

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LUANA ZANCHETTA TESCHE

**Estudo comparativo das características e da eficácia de celulasas de
fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**

Araraquara

2017

LUANA ZANCHETTA TESCHE

**Estudo comparativo das características e da eficácia de celulases de
fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

T337e Tesche, Luana Zanchetta
Estudo comparativo das características e da eficácia de
celulases de fungos endofíticos na sacarificação do bagaço
de cana-de-açúcar pré-tratado / Luana Zanchetta Tesche. –
Araraquara : [s.n.], 2017
128 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Daniela Alonso Bocchini

1. Fungos endofíticos. 2. Celulase. 3. Bagaço de cana.
4. Hidrólise. 5. Biomassa. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo comparativo das características e da eficácia de celulasas de fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado"

AUTORA: LUANA ZANCHETTA TESCHE

ORIENTADORA: DANIELA ALONSO BOCCHINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof^a. Dr^a. DANIELA ALONSO BOCCHINI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof^a. Dr^a. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 10 de outubro de 2017

DADOS CURRICULARES

Luana Zanchetta Tesche

Nascimento: 05/05/1993, Leme – SP

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3193939930522996>

Nome em citações bibliográficas: TESCHE, L. Z.

Formação acadêmica (2011/2014)

Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis
Faculdade de Tecnologia “Nilo de Stéfani” (Fatec)
Jaboticabal, Brasil.

Atividades acadêmicas relevantes

1. Participação em eventos científicos:

VIII Simpósio de Microbiologia

Período: 15 a 19 de agosto de 2016.

São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP), Brasil.

- Apresentação na forma de painel do trabalho “Produção de celulasas pelo fungo endofítico *Phomopsis stipata* SC04 e aplicação do extrato enzimático na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar”
- Co-autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Influência de parâmetros de fermentação na produção de celulasas por fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04”.

IV Simpósio de Tecnologia Sucroenergética e de Biocombustíveis

Período: 03 a 07 de outubro de 2016.

Jaboticabal, Brasil.

- Apresentação na forma de painel do trabalho “Aplicação de celulasas produzidas pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar”.

Trabalho premiado como melhor pôster.

Workshop on Second Generation Bioethanol 2016

Período: 30 de novembro e 1 de dezembro de 2016

Campinas, Brasil

- Co-autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Optimization of β -glucosidase production by the endophytic fungus *Saccharicola* sp. EJC04”.

39th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals

Período: 01 a 04 de maio de 2017

São Francisco, Califórnia, Estados Unidos.

- Trabalho apresentado na forma de painel (co-autora) “Sugarcane bagasse saccharification by cellulases from the endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. AM01”.
- Co-autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Optimization of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse using a blend of enzymatic extracts produced by endophytic fungi *Botryosphaeria* sp. AM01.

Congresso Internacional de Biomassa 2017

Período: 20 a 22 de junho de 2017

Curitiba, Paraná, Brasil.

- Apresentação na forma de painel do trabalho “Otimização da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico *Phomopsis stipata* SC04”

Classificado em 3º lugar na categoria melhores pôsteres.

2. Outros:

Estágio docência

Realizado junto ao Curso de Graduação Bacharelado em Química, período integral, na Disciplina Bioquímica Geral e Experimental I.

Supervisor do estágio na disciplina: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini.

Número de horas do estágio de docência: 3h/semana; 45h/total.

Regência de classe - Tema: “Extração e identificação de ácidos nucleicos” (3 horas).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
aos meus pais Ângela e
Valdir,
que por todo este
tempo me apoiaram e
me ensinaram o
verdadeiro valor da vida.
É por vocês e para vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, luz e proteção em minha caminhada, pois sem Ele jamais teria conseguido.

Aos meus pais, Ângela e Valdir, que sempre me ensinaram o verdadeiro valor da vida e que sempre lutaram pelos meus estudos. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pela força e principalmente por ser quem vocês são. A vocês minha eterna gratidão!

Ao meu irmão Lucas, que junto aos meus pais me ensinou muito e sempre me incentivou a seguir os estudos. Em você que me espelho!

Ao meu namorado Vinícius, por todo apoio e colaboração durante todo mestrado. Seu incentivo foi essencial. Muito obrigada!

À Prof^a Dra Daniela Alonso Bocchini, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientação. Muito obrigada!

À Prof^a Dra Kelly Johana Dussán Medina por sempre estar de portas abertas para ajudar. Seus ensinamentos foram fundamentais, muito obrigada!

Às amigas e companheiras de laboratório Natália Paganini Marques e Naiani Tartarine obrigada por todo auxílio, pela amizade e momentos compartilhados. Vocês são parte desse trabalho!

À Josiani Pereira por toda colaboração para o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Ângela Regina Araújo que gentilmente forneceu sua coleção de fungos ao nosso grupo de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Química pela oportunidade e excelente oferecimento de seus serviços prestados ao longo deste mestrado.

À Maria Isabel por todo suporte dado para o desenvolvimento da dissertação, sua ajuda foi fundamental.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos funcionários da seção de pós-graduação pela atenção e toda ajuda prestada.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram e colaboraram para realização deste trabalho. Muito obrigada!

*Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os
únicos benfeitores do mundo.*

