem ser cultivados em laboratório sobre uma variedade de meios líquido ou sólido. As colônias que crescem em meios relativamente homogêneos podem ser pigmentadas, apresentar setores morfológicos distintos, produzir estruturas aéreas e até mesmo apresentar um crescimento rítmico (PAPAGIANNI, 2004; WALKER e WHITE, 2011).

Eles são microrganismos saprófitos que segregam uma grande variedade de enzimas envolvidas na decomposição e reciclagem de biopolímeros complexos a partir dos tecidos de plantas e animais. A maioria destas enzimas são hidrolíticas e desempenham um papel importante na nutrição de fungos, liberando carbono e nitrogênio presos em macromoléculas insolúveis, obtidas das atividades metabólicas de outros organismos. Dessa forma, estes fungos são bastante utilizados em processos industriais, com vasto uso comercial, como na indústria têxtil, na fabricação de couro e nas indústrias de papel, bebidas e alimentos. Entre eles, o gênero *A. niger* tem uma longa história na indústria de fermentação, sendo geralmente considerado como seguro (*Generally Recognized as Safe* – GRAS), de acordo com *Food and Drug Administration* (FDA) (EL-ENSHASYA, 2007).

2.2.2 O gênero *Aspergillus*

Em micologia, *Aspergillus* é qualquer um, de um grande número de fungos, que se reproduz por meio de esporos assexuados. Seus conidióforos consistem em uma haste alongada ou estipe culminando numa região bulbosa expandida, comumente denominada de columela ou vesícula, sobre a qual são suportadas uma ou duas camadas de células (chamadas de esterigmas primária e secundária, ou fiálides e métulas, respectivamente), que geram esporos assexuados ou conídios (Figura 4). Estes esporos são componentes comuns de aerossóis, dispersando-se

em distâncias curtas e longas, dependendo das condições ambientais. Ao entrarem em contato com uma superfície sólida ou líquida, eles são depositados e, se as condições de umidade forem apropriadas, germinam. Trata-se de um dos fungos mais comuns da terra (BENNETT, 2009, 2010).



Figura 4 – Estrutura do fungo *Aspergillus niger*

Fonte: Autora (2016)

É um gênero de fungos filamentosos composto por uma variedade de espécies, totalizando aproximadamente 180, com alto impacto econômico e social, compreendendo linhagens bem conhecidas, com valor comercial, a exemplo de *A. oryzae* e *A. niger*, de agentes patogênicos como *A. parasiticus* e *A. fumigatus*, e de contaminantes produtores de toxina de alimentos e rações como *A. flavus*, além das espécies menos conhecidas, *A. terreus*, que tem uma função muito importante, visto que é fonte da lovastatina, um agente redutor do colesterol. O fungo utilizado na pesquisa genética básica é o *A. nidulans* (LUBERTOZZI e KEASLING, 2009).

Apesar da sua reputação de estragar comida, produzir micotoxinas e causar doenças em humanos e animais (aspergilose), muitas espécies são usadas em biotecnologia para a produção de metabólitos, tais como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos ou enzimas, ou como agentes em fermentações. Todavia, mesmo com sua potencialidade evidente e uma boa quantidade de trabalhos produzidos, o número de pesquisadores usando o *Aspergillus* é pequeno em comparação com a levedura *Saccharomyces* (LUBERTOZZI e KEASLING, 2009; SAMSON *et al.*, 2014).

Os fungos são heterotróficos. Primeiro, digerem seus alimentos, em seguida, os comem. A absorção de nutrientes é auxiliada por forças mecânicas, as quais permitem que as pontas das hifas cresçam até os substratos alimentares. As espécies de *Aspergillus* são exemplos

típicos do estilo de vida dos fungos. Frequentemente, são encontradas em habitats terrestres e são isoladas do solo e de resíduos vegetais associados. Vários substratos são atacados por consórcios de organismos, em diferentes taxas. O *Aspergillus*, em conjunto com outros fungos, desempenha um papel importante nestes consórcios, pois são capazes de degradar amidos, hemicelulose, pectinas, celulose e outros polímeros de açúcar, além de gorduras, óleos, quitina e queratina, gerando diversos produtos (Tabela 4). O processo de degradação é o meio de obtenção de nutrientes para este gênero (BENNETT, 2010).

Tabela 4 – Exemplos de produtos gerados a partir do fungo Aspergillus

Microrganismo	Substrato	Produto	Referência
<i>Aspergillus terreus</i>	Palha de arroz	Celulase	NARRA <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Molho doce de soja	Amilase	SAHNOUN <i>et al.</i> (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho	Xilanase	MICHELIN <i>et al.</i> (2013)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de mandioca	Ácido cítrico	ADEOYE <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de laranja	Pectinase	AHMED <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelos de trigo, soja, algodão e casca de laranja	Protease	CASTRO <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Palha de sorgo	Xilanase	ADHYARU <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Palha de trigo, palha de arroz, palha de cevada, palha de sorgo e sabugo de milho	Xilanase	ADHYARU <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de soja e resíduos de papel	Celulase	BOGGIONE <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho	Ácido oxálico	MAI <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Casca de papaia	Pectina metilesterase	PATIDAR <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bolo de óleo de mostarda	Lipase	SETHI <i>et al.</i> (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Palha de milho	Ácido glucônico	ZHANG <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Autora (2016)

Uma das mais conhecidas, a linhagem *A. niger* é oriunda de colônias com pouca ou nenhuma coloração, diferenciando-se pelos seus conídios esféricos pretos, apresentando um

ótimo crescimento na faixa de temperatura de 35 a 37 °C. Este fungo consome um grande número de substratos e, desse modo, produz várias enzimas extracelulares com importância industrial significativa, englobando celulasas, amilases, proteases, lipases, pectinases e quitinases (PITT e HOCKING, 2009; PARSHIKOV e SUTHERLAND, 2014). É comum o seu emprego na produção de enzimas celulolíticas, tendo como exemplo os estudos desenvolvidos por Chandra *et al.* (2007), Ncube *et al.* (2012) e Bansal *et al.* (2012).

Para a escolha da cepa, deve-se levar em consideração que ela produzirá enzimas extracelulares com a purificação e a recuperação bem mais fácil do que quando gerada intracelularmente (SINGHANIA *et al.*, 2015). O gênero *Aspergillus* pode ser cultivado em ampla faixa de temperatura (10 – 50 °C), pH (2 – 11), salinidade (0 – 34%), atividade da água (0,6 – 1,0) e em condições oligotróficas ou ricas em nutrientes, podendo ser empregado nas fermentações em estado sólido ou submersas (MEYER *et al.*, 2011).

2.3 PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DE ENZIMAS

Entende-se como fermentação o método pelo qual os microrganismos catalisam nutrientes, sintetizam metabólitos secundários e completam outras atividades fisiológicas em condições anaeróbias ou aeróbias. Esta tecnologia tem sido empregada na produção de enzimas. Para isso, três elementos de pesquisa devem ser analisados: o produto desejado, o tipo de microrganismo e o ambiente necessário para a formação (temperatura, pH, oxigênio, entre outros) (CHEN, 2013a).

Os nutrientes podem ser classificados em macro e micronutrientes. Os principais macronutrientes são carbono, nitrogênio e oxigênio, sendo os carboidratos a principal fonte de energia para a cultura microbiana. Para fermentações em pequena escala, glicose, sacarose e frutose são geralmente usadas como fonte de carbono. Outro nutriente muito importante é o nitrogênio, o qual pode ser encontrado na amônia, nos sais de amônio, nas proteínas, no extrato de levedura, na peptona, entre outros. Além disso, para o crescimento de culturas e aumento das taxas de produção, é preciso traços de elementos, denominados oligoelementos ou microminerais, como ferro, zinco, manganês, cobre, cobalto, cálcio e sódio. Deve-se observar a temperatura ótima para a fermentação, pois acima dela o crescimento desacelera e a morte térmica pode ocorrer. Isto posto, os microrganismos são classificados em três grupos: psicrófilos, os quais preferem um ambiente frio com menos de 20 °C; mesófilos, que precisam de uma temperatura moderada entre 20 e 45 °C, tendo como exemplo o fungo *A. niger*; e termófilos, que preferem o calor, com temperatura ótima acima dos 45 °C. O pH também

desempenha um valioso papel na fermentação para obter altos rendimentos, o qual pode ser controlado pela adição de ácidos ou bases (DEMIRCI *et al.*, 2014).

Os processos fermentativos podem ser classificados em batelada (descontínuo), batelada alimentada ou contínuo/semicontínuo. Na fermentação em batelada, uma cultura de microrganismos é inoculada em um meio contendo o substrato e, sob condições adequadas de crescimento celular, é conduzida ao longo de um período de tempo, com ou sem a adição de nutrientes. Os produtos são colhidos ao final do processo. Já na contínua, os substratos são alimentados, continuamente, nos vasos de fermentação, e os produtos finais são obtidos simultaneamente. A batelada alimentada se diferencia da descontínua pela adição de uma certa quantidade de substrato, durante as operações, e pela retirada de uma porção proporcional de caldo, a qual é limitada pela necessidade de manter dentro do fermentador a concentração de biomassa necessária para a produção (LONGOBARDI, 1994; LI *et al.*, 2014).

Uma das preocupações nas fermentações é com a contaminação. Por isso, a esterilização, um processo intensivo de energia, que utiliza altas temperatura e pressão de vapor para eliminar quaisquer microrganismos vivos, ainda é necessária para quase todos os procedimentos, com o objetivo de reduzir a possibilidade de contaminação microbiana, pois a existência de um contaminante, no meio ou em alguma parte do equipamento, faz com que os organismos produtores precisem competir com os contaminantes por nutrientes limitados (LI *et al.*, 2014; SINDHU *et al.*, 2015).

Os métodos mais comuns são a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Ambas oferecem vários benefícios, mas têm as suas próprias limitações. Em larga escala, por exemplo, apesar da FES utilizar resíduos para o crescimento microbiano e recuperar o produto com mais facilidade, há dificuldade em manter as suas condições operacionais (McNEIL *et al.*, 2013).

Em escala laboratorial, a fermentação em estado sólido é um poderoso método para a obtenção desses metabólitos, pois apresenta baixo risco de contaminação, utiliza substratos de baixo custo, possui alto rendimento, menor gasto de energia e um processamento mais simples. Estas particularidades a têm tornado mais atraente que a fermentação submersa, que apresenta elevado consumo de energia e sérios problemas de poluição, perdendo, com isso, o fator de sustentabilidade. Ademais, a evolução dos fungos e actinomicetos ocorreu em substratos de crescimento sólido, isto é, esses organismos passaram sua história evolutiva como terrestres. Logo, os produtos fúngicos de interesse biotecnológico, como os esporos e as enzimas, foram desenvolvidos por estes organismos para o uso em substratos sólidos úmidos, mas não em líquidos. Assim sendo, o cultivo dos microrganismos em suspensões aquosas pode prejudicar a

sua eficiência metabólica. O teor de água do substrato sólido deve ser mantido na faixa de 12 a 80%, principalmente em torno de 60%. Em contraste, o teor de água da fermentação submersa é superior a 95% (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; CHEN, 2013a; CASTRO e SATO, 2015). Na Tabela 5, há uma comparação entre esses dois tipos de fermentação.

Tabela 5 – Comparação entre a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido

Fermentação submersa	Fermentação em estado sólido
Microrganismos absorvem nutrientes a partir da cultura líquida; não há gradiente de concentração de nutrientes	Microrganismos absorvem nutrientes do substrato sólido úmido; existe um gradiente de concentração de nutrientes
O sistema de cultura é composto principalmente de líquido (fase contínua)	O sistema de cultura consiste em três fases: gás (fase contínua), líquido e sólido
O oxigênio necessário é a partir do oxigênio dissolvido; há uma maior quantidade de oxigênio dissolvido	O oxigênio necessário é a partir da fase gasosa; baixo consumo de energia
Inoculação pequena, menor que 10%	Inoculação grande, maior que 10%
Os microrganismos se distribuem uniformemente no sistema de cultura	Microrganismos absorvem ou penetram no substrato sólido
No final da fermentação, o meio é líquido e as concentrações de produtos são baixas	No final da fermentação, o meio é um substrato de estado úmido e as concentrações dos produtos são altas
Baixa taxa de produção e de baixo rendimento do produto	Alta taxa de produção e alto rendimento de produto
A mistura é fácil e o crescimento de microrganismos não é restrito por difusão de nutrientes	A mistura é difícil e o crescimento de microrganismos é restrito por difusão de nutrientes
Fácil controle de temperatura	Difícil remoção de calor metabólito
Homogeneidade	Heterogeneidade
O processo de fermentação pode ser detectado e controlado <i>on-line</i>	O processo de fermentação é difícil de detectar e controlar <i>on-line</i>
Processo de extração complexo	Processo de extração simples e controlável
Alta atividade de água	Baixa atividade de água
Recipiente de fermentação selado	Recipiente de fermentação simples
Estirpes puras	Enriquecimento natural ou estirpes de reprodução artificial
Consumo de energia e investimento em equipamentos são baixos	Consumo de energia e o investimento de equipamento são altos
Matéria-prima de alto custo	Matéria-prima de baixo custo

Fonte: Adaptado de Chen (2013a)

2.3.1 Fermentação submersa

Define-se como fermentação submersa a fermentação com excesso de água. Em grande escala, esta tecnologia é amplamente utilizada devido a uma melhor monitorização e facilidade de manuseio, que possibilita uma produção ou conversão ótima. Os fatores que influenciam no processo, a exemplo do pH e da temperatura, devem ser medidos, preferencialmente *on-line*, para que haja um controle em tempo real, bem como a implementação de uma ação corretiva. Na produção de celulasas, pode ser empregado um processo contínuo de duas etapas, no qual a fase de crescimento e a fase de produção podem ser separadas por diferentes pH e condições favoráveis de temperatura (VAIDYANATHAN *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2011).

A morfologia de crescimento de organismos filamentosos, em cultivo submerso, influencia na produtividade das fermentações fúngicas e pode dar à suspensão características bastante diferentes de culturas de bactérias e leveduras, variando de discretos *pellets* de hifas a uma suspensão homogênea de micélios dispersos, proporcionando, por causa disso, diferenças significativas na fisiologia e na cinética de crescimento. Dessa forma, afirma-se que o crescimento de micélios é semelhante ao de organismos unicelulares, os quais se reproduzem por fissão binária, com uma distribuição homogênea de biomassa, substrato e produtos, e com crescimento exponencial a uma taxa específica constante de culturas em batelada, onde os substratos estão em excesso. Também, a forma filamentosa de hifas do micélio facilmente provoca emaranhamento e, com isso, o caldo de cultivo torna-se muito viscoso. A alta viscosidade reduz a transferência de oxigênio para o caldo e, por esse motivo, é necessário um elevado grau de agitação para se obter alta transferência de massa e de oxigênio, bem como uma maior produtividade (EL-ENSHASYA, 2007; NØRREGAARD *et al.*, 2014).

Na maioria das vezes, as enzimas industriais fúngicas são produzidas por batelada alimentada, onde a biomassa é cultivada inicialmente em batelada até que um componente escolhido do substrato seja totalmente utilizado. Posteriormente, o substrato é alimentado com o caldo para promover o crescimento e a formação do produto. Visto que o objetivo é a formação do produto, o substrato é convertido imediatamente na entrada do biorreator por altos níveis de biomassa ativa. Portanto, o metabolismo é direcionado à formação do produto e não para o crescimento (controlado), e a concentração do substrato e a repressão catabólica são minimizadas. A taxa de crescimento específica não é constante, uma vez que diminui com o aumento do volume de cultura (PAPAGIANNI, 2004).

Na fermentação submersa, um dos fatores importantes para a viabilidade do processo é a agitação, que é realizada para garantir a homogeneidade do caldo fermentado, misturando o líquido no recipiente e, também, para dispersar as bolhas de ar libertadas pelo aspersor de ar. Na escala de laboratório, o controle de pH normalmente é efetuado com a adição de um líquido ácido/básico no sistema. Além desta análise, existem inúmeras técnicas de medição para quantificar as propriedades do caldo e para obter uma fermentação com alto rendimento (NØRREGAARD *et al.*, 2014).

2.3.2 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é definida como a fermentação envolvendo sólidos na ausência de água livre, onde o substrato deve possuir umidade suficiente para apoiar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos. É um processo heterogêneo, composto por três fases: sólida, líquida e gasosa, favorecendo o desenvolvimento de produtos e bioprocessos. Nas últimas décadas, esta tecnologia ganhou atenção significativa em relação aos bioprocessos industriais, especialmente pelo menor uso de energia, associado a rendimentos mais elevados do produto e menor produção de efluentes, tendo, por isso, baixo risco de contaminação. Este processo é considerado ecológico, pois a maioria utiliza resíduos agroindustriais sólidos como substrato (fonte de carbono e outros nutrientes). Na fermentação, o substrato também pode ser um material inerte, contendo uma solução de crescimento que possibilita o cultivo dos microrganismos. Em geral, as culturas de fungos e leveduras são consideradas como as mais apropriadas para os processos de FES, pois necessitam de atividade de água (a_w) mais baixa, normalmente em torno de 0,5 – 0,6 (PANDEY, 2003; THOMAS *et al.*, 2013).

A seleção do substrato é um aspecto extremamente importante para este processo, uma vez que atuará como um suporte físico e fonte de nutrientes. Vários materiais podem ser usados com esta finalidade, incluindo os suportes inertes como vermiculita, perlita e polietileno, e os naturais, tais como os resíduos agroindustriais, que apresentam as propriedades necessárias para promover o crescimento dos microrganismos. Todavia, seu emprego dependerá de alguns parâmetros físicos, como o tamanho de partícula, o nível de umidade, espaçamento intrapartícula e composição de nutrientes dentro do substrato (BHARGAV *et al.*, 2008; CASTRO e SATO, 2015).

Em relação aos microrganismos, a fermentação em estado sólido pode ser dividida em duas categorias: processo de cultura pura ou não pura. Em culturas puras, é usada uma única espécie de microrganismo nas reações biológicas. Por isso, estes organismos necessitam, na

maioria das vezes, de uma variedade de características desejáveis para se adaptarem às exigências da produção industrial, especialmente, na produção de enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos e outros metabólitos. No caso da cultura não pura, as populações microbianas são geridas pelo controle das condições ambientais, tais como oxigênio, temperatura e umidade. No entanto, as estruturas das comunidades multimicrobiais são formadas invariavelmente na matriz sólida e, dessa forma, diferentes espécies assumem papéis distintos. Logo, é difícil de exigir uma característica definida de substrato para os microrganismos específicos (CHEN, 2013b).

Nos processos fermentativos, sistemas de biorreatores proporcionam o ambiente necessário para o crescimento e o cultivo de microrganismos. Ainda assim, alguns dos fatores que afetam o desenvolvimento do produto na FES são a temperatura, umidade do substrato no leito, tipo de substrato utilizado, tamanho do biorreator, aeração, taxa de resfriamento, altura do leito e morfologia fúngica. A fermentação em estado sólido é realizada em sistemas de biorreatores mais simples, se comparada com a submersa. Os biorreatores são equipados com umidificador, com/sem unidade de agitação. Além da composição, tamanho das partículas, porosidade e capacidade do substrato de reter água, a baixa condutividade térmica do substrato no leito apresenta um grande desafio para os projetos de biorreator. Em escala de bancada, a FES é realizada em placas de Petri, frascos Erlenmeyer, garrafas de Roux e frascos cilíndricos. Estes sistemas são simples e as análises são feitas com facilidade (BHARGAV *et al.*, 2008).

Na literatura, encontram-se muitos estudos utilizando a fermentação em estado sólido para a produção de enzimas extracelulares. Na pesquisa de Santos *et al.* (2012) foram produzidas enzimas celulolíticas a partir da casca de batata, usando como microrganismo o fungo *Aspergillus niger* onde, por meio de análises estatísticas, obtiveram 51,48% de atividade para CMCase, 50,19% para FPase e 50,72% para xilanase. Cheirsilp e Kitcha (2015) aproveitaram os resíduos lignocelulósicos da indústria de óleo de palma para a produção de celulase ($2,35 \pm 0,22$ U/g) e xilanase ($11,83 \pm 0,18$ U/g), com quatro fungos filamentosos, entre eles o *Aspergillus tubingensis*.

O trabalho de Azabou *et al.* (2016) avaliou o uso do extrato de enzimas obtido por fermentação em estado sólido a partir de *Fusarium solani pisi*, na extração de licopeno do tomate. Vasconcellos *et al.* (2015) compararam a eficiência de diferentes sistemas de cultivo na produção e na termoestabilidade das enzimas celulolíticas, entre eles a fermentação em estado sólido. O microrganismo empregado foi o fungo *Aspergillus niger*, tendo como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram o potencial da FES na produção da endoglucanase e da β -glicosidase, apresentando atividades residuais entre 80 e 100% (após 24 h de incubação a 50 °C), indicando que estas enzimas são altamente termoestáveis.

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As condições operacionais, tais como temperatura, pH, aeração, tamanho da partícula, atividade da água, entre outros, desempenham um papel crucial no desenvolvimento microbiano e na geração do produto. Por isso, precisam ser cuidadosamente avaliadas no processo de fermentação.

2.4.1 Temperatura

A temperatura é uma das variáveis do processo que mais influencia a FES, porque o crescimento microbiano, em condições aeróbias, resulta na liberação de calor metabólico. Em níveis extremos, isto pode causar desnaturação das enzimas obtidas, além de outros efeitos prejudiciais ao crescimento dos microrganismos e à produção de metabólitos. Uma vez que este processo ocorre na ausência de água livre, é difícil remover o calor metabólico produzido durante o desenvolvimento microbiano, devido à condutividade térmica limitada do substrato sólido e a baixa capacidade térmica do ar. O controle de temperatura em FES torna-se mais relevante quando o processo é em grande escala. Dessa forma, a caracterização de cada microrganismo, em termos da influência da temperatura na cinética de crescimento e da formação de produto, é essencial para o desenvolvimento dos bioprocessos (FARINAS, 2015).

A transferência de calor para dentro ou para fora do sistema de FES está intimamente associada com a atividade metabólica dos microrganismos, assim como a aeração. A temperatura do substrato é um fator muito crítico para este tipo de fermentação. Altas temperaturas afetam a germinação dos esporos, o crescimento, a formação de produto e a esporulação. Ao mesmo tempo, baixas temperaturas não são favoráveis para o crescimento dos microrganismos e para outras reações bioquímicas, fora que o baixo teor de umidade e a baixa condutividade do substrato fazem com que seja difícil conseguir uma boa transferência de calor (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Na Tabela 6, são apresentados alguns exemplos da influência da temperatura na obtenção de enzimas celulolíticas, ou seja, a temperatura (ótima) na qual a produção teve o maior rendimento.

Tabela 6 – Temperatura ótima para a produção de enzimas celulolíticas

Substrato	Microrganismo	Faixa de temperatura (°C)	Temp. ótima (°C)	Produto	Referência
Farelo de arroz	<i>Penicillium decumbens</i>	25 – 35	30	Celulase	LIU <i>et al.</i> (2011b)
Pinhão-manso	<i>Aspergillus niger</i>	25 – 45	40	Celulase	NCUBE <i>et al.</i> (2012)
Palha de trigo	<i>Aspergillus fumigatus</i>	45 – 65	55	Exoglucanase	MAHMOOD <i>et al.</i> (2013)
Palha de trigo	<i>Aspergillus oryzae</i>	28 – 37	28	Xilanase	PIROTA <i>et al.</i> (2013)
Resíduos de banana	<i>Penicillium oxalicum</i>	20 – 50	28	Celulase	SHAH <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Autora (2016)

2.4.2 Umidade e atividade da água

A atividade de água (a_w) é definida como a razão entre a pressão de vapor de uma solução aquosa com a da água pura a mesma temperatura. É um fator importante para determinar se os microrganismos podem crescer em uma matriz sólida, pois baixos níveis de umidade (em relação ao exigido) dentro do substrato limitam o crescimento e o metabolismo dos mesmos, impedindo a absorção eficaz de nutrientes pelos fungos. Na fermentação em estado sólido com fungos filamentosos, ela se relaciona com a germinação dos esporos, extensão do micélio, formação de esporos, geração de metabólitos, entre outros aspectos (BHARGAV *et al.*, 2008; CHEN, 2013b).

A alteração da a_w pode ser usada como um método para modificar a formação do produto e a excreção de microrganismos, o que pode ser feito por meio do ajuste da umidade relativa do ar circundante (SINDHU *et al.*, 2015). Deswal *et al.* (2011) estudaram a relação entre a umidade e a produção de enzimas, com as proporções de 1:1 a 1:4 (sólido: líquido), sendo a razão que apresentou produção máxima da enzima a de 1:3,5.

O teor de umidade depende de vários fatores, como substrato, tipo de microrganismo e produto desejado. Os materiais com a alta capacidade de absorção de água mantêm os seus níveis de umidade em todas as partes do processo de fermentação. Mas, se a quantidade de água adicionada ao substrato sólido é suficientemente alta para ser completamente absorvida pelo material, isso resulta em altos teores de umidade inicial, diminuição da porosidade, perda da estrutura das partículas e troca gasosa reduzida (CASTRO e SATO, 2015).

2.4.3 pH

O pH exerce grande influência sobre a eficiência global da fermentação, onde o substrato pode ter seu pH alterado devido ao crescimento microbiano. Esta mudança depende da atividade metabólica do microrganismo e da capacidade tamponante do substrato sólido. Além disso, essa alteração ocorre pela produção de ácidos ou pela utilização de compostos nitrogenados, que leva a uma diminuição ou aumento de pH. Um dos melhores métodos para minimizar essa variação é utilizando tampões. A maioria das espécies podem crescer com pH no intervalo de 3 a 4 (MITCHELL *et al.*, 2002; SINDHU *et al.*, 2015).

A atividade enzimática é normalmente influenciada pelo pH, porque os sítios ativos das enzimas, muitas vezes, dependem da presença da espécie iônica para manter conformações que permitem a ligação eficiente ao substrato. Entretanto, o monitoramento e controle de pH na fermentação em estado sólido não é simples e a maioria dos estudos relatados na literatura apenas descrevem a influência do pH inicial do meio na produção da enzima (FARINAS, 2015).

Handa *et al.* (2014) avaliaram o pH inicial da farinha de soja desengordurada, na fermentação em estado sólido com *Aspergillus oryzae* e *Monascus purpureus*, para otimizar a produção de β -glicosidase e converter isoflavonas glicosídicas em agliconas. O pH ótimo para a atividade enzimática foi determinado utilizando o substrato p-NPG e tampão de fosfato-citrato 0,1 M, em uma faixa de pH entre 3 e 8. O pH que apresentou maior índice de atividade foi entre 5,0 e 5,5 para *M. purpureus*, e entre 5,5 e 6,0 para *A. oryzae*, sendo, posteriormente, adotado pH 5,5 para a determinação da atividade β -glucosidase de ambos os fungos.

Mehboob *et al.* (2014) otimizaram a produção de enzima através da manutenção de diferentes variáveis, entre elas o pH, a fim de obter a máxima produção de celulasas de *A. fumigatus*. Durante o estudo, as três celulasas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) apresentaram uma atividade máxima em pH 5,5 do meio de crescimento.

2.4.4 Substrato e concentração de nutrientes

O uso de resíduos agroindustriais como substratos em FES é visto como uma grande vantagem desta técnica, pois estes resíduos, geralmente, são subprodutos de outros processos industriais, que são gerados em abundância e têm baixo valor comercial, além de apresentarem em sua estrutura básica celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e fibras, que determinam as propriedades do substrato e fornecem fontes de carbono para o meio de cultivo. Contudo,

quando o substrato não fornece a quantidade necessária de nutrientes para o cultivo dos microrganismos, devem ser adicionadas fontes suplementares que, dependendo do tipo e concentração, são essenciais para alcançar o máximo crescimento microbiano e rendimento enzimático (FARINAS, 2015).

O tipo, a fonte e a natureza do carbono e nitrogênio são uns dos fatores mais importantes na fermentação. A fonte de carbono corresponde à fonte de energia que estará disponível no meio para o crescimento dos microrganismos. Pode ser mais simples, a exemplo de um monossacarídeo puro, como a glicose, ou complexo, como moléculas poliméricas de celulose ou amido. Para selecionar a fonte de carbono utilizada na fermentação, deve-se levar em consideração o microrganismo empregado e o produto desejado (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

Muitos substratos sólidos são suplementados com fontes solúveis de nitrogênio, já que este nutriente também influencia no crescimento microbiano. Todavia, sua seleção deve ser criteriosa, dado que o nitrogênio pode causar mudanças no valor do pH durante a fermentação (MITCHELL *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

Alguns fatores relacionados ao substrato e à concentração dos nutrientes afetam o crescimento e o metabolismo na fermentação em estado sólido, como: limitação de nutrientes, proporção de diferentes nutrientes, inibição de substrato, repressão catabólica e inibição do produto. Em relação à razão carbono/nitrogênio (C:N), por exemplo, mesmo que o substrato contenha níveis elevados de carbono, fornecendo níveis suficientes da fonte de nitrogênio para permitir a utilização completa da fonte de carbono, pode potencialmente causar a inibição do substrato. Ainda, quando se trabalha com fungos, a relação C:N pode induzir ou retardar a esporulação (MITCHELL *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

Nos seus estudos com farelo de trigo, para a produção de xilanase por *Bacillus subtilis* ASH, Sanghi *et al.* (2008) constataram que a suplementação com glicose e xilose causou repressão da produção de xilanase, reduzindo sua atividade. Em pesquisa mais recente, Das e Ray (2016) também estudaram a produção de xilanase com farelo de trigo, neste caso, utilizando o fungo *Aspergillus aculeatus*. Seus resultados mostraram uma pequena repressão catabólica na atividade da xilanase, com o aumento da concentração de xilose e glicose no meio.

2.4.5 Tamanho da partícula

O tamanho das partículas do substrato está diretamente relacionado a sua porosidade. Este parâmetro pode ser analisado por distribuição granulométrica usando peneiras com

diâmetros de malha conhecido ou por determinação da densidade aparente. O tamanho do substrato determina o espaço vazio, isto é, o volume ocupado pelo ar. Como a taxa de transferência de oxigênio neste espaço afeta o crescimento microbiano, o substrato deve apresentar partículas de tamanho adequado para melhorar a transferência de massa (KRISHNA, 2005; CASTRO e SATO, 2015).

As experiências em laboratório podem ser realizadas com partículas de diferentes tamanhos, de modo a determinar o tamanho ótimo do ponto de vista da cinética de crescimento (MITCHELL *et al.*, 2006). Para a otimização da produção de celulase, Shah *et al.* (2015) utilizaram peneiras com diferentes tamanhos (*mesh*), para a obtenção de um pó fino do resíduo de banana. A partícula de menor tamanho (180 μm) mostrou a maior atividade enzimática em comparação com as demais. Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani (2010) usaram três peneiras com malhas distintas, para estudar o efeito do tamanho das partículas de farelo de arroz na produção de celulases. Esta redução de tamanho também proporcionou o aumento da atividade das enzimas.

A análise do tamanho dos resíduos de pão, com uma faixa de 0 a 50 mm, na produção de proteases e glucoamilase mostrou que, no tamanho de 20 mm, as enzimas apresentaram maior atividade (MELIKOGLU *et al.*, 2013).

2.4.6 Aeração e agitação

Esses fatores, geralmente, têm uma influência determinante na fermentação em estado sólido devido a dois aspectos fundamentais: demanda de O_2 nos processos aeróbios e fenômenos de transferência de calor e massa em um sistema heterogêneo. A demanda de oxigênio na FES pode ser satisfeita com níveis relativamente baixos de aeração. No caso da agitação, esta variável melhora a transferência de calor e massa, além de permitir a adição de água ao sistema para compensar a perda por evaporação. Contudo, a agitação não é muito empregada em processos de fermentação sólida, ocorrendo apenas em escala industrial, quando são utilizados biorreatores contínuos ou periodicamente agitados (KRISHNA, 2005; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2008).

A aeração tem como função manter as condições aeróbias, remover o dióxido de carbono gerado e regular o nível de temperatura e umidade do substrato, pois o crescimento celular e a produção de enzimas podem ser afetados pelo gás ambiente na fermentação. Em cultivos submersos, o fornecimento de oxigênio é muitas vezes o fator limitante para o desenvolvimento microbiano devido à baixa solubilidade do oxigênio na água. A aeração em

FES é facilitada em razão da rápida difusão de oxigênio, através da película de água em torno das partículas do substrato (FARINAS, 2015).

Gassara *et al.* (2013) analisaram o efeito da aeração e de diferentes tipos de agitação na produção de enzimas ligninolíticas e na extração de compostos polifenólicos em culturas de estado sólido de *Phanerochaete chrysosporium*, usando o bagaço de maçã como substrato: (1) agitação contínua durante todo o processo de fermentação; (2) agitação contínua durante a fase lag, agitação descontínua durante a fase exponencial, agitação contínua durante a fase estacionária e fase lag (C/D/C); (3) agitação descontínua durante a fase estacionária, agitação contínua durante a fase exponencial, agitação descontínua durante a fase estacionária e fase lag (D/C/D). Os resultados mostraram que a máxima produção de enzimas foi obtida usando C/D/C, D/C/D e agitação contínua, respectivamente. Portanto, a ausência de agitação durante a fase exponencial de crescimento de *P. chrysosporium* aumentou a produção de enzimas ligninolíticas. Supõe-se que a agitação durante a fase exponencial pode quebrar os micélios e causar a alteração do metabolismo secundário do microrganismo. Assim, a agitação contínua desacelera o crescimento dos microrganismos. Em relação à aeração, três taxas de fluxo de ar (0,83, 1,25 e 1,66 VVM) foram avaliadas para identificar qual delas proporcionaria maior atividade enzimática. Observou-se que o aumento da taxa de fluxo de ar aumentou a produção das enzimas ligninolíticas, tal como a atividade de *P. chrysosporium*. Logo, houve máxima produção de enzimas usando a maior taxa de aeração, 1,66, seguida por 1,25 e 0,83 VVM.

2.4.7 Outros fatores

Ao desenvolver ou utilizar um biorreator na fermentação em estado sólido, deve-se saber que, além dos substratos diferirem muito em relação a sua composição e sua natureza, as métricas do leito também apresentam comportamentos distintos devido à variação da composição, propriedades mecânicas, porosidade (incluindo espaços inter e intra-partícula), capacidade de retenção de água, área superficial, entre outros. No caso da taxa de difusão do oxigênio, que depende das propriedades do leito, quando há a diminuição do leito de substrato em razão do crescimento micelial, a porosidade do leito é modificada e, por conseguinte, a difusividade efetiva, dificultando o transporte de oxigênio (MUNISWARAN *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 2013).

Além disso, outro ponto que precisa ser levado em consideração é o tipo de microrganismo utilizado, já que eles diferem em sua morfologia (células únicas ou micélios), podendo afetar o desempenho do processo. Por exemplo, ao mesmo tempo que a mistura do

substrato pode ajudar nos efeitos de transferência de calor e massa, pode danificar o micélio da cultura fúngica, afetando o crescimento e a formação do produto (THOMAS *et al.*, 2013).

2.5 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, produzidas por organismos vivos para aumentar a taxa (velocidade) de um diversificado conjunto de reações químicas necessárias para a vida, tais como replicação e transcrição do DNA, síntese de proteínas, metabolismo e transdução de sinal, entre outros. Com a exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas são proteínas e a sua atividade depende da sua conformação de proteína nativa. Como têm a capacidade de realizar transformações químicas muito específicas, as enzimas tornaram-se cada vez mais úteis em processos industriais. Atualmente, são conhecidos quase 4.000 tipos de enzimas e, destes, aproximadamente 200 são usados comercialmente. Apesar disso, apenas cerca de 20 enzimas são produzidas em escala verdadeiramente industrial. Com o aumento do conhecimento sobre a bioquímica da produção de enzima, processos de fermentação (com bactérias e fungos) e métodos de recuperação, um número crescente de enzimas industriais pode ser previsível (LI *et al.*, 2012; TALENS-PERALES *et al.*, 2016).

Para estudar a produção das enzimas, alguns ensaios enzimáticos são necessários. Estes ensaios têm como objetivos principais: identificar uma enzima especial, para comprovar a sua presença ou ausência numa espécie distinta, como um organismo ou um tecido; e determinar a quantidade de enzima na amostra. Para o primeiro, a abordagem qualitativa é suficiente, apenas fornecendo um resultado claro positivo ou negativo. Já no segundo, a abordagem deve ser quantitativa e, desse modo, precisa fornecer dados exatos sempre que possível. Muitas metodologias de análises são documentadas e citadas em vários artigos científicos. Contudo, os mesmos ensaios, realizados de forma independente e em condições idênticas, podem produzir resultados bastante diferentes, pois a atividade da enzima depende de múltiplos fatores e da compreensão geral de suas características particulares. Como são substâncias sensíveis, presentes em pequenas quantidades, sua atividade na célula, muitas vezes, só consegue ser detectada em suas condições ótimas (BISSWANGER, 2014).

Algumas enzimas foram projetadas pela natureza para formar moléculas complexas a partir de outras mais simples, enquanto outras foram planejadas para quebrar as moléculas complexas em outras mais simples; também, algumas enzimas estão presentes para modificar as moléculas. Uma das propriedades das enzimas é a especificidade, a qual lhe permite

reconhecer um determinado composto químico ou substrato que deve ser atingido. As enzimas foram classificadas em seis grandes grupos, com base na sua função, como oxidorreductase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase (SINGHANIA *et al.*, 2015). As enzimas industriais foram agrupadas sob estas classes e são especificadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Classificação das enzimas usadas nos processos industriais

Classe	Enzimas industriais
Oxidorreductase	Catalase, glucose oxidase, lacase
Transferase	Frutossiltransferases, glicosiltransferases
Hidrolase	Amilases, celulasas, lipases, mananases, pectinases, fitases, proteases, pululanases, xilanases
Liase	Pectato liases, descarboxilase α -acetolactato
Isomerase	Glicose isomerase, epimerases, mutases, liases, topoisomerases
Ligase	Argininosuccinato sintase

Fonte: Singhanian *et al.* (2015)

As amilases são enzimas capazes de hidrolisar o amido e os sacarídeos relacionados. As mais conhecidas são a α -amilase, β -amilase e glucoamilase. Basicamente, elas pertencem ao grupo glicosídeo hidrolases, no qual formam suas próprias famílias, 13, 14 e 15, respectivamente, embora algumas α -amilases sejam classificadas na família 57. No que se refere as fontes de enzimas amilolíticas, estas são, em geral, produzidas por vários microrganismos, plantas e animais. As α -amilases são encontradas em mais vasto espectro de sistemas vivos. As propriedades das enzimas amilolíticas geralmente refletem as características do meio ocupado pelo organismo vivo, que é a fonte da enzima. Uma das aplicações das amilases é na indústria de alimentos, a exemplo da fabricação de cerveja, panificação, produção de bolos, sucos de frutas, xaropes de amido, entre outros (HORVÁTHOVÁ *et al.*, 2000; COUTO e SANROMÁN, 2006).

As enzimas pectinolíticas são classificadas em protopectinase, poligalacturonase, liases e pectina esterase. Protopectinase catalisa a solubilização de protopectina, enquanto as poligalacturonases hidrolisam a cadeia de ácido poligalacturônico, por adição de água, e são as mais abundantes entre todas as enzimas deste tipo. As liases catalisam a clivagem trans-eliminativa do polímero de ácido galacturônico e, por último, a pectina esterase liberta as pectinas e o metanol por desesterificação das ligações éster metílico da estrutura principal de pectina. Estas enzimas têm importância significativa na era biotecnológica atual, pois são aplicadas na extração de suco de fruta e sua clarificação, lavagem de algodão, degomagem de

fibras vegetais, tratamento de águas residuais, extração de óleos vegetais, fermentações de chá e café, branqueamento de papel, em aditivos para a alimentação de aves de capoeira, nas bebidas alcoólicas e nas indústrias de alimentos (JAYANI *et al.*, 2005).

Um dos componentes da hemicelulose é a xilana, um composto heterogêneo, que envolve em sua hidrólise uma mistura de enzimas, abrangendo β -1,4-endoxilânase, β -xilosidase, α -glucuronosidase, α -arabinofuranosidase e acetil-xilana-esterase. Dentre estes, as endoxilânases são as mais importantes devido ao seu envolvimento direto na quebra das ligações glicosídicas e na liberação de xilo-oligossacarídeos curtos. As xilanases são contidas principalmente nas famílias 10 e 11 das glicosil hidrolases, com base na análise do agrupamento hidrofóbico de domínios catalíticos e semelhanças nas sequências de aminoácidos. Do mesmo modo, também foram relatadas nas demais famílias 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 e 62. Estas enzimas são aplicadas em diversas indústrias, a exemplo das indústrias de papel, têxteis, alimentos, bioetanol e de tratamento de resíduos orgânicos (VERMA e SATYANARAYANA, 2012; KUMAR *et al.*, 2016b).

Outras enzimas hidrolíticas, as proteases hidrolisam ligações peptídicas das proteínas, resultando em produtos de peptídeos e aminoácidos de baixo peso molecular. Contudo, quando as concentrações mais elevadas do hidrolisado de proteínas ou peptídeos são incubadas com a protease apropriada, podem resultar na formação de uma estrutura macromolecular agregada, menos solúvel, denominada plasteína, a qual é aplicada na melhoria da qualidade nutricional das proteínas (GONG *et al.*, 2015; UDENIGWE e RAJENDRAN, 2016). Enquanto isso, as lipases, que pertencem a classe das acil-hidrolases, são os biocatalisadores mais utilizados, pois podem catalisar várias reações não naturais em meios não aquosos, tais como a produção de biocombustíveis, ésteres, ácidos orgânicos, alimentos, bebidas, cosméticos e materiais farmacêuticos, produtos com alto valor agregado (KUMAR e KANWAR, 2012).

2.5.1 Celulase

As celulasas pertencem ao grupo O-glicosídeo das hidrolases. Há três classes principais de celulasas: endoglucanases (EG), exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidasas (BGL). As três celulasas devem agir em conjunto para a máxima degradação da celulose, isto é, na conversão da celulose em glicose. Esta interação deve ocorrer em sequência e sinergicamente. As endoglucanases quebram, aleatoriamente, a estrutura da celulose em locais amorfos ao longo da fibra de celulose, o que leva a uma rápida diminuição do grau de polimerização da fibra de celulose e exhibe novas extremidades da cadeia. No caso das

celobiohidrolases, elas agem nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia para libertar, principalmente, a celobiose (unidade de repetição de duas unidades de glicose). Já as β -glicosidases hidrolisam a ligação glicosídica β -1,4 da celobiose e oligossacarídeos, como a celodextrina, para liberar unidades de glicose (KRICKA *et al.*, 2014).

Em geral, as enzimas consistem em unidades estruturais e funcionalmente distintas, chamadas de domínios. As celulases, na maioria dos casos, são compostas por dois domínios. Um deles é um domínio catalítico, formado para a clivagem específica de ligações 1,4- β -D-glicosídicas da celulose, e o outro é o domínio ligante de celulose, que tem a função de aproximar o domínio catalítico ao substrato, ligando-se a cadeia de celulose. O domínio catalítico das endoglucanases são em forma de fenda, enquanto o das exoglucanases tem a forma de um túnel. Logo, os dois domínios estão ligados com a ajuda de um ligante interdomínios (KAUR *et al.*, 2016).

As celulases são sintetizadas por vários tipos de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, durante o seu crescimento em substratos lignocelulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbios, anaeróbios, mesofílicos ou termofílicos. Destacam-se os gêneros de *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* e *Aspergillus* (produtor de celulase mais estudado) (SUN e CHENG, 2002).

O isolamento de microrganismos da natureza é uma das formas de se obter novas celulases. Estes microrganismos recém-selecionados são fontes de novos genes de celulase com diversas propriedades. Geralmente, são saprófitos, ou seja, crescem em matéria orgânica morta e apodrecida. Muitas vezes, são isolados de amostras de solo obtidas de florestas e reservas naturais, nascentes de água quente, adubo, esgoto, esterco animal e rúmen bovino. As celulases obtidas a partir de fungos são importantes comercialmente, porque estas enzimas são secretadas no exterior das células (JUTURU e WU, 2014).