-Walter S. Landor

RESUMO

Os principais desafios para a produção de etanol celulósico se relacionam aos custos de obtenção das celulases, à disponibilização da celulose presente nos materiais lignocelulósicos (para maior rendimento da sacarificação enzimática), bem como à eficiente conversão da glicose liberada em etanol. As celulases microbianas têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos, visando a sua aplicação no bagaço de cana-de-açúcar para liberação de açúcares fermentescíveis e posteriormente a produção de etanol celulósico. O presente trabalho teve como objetivo o estudo da produção de celulases por oito fungos endofíticos, por fermentação em estado sólido (FES) e a utilização dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Os fungos foram cultivados utilizando-se quatro misturas (1:1 p/p) de diferentes substratos lignocelulósicos, sendo selecionada para cada fungo, a mistura que proporcionou as maiores atividades de celulases nos extratos enzimáticos obtidos. Tais enzimas foram utilizadas na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino (NaOH 5% p/v), o qual apresentou a vantagem de gerar uma baixa concentração de inibidores, seguindo três diferentes protocolos de sacarificação. Nesta etapa, foram selecionados os fungos *Phomopsis stipata* SC 04 (concentrações de glicose de 3,82 e 4,72 mg/mL nos hidrolisados obtidos pelos Protocolos 1 e 2 de sacarificação respectivamente) e *Botryosphaeria* sp. AM 01 (concentração de glicose de 4,01 mg/mL no hidrolisado obtido pelo Protocolo 2 de sacarificação). Foram realizados delineamentos experimentais visando a avaliação da influência das variáveis envolvidas na sacarificação. Para *P. stipata* SC 04 Protocolo 1, foram otimizadas as cargas de bagaço, endoglucanase e concentração de Tween 80 (15,364% e 288,07 U totais, 0,095% respectivamente), obtendo-se glicose em concentração 2,42 vezes superior, quando comparado com a sacarificação prévia. Quando se empregou o Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se *P. stipata* SC 04 ou *Botryosphaeria* sp. AM 01, foi possível otimizar as condições carga de bagaço pré-tratado e concentração de Tween 80 (9,27% e 0,283%, respectivamente, para o primeiro fungo; 7,17% e 0,8345%, respectivamente, para o segundo fungo). Assim, o uso de enzimas microbianas na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico com NaOH levou a obtenção de hidrolisado com características adequadas para a utilização como fonte de glicose para produção de etanol celulósico, o que permitiu que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consumisse 85,8% da glicose presente em 24 horas de fermentação, produzindo 5,22 g/L de etanol celulósico.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, Celulase, Bagaço de cana, Hidrólise, Biomassa.

ABSTRACT

The main challenges for cellulosic ethanol production have been related to cellulases costs, to the availability of cellulose in lignocellulosic materials (for higher yield of enzymatic saccharification), as well as to the efficient conversion of glucose in ethanol. Microbial cellulases have been extensively studied in the last years, aiming its application on sugarcane bagasse to release of fermentable sugars and later the cellulosic ethanol production. The present work had as objective the study of cellulase production by eight endophytic fungi by solid-state fermentation (SSF), and the use of the enzymatic extracts in saccharification of pre-treated sugarcane bagasse. The fungi were cultivated using four mixtures (1:1 w/w) of different lignocellulosic substrates, has being selected for each fungus, the mixture that provided the highest cellulases activities in the enzymatic extracts obtained. These enzymes were used in the saccharification of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pre-treatment (NaOH 5% w/v), which had the advantage of generates a low inhibitors concentration, following three different saccharification protocols. In this step, the fungi selected were *Phomopsis stipata* SC 04 (glucose concentration of 3.82 and 4.72 mg/mL in the hydrolysates obtained from saccharification Protocols 1 and 2, respectively), and *Botryosphaeria* sp. AM 01 (glucose concentration of 4.01 mg/mL in the hydrolysate obtained from saccharification Protocol 2). Experimental designs were performed aiming the evaluation of the influence of variables involved in saccharification. For *P. stipata* SC 04, using Protocol 1, the charges of bagasse, endoglucanase and Tween 80 were optimized (15.364% e 288.07 U totais, 0.095% respectively), obtaining glucose in concentration 2.42 times higher when compared to previous saccharification. When saccharification Protocol 2 was employed, using *P. stipata* SC 04 or *Botryosphaeria* sp. AM 01, it was possible to optimize the conditions of pre-treated bagasse charge and Tween 80 concentration (9.27% and 0.283%, respectively, for the first fungus; 7.17% and 0.8345%, respectively, for the second fungus). Therefore, the use of microbial enzymes in saccharification of sugarcane bagasse submitted to hydrothermal pre-treatment with NaOH led to achievement of hydrolysate with suitable characteristics for using as glucose source to cellulosic ethanol production, allowing the *Saccharomyces cerevisiae* to consume 85.8% of contained glucose in 24 hours of fermentation, producing 5.22 g/L of cellulosic ethanol.

Keywords: Endophytic fungi, Cellulase, Sugarcane bagasse, Hydrolysis, Biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do material lignocelulósico e seus principais constituintes.....	28
Figura 2 – Esquema da estrutura molecular da celulose.....	29
Figura 3 – Demonstração do arranjo paralelo das cadeias do polímero da celulose.	30
Figura 4 – Organização estrutural da fibra de celulose.	31
Figura 5 – Estrutura molecular da hemicelulose (A); Estrutura da xilana (B).	32
Figura 6 – Estrutura esquemática da lignina de madeira macia.	33
Figura 7 – Monômeros fenilpropanóides constituintes da lignina.	33
Figura 8 – Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano.....	37
Figura 9 – Esquema do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.	38
Figura 10 – FES em sacos de polipropileno.	44
Figura 11 – Produção de celulasas pelo fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.....	60
Figura 12 – Produção de celulasas pelo fungo <i>Ustilaginoidea</i> sp. XYA 04.	60
Figura 13 – Produção de celulasas pelo fungo <i>P. stipata</i> SC 04.....	61
Figura 14 – Produção de celulasas pelo fungo <i>T. viridae</i> PAJ 01.	62
Figura 15 – Produção de celulasas pelo fungo <i>C. cladosporioides</i> PAJ 03.....	62
Figura 16 – Produção de celulasas pelo fungo <i>Ustilaginoidea</i> sp. CV 04.....	63
Figura 17 – Produção de celulasas pelo fungo <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04.....	64
Figura 18 – Produção de celulasas pelo fungo <i>Paecilomyces</i> sp. SF 021.	64
Figura 19 – Concentrações de glicose e xilose nos hidrolisados obtidos a partir dos experimentos iniciais de sacarificação do bagaço de cana de açúcar pré-tratado. (A): Protocolo 1; (B): Protocolo 2; (C): Protocolo 3.	69
Figura 20 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) obtidas pelo fungo <i>P. stipata</i> SC 04.....	73
Figura 21 – Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e β - glicosidase (B), presentes no extrato enzimático de <i>P. stipata</i> SC 04, em função das variáveis pH e temperatura, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3	75
Figura 22 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e Temperatura no delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 empregado na caracterização da endoglucanase (A) e β -glicosidase (B), utilizando- se o extrato enzimático de <i>P. stipata</i> SC 04.....	76

Figura 23 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) obtidas pelo fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	79
Figura 24 – Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B), presentes no extrato enzimático de fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01, em função das variáveis pH e temperatura, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 .	81
Figura 25 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e Temperatura sobre as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) presentes no extrato enzimático de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	82
Figura 26 – Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades de endoglucanase e β -glicosidase presentes nos extratos enzimáticos dos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 (A) e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 (B) (-■- Endoglucanase; -●- β -glicosidase).	83
Figura 27 – Efeito da temperatura sobre a estabilidade das atividades de endoglucanase e β -glicosidase obtidas pelos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 (A) e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 (B)	84
Figura 28 – Efeito de glicose (A) e etanol (B) sobre as atividades das β -glicosidases presentes nos extratos enzimáticos dos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	86
Figura 29 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis carga de bagaço, carga de endoglucanase e carga de Tween 80 na concentração de glicose obtida a partir dos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo1.	89
Figura 30 – Superfícies de resposta para concentração de glicose empregando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 – Protocolo 1, em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima endoglucanase (A), Tween 80 e carga de bagaço (B), Tween 80 e carga de enzima endoglucanase (C).	91
Figura 31 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço, carga de Endoglucanase e surfactante Tween 80 no planejamento composto central rotacional para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático do fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1.	92

Figura 32 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis temperatura, tempo e agitação na concentração de glicose obtida a partir dos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1.....	94
Figura 33 – Superfícies de resposta da concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1, em função das variáveis Agitação e Temperatura (A), Tempo e Temperatura (B), Tempo e Agitação (C).	96
Figura 34 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis Temperatura, Agitação e Tempo no delineamento fatorial do tipo face centrada para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático do fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1.	97
Figura 35 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis sobre a concentração de glicose empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04.	100
Figura 36 – Superfície de resposta para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e Tween 80, empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04.....	101
Figura 37 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço e carga de Tween 80 no DCCR para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 2.	102
Figura 38 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis físicas na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 – Protocolo 2.....	104
Figura 39 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico ..	107
Figura 40 – Superfície de resposta para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço pré-tratado e Tween 80, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	108
Figura 41 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço e carga de Tween 80 no DCCR 2 ² para a otimização das	

condições de sacarificação utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 no Protocolo 2.	109
Figura 42 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis físicas na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos endofíticos utilizados e plantas hospedeiras a partir das quais foram obtidos.....	43
Tabela 2 – Misturas de substratos utilizadas para o cultivo dos fungos, por FES, a 28 °C, por 8 dias.....	45
Tabela 3 – Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial fracionado do tipo face centrada 2 ² , para estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade de endoglucanases e β-glicosidasas.....	51
Tabela 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2 ³ empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC 04.....	53
Tabela 5 – Delineamento fatorial do tipo face centrada 2 ³ empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC04.....	54
Tabela 6 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC04.....	54
Tabela 7 - Delineamento fatorial do tipo face centrada 2 ³ empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC04.....	55
Tabela 8 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	55
Tabela 9 - Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ³ empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	56
Tabela 10 – Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana) e lignina dos substratos utilizados.....	59
Tabela 11 – Substratos selecionados para cada fungo e respectivas atividades enzimáticas obtidas pelos cultivos por FES, a 28°C, por 8 dias.....	65
Tabela 12 – Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana) e lignina do bagaço de cana-de-açúcar.	67

Tabela 13 – Ensaio do delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais das variáveis pH e temperatura, obtendo-se como resposta as atividades de endoglucanase e β -glicosidase do extrato enzimático de <i>P. stipata</i> SC 04.	72
Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da endoglucanase de <i>P. stipata</i> SC 04.	73
Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da β -glicosidase de <i>P. stipata</i> SC 04.	74
Tabela 16 – Ensaio do delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais das variáveis pH e temperatura, obtendo-se como resposta as atividades de endoglucanase e β -glicosidase do extrato enzimático de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	78
Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	79
Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da β -glicosidase de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.	80
Tabela 19 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3 , em níveis codificados e reais, empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC 04.	88
Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1.	90
Tabela 21 – Delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais, empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04.	93
Tabela 22 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1.	95
Tabela 23 – Ensaio do delineamento composto central rotacional, em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.	99

Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) para a liberação de glicose empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04.	100
Tabela 25 – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2 ³ , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.	103
Tabela 26 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 – Protocolo 2.	105
Tabela 27 – Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ² , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.	106
Tabela 28 – Análise de variância (ANOVA) para a liberação de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2.	107
Tabela 29 – Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ³ , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.	111
Tabela 30 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2.	112
Tabela 31 – Comparação da concentração de glicose nos hidrolisados obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado.....	114
Tabela 32 – Açúcares presentes antes e após o experimento de fermentação alcoólica.	115

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 Cana-de-açúcar e produção de etanol.....	26
3.2 Biomassa lignocelulósica.....	27
3.2.1 Celulose	29
3.2.2 Hemicelulose	31
3.2.3 Lignina	32
3.3 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos	34
3.4 Produção de enzimas de degradação de material vegetal	35
3.4.1 Enzimas do complexo celulolítico	36
3.5 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	37
3.5.1 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino	39
3.6 Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos	39
3.6.1 Fatores que afetam a sacarificação enzimática	40
3.7 Fermentação alcoólica de hidrolisado celulósico	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Microrganismos.....	43
4.2 Produção das celulasas por fermentação em estado sólido (FES)	43
4.3 Determinação das atividades enzimáticas	45
4.3.1 Endoglucanase	45
4.3.2 Exoglucanase	46
4.3.3 β -glicosidase	46
4.3.4 Fpase	47
4.3.5 Xilanase	47
4.3.6 β -xilosidase	48
4.4 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino do bagaço de cana-de-açúcar.....	48