Depois que as enzimas são produzidas, ensaios de atividade são necessários para a sua detecção. A atividade da celulase é avaliada, principalmente, usando um ensaio de açúcar redutor para medir os produtos finais da hidrólise da celulase. A atividade da celulase total (FPase) foi desenvolvida por Mandels e Sternberg (1975), tornando-se amplamente utilizada desde 1984, quando a comissão de biotecnologia da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) propôs uma série de procedimentos padrões para a sua medição. Este método utiliza o papel filtro como substrato padrão. A quantidade total de glicose obtida devido à atividade da celulase é medida usando diferentes métodos de determinação de açúcares redutores, entre eles o do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), sugerido por Miller (1959). A atividade da endoglucanase (CMCase) é quantificada utilizando derivados de celulose com um

elevado grau de polimerização, tais como a carboximetilcelulose (CMC). Os açúcares podem ser avaliados do mesmo modo que a FPase. As atividades da exoglucanase e β -glicosidase são mensuradas utilizando, como substrato, a celulose cristalina (marca Avicel) e a celobiose, respectivamente. O reagente DNS contém: (1) tartarato de sódio e potássio, que diminui a tendência para dissolver o oxigênio, aumentando a concentração de íons na solução; (2) fenol, que aumenta a quantidade de cor produzida durante a reação; (3) bissulfito de sódio, que estabiliza a cor obtida e reage com qualquer oxigênio presente no tampão; (4) um tampão alcalino necessário para a reação redox entre o DNS e a glicose ou outros açúcares redutores (DASHTBAN *et al.*, 2010).

Estudos desenvolvidos com as enzimas celulolíticas têm constatado seu potencial biotecnológico em várias indústrias, tais como as indústrias de alimentos, ração animal, fabricação de cerveja e produção de vinho, agricultura, refinaria de biomassa, papel e celulose, têxtil e lavanderia (KUHAD *et al.*, 2011). Na Tabela 8, são apresentadas algumas aplicações destas enzimas.

Tabela 8 – Algumas aplicações das celulasas nas indústrias

Indústria	Algumas aplicações
Agricultura	Controle de patógenos e doenças de plantas; favorecimento do crescimento e floração da planta; melhoria da qualidade do solo; redução da dependência em fertilizantes minerais
Bioconversão	Conversão de materiais celulósicos para etanol, outros solventes, ácidos orgânicos e proteínas de célula única, e lípideos; produção de alimentos ricos em energia para animais; melhoria da qualidade nutricional dos alimentos para animais; melhoria da digestão e absorção de alimentos
Detergentes	Detergentes à base de celulase; têm superior ação de limpeza sem danificar as fibras; remoção de protuberâncias irregulares em tecidos de algodão; antirre deposição de partículas de tinta
Fermentação	Melhoria da maltagem e maceração; melhoria da prensagem e extração da cor de uvas; melhoria do aroma dos vinhos; melhoria na fermentação primária e qualidade da cerveja; melhoria da viscosidade e capacidade de filtração do mosto
Alimentos	Melhoria do rendimento na extração de amido e proteínas; melhoria da maceração, prensagem e extração da cor de frutas e legumes; clarificação de sucos de frutas; melhoria da textura e qualidade de produtos de padaria; melhoria da textura, sabor, aroma e propriedades voláteis de frutas e vegetais
Polpa e papel	Coaditivo no branqueamento de pasta de papel; polpação biomecânica; melhoria da drenagem; redução da necessidade de energia e cloro
Têxtil	Melhoria da qualidade e estabilidade dos tecidos, da propriedade de absorção das fibras; amolecimento de vestuário; remoção do excesso de corante em tecidos

Fonte: Kuhad *et al.* (2011)

2.6 MERCADO DE ENZIMAS

As propriedades catalíticas eficientes e altamente específicas de enzimas estimularam a sua introdução em vários processos e produtos industriais. As pesquisas recentes em biotecnologia, especificamente em áreas como engenharia das proteínas e engenharia genética, forneceram instrumentos importantes para o desenvolvimento eficaz de novas enzimas. Com isto, desenvolveram-se enzimas com propriedades aperfeiçoadas para aplicações técnicas e industriais estabelecidas. O mercado mundial de enzimas industriais foi de quase US\$ 4,5 bilhões em 2012, e cerca de US\$ 4,8 bilhões em 2013. Então, espera-se que o mercado atinja, aproximadamente, US\$ 7,1 bilhões até 2018, com uma taxa de crescimento anual composta de 8,2% de 2013 a 2018 (DEWAN e SETIA, 2014).

Como as enzimas são catalisadores naturais, não tóxicos, biodegradáveis, eficientes e altamente específicos, que funcionam em condições suaves, seu uso geralmente representa uma alternativa ecológica (verde) para os procedimentos convencionais. A empresa dinamarquesa Novozymes controla o mercado mundial com uma quota que se aproxima da metade da produção total. Outras empresas produtoras de enzimas são a DSM, na Holanda, e BASF, na Alemanha. Nos Estados Unidos, a DuPont alcançou um papel importante neste negócio a partir da compra da Danisco e da Genencor. A principal área de aplicação das enzimas são os setores de alimentos e rações, os quais consomem mais de um terço da produção enzimática, seguido por detergentes e produtos de limpeza (TALENS-PERALES *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da tecnologia enzimática no Brasil é muito importante, em consequência da sua grande disponibilidade de recursos naturais. Ainda assim, enquanto o mercado internacional de enzimas industriais e especiais é estimado em US\$ 4 bilhões, o mercado externo brasileiro de biocatalisadores é estimado em, aproximadamente, US\$ 200 milhões, já levando em conta a predominância dos produtos importados. Em suma, a produção de enzimas no Brasil é escassa e os preços são elevados, o que dificulta o crescimento desta área (ANDREAUS *et al.*, 2014).

Atualmente, as celulasas são o terceiro maior mercado de enzimas industriais no mundo, principalmente devido a sua utilização no processamento de algodão, na reciclagem de papel, na formulação de detergentes, na extração de suco e como aditivos para alimentação animal. Todavia, as celulasas têm grande potencial de se tornar o maior mercado de enzimas industriais, onde, o etanol, o butanol ou outro produto de fermentação de açúcares, produzido por enzimas a partir de biomassa deve se tornar um dos principais combustíveis (WILSON, 2009).

O custo das enzimas é considerado uma importante barreira na produção de biocombustíveis. Estes custos são contabilizados e relatados em termos de dólares por litro de etanol. A produção também depende de outros fatores, incluindo a escolha da matéria-prima, a carga da enzima e o rendimento global de biocombustível (KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012).

Conforme Klein-Marcuschamer *et al.* (2012), a contribuição do custo das enzimas para o etanol produzido pela conversão de palha de milho seria de \$ 0,68 por galão, se os açúcares da biomassa pudessem ser convertidos em rendimento teórico máximo, e de \$ 1,47 por galão, se os rendimentos se baseassem nos rendimentos de sacarificação e fermentação previamente relatados na literatura científica. Wilson (2009) relatou que o custo das celulasas era cerca de \$ 0,50 por galão de etanol. Lynd *et al.* (2008) estimaram o custo da celulase em \$ 0,30 por galão de etanol. No entanto, afirmaram que há pouca informação de conhecimento público sobre esse valor e que o mesmo seria afetado por uma variedade de fatores.

Em função disto, a produção de celulasas por microrganismos a partir de resíduos lignocelulósicos é um método eficaz e barato para a obtenção de produtos com alto valor agregado, uma vez que os extratos enzimáticos obtidos após o processo fermentativo podem ser utilizados na hidrólise da biomassa para a sua conversão em biocombustíveis ou produtos químicos (UÇKUN KIRAN *et al.*, 2014).

2.7 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

O projeto experimental e a otimização exercem um papel importante na metodologia realizada, quando um novo método analítico é desenvolvido e validado. Esta é a razão pela qual os métodos analíticos devem atender requisitos de qualidade complexa, sendo o processo geralmente afetado por um grande número de variáveis ou fatores. No geral, a otimização é uma etapa do processo para encontrar os valores das variáveis que fornecem a melhor resposta possível. Há duas estratégias de otimização: as abordagens univariada e multivariada. Na univariada, apenas um fator é variado por vez, enquanto os outros fatores permanecem constantes, não levando em consideração as interações entre os fatores. Neste caso, o número de experimentos é importante e, quando o número de fatores aumenta, geralmente o domínio experimental explorado é menor, se comparado com o examinado com a abordagem multivariada. Por outro lado, na estratégia multivariada, vários fatores são estudados simultaneamente em um número predefinido de experimentos, variando os níveis de todos os fatores envolvidos no processo (CANDIOTI *et al.*, 2014).

O design multivariado de experimentos (DOE) e a metodologia de superfície de resposta (MSR) são úteis para o desenvolvimento, aperfeiçoamento e otimização de processos. Como a otimização de múltiplos parâmetros é demorada, a MRS pode ser utilizada para avaliar a significância de vários fatores, especialmente quando há interações entre os fatores e elas são complexas de determinar (OBEROI *et al.*, 2014).

A metodologia de superfície de resposta é obtida a partir do planejamento de experimentos, o qual determina os valores dos fatores para a realização de experimentos e recolhimento de dados. Estes dados são, então, utilizados para desenvolver um modelo empírico que relaciona a resposta do processo aos fatores. Posteriormente, o modelo facilita a busca da melhor resposta do processo, que é validada por meio de experimentos (ZHEN *et al.*, 2013).

A MSR consiste nas seguintes fases gerais: (1) triagem, onde os experimentos são projetados com o propósito de descobrir os fatores de controle que causam efeitos estatisticamente significativos de importância prática para o objetivo do estudo; (2) modelagem, na qual os experimentos são projetados com a finalidade de modelar a característica de qualidade de interesse (resposta) em função dos fatores de controle; (3) otimização, onde o modelo de resposta é analisado para determinar as configurações de variáveis nas quais são obtidas as condições ótimas de propriedade do sistema. Esta metodologia apresenta estratégia de experimentação sequencial, a qual leva a um alto nível de conhecimento do sistema, caso os problemas das fases experimentais sejam devidamente controlados (COSTA *et al.*, 2011).

Alguns problemas em vários campos da ciência envolvem múltiplas respostas, estas respostas devem ser otimizadas simultaneamente, já que sua análise separada pode resultar em soluções incompatíveis. Esta análise simultânea é uma estratégia utilizada na MSR, a qual consiste em converter as respostas múltiplas em uma única resposta, combinando as respostas individuais em uma função composta seguida de sua otimização. Um das técnicas utilizadas é a desejabilidade, que apresenta métodos fáceis de entender e de usar, além de apresentar flexibilidade para incorporar as preferências do responsável por decisões (pesos ou prioridades destinadas às respostas). Ademais, o método de desejabilidade mais popular, proposto por Derringer e Suich (1980) ou suas modificações, está disponível em muitos pacotes de *software* para análise de dados (COSTA *et al.*, 2011).

A função de desejabilidade converte os modelos de resposta estimados, normalmente modelos de segunda ordem, em funções de desejabilidade individuais que são, então, agregadas em uma função composta (desejabilidade global). Geralmente, essa função é uma média geométrica ou aritmética, que será maximizada ou minimizada, respectivamente (COSTA *et al.*, 2011).

Xiao *et al.* (2006) estudaram os efeitos da composição do meio e dos parâmetros de fermentação na produção simultânea de micélios e polissacarídeos intracelulares, em cultivo submerso, usando funções de desejabilidade. Com os dados das condições ótimas, constataram que o uso de funções de desejabilidade é eficaz na otimização de processos de fermentação multi-resposta, sendo prontamente aplicável a outros sistemas de fermentação.

Nos estudos de Gadhe *et al.* (2013), a MRS e a função de desejabilidade foram empregadas a fim de alcançar a máxima produção de hidrogênio em lodo anaeróbio. Li *et al.* (2007) projetaram um meio ideal para o processo de fermentação de L-glutamina, utilizando metodologia de superfície de resposta. Com base nos resultados da MSR, a função de desejabilidade foi introduzida para prever a melhor condição do meio em relação à concentração de glutamina e ao custo de produção, onde as técnicas de otimização simultânea aplicadas demonstraram ser eficientes para otimizar o meio de fermentação para a produção de glutamina.

Yang *et al.* (2014) investigaram a influência da composição do meio e das condições culturais da cultura submersa de *Cordyceps militaris* CGMCC 2909 sobre a produção ideal de micélios, polissacarídeos, adenosina e manitol, usando métodos estatísticos sequenciais combinados com a função de desejabilidade. Assim como em outros estudos, os seus resultados confirmaram que a função de desejabilidade e a metodologia de superfície de resposta são ferramentas eficazes para modelagem matemática e para a análise fatorial do processo de otimização.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os ensaios de fermentação e extração do caldo enzimático foram baseados na metodologia descrita por Mrudula e Murugammal (2011), com algumas modificações. O esquema descrito na Figura 5 apresenta, de forma sucinta, as etapas empregadas no processo de produção das enzimas celulolíticas.

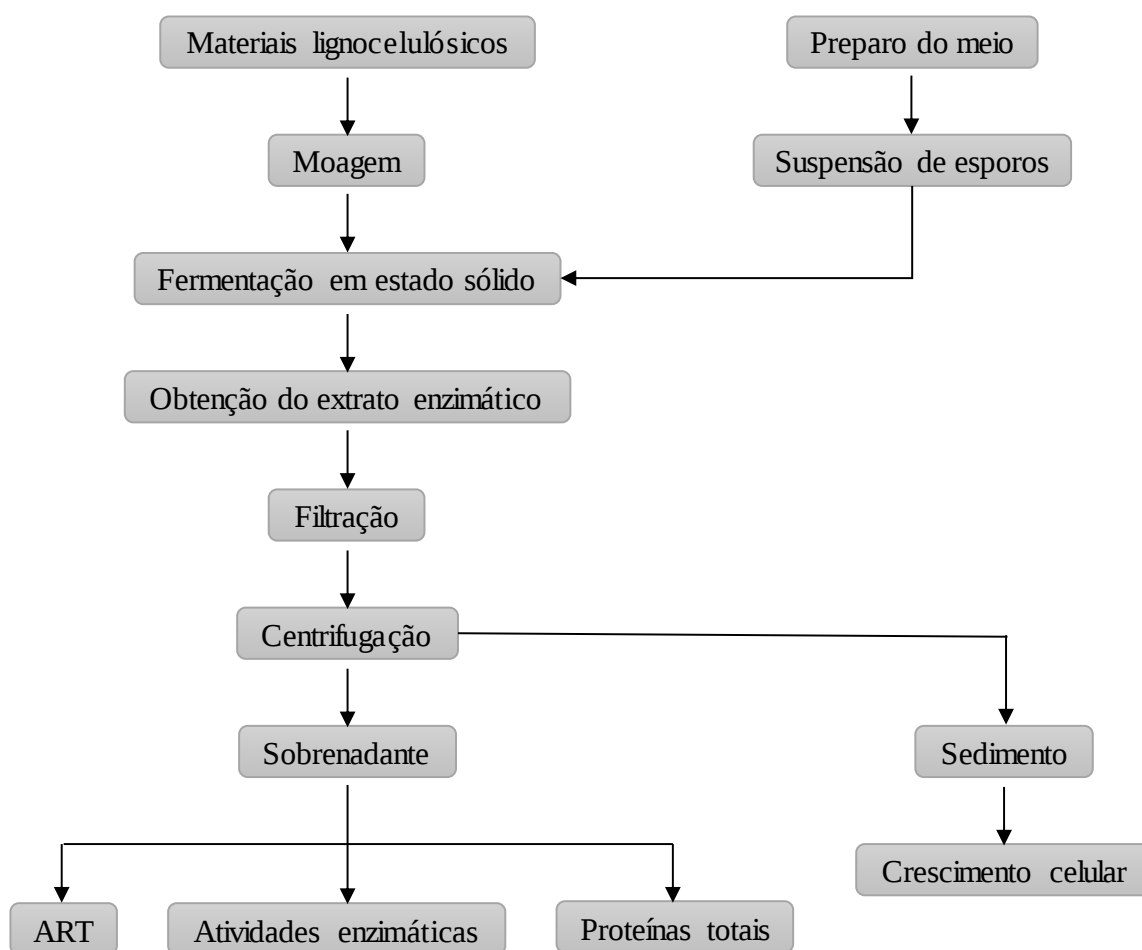


Figura 5 – Diagrama do processo de produção de enzimas celulolíticas

Fonte: Autora (2016)

3.1 SUBSTRATOS

Os materiais lignocelulósicos empregados na fermentação em estado sólido foram resíduos de folhas, coletados na região adjacente ao LABAM, além de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho obtidos em feiras locais. Estes substratos foram moídos, para a

obtenção de um pó homogêneo, e classificados utilizando peneira *Tyler* 20. Em seguida, os resíduos foram armazenados em recipientes hermeticamente fechados.

3.2 MICRORGANISMOS

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger* (Figura 6), isolado do solo pelo Grupo de Engenharia de Sistemas Biológicos (BIOSE), que pertence a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e, gentilmente, doado pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Sergipe. No primeiro repique, a cultura foi semeada em meio ágar batata dextrose (Potato Dextrose Agar – PDA), em tubos inclinados, os quais foram incubados a 30 °C por cinco dias, para proporcionar o crescimento de colônias fúngicas. Depois deste período, os esporos obtidos foram armazenados a 4 °C, para a sua preservação. A partir dos tubos, foi realizado um segundo repique, com os mesmos requisitos do anterior, onde os fungos foram inoculados em frascos Erlenmeyers, para obter uma maior área de desenvolvimento da cultura e, conseqüentemente, uma maior esporulação.



Figura 6 – Fungo *Aspergillus niger*

Fonte: Autora (2016)

3.3 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, 50 mL da solução estéril de *Tween* 80 a 0,01% (v/v) foram adicionados aos frascos Erlenmeyers, com os microrganismos no meio PDA, para desprender os esporos a partir de raspagem e agitação. Posteriormente, a suspensão de esporos foi transferida para outro frasco esterilizado e armazenada a 4 °C.

3.3.1 Contagem de esporos

A contagem dos esporos foi realizada em câmara de *Neubauer*, com o auxílio de um microscópio, em cinco quadrantes (um central e quatro periféricos). Cada quadrante é composto por 16 quadrados, com área igual a 0,0025 mm², e a profundidade da câmara corresponde a 0,1 mm. O volume da suspensão inoculado no meio de fermentação foi ajustado para a concentração final de 2×10^7 esporos por grama de substrato sólido e calculado de acordo com a Equação 1 (BARROS *et al.*, 2014).

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{C_{\text{desejada}} \times m_{\text{substrato}}}{C_{\text{calculada}}} \quad (1)$$

Nesta equação, $V_{\text{inóculo}}$ é o volume de inóculo a ser adicionado (mL); $m_{\text{substrato}}$ é a massa de substrato usada na fermentação (g); C_{desejada} é a concentração final de esporos na fermentação (esporos/g); $C_{\text{calculada}}$ é a concentração de esporos na suspensão (esporos/mL).

3.3.2 Crescimento celular

O crescimento celular foi determinado com base no método da massa seca, com algumas alterações, no qual 10 mL do extrato enzimático foram centrifugados a 3.400 rpm durante 10 min, e então a massa foi separada do sobrenadante e colocada para secar em estufa a 60 °C até atingir peso constante. A Equação 2 representa o cálculo da concentração de biomassa na solução por massa seca, para obter a concentração de esporos no caldo (ROCHA, 2010).

$$X = \frac{m_s}{V_c} \times V_f \times \frac{100}{m_r} \quad (2)$$

Onde X é a quantidade de células (g/100 g de substrato); m_s é a massa seca (g); V_c é o volume do caldo enzimático (mL); V_f é o volume de água adicionado na extração das enzimas (mL); m_r é a massa do substrato (g).

3.4 PROCESSO FERMENTATIVO

As fermentações em estado sólido, para a obtenção de enzimas celulolíticas, foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, usados como biorreatores, contendo 7,5 g de cada substrato (resíduos de folhas, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho) e o volume da solução nutriente suficiente para atingir 55% de umidade. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 1 atm durante 15 min. Após o resfriamento, o meio foi inoculado com a suspensão de esporos de *Aspergillus niger* e incubado a 30 °C por um período de 120 h. Os Erlenmeyers foram submetidos à agitação suave periodicamente.

3.4.1 Solução nutriente

Como a composição da solução nutriente varia entre os trabalhos da literatura, diferindo tanto nos elementos quanto nas suas concentrações, realizou-se um levantamento com alguns autores (Tabela 9) para verificar quais as principais fontes de nitrogênio e sais minerais utilizados nesta solução. Diante disso, foram selecionados os complementos nutricionais da fermentação. A escolha se baseou nos elementos mais utilizados entre os autores citados e, também, na sua disponibilidade no laboratório.

Dessa forma, a solução nutriente foi composta por: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/L; KH_2PO_4 , 3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L; CaCl_2 , 0,5 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0016 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0014 g/L.

3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Ao final da fermentação, as enzimas celulolíticas foram extraídas a partir do caldo fermentado. Em cada frasco Erlenmeyer, adicionou-se água destilada, na proporção de 1:10 (m/v), misturando homogeneamente em um agitador rotativo a 120 rpm e 30 °C durante 1 h. O extrato enzimático obtido foi filtrado a vácuo. Em seguida, foi retirado o volume de extrato necessário para a análise do crescimento celular e o restante foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min, sendo o sobrenadante utilizado como fonte de enzima extracelular para a determinação da concentração de substrato (ART), atividade enzimática e proteína total.

Tabela 9 – Comparação da solução nutriente entre alguns autores

Nutriente	AUTORES								
	(JECU, 2000)	(HU <i>et al.</i> , 2011)	(BOGGIONE <i>et al.</i> , 2016)	(ABUD <i>et al.</i> , 2015)	(SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2015)	(CUNHA <i>et al.</i> , 2012b)	(GAO <i>et al.</i> , 2008)	(NARRA <i>et al.</i> , 2012)	(LEVER <i>et al.</i> , 2013)
	Concentração (g/L)								
(NH₄)₂SO₄	10,00	10,00	-	10,00	3,50	1,40	3,50	1,86	10,00
KH₂PO₄	3,00	3,00	-	3,00	3,00	2,00	3,00	2,00	3,00
MgSO₄.7H₂O	0,50	-	0,30	1,00	0,50	0,20	0,50	0,30	0,50
MgSO ₄	-	0,50	-	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ . H ₂ O	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50
CaCl₂	-	0,50	-	0,50	0,50	0,30	0,50	0,30	-
Peptona	-	-	1,00	-	-	5,00	-	8,00	-
FeSO₄. 7H₂O	-	-	-	0,005	-	0,005	-	0,005	-
FeSO ₄	-	-	0,005	-	-	-	-	-	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	0,0016	-	-	-	-	-	-
MnSO₄.H₂O	-	-	-	-	-	0,0016	-	0,0016	-
MnSO ₄	-	-	-	0,005	-	-	-	-	-
ZnSO₄.7H₂O	-	-	0,0014	-	-	0,0014	-	0,0014	-
ZnSO ₄	-	-	-	0,005	-	-	-	-	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-
CoCl ₂	-	-	-	-	-	0,002	-	0,002	-
Ureia	-	-	0,30	-	-	0,30	-	0,30	-
Extrato de levedura	-	-	0,25	-	-	2,00	-	4,08	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	0,001	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autora (2016)

3.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Os sobrenadantes do caldo enzimático foram analisados para a quantificação das atividades da celulase total e da endoglucanase, segundo metodologia sugerida Ghose (1987). Uma unidade de atividade enzimática (FPase e CMCase) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um μmol de açúcares redutores por minuto, como a glicose, sob as condições de análise (MANSOUR *et al.*, 2016). Para a quantificação desses açúcares, elaborou-se uma curva padrão com os valores das concentrações de glicose versus a absorbância.