4.5 Caracterização química dos bagaços <i>in natura</i> e pré-tratado por NaOH	48
4.6 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado	48
4.6.1 Protocolo 1 de sacarificação	49
4.6.2 Protocolo 2 de sacarificação	49
4.6.3 Protocolo 3 de sacarificação	49
4.7 Análise açúcares, etanol e inibidores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	50
4.8 Caracterização físico-química de endoglucanases e β-glicosidases presentes nos extratos de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>P. stipata</i> SC 04	51
4.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática	51
4.8.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas	52
4.8.3 Efeito de glicose e etanol sobre as atividades de β -glicosidases	52
4.9 Delineamentos experimentais empregados visando a otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado	52
4.9.1 Protocolo 1 de sacarificação utilizando o extrato de <i>Phomopsis stipata</i> SC 04	53
4.9.2 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo de <i>Phomopsis stipata</i> SC 04	54
4.9.3 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o extrato de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01	55
4.10 Fermentação alcoólica	56
4.11 Análise estatística	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Avaliação da produção das enzimas pelo cultivo dos fungos por FES	58
5.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado	66
5.3 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-açúcar	68
5.4 Caracterização físico-química das celulasas	71
5.4.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas de <i>P. stipata</i> SC 04	71
5.4.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01	77
5.4.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas dos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01	83

5.4.4 Efeito de glicose e etanol sobre as atividades das β -glicosidasas.....	85
5.5 Delineamentos experimentais empregados para a otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado	87
5.5.1 Protocolo 1 de sacarificação utilizando-se o extrato de <i>Phomopsis stipata</i> SC 04.....	87
5.5.2 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo <i>Phomopsis stipata</i> SC 04.....	98
5.5.3 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.....	105
5.5.4 Seleção do hidrolisado a ser utilizado na fermentação alcoólica	114
5.6 Análise de inibidores e ensaios de fermentação alcoólica	114
6 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida mundialmente como fonte sustentável de açúcares com grande potencial para a utilização na produção de biocombustíveis (HIMMEL et al., 2007), entre os quais o etanol celulósico ou de segunda geração, representando assim uma importante alternativa para a obtenção de energia renovável (KUHAD et al., 2016).

O bagaço de cana é um subproduto lignocelulósico gerado na indústria sucroalcooleira durante a extração do caldo de cana (DIAS et al., 2012), sendo considerado uma importante e eficaz biomassa para produção de etanol de segunda geração. É composto por aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Apresenta pequenas quantidades de pectina, proteínas, minerais e compostos de baixo peso molecular, além de apresentar baixo teor de cinzas (em torno de 2,4%), o que representa uma grande vantagem para sua bioconversão por microrganismos quando comparado com outros resíduos lignocelulósicos (PANDEY et al., 2000).

Os açúcares fermentescíveis podem ser obtidos a partir do bagaço de cana por hidrólise química ou enzimática de seus principais polissacarídeos constituintes, celulose e hemicelulose. Especialmente em relação à celulose, alguns fatores restringem a eficácia da hidrólise enzimática, como a recalcitrância do bagaço, representada principalmente pela presença da lignina, a qual dificulta o acesso das celulasas aos seus substratos. Além disso, a cristalinidade da celulose também é um fator limitante à ação das celulasas. Assim, uma etapa de pré-tratamento faz-se necessária para modificar a estrutura da lignina ou removê-la, bem como diminuir a cristalinidade da celulose, aumentando a eficiência da de hidrólise enzimática (FERNANDES et al., 2009; HOANG et al., 2015; WANG et al., 2016).

Vários pré-tratamentos tem sido empregados para esta finalidade. O pré-tratamento hidrotérmico, também chamado de auto-hidrólise, utiliza água sob temperaturas elevadas (120-260°C) como meio de reação (CARVALHO et al., 2015). A eficácia deste método pode ser aumentada com o emprego de agentes deslignificantes, como NaOH, que contribuem para variações de pH favorecendo a desestruturação da fibra vegetal (CARVALHO et al., 2015; GAO et al., 2013; MARYANA et al., 2014). O pré-tratamento hidrotérmico tem sido relatado por facilitar

a posterior hidrólise enzimática da celulose, pois não há elevada geração de produtos inibidores da fermentação (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Além da escolha de um método de pré-tratamento que não leve à perda de celulose, não seja oneroso e que não comprometa a fermentação alcoólica pela geração de inibidores, a obtenção de celulasas eficientes e a baixo custo é essencial para tornar o processo de obtenção de etanol de segunda geração economicamente viável (SIMS et al., 2010). A obtenção de celulasas pelo cultivo de microrganismos por fermentação em estado sólido (FES) tem sido uma importante alternativa para produção dessas enzimas a baixo custo, uma vez que há possibilidade de se utilizar como substratos resíduos agrícolas e agroindustriais abundantes, amplamente disponíveis e baratos (AMANDE et al., 2013; CHILIVERI; KOTI; LINGA, 2016; VASANTHI; MEENAKSHISUNDARAM, 2012).

As celulasas podem ser produzidas por muitos microrganismos, especialmente pelos fungos filamentosos quando cultivados por FES em substratos lignocelulósicos (MAEDA et al., 2013). Dentre os fungos filamentosos, tem se destacado os endofíticos, por possuírem potencial de produção de enzimas de degradação de material vegetal, entre as quais as celulasas (ZHENG et al., 2015). Constituem um grupo de organismos muito diversificado e estão presentes na maioria (se não em todas) das plantas de ecossistemas naturais, sem provocar sintomas externos (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). Desta forma, fungos endofíticos tem despertado interesse como novas fontes de celulasas pois, uma vez que colonizam os tecidos vegetais, podem produzir enzimas com características peculiares e interessantes do ponto de vista do ataque à celulose. Estudos envolvendo prospecção de celulasas pelo cultivo dos fungos endofíticos por fermentação em estado sólido (FES) são pouco frequentes e abordam a produção por alguns gêneros mais estudados. Desta forma, é importante a busca por gêneros não comumente citados na literatura (KAPOOR et al., 2010).

O complexo celulolítico microbiano é composto pelas enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. Endoglucanases ou carboximetilcelulasas (CMCases) (EG, endo-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) atuam sobre a celulose liberando glicooligossacarídeos, diminuindo o grau de polimerização da celulose, facilitando a ação das exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- β -D-glucan cellobiodehydrolase, EC 3.2.1.91). Estas, por sua vez, hidrolisam as ligações glicosídicas a partir das extremidades redutoras

(CBH I) e não redutoras (CBH II) das cadeias de celulose, liberando unidades de celobiose. As β -glucosidases (EC 3.2.1.21) então hidrolisam celobiose e pequenos oligossacarídeos, liberando glicose (LYND et al., 2002).

Em busca da melhoria dos processos, tem sido citado em vários trabalhos o uso de ferramentas de planejamento experimental para otimizar a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar utilizando-se extratos enzimáticos com atividade de celulasas, além de outras enzimas de degradação de lignocelulose (MAURYA et al., 2013; MORANDO et al., 2014; MYAT; RYU, 2014). Esta metodologia é interessante, pois permite avaliar a interação entre as variáveis estudadas e, na maioria das vezes, otimizar o processo, gerando uma superfície de resposta a partir de um número reduzido de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2014; SINDHU et al., 2014). As principais variáveis estudadas são carga de enzima, carga de substrato, agitação, surfactantes como Tween 80, temperatura e tempo (ARIAS et al., 2016; MORANDO et al., 2014; MORETTI et al., 2014a; QING; WYMAN, 2010) .

Considerando-se o exposto, no presente trabalho foi avaliada a influência de diferentes substratos na produção de celulasas por 8 fungos endofíticos, por FES, bem como foram realizados experimentos de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino. Os experimentos de sacarificação envolveram o uso dos extratos enzimáticos obtidos bem como o emprego de todo o material fermentado (substratos + crescimento fúngico), excluindo-se a etapa de extração das enzimas. Foram ainda realizados experimentos de otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado, utilizando-se metodologias de planejamento experimental e superfície de resposta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo principal o estudo da produção de celulasas por fungos endofíticos, por FES, e a utilização dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos do presente trabalho destacam-se:

- avaliar a influência de diferentes substratos lignocelulósicos sobre a produção de celulasas por 8 fungos endofíticos cultivados por FES e selecionar aquele que proporcionar melhores atividades enzimáticas, para cada fungo;
- submeter o bagaço de cana-de-açúcar a pré-tratamento hidrotérmico alcalino, utilizando-se NaOH;
- caracterizar o bagaço *in natura* e pré-tratado quanto ao teor de lignina, celulose e hemicelulose;
- utilizar os extratos enzimáticos produzidos pelos 8 fungos, pelo cultivo por FES nos respectivos substratos selecionados, na sacarificação do bagaço pré-tratado empregando-se o Protocolo 1 de sacarificação;
- cultivar os 8 fungos, por FES, nos respectivos substratos selecionados e utilizar todo o material proveniente deste cultivo (substrato + crescimento fúngico) como fonte de enzimas para a sacarificação do bagaço pré-tratado, utilizando o os Protocolos 2 e 3 de sacarificação, os quais excluem a etapa de extração das enzimática. Selecionar as condições (fungos e respectivos Protocolos de sacarificação) que levarem à maior concentração de glicose nos hidrolisados obtidos na sacarificação e otimizar este processo utilizando-se ferramentas de planejamento experimental;
- caracterizar as celulasas produzidas pelos fungos selecionados na etapa acima quanto à temperatura e pH ótimos de atividade, além de estabilidade frente a variações de pH e temperatura;

- avaliar a influência de glicose e etanol sobre a atividade das β -glicosidases produzidas pelos fungos selecionados.
- analisar o hidrolisado selecionado obtido sob as condições otimizadas de sacarificação em relação à presença de inibidores de fermentação e utilizá-lo como fonte de glicose para fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar e produção de etanol

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma monocotiledônea pertencente à família das *Poaceae*, mais comumente chamadas de gramíneas. É originária do sudeste asiático, sendo introduzida no Brasil no início do século XVI (ROSILLO-CALLE; BAJAY; ROTHMAN, 2005).

Todo modelo brasileiro para produção de açúcar e, mais tarde, para produção de etanol é consequência da inclusão da cana-de-açúcar pelos portugueses devido à necessidade de combustíveis durante a crise do petróleo (SCHWARTZ, 2005).

Atualmente, a cana-de-açúcar tem sido uma das principais culturas da economia brasileira, sendo também cultivada em mais de 100 países. O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar para a indústria de açúcar e álcool, sendo responsável por 651,841 mil toneladas na safra atual (2016/2017) (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2016) e é, consequentemente, o maior exportador (TRIANA, 2011).

No processamento industrial da cana é realizada a extração do caldo rico em sacarose, a partir do qual são produzidos o açúcar e o etanol. Parte do bagaço resultante deste processamento é direcionada para queima e posterior geração de energia elétrica (ESPIRITO SANTO, 2015; HASSUANI; LEAL; MACEDO, 2005), havendo ainda um grande excedente. A partir de cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados aproximadamente 260 quilos de bagaço (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2016). Sendo geradas muitas toneladas desse material lignocelulósico, anualmente, este se torna uma fonte importante para obtenção de vários bioprodutos, sem concorrer com a quantia destinada para alimentação de rebanhos (HICKERT, 2010; KIM; YUN, 2006). Um desses bioprodutos é o etanol de segunda geração (2G), que se apresenta como uma alternativa promissora ao uso de combustíveis fósseis, cujas reservas tem diminuído progressivamente (SCHEUFELE et al., 2012).

O etanol de primeira geração é produzido através da fermentação dos açúcares encontrados na cana-de-açúcar (ESPIRITO SANTO, 2015). Já o etanol 2G é produzido a partir da glicose ou xilose obtidas pela hidrólise da celulose e hemicelulose, respectivamente (SCHEUFELE et al., 2012). Considerando-se que a