3.6.1 Atividade enzimática total em papel filtro (FPase)

A atividade em FPase foi determinada usando como substrato uma tira de papel filtro qualitativo Whatman n.º 1 (1 por 6 cm, com 50 mg aproximadamente). Em tubos de ensaio de 25 mL foram adicionados 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e o substrato. Esta mistura reagiu por 5 min a 50 °C. Em seguida, 0,5 mL do filtrado enzimático, diluídos em tampão citrato, foram acrescentados aos tubos, e os mesmos foram incubados em banho termostático a 50 °C durante 60 min. Depois da incubação, os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do DNS, proposto por Miller (1959). Para isso, foram adicionados 3 mL de reagente DNS para interromper a reação enzimática. A mistura foi colocada em água fervente por 5 min, sendo posteriormente resfriada em banho de gelo e, então, diluída com a adição de 20 mL de água destilada. Por último, os tubos foram deixados em repouso durante 20 min, e a cor formada foi lida em um espectrofotômetro a 540 nm. O branco da enzima foi elaborado sem a presença do substrato, com 1 mL de tampão citrato e 0,5 mL do filtrado enzimático. No caso do zero do espectrofotômetro, a enzima não foi utilizada, apenas 1,5 mL do tampão.

Pelo menos, duas diluições foram realizadas. Uma diluição deve ser capaz de libertar um pouco mais que 2 mg de glicose utilizando o reagente DNS, já a outra deve liberar uma quantidade menor.

A partir da curva padrão foi possível determinar a concentração de glicose liberada na reação enzimática. As diluições da enzima foram convertidas em concentração pela Equação 3.

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{Diluição}} = \frac{\text{volume de enzima na diluição}}{\text{volume total de diluição}} \quad (3)$$

A concentração de enzima que produziu exatamente 2,0 mg de glicose foi estimada a partir de um gráfico que relaciona a glicose liberada com a concentração. Com o valor obtido, as unidades foram calculadas pela Equação 4.

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentração da enzima que libera 2,0 mg de glicose}} \text{ U/mL} \quad (4)$$

Onde,

1 U = 1 $\mu\text{mol/min}$ de substrato convertido;

1 U = 0,18 mg/min quando o produto é glicose.

Como a quantidade absoluta de glicose liberada no ensaio FPU, produzida por 0,5 mL de enzima em 60 min, em uma diluição crítica é 2,0 mg, conclui-se que:

$$2,0 \text{ mg de glicose} = \frac{2}{0,18 \times 0,5 \times 60} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,37 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,37 \text{ U/mL}$$

A enzima não diluída libera menos do que a quantidade crítica de glicose, apresentando baixos níveis de atividade. Nesse caso, as atividades foram calculadas pela Equação 5.

$$\text{FPU} = \text{mg de glicose liberada} \times 0,185 \quad (5)$$

Onde,

$$1,0 \text{ mg de glicose} = \frac{1}{0,18 \times 0,5 \times 60} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,185 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,185 \text{ U/mL}$$

3.6.2 Atividade enzimática da endo- β -1,4-glucanase (CMCase)

A atividade CMCase foi analisada usando como substrato a carboximetilcelulose 2% (CMC). Neste ensaio, uma amostra de 0,5 mL do caldo enzimático, diluído em tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8), foi adicionada em tubos de ensaio de 25 mL. A solução enzimática foi aquecida em banho termostático durante 5 min a 50 °C. Posteriormente, 0,5 mL de carboximetilcelulose 2% foram adicionados aos tubos. As amostras foram incubadas a

temperatura de 50 °C por 30 min. Após este período, 3 mL do reagente DNS foram adicionados para cessar a reação. A mistura foi colocada em água fervente por 5 min, em seguida, foi resfriada e diluída com a adição de 20 mL de água destilada. A absorbância da reação foi aferida, no espectrofotômetro, em comprimento de onda 540 nm. A amostra de branco foi produzida com 0,5 mL de solução de substrato e 0,5 mL do filtrado enzimático diluído. O branco do espectrofotômetro (absorbância zero) foi composto por 0,5 mL da solução de substrato e 0,5 mL do tampão citrato.

Pelo menos, duas diluições foram realizadas. Uma diluição deve ser capaz de libertar um pouco mais que 0,5 mg de glicose utilizando o reagente DNS, já a outra deve liberar uma quantidade menor.

As diluições da enzima também foram convertidas em concentração de acordo com a Equação 3.

A concentração de enzima que produziu exatamente 0,5 mg de glicose foi avaliada a partir de um gráfico que relaciona a glicose liberada com a concentração. Com o valor obtido, as unidades foram mensuradas pela Equação 6.

$$\text{CMC} = \frac{0,185}{\text{concentração da enzima que libera 0,5 mg de glicose}} \text{U/mL} \quad (6)$$

Onde,

1 U = 1 μmol /min de substrato convertido;

1 U = 0,18 mg/min quando o produto é glicose.

Como a quantidade absoluta de glicose liberada no ensaio CMC, produzida por 0,5 mL de enzima em 30 min, em uma diluição crítica é 0,5 mg, tem-se que:

$$0,5 \text{ mg de glicose} = \frac{0,5}{0,18 \times 0,5 \times 30} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,185 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,185 \text{ U/mL}$$

A enzima não diluída libera menos do que a quantidade crítica de glicose, apresentando baixos níveis de atividade. Nesse caso, as atividades foram calculadas pela Equação 7.

$$\text{CMC} = \text{mg de glicose liberada} \times 0,37 \quad (7)$$

Onde,

$$1,0 \text{ mg de glicose} = \frac{1}{0,18 \times 0,5 \times 30} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,37 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min.mL}} = 0,37 \text{ U/mL}$$

3.6.3 Curva padrão de glicose

A construção da curva padrão baseou-se no procedimento proposto por Adney e Baker (1996). Para isso, foram utilizadas duas soluções estoque de glicose anidra, 2 mg/mL (CMCase) e 10 mg/mL (FPase), as quais foram armazenadas sob refrigeração (congeladas). Depois que as soluções foram descongeladas, sofreram agitação para garantir uma mistura adequada.

Para o padrão da FPase, foram adicionados 0,5 mL das diluições de glicose com 1 mL do tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8), em tubos de ensaio, os quais foram incubados a 50 °C durante 60 min. No caso da curva de calibração da CMCase, em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL das diluições de glicose com 0,5 mL da solução de CMC 2% e, em seguida, foram incubados por 30 min a 50 °C.

A reação foi interrompida com o acréscimo de 3 mL da solução DNS, após o período de incubação. Logo após, os tubos foram colocados em água fervente por 5 min e, depois do aquecimento, foram colocados em banho de gelo e deixados em repouso por alguns instantes. Ao final, foram acrescentados 20 mL de água destilada, a mistura foi homogeneizada, e a cor formada foi analisada em espectrofotômetro a 540 nm, o qual deve ser calibrado com uma amostra sem glicose. As diluições para a FPase são apresentadas na Tabela 10 e, para a CMCase, na Tabela 11.

Tabela 10 – Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da FPase

Diluição	Estoque de glicose (mL)	Tampão citrato de sódio (mL)	Concentração (mg/0,5 mL)	Concentração (mg/mL)
1:1,5	1,0	0,5	3,33	6,67
1:2	1,0	1,0	2,50	5,00
1:3	1,0	2,0	1,65	3,30
1:5	1,0	4,0	1,00	2,00
1:7	1,0	6,0	0,71	1,42
1:9	1,0	8,0	0,56	1,12

Fonte: Adaptado de Ghose (1987)

Tabela 11 – Diluições das soluções estoque de glicose para construção da curva padrão da CMCase

Diluição	Estoque de glicose (mL)	Tampão citrato de sódio (mL)	Concentração (mg/0,5 mL)	Concentração (mg/mL)
1:1	1,0	0,0	1,00	2,00
1:1,5	1,0	0,5	0,67	1,33
1:2	1,0	1,0	0,50	1,00
1:4	1,0	3,0	0,25	0,50
1:6	1,0	5,0	0,17	0,33

Fonte: Adaptado de Ghose (1987)

3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

A determinação dos açúcares redutores totais foi realizada a partir do método colorimétrico do DNS, conforme descrito por Miller (1959). Inicialmente, o extrato enzimático sofreu uma hidrólise com ácido sulfúrico e, em seguida, neutralização com hidróxido de sódio. Para esse processo, 1 mL do extrato foi transferido para um tubo de ensaio juntamente com 5 mL de H₂SO₄ 1,5 M, então essa mistura foi colocada em banho fervente durante 30 min, com agitação constante, para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não redutores. Em seguida, foi colocada em banho de gelo e, após a adição de fenolftaleína, foi neutralizada com NaOH 10%. A solução foi filtrada e o seu volume completado com água destilada até 25 mL. Ao final desse procedimento, 0,25 mL da amostra foi transferido para um tubo de ensaio com 0,5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente DNS. O tubo foi colocado em água fervente por 5 min, depois resfriado em banho de gelo para cessar a reação e, posteriormente, a mistura foi diluída com a adição de 4 mL de água destilada. A cor formada nessa reação foi lida em um espectrofotômetro a 540 nm. O zero do espectrofotômetro foi elaborado sem a presença da amostra hidrolisada, apenas com 0,75 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente DNS. A partir de uma curva padrão foi possível determinar a concentração de ART em glicose, em g/L. Os cálculos para a determinação dos açúcares redutores totais podem ser realizados por meio da Equação 8.

$$\text{ART (g/L)} = \text{Diluição da hidrólise} \times \text{absorbância} \times \text{fator da curva padrão} \quad (8)$$

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), o qual se baseia em uma curva padrão com diferentes concentrações de uma proteína conhecida, usualmente a albumina do soro bovino (BSA), e a solução corante. A solução corante foi preparada dissolvendo-se azul brilhante de Coomassie G-250 em etanol, ácido fosfórico 85% e água destilada. E a curva de calibração foi construída utilizando soluções de BSA com concentrações na faixa de 0,02 g/L a 0,10 g/L.

Para a dosagem de proteínas, em tubos de ensaio, foram adicionados 0,1 mL do extrato enzimático e 1 mL da solução corante. Após 10 min de reação, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro, com o comprimento de onda 600 nm. O zero do espectrofotômetro foi composto por 0,1 mL de água destilada e 1 mL do corante.

As atividades específicas da celulase total e da endoglucanase foram avaliadas pela relação entre atividade enzimática (U/mL) e o teor de proteínas totais (mg/mL).

3.9 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

3.9.1 Planejamento fatorial completo ($2^4 + 3$)

O planejamento fatorial foi realizado para analisar quais as condições mais adequadas para a produção de celulases pelo fungo *Aspergillus niger*, por meio da fermentação em estado sólido, tendo os resíduos de folhas (biomassa abundante, barata e composta por lignocelulose) como fonte de carbono.

Então, para estudar a influência das variáveis: concentração do inóculo (esporos/g_{substrato}), pH inicial, temperatura (°C) e umidade da amostra (%), nas atividades enzimáticas da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) e nas suas atividade específicas, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4 , com três repetições no ponto central (PC), utilizando o *software* STATISTICA®, de acordo com a metodologia de Barros Neto *et al.* (2001). Na Tabela 12, é apresentada a matriz do planejamento com os valores reais e codificados.

A faixa de valores para os níveis da concentração final do inóculo foi escolhida de acordo com os trabalhos descritos na literatura. Como não há um padrão para este valor, foi selecionada uma quantidade com diferença de 1×10^7 de esporos/g_{substrato} entre os níveis superior e inferior, levando em consideração a concentração inicial do inóculo. Os níveis do pH

inicial e da temperatura foram escolhidos em conformidade com o crescimento dos microrganismos, isto é, em condições onde o crescimento era mais favorável. E, por último, os níveis de umidade da amostra foram definidos baseados no teor de água suportado pela fermentação em estado sólido. Também foi realizado um estudo prévio do processo fermentativo com diferentes quantidades de água. Deve-se salientar que todos os dados foram pesquisados na literatura.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 3,5 g de substrato, sendo acompanhadas durante 192 h, com análises diárias, em triplicata, das atividades de FPase e CMCase, assim como ART e proteínas.

Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial ($2^4 + 3$) para a produção de celulasas

Ensaio	Concentração do inóculo (esporos/g_{substrato})	pH inicial	Temperatura (°C)	Umidade (%)
1	1x10 ⁷ (-1)	5 (-1)	30 (-1)	30 (-1)
2	1x10 ⁸ (1)	5 (-1)	30 (-1)	30 (-1)
3	1x10 ⁷ (-1)	6 (1)	30 (-1)	30 (-1)
4	1x10 ⁸ (1)	6 (1)	30 (-1)	30 (-1)
5	1x10 ⁷ (-1)	5 (-1)	40 (1)	30 (-1)
6	1x10 ⁸ (1)	5 (-1)	40 (1)	30 (-1)
7	1x10 ⁷ (-1)	6 (1)	40 (1)	30 (-1)
8	1x10 ⁸ (1)	6 (1)	40 (1)	30 (-1)
9	1x10 ⁷ (-1)	5 (-1)	30 (-1)	70 (1)
10	1x10 ⁸ (1)	5 (-1)	30 (-1)	70 (1)
11	1x10 ⁷ (-1)	6 (1)	30 (-1)	70 (1)
12	1x10 ⁸ (1)	6 (1)	30 (-1)	70 (1)
13	1x10 ⁷ (-1)	5(-1)	40 (1)	70 (1)
14	1x10 ⁸ (1)	5 (-1)	40 (1)	70 (1)
15	1x10 ⁷ (-1)	6 (1)	40 (1)	70 (1)
16	1x10 ⁸ (1)	6 (1)	40 (1)	70 (1)
17 (PC)	5,5x10 ⁷ (0)	5,5 (0)	35 (0)	50 (0)
18 (PC)	5,5x10 ⁷ (0)	5,5 (0)	35 (0)	50 (0)
19 (PC)	5,5x10 ⁷ (0)	5,5 (0)	35 (0)	50 (0)

Fonte: Autora (2016)

3.9.2 Função de desejabilidade

A função de desejabilidade é um método de otimização simultânea das variáveis dependentes (saída/resposta), as quais dependem de um conjunto de variáveis independentes (entrada). Basicamente, envolve a seleção de um conjunto de condições de entrada, que fornecem os valores de saída mais desejáveis (DERRINGER e SUICH, 1980).

Quando há um grande número de variáveis de entrada e saída, a análise de resposta única apresenta algumas limitações, pois as condições de entrada não são as mesmas para as diferentes respostas, levando a uma falsa interpretação da situação ótima (DEKA *et al.*, 2013).

A função envolve a transformação de cada variável de resposta estimada, y_i , em um valor desejável, d_i , o qual varia de 0 a 1. O valor de d_i aumenta à medida que aumenta a desejabilidade da resposta correspondente. Respostas com valores de d_i iguais a 0 são consideradas fora da região aceitável. Então, as desejabilidades individuais são combinadas, usando média geométrica, para determinar a desejabilidade global (D) do sistema de múltiplas respostas, como é mostrado na Equação 9 (DERRINGER e SUICH, 1980).

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_k)^{1/k} \quad (9)$$

Onde k é o número de respostas. E, assim como d_i , a desejabilidade global (D) varia de 0 a 1 e aumenta à medida que o equilíbrio das propriedades se torna mais favorável.

Dependendo se uma resposta particular, y_i , deve ser maximizada, minimizada ou atribuída um valor alvo, podem ser utilizadas diferentes funções de desejabilidade, d_i (DERRINGER e SUICH, 1980). Como neste trabalho a função de desejabilidade foi aplicada com o objetivo de otimizar as variáveis de entrada para maximizar as atividades da celulase total e da endoglucanase, a desejabilidade individual foi determinada pela Equação 10.

$$d_i(\hat{y}_i) = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i \leq y_{i*} \\ \left[\frac{\hat{y}_i - y_{i*}}{y_i^* - y_{i*}} \right]^r & y_{i*} < \hat{y}_i < y_i^* \\ 1 & \hat{y}_i \geq y_i^* \end{cases} \quad (10)$$

Onde $d_i(\hat{y}_i)$ é a função de desejabilidade; y_{i*} é o valor mínimo aceitável de $\hat{y}_i$; y_i^* é o valor mais alto de $\hat{y}_i$; r é o peso de uma resposta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalhos estão divididos em duas partes. A primeira refere-se ao estudo da influência de diferentes substratos (resíduos de folhas, bagaço de cana e sabugo de milho) nas atividades enzimáticas da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase), isto é, como estas atividades são influenciadas pelo crescimento microbiano e pelo consumo dos substratos. Já a segunda parte discorre sobre a análise das variáveis: concentração final do inóculo, pH inicial, temperatura e umidade, na fermentação em estado sólido com os resíduos de folhas, e como as mesmas interferem nas atividades das celulasas em diferentes condições.

Como não há programas ambientais que visam a alocação adequada dos resíduos urbanos, como folhas, galhos e troncos de árvores, com o intuito de reciclagem ou reaproveitamento, a bioconversão desses resíduos é uma alternativa para minimizar os impactos ambientais causados pelo descarte incorreto e para utilizar uma fonte barata e rica de nutrientes para obter produtos úteis, sustentáveis e com alto valor agregado. Diante disso, os resíduos de folhas foram utilizados neste trabalho como substrato na produção de celulasas. Ainda, a sua seleção foi devido ao uso já consolidado do bagaço de cana e do sabugo de milho na produção de biocombustíveis e outras aplicações, bem como pela escassez de estudos disponíveis na literatura que utilizam as folhas como substrato.

4.1 INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

4.1.1 Resíduos de folhas

Os extratos enzimáticos das folhas, obtidos a partir das fermentações, foram analisados em relação à composição de açúcares redutores totais (ART), atividades da celulase total e da endoglucanase, em um período de 120 h.

Na Figura 7, observa-se que a FPase alcançou a maior atividade em 48 h, com $0,78 \pm 0,00$ U/g, seguido por um decaimento no ART e um aumento na concentração de esporos, indicando que o microrganismo consumiu o substrato para a produção de enzimas. A partir desse período, houve uma queda na atividade enzimática, a qual apresentou uma variação mínima entre 72 e 96 h, enquanto os açúcares redutores permaneceram em declínio, atingindo seu valor mínimo em 72 h, ao mesmo tempo que o crescimento microbiano atingiu o seu máximo. Nessa etapa, o fungo esgotou a quantidade de açúcar disponível no substrato e, como estava em uma fase de crescimento exponencial, essa concentração de açúcar, especialmente a

glicose, não foi o suficiente para acompanhar o seu desenvolvimento, tornando possível a obtenção de mais açúcares por meio das enzimas já produzidas (OBEROI *et al.*, 2012). Em 96 h, nota-se uma redução na concentração de esporos em decorrência da morte ou crescimento lento dos fungos, ao passo que o ART aumentou e a atividade diminuiu, já que os fungos não estavam com o metabolismo ativo para a produção de enzimas. Em 120 h, os microrganismos voltaram a crescer, consumindo o açúcar do substrato, proporcionando um leve acréscimo na atividade de celulase total.

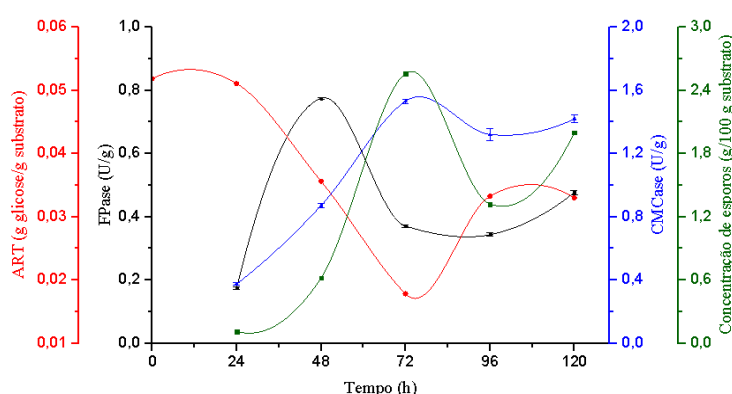


Figura 7 – Curvas de crescimento do *Aspergillus niger*, teores de açúcares redutores totais, atividades da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) em função do tempo de fermentação, utilizando resíduos de folhas como fonte de carbono

O perfil de atividade enzimática da endoglucanase acompanhou o crescimento microbiano, alcançando sua maior produção em 72 h (Figura 7). À medida que os microrganismos se desenvolveram, alimentando-se dos açúcares disponíveis no substrato, produziram a enzima em questão. Neste tempo, o caldo apresentou uma atividade de $1,53 \pm 0,01$ U/g, com menor concentração de açúcares redutores totais ($0,02 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) e maior produção de esporos ($2,56 \text{ g}_{\text{esporos}}/100 \text{ g}_{\text{substrato}}$). Em 96 h, observa-se uma diminuição do crescimento fúngico e da atividade da endoglucanase, ao mesmo tempo em que não houve consumo de substrato e, sim, uma liberação de açúcares no meio, mostrando que os fungos, ainda ativos, liberaram enzimas para a hidrólise dos açúcares e para a sua reprodução, fato observado no final das fermentações (120 h), onde os esporos exibiram um acréscimo em sua concentração e, com isso, influenciaram na produção de CMCase, a qual apresentou atividade de $1,42 \pm 0,02$ U/g.

Este estudo utilizou resíduos de folhas como fonte de carbono para a produção de celulases, tornando inviável uma comparação mais minuciosa em torno dos demais substratos.

Kumar *et al.* (2016a) avaliaram a influência de diferentes substratos na produção de celulasas pelo fungo *A. nidulans*, onde se destacou o resíduo da grama preta (*Vigna mungo*), parte da planta sem raiz e sementes, obtendo atividade máxima da celulase total de 1,50 U/g e endoglucanase de 61,7 U/g. Nos estudos de Liang *et al.* (2012), com *Aspergillus* sp. cultivado em grama de arroz (*Spartina* spp.), a atividade da celulase total foi de 1,14 U/g após a otimização das variáveis da fermentação. Essa disparidade entre os valores da literatura e os encontrados neste trabalho é plausível, uma vez que as fermentações foram realizadas em condições específicas, com diferentes cepas de microrganismos e com grande variabilidade de substratos.