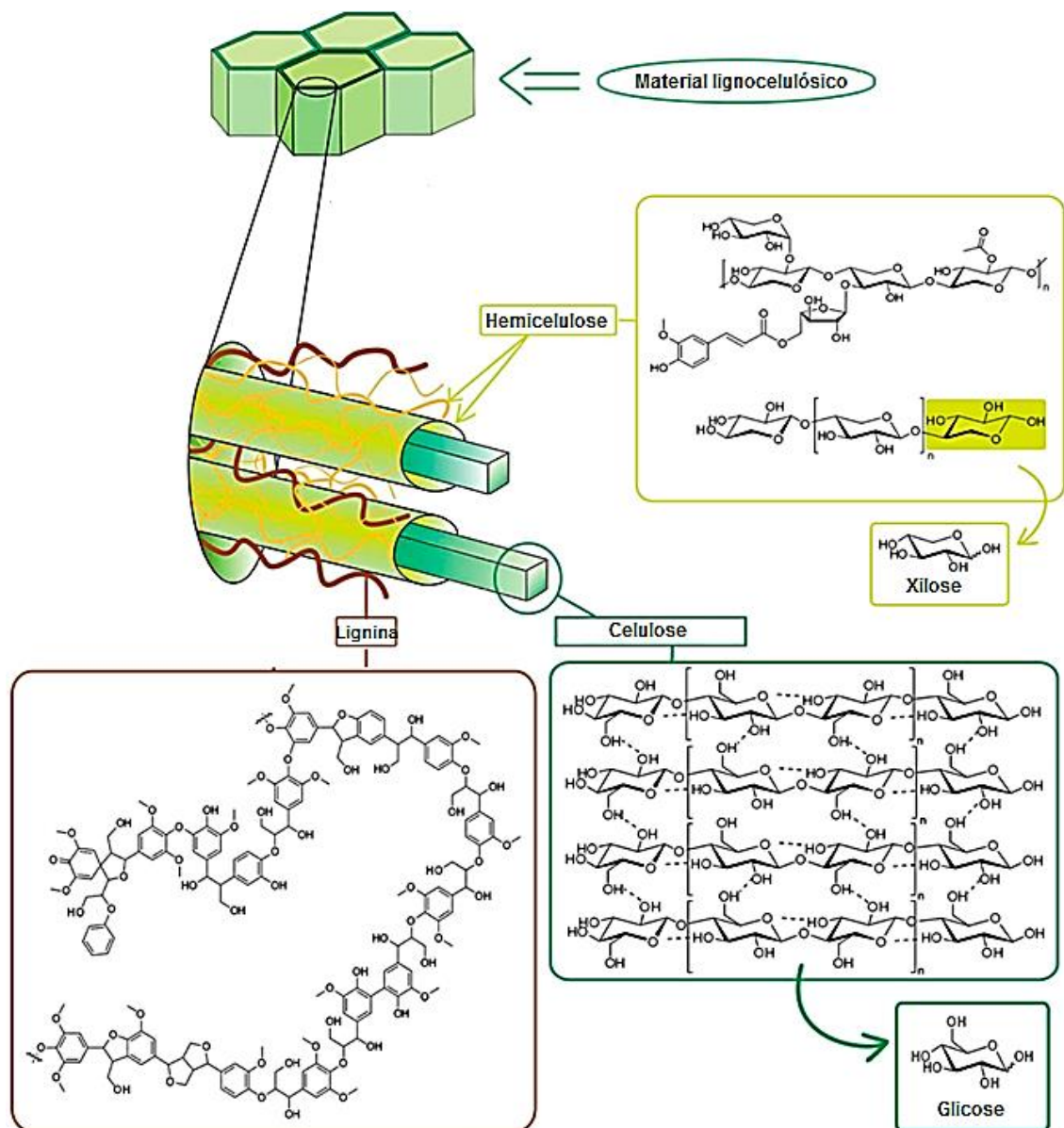
levedura *Saccharomyces cerevisiae* tradicionalmente empregada nos processos de produção de etanol não fermenta pentoses, grande parte das pesquisas sobre bioetanol tem focado no etanol celulósico, produzido pela fermentação da glicose obtida a partir da hidrólise da celulose (ZABED et al., 2016). As pesquisas científicas envolvendo este contexto de biorrefinarias tem se intensificado nos últimos anos, visando a bioconversão da lignocelulose presente no bagaço de cana para a produção de etanol (ZHANG; SONG; HAN, 2017). A bioconversão dessa biomassa lignocelulósica poderia aumentar significativamente o potencial dessa gramínea e, além disso, a implantação dessa tecnologia seria economicamente viável, pois poderia ser anexada às usinas sucroalcooleiras (ESPIRITO SANTO, 2015).

3.2 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta basicamente por celulose, hemicelulose e lignina os quais estão intimamente ligados, constituindo o que se denomina de lignocelulose, o principal componente da parede celular vegetal. Além destes componentes, estão presentes quantidades menores de outros como extrativos, proteínas estruturais e cinzas. (FENGEL; WEGENER, 1989). Assim a lignocelulose representa aproximadamente 90% do peso seco total (BALAT, 2011).

A Figura 1 apresenta um modelo da estrutura do material lignocelulósico e seus principais.

Figura 1 – Estrutura do material lignocelulósico e seus principais constituintes.



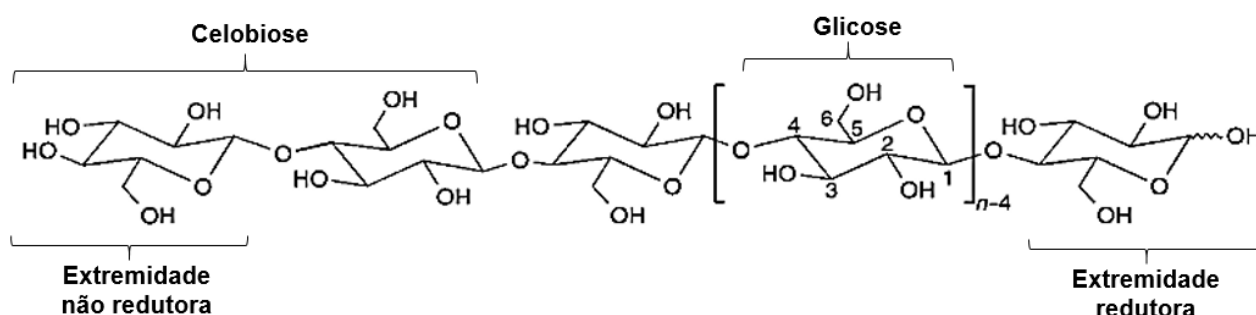
Fonte: Adaptado de Zhang; Song; Han, (2017)

Celulose e a hemicelulose, juntas, representam cerca de 70% da biomassa vegetal, estando estreitamente ligadas à lignina através de ligações covalentes que tornam a estrutura altamente robusta, gerando rigidez à parede celular (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004; MIELENZ, 2001)

3.2.1 Celulose

A celulose representa de 40 a 60% da biomassa vegetal seca, sendo também o polímero mais abundante na natureza (GURGEL, 2007). É um homopolissacarídeo linear e não ramificado (NELSON; COX, 2014), constituído de monômeros de glicose unidos por ligações β -(1,4) glicosídicas, tendo como unidade repetitiva a celobiose (KLEMM et al., 1998) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema da estrutura molecular da celulose.