4.1.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Analogamente aos resíduos de folhas, os caldos enzimáticos da fermentação sólida, tendo o bagaço de cana como fonte de carbono, foram avaliados em relação à atividade da celulase total e da endoglucanase, o crescimento do fungo *Aspergillus niger* e os teores de açúcares redutores totais. Todos em função do tempo, com duração de 120 h.

Conforme a Figura 8, o microrganismo apresentou um crescimento lento, seguido por uma fase de declínio, nas primeiras horas de fermentação, reduzindo-se consideravelmente até 72 h, uma vez que sua concentração caiu de 2,29 para 0,32 g_{esporos}/100 g_{substrato} em um intervalo de tempo de 24 h. Apesar disso, percebe-se que, mesmo com a baixa concentração de esporos, a FPase continuou sendo produzida em taxas reduzidas, apenas com uma pequena queda em 96 h, atingindo atividade máxima de produção em 120 h ($1,09 \pm 0,01$ U/g). A diminuição na atividade ocorreu simultaneamente ao aumento na produção de esporos, o que provavelmente foi causado pela utilização das enzimas como fonte de nutrientes para sua reprodução. Em 120 h, os perfis cinéticos das três variáveis apresentaram o comportamento esperado, isto é, consumo do substrato pelo microrganismo e consequente produção enzimática.

Um estudo envolvendo vários resíduos lignocelulósicos, dentre eles, o bagaço de cana, foi realizado por Bansal *et al.* (2012) com o objetivo de produzir celulasas por *A. niger* em cultivo sólido. A atividade da celulase total foi de $1,50 \pm 0,01$ U/g, no resíduo sem tratamento, assemelhando-se ao ponto de máxima atividade encontrado neste trabalho. Em contrapartida, no trabalho de Membrillo *et al.* (2008), a produção de FPase por duas cepas de *Pleurotus ostreatus* cultivadas no mesmo substrato atingiu maior atividade (0,013 U/g) em 192 h (8 dias). Isto mostra que, mesmo compartilhando o substrato, a forma como o microrganismo age no

consumo de nutrientes e as condições da fermentação (tamanho da partícula, temperatura, umidade, entre outros) são fatores cruciais para o andamento do processo.

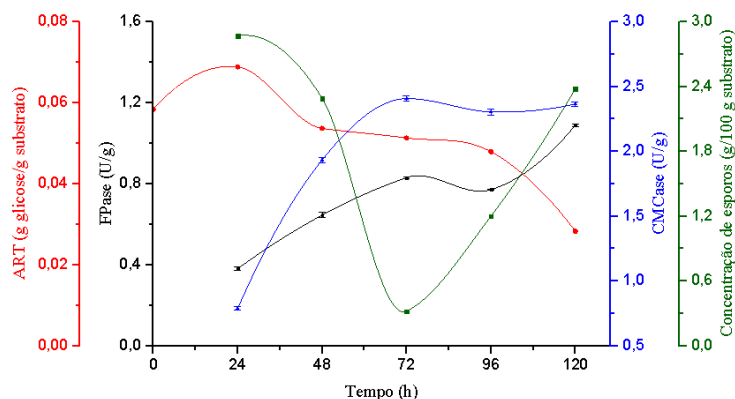


Figura 8 – Curvas de crescimento do *Aspergillus niger*, teores de açúcares redutores totais, atividades da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) em função do tempo de fermentação, utilizando bagaço de cana como fonte de carbono

Embora tenham apresentado crescimento nas primeiras horas de cultivo, os microrganismos entraram em uma fase de declínio logo em seguida, atingindo seu mínimo em 72 h, tempo no qual a enzima endoglucanase atingiu sua atividade máxima ($2,40 \pm 0,02$ U/g). Entre 24 e 72 h, a atividade da endoglucanase aumentou à medida que a produção de esporos diminuiu, mostrando que, apesar da pequena quantidade de microrganismos, os mesmos estavam metabolicamente ativos e propensos à degradação do substrato para a produção da enzima. Após seu pico de produção, a atividade teve uma leve redução em 96 h ($2,30 \pm 0,02$ U/g), crescendo novamente em 120 h, coincidindo com o aumento na produção de esporos e sugerindo que a produção está relacionada com o bom desenvolvimento dos fungos.

De acordo com Delabona *et al.* (2012), há na literatura muitos trabalhos que indicam o gênero *Aspergillus* como bom produtor da endoglucanase. Em suas análises com o fungo *Aspergillus fumigatus*, cultivados em diferentes substratos (bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de soja e casca de laranja), os autores identificaram que a fonte de carbono exerce grande influência na atividade da CMCase, obtendo menores níveis de produção da endoglucanase no bagaço de cana ($16,7$ U/g), após 96 h de fermentação, um valor três vezes maior ao encontrado Bansal *et al.* (2012) com o fungo *Aspergillus niger* ($5,00 \pm 0,1$ U/g). Essa diferença entre os dois fungos pode ser notada nas pesquisas de Delabona *et al.* (2013), onde obtiveram atividade de $8,50$ U/g para o *A. niger* e $13,0$ U/g para o *A. fumigatus*, em um estudo de umidade, indicando que a atividade da CMCase não é influenciada apenas pelo tipo de microrganismo, mas também por condições específicas impostas ao meio fermentado.

4.1.3 Sabugo de milho

Durante 120 h, foram quantificados a atividade de celulase total, atividade da endoglucanase, açúcares redutores totais e crescimento dos microrganismos nos caldos enzimáticos do sabugo de milho.

No início da incubação, os fungos produziram maior quantidade de açúcares em comparação a produção de enzimas (Figura 9). Após as 24 h, os microrganismos começaram a consumir os açúcares disponíveis no sabugo e, com isso, a atividade da FPase também apresentou acréscimo. Os maiores valores de atividade ocorreram em 72 ($0,98 \pm 0,02$ U/g) e 120 h ($1,06 \pm 0,01$ U/g), ambos com menores concentrações de esporos, sugerindo que os fungos resistiram a fatores capazes de inibir seu crescimento, ou até mesmo a morte, ingerindo os nutrientes do meio para a produção de FPase. Por volta das 96 h, os fungos estavam na sua fase de crescimento mais acentuada ($3,69$ g_{esporos}/100 g_{substrato}), consumindo o açúcar do substrato e parte liberado pelas enzimas produzidas, fato observado pela ligeira queda da atividade. Os açúcares redutores totais diminuíram durante todo o tempo de incubação, sendo degradados tanto para o desenvolvimento dos fungos quanto para a produção da celulase total.

A atividade da FPase encontrada por Deswal *et al.* (2011) na produção de celulases por *Fomitopsis* sp. em sabugo de milho foi de $0,19 \pm 0,01$ U/g, valor inferior ao deste trabalho. Já os resultados da FPase obtidos nas pesquisas de Bansal *et al.* (2012), utilizando o fungo *Aspergillus niger* em meio de cultivo contendo sabugo de milho, mostraram-se mais elevados que os deste estudo, com níveis de $3,10 \pm 0,06$ U/g, sugerindo que não só a variabilidade do substrato, mas também a cepa do microrganismo influencia a obtenção das enzimas.

A endoglucanase apresentou maior atividade quando a concentração de esporos atingiu o seu máximo em 96 h, chegando a $3,37 \pm 0,02$ U/g (Figura 9). Enquanto o ART foi reduzido à metade no período de 24 a 96 h. A endoglucanase apresentou perda de atividade em 72 h e em 120 h, sendo esta última fase acompanhada de uma grande redução no número de esporos, atingindo $0,86$ g_{esporos}/100 g_{substrato}. Na segunda diminuição de atividade, os nutrientes que ainda restavam no substrato foram consumidos mais para o crescimento de novas células do que para a produção de enzimas, indicando que a atividade enzimática estava relacionada com o cultivo de esporos no meio, ou seja, quanto mais microrganismos na plenitude de suas funções metabólicas, maior a atividade da CMCase. Outra possível causa dessa redução seria o consumo da própria enzima pelos microrganismos, também com intuito de reprodução.

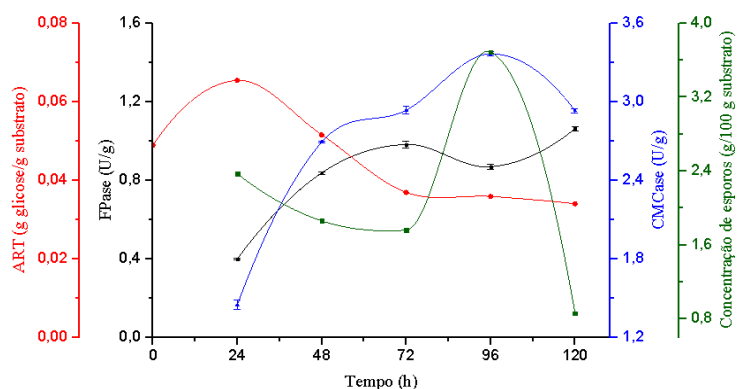


Figura 9 – Curvas de crescimento do *Aspergillus niger*, teores de açúcares redutores totais, atividades da celulase total (FPase) e da endoglucanase (CMCase) em função do tempo de fermentação, utilizando sabugo de milho como fonte de carbono

Sabendo que a produção de enzimas extracelulares depende muito da composição do meio, Deswal *et al.* (2011) estudaram a influência de várias fontes de carbono na produção em meio sólido de celulases pelo fungo *Fomitopsis* sp., utilizando o sabugo de milho como um dos substratos, obtendo atividade da endoglucanase de $2,22 \pm 0,04$ U/g. Pandey *et al.* (2015) analisaram oito espécies de *Trichoderma* para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido em diferentes substratos, entre eles o sabugo de milho, o qual forneceu maior produção de celulases em todas as espécies. Liu *et al.* (2011a), utilizando palhas de arroz, de trigo, de milho e de algodão na produção de celulases pelo fungo *A. fumigatus*, por 4 dias (96 h), observaram maiores atividades na palha de milho, com atividade de FPase e CMCase de $507,6 \pm 13,7$ U/g e $100,8 \pm 4,30$ U/g, respectivamente. A capacidade de produção de celulases por uma espécie termoacidófila de *Aspergillus terreus*, em diferentes resíduos, foi analisada por Gao *et al.* (2008), e os resultados do cultivo sólido com a palha de milho mostraram potencial promissor, com atividade da endoglucanase de 440 U/g. Esses dados apontam a importância da escolha do microrganismo, da fonte de carbono e das condições da fermentação, uma vez que a atividade enzimática depende de tais fatores.

4.1.4 Comparação entre os substratos a partir das suas atividades específicas

As atividades específicas (AE) da celulase total e da endoglucanase foram determinadas pela relação entre as suas atividades enzimáticas e o teor de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos.

Devido à baixa quantidade de proteínas no caldo, obteve-se uma elevada atividade da celulase total por miligrama de proteína. Os perfis de atividade específica da celulase total, para

os diferentes substratos, são apresentados na Figura 10. Os resíduos de folhas apresentaram um aspecto crescente até as 48 h, quando alcançou sua maior atividade específica ($1,29 \pm 0,01$ U/mg_{proteínas}), havendo, após esse período, uma redução com o decorrer do tempo de reação. Para o bagaço de cana, a curva se manteve estável durante toda a fermentação, com pequenas variações nos valores da atividade específica entre 48 e 96 h, chegando ao seu máximo em 120 h ($1,40 \pm 0,01$ U/mg_{proteínas}). Já para o sabugo de milho, o pico de maior atividade específica foi em 72 h ($1,95 \pm 0,35$ U/mg_{proteínas}), tendo, assim como para as folhas, um decréscimo da atividade até o final da fermentação. Portanto, nas etapas que exibiram valores de atividade específica mais elevados, a fração de proteínas no caldo era mais rica em enzimas FPase.

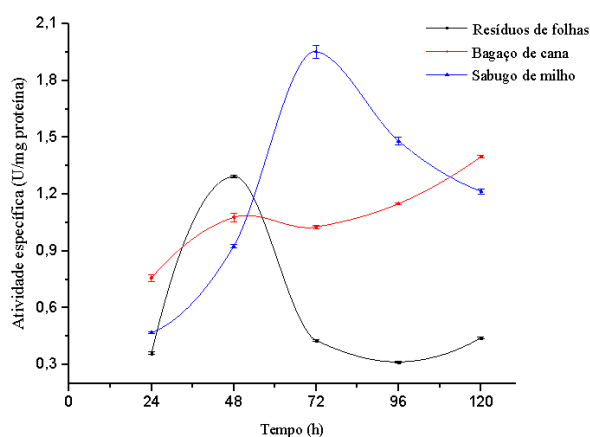


Figura 10 – Perfis de atividade específica das enzimas FPase produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, utilizando resíduos de folhas, bagaço de cana e sabugo de milho como fonte de carbono

O sabugo de milho apresentou atividades específicas da endoglucanase mais elevadas que os demais substratos (Figura 11), atingindo em 72 h o seu valor máximo ($5,84 \pm 0,06$ U/mg_{proteínas}). O bagaço de cana mostrou atividade máxima em 96 h ($3,44 \pm 0,04$ U/mg_{proteínas}), quando o caldo apresentou menor teor de proteínas. Para a CMCase, os resíduos de folhas foram o único substrato que apresentou, no mesmo tempo de fermentação (72 h), pico de atividade enzimática e de atividade específica, mostrando que, em relação às proteínas liberadas, essa parte do caldo era mais rica em enzimas endoglucanase ($1,77 \pm 0,01$ U/mg_{proteínas}).

Jung *et al.* (2015) analisaram o perfil da produção de celulasas por *Penicillium* sp. TG2, em experimentos que utilizaram 5% de celulose como substrato. As atividades específicas máximas foram de $2,28$ U/mg_{proteínas} para endoglucanase e $0,81$ U/mg_{proteínas} para celulase total, em dois dias de cultivo. Harini e Kumaresan (2014) estudaram a produção da endoglucanase a partir de *A. niger*, utilizando sabugo de milho como substrato em fermentação submersa. Os resultados indicaram uma atividade específica de $0,004$ U/mg_{proteínas}. Este valor é inferior aos

valores encontrados neste trabalho, sugerindo que a variabilidade do substrato, a composição de celulose e o tipo de fermentação interferem na atividade enzimática e, conseqüentemente, na atividade específica.

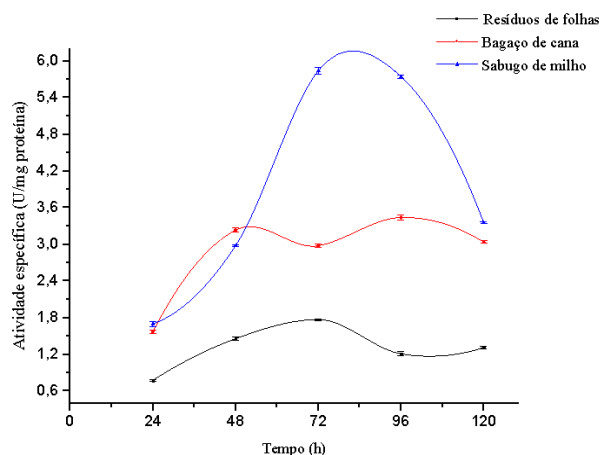


Figura 11 – Perfis de atividade específica das enzimas CMCase produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, utilizando resíduos de folhas, bagaço de cana e sabugo de milho como fonte de carbono

No geral, o sabugo de milho apresentou os maiores picos de atividade específica, tanto para a FPase quanto para a CMCase, seguido pelo bagaço de cana e, por último, pelos resíduos de folhas. A produção de celulasas com menor tempo de fermentação pelo fungo *A. niger* é mais interessante, pelo ponto de vista econômico e operacional, pois menores tempos correspondem a menores gastos com energia, com matéria-prima, entre outros.

Comparando o bagaço de cana e o sabugo de milho, o primeiro resíduo apresentou maior produção de FPase em 120 h, enquanto o segundo mostrou maior produção em 72 h. Para a CMCase, em 96 e 72 h, respectivamente. Nesse sentido, o sabugo de milho torna-se mais vantajoso, pois precisa de um tempo menor para alcançar maiores atividades enzimáticas.

Os resíduos de folhas atingiram a máxima atividade específica de FPase em 48 h, ao passo que o sabugo de milho levou 24 h a mais, porém com maior atividade. Com relação à CMCase, ambos precisaram de apenas 72 h para maximizar a produção da enzima, porém o sabugo de milho produziu três vezes mais do que as folhas sendo, por isso, considerado o substrato mais eficaz para a produção de celulasas ao utilizar o fungo *A. niger*. Comparando a atividade enzimática da celulase total entre as folhas e o bagaço de cana, o fungo atingiu a maior produção de celulasas em 48 h para o primeiro resíduo, e em 120 h para o segundo, ambos com valores aproximados. No caso da endoglucanase, as folhas exibiram maior atividade em 72 h, enquanto que o bagaço de cana foi em 96 h, com quase o dobro da produção de celulasas.

Mesmo sendo um bom substrato para a produção de celulases, atualmente, a maior parte do bagaço de cana é destinado para a produção de biocombustíveis (SINDHU *et al.*, 2016). No entanto, sua disponibilidade para a conversão em biocombustível é comprometida pelo seu uso na produção de eletricidade, pois além de fornecer toda a energia necessária às usinas, a cogeração de energia continua em crescimento, podendo gerar um excedente de energia com consequente comercialização (HOFSETZ e SILVA, 2012). Portanto, a bioconversão do bagaço pode ser economicamente vantajosa para a produção de enzimas, aminoácidos e fármacos se forem requeridas pequenas quantidades de bagaço, não comprometendo o processo de queima nas plantas industriais (PANDEY *et al.*, 2000).

O sabugo de milho, assim como o bagaço, é utilizado na produção de combustíveis, como apresentado por Wakade e Pal (2015), na produção de etanol de sabugo de milho a partir da cofermentação, e nos estudos de Brar *et al.* (2016), que relataram a bioconversão de sabugo de milho em etanol, empregando uma abordagem híbrida baseada na coutilização de hidrolisado ácido e enzimático.

Dessa forma, como os resíduos de folhas apresentaram um potencial na produção de celulases por fermentação em estado sólido, e também não possuem uso comercial conhecido, foi realizado um estudo mais aprofundado do processo fermentativo, no qual foram ajustadas variáveis operacionais visando maior atividade enzimática.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES

Para otimizar as condições operacionais que levam a valores maiores de atividades enzimática e específica (FPase e CMCase) em resíduos de folhas, os quatro fatores (concentração final do inóculo, pH inicial, temperatura e umidade inicial do substrato) foram estudados em dois níveis, com três repetições no ponto central, utilizando o planejamento fatorial completo ($2^4 + 3$). As análises de atividade foram realizadas no extrato enzimático, em intervalos de 24 h, até as 192 h (8 dias), para cada ensaio.

Como a FPase mede a capacidade geral da hidrólise de celulose, ou seja, como as três celulases agem em conjunto para converter a celulose em glicose, e como é necessária a presença da CMCase para iniciar este processo (RAY e BEHERA, 2017), os estudos de ambas atividades são muito importantes na produção de enzimas e, neste caso, precisam ser otimizados simultaneamente. Para isso, foi utilizada a função de desejabilidade, estudada/maximizada no Excel, atribuindo o mesmo peso (importância) para as duas variáveis de saída. Esta função permitiu a seleção dos valores mais desejáveis (desejabilidade global igual ou próxima a 1) das

atividades enzimática e específica da celulase total e da endoglucanase, uma vez que os resultados obtidos, para cada condição experimental, apresentaram pontos ótimos em diferentes tempos de fermentação.

Na Tabela 13, são apresentados os valores das atividades da celulase total e da endoglucanase, após o uso da função de desejabilidade. O valor mais desejável de atividade da celulase total ($0,84 \pm 0,02$ U/g) foi observado em pH inicial 6, teor de umidade de 70%, concentração de inóculo de 1×10^7 esporos/g_{substrato} e temperatura de 40 °C. Para a endoglucanase, o ponto ótimo foi de $1,51 \pm 0,04$ U/g, em pH 6, umidade de 30%, concentração de inóculo de 1×10^7 esporos/g_{substrato} e temperatura de 40 °C.

Tabela 13 – Valores mais desejáveis das atividades FPase e CMCase otimizados a partir da função de desejabilidade

Ensaio	Inóculo (esp/g _{substrato})	pH inicial	Temperatura (°C)	Umidade (%)	FPase (U/g)	CMCase (U/g)
1	1×10^7	5	30	30	$0,44 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,06$
2	1×10^8	5	30	30	$0,33 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,02$
3	1×10^7	6	30	30	$0,61 \pm 0,01$	$1,48 \pm 0,01$
4	1×10^8	6	30	30	$0,34 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,01$
5	1×10^7	5	40	30	$0,65 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,02$
6	1×10^8	5	40	30	$0,34 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,02$
7	1×10^7	6	40	30	$0,75 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,04$
8	1×10^8	6	40	30	$0,25 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,02$
9	1×10^7	5	30	70	$0,36 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,00$
10	1×10^8	5	30	70	$0,33 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,00$
11	1×10^7	6	30	70	$0,20 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$
12	1×10^8	6	30	70	$0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
13	1×10^7	5	40	70	$0,22 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$
14	1×10^8	5	40	70	$0,40 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,05$
15	1×10^7	6	40	70	$0,84 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,04$
16	1×10^8	6	40	70	$0,28 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,04$
17 (PC)	$5,5 \times 10^7$	5,5	35	50	$0,52 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$
18 (PC)	$5,5 \times 10^7$	5,5	35	50	$0,48 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$
19 (PC)	$5,5 \times 10^7$	5,5	35	50	$0,57 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,00$

Os valores das atividades específicas (AE) da celulase total e da endoglucanase, otimizados pela função de desejabilidade, são mostrados na Tabela 14. De acordo com a

desejabilidade global, a celulase total apresentou seu ponto ótimo de atividade específica ($4,94 \pm 0,21$ U/mg_{proteínas}) em pH inicial 5, teor de umidade de 70%, concentração final do inóculo de 1×10^8 esporos/g_{substrato} e temperatura de 30 °C. Para a endoglucanase, a este valor foi de $4,89 \pm 0,10$ U/mg_{proteínas}, em pH 5, umidade de 30%, concentração de inóculo de 1×10^8 esporos/g_{substrato} e temperatura de 40 °C.

Tabela 14 – Valores mais desejáveis das atividades específicas da FPase e da CMCase otimizados a partir da função de desejabilidade

Ensaio	Inóculo (esp/g _{subst.})	pH inicial	Temperatura (°C)	Umidade (%)	AE FPase (U/mg _{prot.})	AE CMCase (U/mg _{prot.})
1	1×10^7	5	30	30	$0,42 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,06$
2	1×10^8	5	30	30	$0,54 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,03$
3	1×10^7	6	30	30	$0,73 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,01$
4	1×10^8	6	30	30	$0,43 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,01$
5	1×10^7	5	40	30	$0,79 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,03$
6	1×10^8	5	40	30	$1,65 \pm 0,06$	$4,89 \pm 0,10$
7	1×10^7	6	40	30	$0,83 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,05$
8	1×10^8	6	40	30	$0,44 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,04$
9	1×10^7	5	30	70	$0,52 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,00$
10	1×10^8	5	30	70	$4,94 \pm 0,21$	$2,49 \pm 0,00$
11	1×10^7	6	30	70	$0,40 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,03$
12	1×10^8	6	30	70	$0,13 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
13	1×10^7	5	40	70	$0,30 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,03$
14	1×10^8	5	40	70	$0,90 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,12$
15	1×10^7	6	40	70	$0,53 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,03$
16	1×10^8	6	40	70	$0,34 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,05$
17 (PC)	$5,5 \times 10^7$	5,5	35	50	$0,34 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$
18 (PC)	$5,5 \times 10^7$	5,5	35	50	$0,40 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
19 (PC)	$5,5 \times 10^7$	5,5	35	50	$0,44 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,00$

Os valores otimizados pela função de desejabilidade (Tabelas 13 e 14) foram tratados no *software* STATISTICA® e, a partir deles, foram elaborados os diagramas de Pareto, para estudar os efeitos das variáveis, as curvas de contorno, que mostram como as variáveis de entrada influenciaram as atividades enzimáticas da FPase e da CMCase (simultaneamente) e também as suas atividades específicas, além dos perfis de desejabilidade.

4.2.1 Análise estatística dos valores otimizados pela função de desejabilidade

O diagrama de Pareto apresenta de forma clara os efeitos que são estatisticamente significativos, para um intervalo com 95% de confiança (com níveis de significância, p , inferiores a 0,05). Os valores dos efeitos para o planejamento fatorial, que tem como uma das respostas a atividade de celulase total, são apresentados na Figura 12. Analisando o diagrama, percebe-se que os efeitos individuais da concentração do inóculo e da umidade apresentaram significância estatística negativa para a atividade da FPase, para um intervalo de 95% de confiança, ou seja, o valor da atividade tende a diminuir com o aumento dessas variáveis, o mesmo pode ser observado para a interação entre a quantidade de esporos e pH inicial, pois como apresentou efeito negativo, o aumento simultâneo desses fatores causará uma diminuição na atividade da FPase.

Nas condições estudadas, a interação entre os três fatores: pH, temperatura e umidade foi significativa para a atividade da celulase total, apresentando efeito positivo, assim como os efeitos individuais da temperatura. Isto posto, se os três fatores aumentarem simultaneamente ou se a temperatura aumentar individualmente, o caldo enzimático apresentará maior atividade da celulase total. Já o pH e as demais interações não mostraram efeitos estatisticamente significativos para o processo.

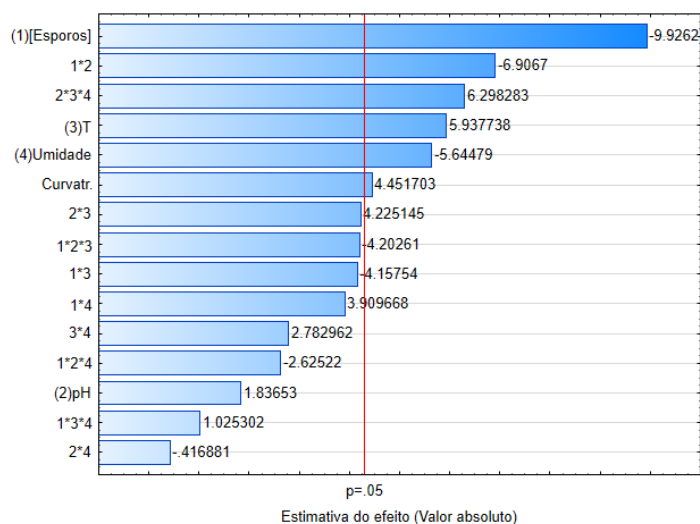


Figura 12 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade da FPase para o fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos de folhas como substrato

Para estimar a linearidade entre os fatores e as variáveis dependentes, foi verificada a curvatura do modelo. Quando essa curvatura é importante, os dados têm melhor ajuste por um modelo não linear e, desse modo, os valores independentes dos parâmetros dos termos quadráticos devem ser determinados. Nesse caso, deve-se aumentar o planejamento com quatro corridas axiais, resultando em um planejamento composto central (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Na Figura 12, a curvatura exibiu um efeito positivo na atividade da FPase. Logo, o modelo linear não apresenta o melhor ajuste dos dados.

Na Figura 13, de acordo com o diagrama de Pareto, com os efeitos padronizados em $p = 0,05$, para a atividade da endoglucanase, os efeitos individuais da umidade e da concentração final dos esporos, além da interação entre os esporos e o pH influenciaram negativamente a atividade desta enzima. Logo, o aumento de todos esses fatores, individualmente ou em conjunto, ocasionará uma diminuição da atividade da CMCase. A curvatura também apresentou efeito negativo na atividade.

Do mesmo modo que na FPase, a interação entre o pH, temperatura e umidade apresentou efeito significativo na atividade da endoglucanase. Além disso, o pH e a temperatura também apresentaram efeitos (individuais) estatisticamente significativos para atividade desta enzima, com níveis de 95% de confiança. Todos estes efeitos foram positivos, isto é, à medida que os valores destas variáveis aumentam, a atividade também aumenta. As demais interações entre os fatores não apresentaram significância estatística para o processo.

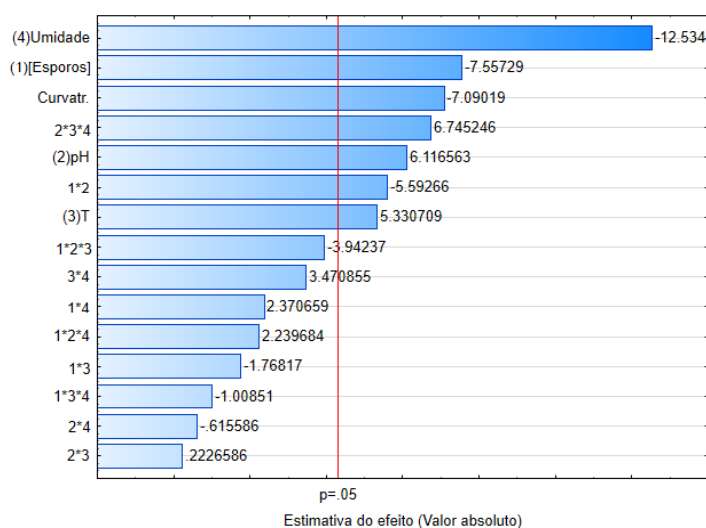


Figura 13 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade da CMCase para o fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos de folhas como substrato

Conforme a Figura 14, todos os fatores bem como as suas interações foram significativos na atividade específica da celulase total no intervalo de 95% de confiança ($p < 0,05$). Entretanto, a maioria influenciou de forma negativa, incluindo a curvatura. Apenas os efeitos individuais da umidade e da concentração de esporos; e as interações entre pH, temperatura e umidade; esporos e umidade; pH e temperatura; e esporos, pH e temperatura influenciaram positivamente.

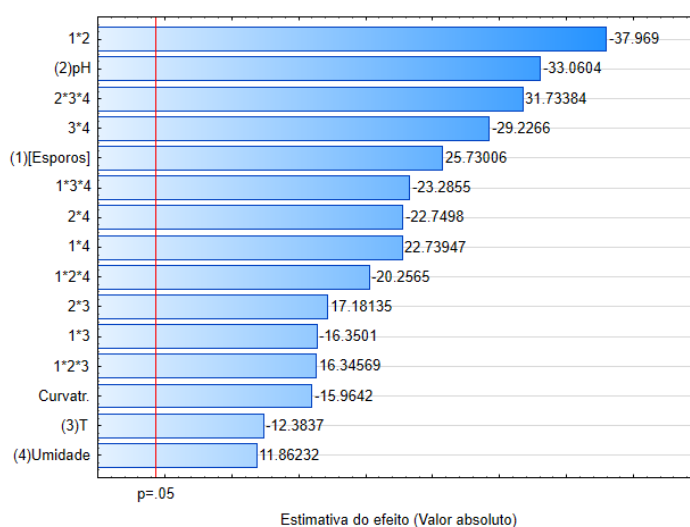


Figura 14 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade específica da FPase para o fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos de folhas como substrato

O diagrama de Pareto (Figura 15) apresenta os efeitos dos fatores na atividade específica da endoglucanase. Apenas as interações entre pH e umidade, e concentração final de inóculo e umidade não foram estatisticamente significativos para essa resposta. As outras interações assim como os fatores individuais apresentaram significância, tanto positiva quanto negativa. Os efeitos individuais da concentração final do inóculo e da temperatura; e as interações entre pH, temperatura e umidade; concentração final do inóculo, pH e umidade; esporos e temperatura apresentaram significância positiva na atividade específica da endoglucanase. Em outras palavras, o aumento desses fatores proporciona o aumento da AE da CMCase. A curvatura exibiu um efeito negativo para essa enzima, tal como os outros fatores e as suas interações.

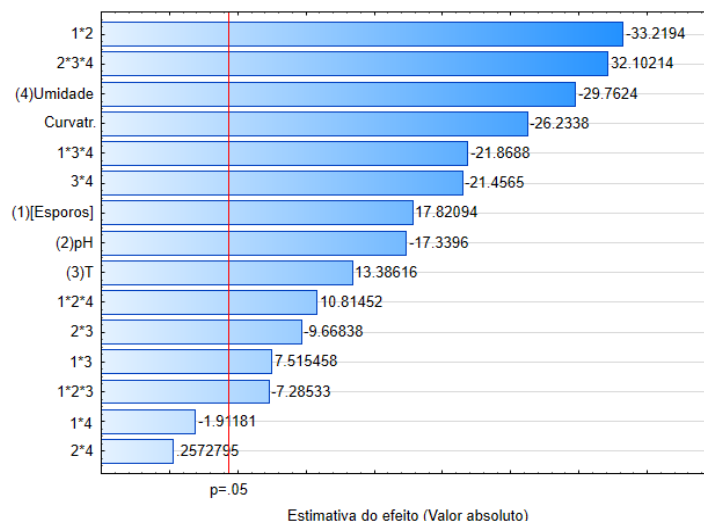


Figura 15 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes na atividade específica da CMCase para o fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos de folhas como substrato

A curvatura foi significativa para todas as respostas, contudo não foi realizado o planejamento proposto pelos autores Calado e Montgomery (2003) para a comprovação do modelo, pois o objetivo deste trabalho foi apenas analisar quais os fatores que mais influenciaram na produção de celulases e, consequentemente, na sua atividade.

4.2.2 Influência das variáveis independentes na atividade enzimática

Os resultados das atividades mostraram que as enzimas avaliadas foram produzidas pelo *Aspergillus niger*, um aspecto importante para o processo. No entanto, como foi difícil determinar uma condição experimental que maximizasse, ao mesmo tempo, a produção das enzimas FPase e CMCase, a função de desejabilidade permitiu a combinação de ambas atividades em uma única resposta. O mesmo processo de otimização foi realizado para as atividades específicas.

As curvas de contorno (Figura 16) mostram os efeitos das combinações entre as variáveis independentes nas atividades da FPase e CMCase. Analisando todas as curvas e suas interações, percebe-se que a atividade enzimática aumentou, quando foi utilizado um volume menor de inóculo para todas as interações, ou seja, quando a concentração final do inóculo foi mais baixa. Uma das causas para a diminuição da atividade com o aumento do inóculo, provavelmente, foi o crescimento desigual do microrganismo no substrato, já que ele não atinge toda a superfície do meio e, consequentemente, não produz maiores quantidades de enzimas.

Segundo Mitchell *et al.* (2002), para se obter bons resultados, o tamanho do inóculo deve ser o suficiente para que a maioria das partículas do substrato seja colonizada, já que

densidade de esporos (número de esporos por unidade de peso do substrato) elevada pode retardar a germinação. Ademais, o aumento do inóculo pode levar ao acúmulo de células, o que reduziria a taxa de absorção de açúcar e oxigênio e também a liberação da enzima, causando uma diminuição nas atividades da celulase total e da endoglucanase (OMOJASOLA *et al.*, 2008).

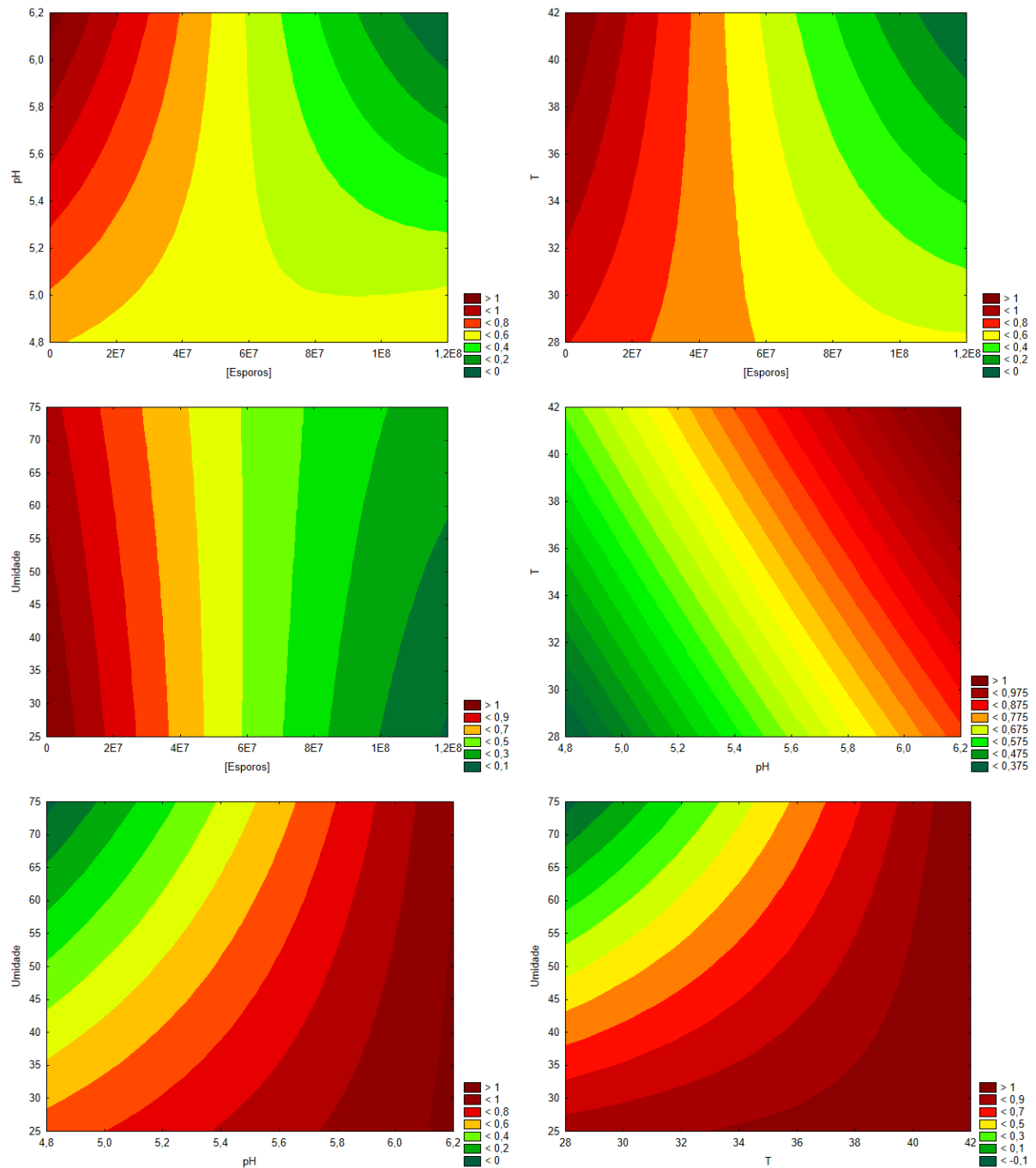


Figura 16 – Curvas de contorno com a influência das variáveis independentes nas atividades da FPase e da CMCase a partir da otimização com a função de desejabilidade

Fadel (2000) avaliou a influência do tamanho do inóculo (5 – 25%, m/v) na produção da celulase total e da endoglucanase utilizando palha de trigo como substrato, e constatou que a atividade máxima foi 31,5 U/g para FPase e 46,6 U/g para a CMCase, ambas com tamanho de inóculo de 10%. O estudo de Dave *et al.* (2013), empregando 1, 3 e 5 discos miceliais (8 mm) de *Thermoascus aurantiacus* como inóculo, tendo como fonte de carbono farelo de trigo, mostrou que o aumento no nível de inóculo acima de 3 discos resultou em uma diminuição das atividades da celulase. Os resultados obtidos por Liu *et al.* (2011a), para a otimização do inóculo, mostraram que a produção de celulases a partir de palhas de arroz, trigo, milho e algodão, com o fungo *A. fumigatus*, apresentou maiores atividades com 7% (m/v) de inóculo, num intervalo de 6 a 8%.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho e os da literatura, verifica-se que uma das causas para os menores valores de atividades da celulase total e da endoglucanase com concentrações mais baixas de inóculo, possivelmente, foi a quantidade insuficiente de esporos para consumir o substrato, enquanto que a diminuição das atividades enzimáticas utilizando maiores concentrações de inóculo, provavelmente, foi causada pelas condições anaeróbias do meio devido à alta concentração inicial de esporos, ou pela falta de nutrientes como resultado do crescimento acelerado dos microrganismos (BANSAL *et al.*, 2012).

O pH do meio exerce um papel importante na morfologia dos microrganismos e na produção de enzimas. As curvas de contorno mostram que a resposta aumentou com a elevação do pH inicial, uma vez que a partir do pH 5,5 houve maior produção de celulases, obtendo ótimas atividades de FPase e CMCase em pH 6 (valores mais desejáveis). Esse comportamento também foi comprovado por Deswal *et al.* (2011), os quais estudaram a produção de celulases por *Fomitopsis* sp., variando o pH inicial de 3 a 10, atingindo maiores atividades da FPase (3,31 U/g) e CMCase (72,7 U/g) em pH 5,5. Liang *et al.* (2012) também produziram celulases em pH ácido. Em suas pesquisas com o fungo *Aspergillus* sp., o pH inicial 5 proporcionou maiores atividades enzimáticas.

No estudo de Herculano *et al.* (2011), que tinha como finalidade a produção de celulases por *Aspergillus japonicus* em fermentação em estado sólido, tendo como substrato farelo de mamona, as atividades ótimas da celulase total (953,4 U/g) e endoglucanase (191,6 U/g) foram encontradas em pH 6, mantendo o caráter ácido encontrado pelos outros autores. Para otimizar a produção da celulase total utilizando uma mistura de palha de arroz e farelo de trigo, Oberoi *et al.* (2014) adotaram como uma das variáveis independentes o pH inicial (com a faixa de 4 a 7). Os resultados indicaram que a capacidade de produção de celulases pelo fungo

Aspergillus niger não foi muito afetada pelo pH inicial. Entretanto, a atividade da celulase total mais elevada (27,2 U/g) foi em pH 4.

O emprego de pH ácidos no meio também pode gerar outros produtos, como no estudo de Ramachandra *et al.* (2013), que produziram ácido cítrico com o fungo *Aspergillus niger* utilizando casca de café como substrato. Para esse fim, foi analisada a influência do pH inicial na fermentação, em uma faixa de 2 a 7, obtendo produção máxima em pH 4,5.

Em tese, a medição e o controle do pH são muito difíceis na fermentação em estado sólido, entretanto os substratos empregados, geralmente, apresentam capacidade tamponante devido a sua composição química complexa, condição que minimiza a variação do pH no meio, impedindo que produtos indesejáveis sejam formados (MAMMA *et al.*, 2008).

Outro fator que tem um efeito importante nas atividades enzimáticas das celulasas é a temperatura. Como já foi citado neste trabalho, o fungo *Aspergillus niger* é mesófilo, ou seja, desenvolve-se em temperaturas moderadas (20 a 45 °C). Então, se no meio de fermentação não há como dispersar o calor liberado pelos fungos durante o seu crescimento, deve-se ter cautela ao escolher a temperatura que será avaliada, pois altas temperaturas podem causar a desnaturação das enzimas, além de afetar a germinação de esporos e o crescimento microbiano, resultando em baixas atividades enzimáticas. Um aspecto positivo da influência da temperatura na atividade enzimática é uma maior interação entre a enzima produzida e a fonte de carbono devido ao aumento da energia cinética das moléculas (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Com base nas curvas de contorno (Figura 16), em todas as interações, houve maior produção de FPase e CMCase, quando a temperatura foi superior a 35 °C, região onde as atividades enzimáticas foram mais elevadas. Contudo, dos três níveis estudados, o que apresentou valores mais desejáveis de atividade foi o nível superior (40 °C).

Bansal *et al.* (2012) constataram que o fungo *Aspergillus niger* NS – 2 é capaz de produzir bons níveis de celulasas, utilizando resíduos agroindustriais e de cozinha, em uma gama de temperaturas. Apesar das maiores atividades de FPase ($15,9 \pm 1,74$ U/g) e CMCase ($297,0 \pm 10,5$ /g) serem obtidas em 30 °C, ambas celulasas apresentaram atividades apreciáveis em 40 e 50 °C, por exemplo, $255,4 \pm 4,46$ U/g para a CMCase em 40 °C. Ja'afaru e Fagade (2010) utilizaram outra cepa de *A. niger* YL128 na produção de celulasas com as seguintes temperaturas: 30, 35, 40, 45 e 50 °C. A máxima produção da endoglucanase foi a 30 °C, diminuindo à medida que aumentava a temperatura, alcançando o mínimo em 50 °C.

Conforme Shu *et al.* (2011), que produziram celulasas a partir do fungo *Trichoderma reesei*, as atividades da celulase total e da endoglucanase, inicialmente, aumentaram com a elevação da temperatura, diminuindo logo em seguida. A atividade da FPase aumentou de 37,3

U/g (26 °C) para 92,2 U/g (30 °C), diminuindo para 5,48 U/g em 40 °C. Já a CMCase aumentou de 236,1 U/g (26 °C) para 377,2 U/g (30 °C), com decréscimo em 40 °C (21,6 U/g). Ambas apresentaram ponto ótimo em 30 °C.