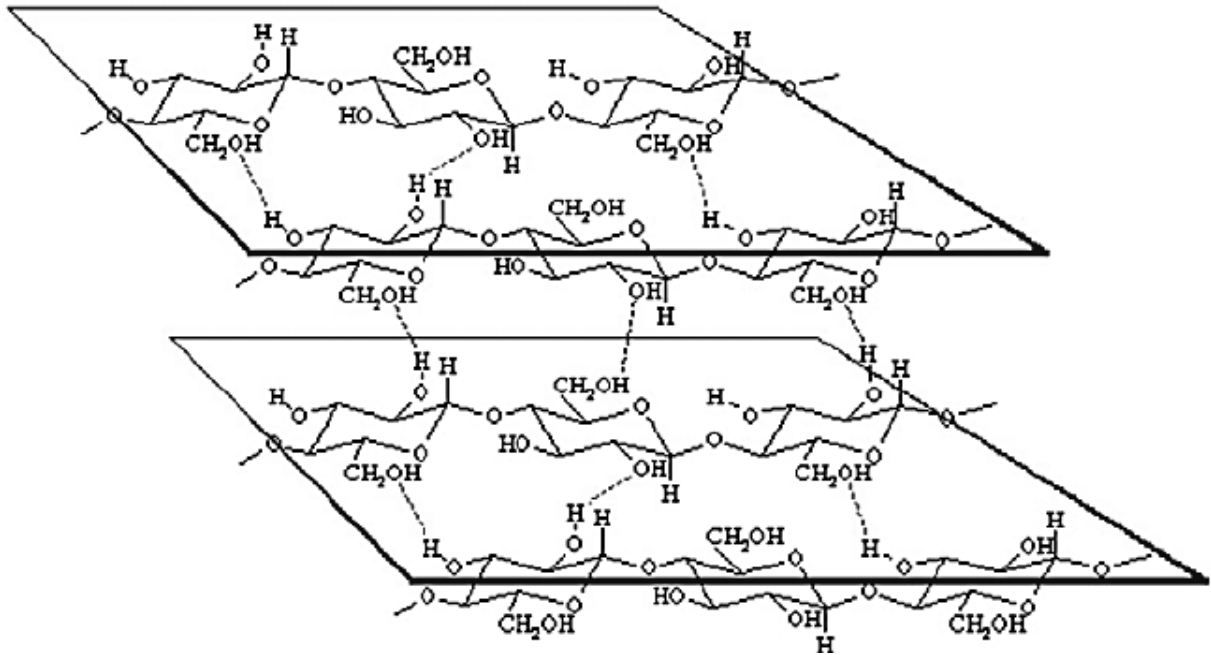


Fonte: Adaptado de Klemm et al., (2005)

As cadeias de celulose apresentam extremidades diferentes em relação aos carbonos envolvidos na ligação glicosídica β -(1,4). Na extremidade redutora, o carbono 1 é apresentado na estrutura hemiacetal, enquanto na extremidade não redutora o carbono C4 possui sua hidroxila original (GURGEL, 2007; KLEMM et al., 2005) (Figura 2.).

Na celulose, as ligações de hidrogênio intra e intercadeias mantêm a estrutura do polímero (Figura 3). Tais ligações são mais organizadas e coesas nas regiões denominadas cristalinas, as quais são de difícil acesso à água e enzimas e, portanto, menos suscetíveis à hidrólise enzimática (SUHAS et al., 2016)..

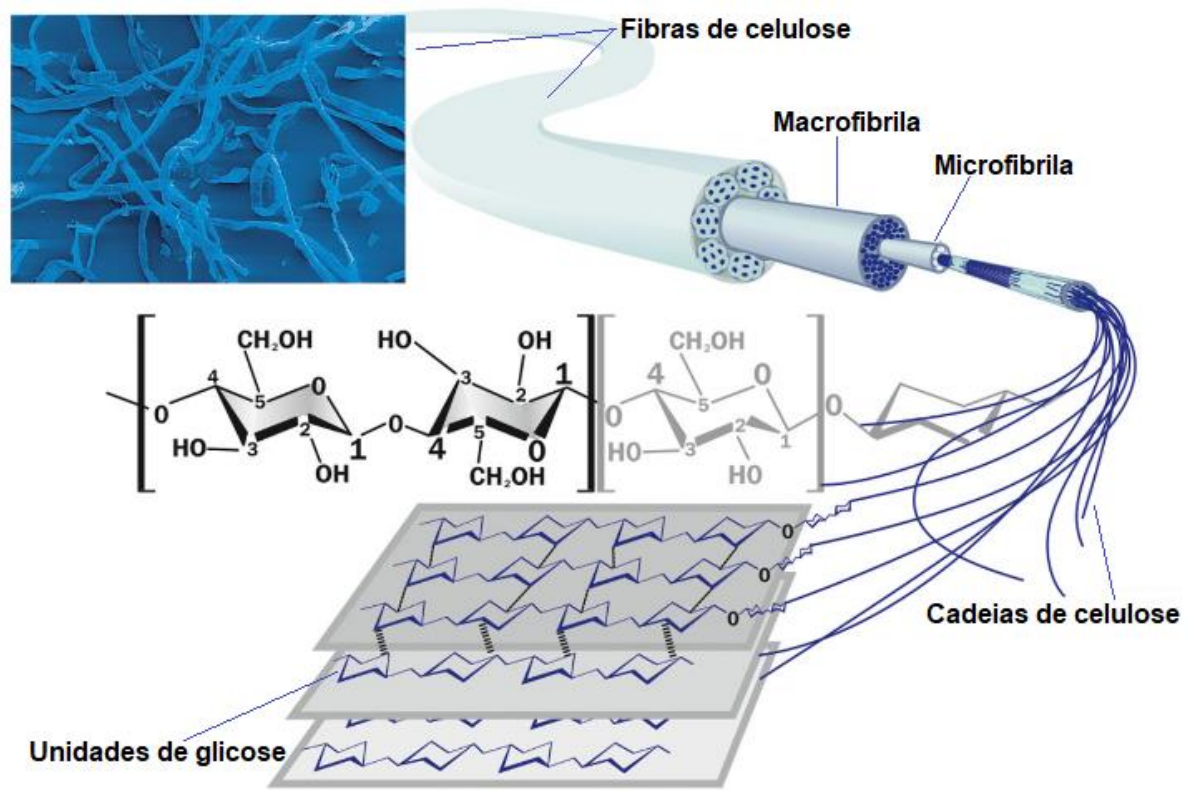
Figura 3 – Demonstração do arranjo paralelo das cadeias do polímero da celulose.