Estes resultados sugerem que o valor da atividade varia com o tipo de microrganismo, e que a temperatura da fermentação deve ser adequada para satisfazer tanto o crescimento microbiano quanto para obter uma boa produção de celulasas.

Em testes preliminares, constatou-se que a umidade é uma variável primordial ao processo e, por isso, deve ser controlada a fim de atingir altas atividades enzimáticas. Os valores obtidos pela função de desejabilidade mostraram que a atividade ótima da celulase total foi com 70% de umidade e a da endoglucanase com 30%. Contudo, observando as curvas de contorno para as duas atividades, verifica-se que em todas as interações níveis mais baixos de umidade proporcionaram valores mais desejáveis de atividades enzimáticas.

Estudos de Delabona *et al.* (2013) analisaram a obtenção de enzimas a partir de duas espécies de *Aspergillus*, *niger* e *fumigatus*, e perceberam que este processo foi fortemente afetado pela umidade inicial dos substratos, e que a diminuição na produção da enzima, com maior teor de umidade, pode estar associada a uma redução da porosidade do substrato e limitação na transferência de oxigênio, já que o espaço vazio dos sólidos é preenchido com água e expulsa o ar, criando condições anaeróbias. Por outro lado, níveis mais baixos de umidade, limitam a difusão dos nutrientes, prejudicando o crescimento dos microrganismos e a formação de produtos (RAGHAVARAO *et al.*, 2003; FARINAS, 2015).

Liang *et al.* (2012) variaram a umidade de 55 a 85% para estudar o seu efeito sobre a produção de celulasas. Seus resultados mostraram que esta variável foi significativa para o processo, exibindo maior atividade de celulasas em 70% de umidade inicial, com menor atividade enzimática nos demais níveis.

O efeito da umidade inicial na atividade da endoglucanase foi observado por Jecu (2000), no cultivo de *A. niger* usando como substrato uma mistura de palha e farelo de trigo na FES. Com o aumento do teor de umidade de 55 a 74%, a atividade enzimática aumentou gradualmente, mas o aumento para 80% teve um efeito negativo na produção de enzimas, diminuindo a atividade da CMCase. Segundo os resultados de Kumar *et al.* (2016a), na fermentação em estado sólido com *A. nidulans*, as máximas atividades da celulase total (2,06 U/g) e endoglucanase (104,9 U/g) ocorreram com 80% de umidade inicial. Levando em consideração estes resultados, percebe-se que o ponto ótimo de umidade inicial depende tanto do microrganismo como da natureza do substrato utilizado na produção de enzimas.

Na Figura 17, são apresentados os perfis da função de desejabilidade. Estes perfis mostram os valores dos pontos ótimos para as variáveis de resposta: celulase total (0,84) e endoglucanase (1,51), e as condições operacionais que levam ao ótimo das atividades enzimáticas. Nesse caso, concentração final de inóculo de 1×10^7 esporos/g_{substrato}; pH inicial 6; temperatura do meio de 40 °C; e umidade inicial de substrato de 30%, com desejabilidade global de 0,96.

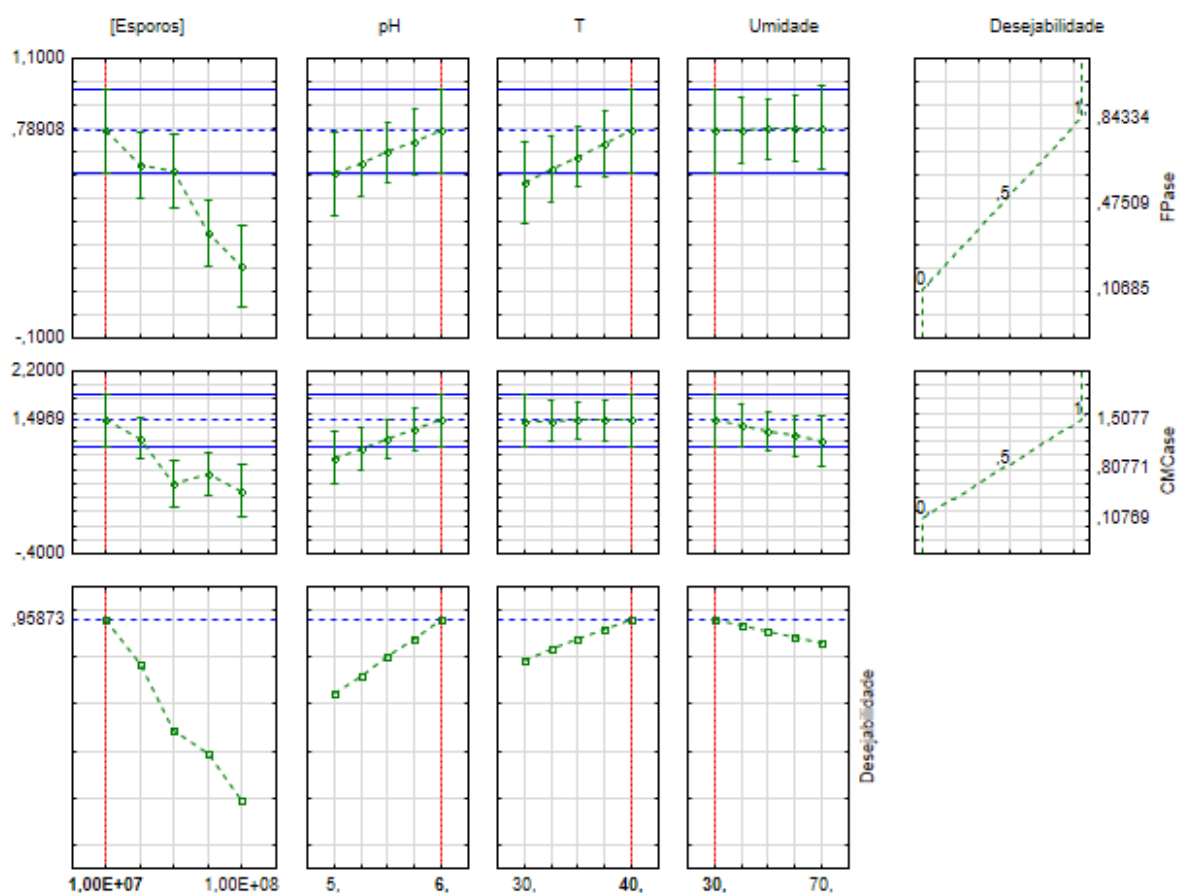


Figura 17 – Perfis da função de desejabilidade com os valores otimizados para as atividades da FPase e da CMCase

4.2.3 Influência das variáveis independentes na atividade específica

Como a atividade específica da celulase é influenciada pelo teor de proteínas totais do extrato enzimático, deve-se maximizar a atividade enzimática para aumentar o seu valor. As curvas de contorno (Figura 18) apresentam os efeitos das combinações entre as variáveis independentes nas atividades específicas da FPase e da CMCase.

Observando a Figura 18, para a concentração final do inóculo, percebe-se que a atividade específica aumentou na mesma proporção que a concentração de esporos, com o ponto

ótimo em 1×10^8 esporos/g_{substrato}. Conforme Durand *et al.* (1988), como a atividade específica é relativamente baixa na celulose cristalina, são necessárias cepas altamente produtivas, para que haja elevadas proporções de enzima-substrato.

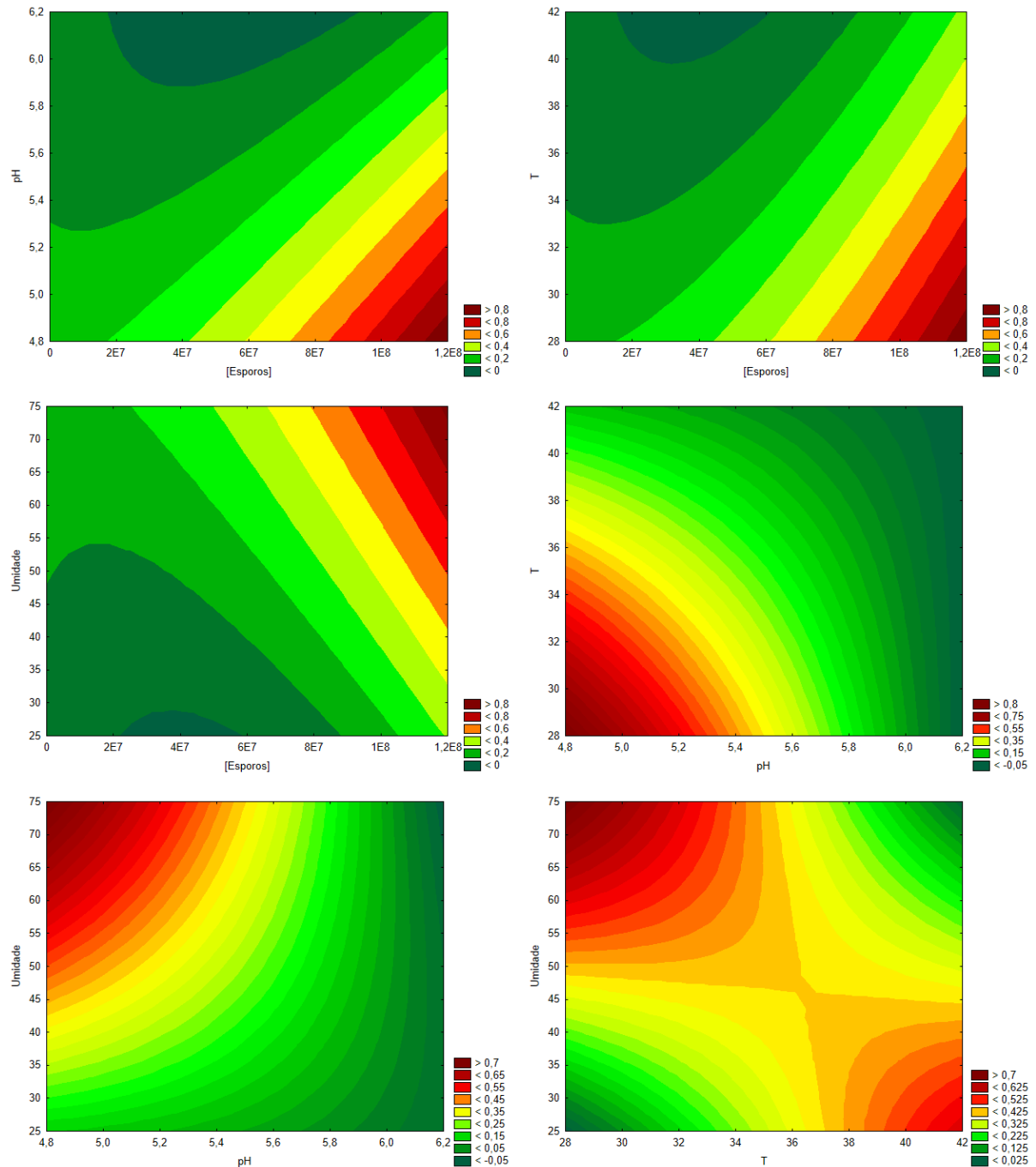


Figura 18 – Curvas de contorno com a influência das variáveis independentes nas atividades específicas da FPase e da CMCase a partir da otimização com a função de desejabilidade

Como pode ser visto no diagrama de Pareto (Figura 19), a concentração final de esporos apresentou significância estatística negativa na concentração de proteínas, no intervalo

de 95% de confiança ($p < 0,05$), ou seja, maiores quantidades de esporos diminuem o teor de proteínas. Dessa forma, a atividade específica será maior quando o extrato enzimático apresentar menores quantidades de proteínas, ainda assim, essa pequena fração deve apresentar mais proteínas com atividade celulolítica, fato observado nos dados obtidos.

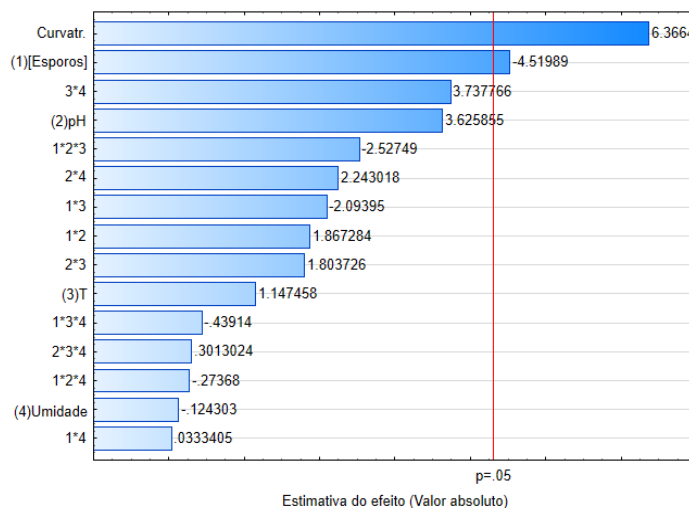


Figura 19 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes no teor de proteínas totais para o fungo *Aspergillus niger* utilizando resíduos de folhas como substrato

Analisando nas curvas de contorno (Figura 18) o efeito do pH, nota-se que a resposta aumentou com a diminuição do pH inicial, com valores mais desejáveis de atividades específicas em pH 5, região na qual a desejabilidade global foi mais próxima a 1. As condições operacionais: pH inicial e concentração do inóculo, apresentaram o ponto ótimo das atividades específicas em níveis diferentes aos indicados nas atividades enzimáticas da FPase e da CMCase, sugerindo que neste ponto a atividade enzimática não exibiu seu maior valor, mas essa parte do caldo continha mais enzimas celulase total e endoglucanase, isto é, as proteínas eram mais específicas.

Em relação à temperatura, as atividades específicas das celulasas apresentaram maiores valores com a sua diminuição, tanto para as interações com o pH inicial quanto com a concentração de esporos. No caso da umidade inicial do substrato, percebe-se nas curvas de contorno que as AEs aumentaram com o acréscimo de maiores quantidades de água, com o ponto ótimo de umidade tendendo a 70%, para as mesmas interações. Entretanto, na interação entre umidade e temperatura, a curva de contorno apresentou duas tendências para alcançar o ótimo de atividade específica: em temperaturas mais baixas e maiores teores de umidade, e temperaturas mais altas com menor umidade. Estas duas condições são caracterizadas pela diminuição na produção de enzimas e, conseqüentemente, menores valores de atividades

enzimática das celulases, que juntamente com o baixo teor de proteínas, proporcionam altas atividades específicas.

Em termos de atividade específica, não foram encontrados dados na literatura sobre a produção de celulases por fungos utilizando resíduos de folhas como substrato, dificultando a comparação com os resultados deste trabalho. Além disso, poucos artigos investigam a produção de celulases com base na maximização e/ou otimização desta atividade.

Chandra *et al.* (2010) constataram que a espécie de planta *Artemisia annua* pode ser usada como substrato para a produção de celulases. Na otimização dos parâmetros, o fungo *Trichoderma citrinoviride* produziu atividade específica de 1,21 U/mg_{proteínas} para a FPase, e 5,59 U/mg_{proteínas} para a CMCase. As melhores condições de operação para esse processo foram 1% de concentração de substrato, pH inicial de 5,5 e temperatura de 28 °C com 75 – 100% de meio de sal mineral. Já as análises de Soares *et al.* (2011) se basearam no estudo do potencial de sementes de jaca na produção da endoglucanase do fungo *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. A atividade específica foi de 138,5 U/mg_{proteínas}, com teor de umidade de 70% e em 35 °C.

De acordo com Kilikian *et al.* (2014), o aumento da atividade específica da celulase seguido por uma diminuição não é totalmente compreendido, pois a produção de celulases por microrganismos também envolve a síntese de proteases, as quais podem reduzir a atividade da enzima de interesse.

Haab *et al.* (1990), em seu trabalho com *Trichoderma reesei* para a produção de proteases, relataram que altos níveis de protease no extrato enzimático estão relacionados à presença de produtos de degradação proteolítica da celulase. No entanto, neste trabalho, não foram realizadas análises para comprovar o aparecimento de proteases no extrato enzimático.

Os perfis da função de desejabilidade são mostrados na Figura 20. Nestes perfis estão representados os valores dos pontos ótimos para as variáveis de resposta: atividade específica da FPase (4,94) e atividade específica da CMCase (4,90), e as condições operacionais que levam ao ótimo para ambas atividades. Nesse caso, concentração final de inóculo de 1×10^8 esporos/g_{substrato}; pH inicial 5; temperatura do meio de 30 °C; e umidade inicial de substrato de 70%, com desejabilidade global de 0,63.

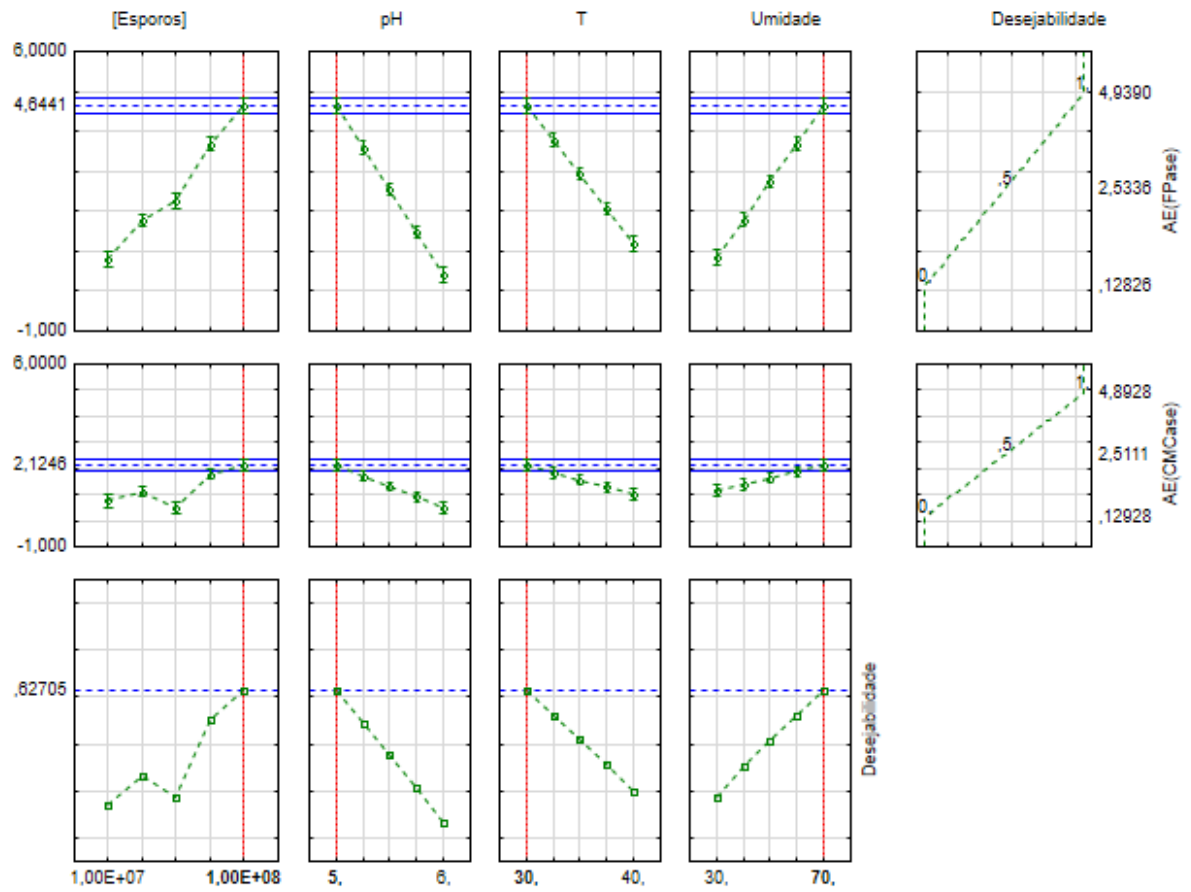


Figura 20 – Perfis da função de desejabilidade com os valores otimizados para as atividades específica da FPase e da CMCCase

5 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O fungo *Aspergillus niger* foi capaz de secretar celulasas por fermentação em estado sólido utilizando os três resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono. Suas curvas de crescimento apresentaram pico de produção, quando houve maiores consumos de substrato, tanto dos nutrientes já existentes no meio quanto dos açúcares produzidos pelas enzimas, apresentando fase de declínio devido ao esgotamento de nutrientes.

Entre os substratos analisados, o sabugo de milho apresentou a maior atividade enzimática, com atividade máxima em 120 h para a celulase total (FPase) e 96 h para a endoglucanase (CMCase), seguido pelo bagaço de cana-de-açúcar e pelos resíduos de folhas. O bagaço de cana apresentou maior atividade de FPase em 120 h e de CMCase em 72 h. Por último, os resíduos de folhas exibiram uma atividade máxima de produção em 48 h para a FPase e 72 h para a CMCase, mostrando que, apesar de produzir baixas quantidades de celulase em comparação aos outros substratos, este material foi considerado bom produtor em razão do curto tempo de fermentação para a obtenção das enzimas. Dessa forma, verificou-se a potencialidade de todos esses substratos na produção da celulase total e da endoglucanase.

Em relação à atividade específica, os substratos exibiram comportamento semelhante ao da atividade enzimática, isto é, o sabugo de milho também apresentou o maior potencial de produção, com atividade máxima em 72 h tanto para a FPase quanto para CMCase. O bagaço de cana em 120 h para a FPase e 96 h para a CMCase, enquanto os resíduos de folhas em 48 h e 72 h, respectivamente. Embora os resultados apontem para uma boa produção de celulasas com o sabugo de milho e o bagaço de cana, esses dois resíduos são aproveitados para a geração de outros produtos, como biocombustíveis. Portanto, a sua utilização como fonte de carbono para a produção de enzimas não é interessante economicamente para as indústrias, apenas se forem utilizadas pequenas quantidades destes materiais.

Nos estudos de otimização da produção de celulasas por meio do planejamento fatorial ($2^4 + 3$) em resíduos de folhas, a função de desejabilidade foi uma ferramenta importante para a maximização simultânea da FPase e da CMCase, fornecendo as condições ótimas para a produção das enzimas, utilizando resíduos de folhas como substrato.

A concentração final do inóculo, temperatura e umidade foram os três fatores que mais influenciaram as atividades enzimáticas da FPase e da CMCase, pois o crescimento microbiano e as interações entre os microrganismos e o substrato dependem destas variáveis para

forneçerem boa produção de enzimas. O pH inicial também foi um fator significativo, apresentando valores ótimos dentro da faixa de crescimento dos fungos. No caso das atividades específicas, estes fatores apresentaram valores que indicaram uma tendência de diminuição na atividade enzimática e nos teores de proteínas totais para a obtenção de altas atividades.

A presença da curvatura foi significativa para o processo. Logo, sugere-se o estudo do planejamento composto central para a comprovação do modelo matemático. Além de estudos que envolvam o uso do extrato enzimático para a hidrólise de materiais lignocelulósicos; a utilização das celulasas na produção de bioetanol; o estudo da produção de celulasas utilizando uma mistura de resíduos de folhas e sabugo de milho como substrato na fermentação em estado sólido; a análise da produção de β -glicosidase; estudos de purificação do extrato enzimático; a determinação dos parâmetros cinéticos da produção de celulasas; a ampliação dos níveis do planejamento fatorial, conferindo o efeito da curvatura; experimentos com os valores ótimos das respostas mostrados nos perfis de desejabilidade; entre outros.

REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S.; ARAÚJO, M. L.; ALMEIDA, R. M. R. G. Uso do resíduo de laranja lima e da casca de coco verde na produção de enzimas. **Scientia Plena**, v. 11, n. 10, p. 1–8, 2015.
- ABULNAJA, K. O.; ABOU-ZEID, A.-Z. A. Utilization of palm-tree compound leaves in formation of cellulases. **Bioresource Technology**, v. 44, p. 255–257, 1993.
- ADEOYE, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 568–574, 2015.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51–57, 2016.
- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **National Renewable Energy Laboratory**, p. 1–11, 1996.
- AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, p. 1–7, 2015.
- ANDREAUS, J.; BON, E. P. DA S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Enzyme technology in Brazil – A need and a challenge. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 1–1, 2014.
- ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; BALASUBRAMANIAN, T. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 151–160, 2014.
- AZABOU, S.; ABID, Y.; SEBII, H.; FELFOUL, I.; GARGOURI, A.; ATTIA, H. Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by *Fusarium solani* pisi for enzymatic extraction of lycopene. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 280–287, 2016.
- BANO, S.; QADER, S. A. U.; AMAN, A.; SYED, M. N.; DURRANI, K. High production of cellulose degrading endo-1,4-beta-D-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 300–304, 2013.
- BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, n. 7, p. 1341–1346, 2012.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175–185, 2012.

BARROS, T. V. F. DE; BONFIM, K. D. DO; MELO, A. L. M. DE; SANTOS, F. A.; SATOS, S. F. DE M. Produção de celulases pelo fungo FSDE3 em cultivo semissólido utilizando resíduos da cana-de-açúcar. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 164–173, 2014.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1 ed. Campinas - SP: Editora da Unicamp, 2001. 411 p.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–56, 2015.

BENNETT, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. **Medical mycology**, v. 47, p. S5–S12, 2009.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Eds.). **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**. 1st. ed. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2010. v. 22p. 1–17.

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: an overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.

BHOSALE, H. J.; SUKALKAR, S. R.; ZAKER, S.; KADAM, T. A. Production of xylanase by *Streptomyces rameus* grown on agricultural wastes. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 505–512, 2011.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1-6, p. 41–55, 2014.

BISWAS, R.; PERSAD, A.; BISARIA, V. S. Production of cellulolytic enzymes. In: BISARIA, V. S.; KONDO, A. (Eds.). **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**. 1st. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2014. p. 105–132.

BOGGIONE, J. M.; ALLASIA, M. B.; BASSANI, G.; FARRUGGIA, B. Potential use of soybean hulls and waste paper as supports in SSF for cellulase production by *Aspergillus niger*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 1–8, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRAR, K. K.; KAUR, S.; CHADHA, B. S. A novel staggered hybrid SSF approach for efficient conversion of cellulose/hemicellulosic fractions of corncob into ethanol. **Renewable Energy**, v. 2, p. 2–8, 2016.

BUDTOVA, T.; NAVARD, P. Cellulose in NaOH-water based solvents: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 5–55, 2015.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. 1 ed. Rio de Janeiro-RJ: E-papers, 2003. 260 p.

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M. de; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

CARERE, C. R.; SPARLING, R.; CICEK, N.; LEVIN, D. B. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1342–1360, 2008.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 678–684, 2015.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085–1093, 2015.

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 and Bioenergy**, v. 34, n. 5, p. 805–811, 2010.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 323–328, 2007.

CHATTERJEE, S.; SAITO, T. Lignin-Derived Advanced Carbon Materials. **ChemSusChem**, v. 8, n. 23, p. 3941–3958, 2015.

CHEIRSILP, B.; KITCHA, S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73–80, 2015.

CHEN, H. Introduction. In: CHEN, H. (Ed.). **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. 1st. ed. Chap. 1. Springer, 2013a. p. 1–21.

CHEN, H. Biotechnology principles of solid state fermentation. In: CHEN, H. (Ed.). **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. 1st. ed. Chap. 2. Springer, 2013b. p. 23–74.

CHEN, W.; ZHONG, L.-X.; PENG, X.-W.; WANG, K.; CHEN, Z.-F.; SUN, R.-C. Xylan-type hemicellulose supported palladium nanoparticles: a highly efficient and reusable catalyst for the carbon–carbon coupling reactions. **Catalysis Science & Technology**, v. 4, p. 1426–1435, 2014.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541–3549, 2011.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1–12, 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Monitoramento agrícola - Safra 2015/2016**, v. 3, n. 9, p. 1–182, 2016.

COSTA, N. R.; LOURENÇO, J.; PEREIRA, Z. L. Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, n. 2, p. 234–244, 2011.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006.

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

CUNHA, F. M.; BACCHIN, A. L. G.; HORTA, A. C. L.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Indirect method for quantification of cellular biomass in a solidscontaining medium used as pre-culture for cellulase production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 1, p. 100–108, 2012b.

DAMM, T.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; USADEL, B.; KLOSE, H. Improving the utilization of lignocellulosic biomass by polysaccharide modification. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 288–296, 2016.

DAS, A.; PAUL, T.; HALDER, S. K.; JANA, A.; MAITY, C.; MOHAPATRA, P. K. DAS; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 290–296, 2013.

DAS, A.; RAY, L. Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus* sp. S6 by solid state fermentation. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3343–3360, 2016.

DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 80–100, 2014.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1–8, 2010.

DAVE, B. R.; SUDHIR, A. P.; PARMAR, P.; PATHAK, S.; RAYKUNDALIYA, D. P.; SUBRAMANIAN, R. B. Enhancement of cellulase activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: Optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 108–115, 2013.

DEKA, D.; DAS, S. P.; SAHOO, N.; DAS, D.; JAWED, M.; GOYAL, D.; GOYAL, A. Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production. v. 2013, p. 11. 2013.

DELABONA, P. DA S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 2012.

DELABONA, P. DA S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 236–242, 2013.

DEMIRCI, A.; IZMIRLIOGLU, G.; ERCAN, D. Fermentation and enzyme technologies in food processing. In: STEPHANIE CLARK, STEPHANIE JUNG, B. L. (Ed.). **Food Processing: Principles and Applications**. 2nd. ed. Chap. 6. Pennsylvania, USA: John Wiley & Sons, 2014. p. 107–136.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimisation of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6065–6072, 2011.

DEWAN, S. S.; SETIA, K. A. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BCC Research**, v. 7215, p. 1–16, 2014.

DIXON, R. A.; CHEN, F.; GUO, D.; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: A “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1069–1084, 2001.

DURAND, H.; CLANET, M.; TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 341–346, 1988.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999–2042, 2015.

EL-ENSHASYA, H. A. Filamentous fungal cultures - Process characteristics, products, and applications. In: YANG, S.-T. (Ed.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications**. Chap. 9. Elsevier B.V., 2007. p. 225–261.

EUDES, A.; LIANG, Y.; MITRA, P.; LOQUÉ, D. Lignin bioengineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 189–198, 2014.

FADEL, M. Production physiology of cellulose and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. **Online Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 401–411, 2000.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

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

GADHE, A.; SONAWANE, S. S.; VARMA, M. N. Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 16, p. 6607–6617, 2013.

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, n. 16, p. 7623–7629, 2008.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; FOLETTO, E. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Production of cellulolytic enzymes and application of crude enzymatic extract for saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 560–572, 2015.

GASSARA, F.; AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; VERMA, M.; VALERO, J. Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 10, p. 2119–2126, 2013.

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

GONG, M.; MOHAN, A.; GIBSON, A.; UDENIGWE, C. C. Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 63–69, 2015.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J. F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2016.

HAAB, D.; HAGSPIEL, K.; SZAKMARY, K.; KUBICEK, C. P. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3-4, p. 187–198, 1990.

HANDA, C. L.; COUTO, U. R.; VICENSOTI, A. H.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce beta-glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food Chemistry**, v. 152, p. 56–65, 2014.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

HARINI, S.; KUMARESAN, R. Production of cellulase from corn cobs by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 5, p. 2900–2904, 2014.

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; PINTO, G. A. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 1057–1067, 2011.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564–573, 2012.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.

HORVÁTHOVÁ, V.; JANEČEK, Š.; ŠTURDÍK, E. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. **Biologia**, v. 55, n. 6, p. 605–615, 2000.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E.L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

HU, T.; ZHOU, Y.; DAI, L.; WANG, Y.; LIU, D.; ZHANG, J.; LIU, H. Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. **Procedia Engineering**, v. 18, p. 335–340, 2011.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. Optimization studies on cellulase enzyme production by an isolated strain of *Aspergillus niger* YL128. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 24, p. 2635–2639, 2010.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 2000.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

JUNG, Y. R.; PARK, J. M.; HEO, S. Y.; HONG, W. K.; LEE, S. M.; OH, B. R.; PARK, S. M.; SEO, J. W.; KIM, C. H. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. **Renewable Energy**, v. 76, p. 66–71, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KAUR, P.; BHARDWAJ, N. K.; SHARMA, J. Application of microbial enzymes in dissolving pulp production. In: SHUKLA, P. (Ed.). **Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology**. New Delhi, India: Springer, 2016. p. 133–156.

KILIKIAN, B. V.; AFONSO, L. C.; SOUZA, T. F. C.; FERREIRA, R. G.; PINHEIRO, I. R. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 279–86, 2014.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KIM, T. H. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: YANG, S.-T.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL., N. (Eds.). **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. 1st. ed. Chap. 6. John Wiley & Sons, 2013. p. 91–109.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

KLEMM, D.; PHILIPP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WAGENKNECHT, W. General considerations on structure and reactivity of cellulose: Section 2.1–2.1.4. In: **Comprehensive Cellulose Chemistry: Fundamentals and Analytical Methods**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. v. I. p. 9–29.

KRICKA, W.; FITZPATRICK, J.; BOND, U. Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass: A perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–11, 2014.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems - An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2005.

KUHAD, R. C.; DESWAL, D.; SHARMA, S.; BHATTACHARYA, A.; JAIN, K. K.; KAUR, A.; PLETSCHKE, B. I.; SINGH, A.; KARP, M. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, p. 1–10, 2011.

KUMAR, A.; KANWAR, S. Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 13–27, 2012.

KUMAR, A.; DUTT, D.; GAUTAM, A. Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2016a.

KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 34, 2016b.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 57–63, 2001.

LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Simplifying cellulase production by using environmental selection pressures and recycling substrate. **Environmental Technology**, v. 34, n. 4, p. 471–475, 2013.

LI, J.; MA, C.; MA, Y.; LI, Y.; ZHOU, W.; XU, P. Medium optimization by combination of response surface methodology and desirability function: An application in glutamine production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 563–571, 2007.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.

LI, T.; CHEN, X. B.; CHEN, J. C.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Open and continuous fermentation: Products, conditions and bioprocess economy. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 12, p. 1503–1511, 2014.

LIANG, X.; HUANG, Y.; HUA, D.; ZHANG, J.; XU, H.; LI, Y.; ZHANG, X. Cellulase production by *Aspergillus* sp. on rice grass (*Spartina* spp.) under solid-state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 39, p. 6785–6792, 2012.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011a.

LIU, Y. T.; LUO, Z. Y.; LONG, C. N.; WANG, H. D.; LONG, M. N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 733–737, 2011b.

LOH, Y. R.; SUJAN, D.; RAHMAN, M. E.; DAS, C. A. Sugarcane bagasse — The future composite material: A literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 75, p. 14–22, 2013.

LONGOBARDI, G. P. Fed-batch versus batch fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 5-6, p. 185–194, 1994.

LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53–75, 2009.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169–172, 2008.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas - MG: Embrapa - CNPMS, 2002. p. 23. (Circular Técnica, 22).

MAHMOOD, R. T.; ASAD, M. J.; MEHBOOB, N.; MUSHTAQ, M.; GULFRAZ, M.; ASGHER, M.; MINHAS, N. M.; HADRI, S. H. Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 4, p. 895–908, 2013.

MAI, H. T. N.; LEE, K. M.; CHOI, S. S. Enhanced oxalic acid production from corn cob by a methanol-resistant strain of *Aspergillus niger* using semi solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 9–15, 2016.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105–114, 2002.

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

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Fermentation Technology**, v. 54, n. 4, p. 267–286, 1975.

MANSOUR, A. A.; COSTA, A. DA; ARNAUD, T.; LU-CHAU, T. A.; FDZ-POLANCO, M.; MOREIRA, M. T.; CACHO RIVERO, J. A. Review of lignocellulolytic enzyme activity analyses and scale-down to microplate-based assays. **Talanta**, v. 150, p. 629–637, 2016.

McKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): Overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 37–46, 2002.

McNEIL, B.; HARVEY, L. M.; ROWAN, N. J.; GIAVASIS, I. Fermentation monitoring and control of microbial cultures for food ingredient manufacture. In: McNEIL, B.; HARVEY, L.; ARCHER, D.; GIAVASIS, I. (Eds.). **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. 1st. ed. Chap. 6. Woodhead Publishing, 2013. p. 125–143.

MEHBOOB, N.; ASAD, M. J.; ASGHER, M.; GULFRAZ, M.; MUKHTAR, T.; MAHMOOD, R. T. Exploring thermophilic cellulolytic enzyme production potential of *Aspergillus fumigatus* by the solid-state fermentation of wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3646–3655, 2014.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 638–646, 2013.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7842–7847, 2008.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 150–158, 2014.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. J. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: Current status and perspectives. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 469–476, 2011.

MICHELIN, M.; MOTA, A. M. DE O.; POLIZELI, M. DE L. T. DE M.; SILVA, D. P. DA; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 19–26, 2013.

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.; BEROVIC, M.; MEIEN, O. F. VON; JR, L. F. L. L. Substrate, air, and thermodynamic parameters for ssf bioreactor models. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (Eds.). **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. 1st. ed. Chap. 19. Springer, 2006. v. 1p. 265 – 278.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183–225, 2002.

MONSALVE G., J. F.; PEREZ, V. I. M. DE; COLORADO, A. A. R. Ethanol production of banana shell and cassava starch. **Dyna**, v. 150, p. 21–27, 2006.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, p. 9–23, 2009.

MORRELL, J. J. Degradation of lignocellulosic materials and its prevention. **JOM**, v. 66, n. 4, p. 580–587, 2014.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1119–1127, 2011.

MUNISWARAN, P. K. A.; SUNDARA MOORTHY, S.; CHARYULU, N. C. L. N. Transport phenomena in solid state fermentation: Oxygen transport in static tray fermentors. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 6, p. 362–366, 2002.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355–361, 2012.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; VAN RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus*

niger FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 118–123, 2012.

NORGREN, M.; EDLUND, H. Lignin: Recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 409–416, 2014.

NØRREGAARD, A.; STOCKS, S. M.; WOODLEY, J. M.; GERNAEY, K. V. Summary box: characteristics of production system filamentous fungi fermentation. In: MEYER, H.-P.; SCHMIDHALTER, D. R. (Eds.). **Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells**. 1st. ed. Chap. 3. Wiley, 2014. p. 130–161.

OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; DHALIWAL, S. S.; KAUR, S.; VADLANI, P. V.; BHARGAV, V. K.; Patil, R. T. Enhanced oil recovery by pre-treatment of mustard seeds using crude enzyme extract obtained from mixed-culture solid-state fermentation of kinnow (*Citrus reticulata*) waste and wheat bran. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 759–767, 2012.

OBEROI, H. S.; RAWAT, R.; CHADHA, B. S. Response surface optimization for enhanced production of cellulases with improved functional characteristics by newly isolated *Aspergillus niger* HN-2. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 119–134, 2014.

OMOJASOLA, P.; JILANI, O.; IBIYEMI, S. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. **Nature and Science**, v. 6, n. 2, p. 64–79, 2008.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69–80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C-G.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels: Alternative feedstock and conversion process**. 1st. ed. Elsevier Inc., 2011.

PANDEY, S.; SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M.; KUMAR, V.; SINGH, A.; TRIVEDI, S.; SRIVASTAVA, Y. K. *Trichoderma* species cellulases produced by solid state fermentation. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 1–4, 2015.

PANWAR, D.; KUMAR SRIVASTAVA, P.; KAPOOR, M. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 118–125, 2014.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2086–2100, 2014.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Papaya peel valorization for production of acidic pectin methylesterase by *Aspergillus tubingensis* and its application for fruit juice clarification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 58–67, 2016.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. DA S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465–471, 2013.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd. ed. North Ryde - AU: Springer, 2009.

RAGHAVARAO, K. S. M.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 127–135, 2003.

RAMACHANDRA, Y. L.; NARAYANAMURTHY, G.; JOIS, S.; CHAVAN, A.; SATWADI, P. R. Production of citric acid in basal coffee husk medium by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Advances in Biological Research**, v. 7, n. 6, p. 234–240, 2013.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.

RAY, R. C.; BEHERA, S. S. Solid state fermentation for production of microbial cellulases. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 1st. ed. Chap. 3. Elsevier Inc., 2017. p. 43–79.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *aspergillus niger* em fermentação em fermentação em estado sólido**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Urubelândia, Urubelândia - MG, Brasil, 2010.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 61–66, 2010.

RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, C. R.; RODRÍGUEZ, D. E.; PANDEY, A. Factors affecting solid-state fermentation. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. (Eds.). **Current Developments in Solid-state Fermentation**. 1st. ed. Chap. 3. Springer, 2008. p. 26 – 47.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two alfa-amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 18–25, 2012.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBE, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SÁNCHEZ, S. R.; SÁNCHEZ, I.G.; ARÉVALO-VILLENA, M.; PÉREZ, A. B. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 587–593, 2015.

SANGHI, A.; GARG, N.; SHARMA, J.; KUHAR, K.; KUHAD, R. C.; G, V. K. Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 633–640, 2008.

SANTOS, T. C. DOS; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1299–1304, 2012.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143–149, 2016.

SHAH, S. P.; KALIA, K. S.; PATEL, J. S. Optimization of cellulase production by *Penicillium oxalicum* using banana agrowaste as a substrate. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 35–43, 2015.

SHU, G.; HU, M.; WANG, S.; CHEN, H. Effect of some factors on production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 357–361, 2011.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products - An overview. **Renewable Energy**, p. 1–13, 2016.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state fermentation for the production of poly(hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 173–181, 2015.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; THOMAS, L.; GOSWAMI, M.; GIRI, B. S.; PANDEY, A. Industrial enzymes. In: PANDEY, A.; HOFER, R.; LARROCHE, C.; TAHERZADEH, M.; NAMPOOTHIRI, M. (Eds.). **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. 1st. ed. Chap. 13. Elsevier B.V., 2015. p. 473–497.

SOARES, C.; PACHECO, V.; NASCIMENTO, A.; JOSE, T.; ROCHA, O. Aproveitamento da semente da jaca para a obtenção de endoglucanase a partir de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. p. 25–30, 2011.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia organosolv**. São Paulo: NAIPPE/USP, 2004, v. 3, p. 29.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 6, p. 433–443, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TALENS-PERALES, D.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. **Enzymes: Functions and Characteristics**. 1st. ed. Valencia, Spain: Elsevier, 2016.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TYE, Y. Y.; LEE, K. T.; WAN ABDULLAH, W. N.; LEH, C. P. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 155–172, 2016.

UÇKUN KIRAN, E.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 903–917, 2014.

UDENIGWE, C. C.; RAJENDRAN, S. R. C. K. Old products, new applications? Considering the multiple bioactivities of plastein in peptide-based functional food design. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 8–13, 2016.

UNICA. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2015/2016**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>>. Acesso em: 7 jan. 2017.

VAIDYANATHAN, S.; MACALONEY, G.; VAUGHAN, J.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Monitoring of submerged bioprocesses. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 277–316, 1999.

VANHOLME, R.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 278–285, 2008.

VARMA, D. S.; VARMA, M.; VARMA, I. K. Coir fibers: part I: Effect of physical and chemical treatments on properties. **Textile Research Journal**, v. 54, n. 12, p. 827–832, 1984.

VASCONCELLOS, V. M.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; FARINAS, C. S. Production efficiency versus thermostability of (hemi)cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1701–1709, 2015.

VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 360–367, 2012.

WAKADE, G. S.; PAL, S. Two step enzymatic hydrolysis and fermentation strategy for conversion of acid treated hydrolysate of corn cob to ethanol. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 6, n. i, p. 133–143, 2015.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: Biology and Applications**. 2nd. ed. Chap. 1. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 1–35.

WANG, C.; WU, G.; CHEN, C.; CHEN, S. High production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* on corncob. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 58–67, 2012.

WANG, G. S.; LEE, J. W.; ZHU, J. Y.; JEFFRIES, T. W. Dilute acid pretreatment of corncob for efficient sugar production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 5, p. 658–668, 2011.

WANG, M.; LIU, K.; DAI, L.; ZHANG, J.; FANG, X. The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 491–500, 2013.

WEI, H.; XU, Q.; TAYLOR, L. E.; BAKER, J. O.; TUCKER, M. P.; DING, S. Y. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 330–338, 2009.

WHITEWAY, M.; TEBUNG, W. A.; CHOUDHURY, B. I.; RODRÍGUEZ-ORTIZ, R. Metabolic regulation in model ascomycetes - adjusting similar genomes to different lifestyles. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 8, p. 445–453, 2015.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 295–299, 2009.

XIAO, J. HUI; CHEN, D. X.; WAN, W. X.; HU, X. J.; OI, Y.; LIANG, Z.Q. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1887–1893, 2006.

YANG, S.; JIN, L.; REN, X.; LU, J.; MENG, Q. Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 4, p. 468–476, 2014.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319–338, 2014.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 17–34, 2001.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; BAO, J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 211–219, 2016.

ZHEN, H.; XU-TAO, Z.; GUI-QING, X. Product quality improvement through response surface methodology: a case study. **International Conference on Technology Innovation and Industrial Management.**, p. 120–130, 2013.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, n. 1, p. 35–53, 2014.

ZIGLIO, B. R.; BEZERRA, J. R. M. V.; BRANCO, I. G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas E Naturais**, v. 9, n. 1, p. 115–128, 2007.