Fonte: Adaptado de Harmsen et al. (2010)

Várias cadeias de celulose, quando dispostas paralelamente e interligadas através de ligações de hidrogênio, formam as microfibrilas. Estas, por sua vez, organizam-se em macrofibrilas que constituem as fibras de celulose, como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Organização estrutural da fibra de celulose.

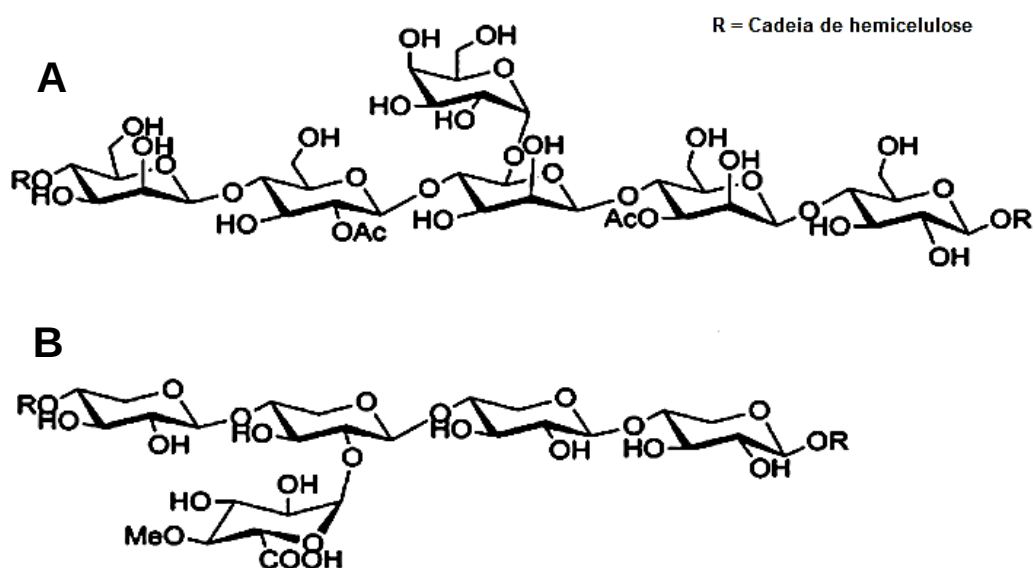


Fonte: Adaptado de J. RETTENMAIER & SÖHNE GMBH + CO KG (2017)

3.2.2 Hemicelulose

Interagindo através de ligações não-covalentes com a celulose tem-se a hemicelulose, que representa cerca de 20 a 30% da biomassa vegetal seca (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999). Consiste em cadeias curtas e altamente ramificadas de vários monossacarídeos com cinco e seis átomos de carbono, principalmente xilose, arabinose, galactose, glicose e manose, podendo conter também ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses. A xilana é o principal polissacarídeo componente da hemicelulose (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999).

Figura 5 – Estrutura molecular da hemicelulose (A); Estrutura da xilana (B).

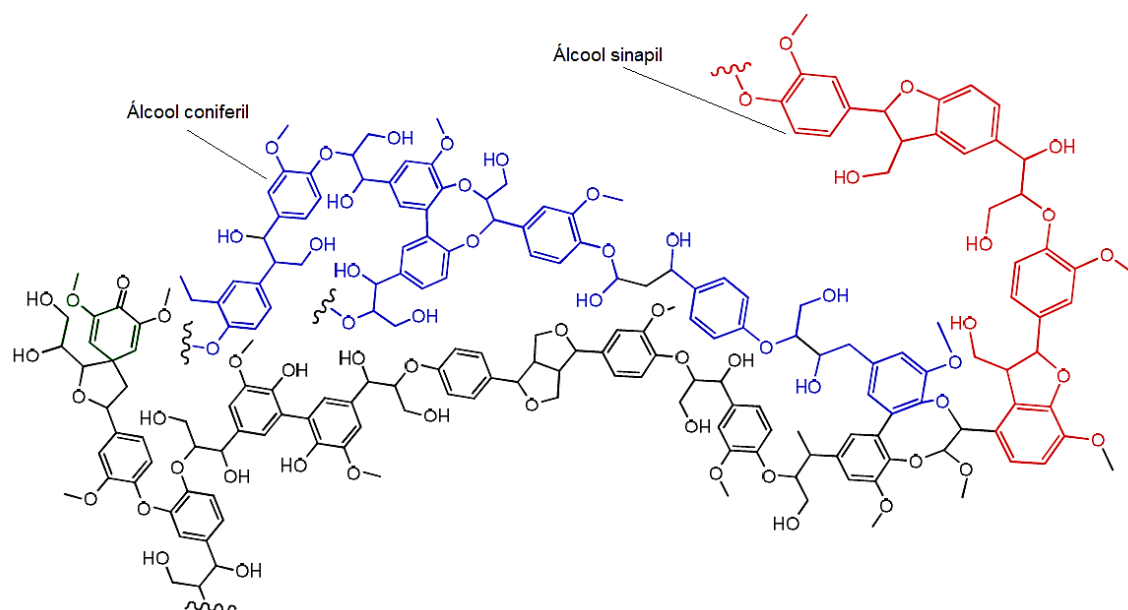


Fonte: Adaptado de Xu; Li; Mu, (2016)

3.2.3 Lignina

A lignina representa de 10 a 25% da composição da biomassa lignocelulósica, atuando como um material cimentante (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Trata-se de um polímero tridimensional complexo composto por unidades fenilpropanóides (Figura 6).

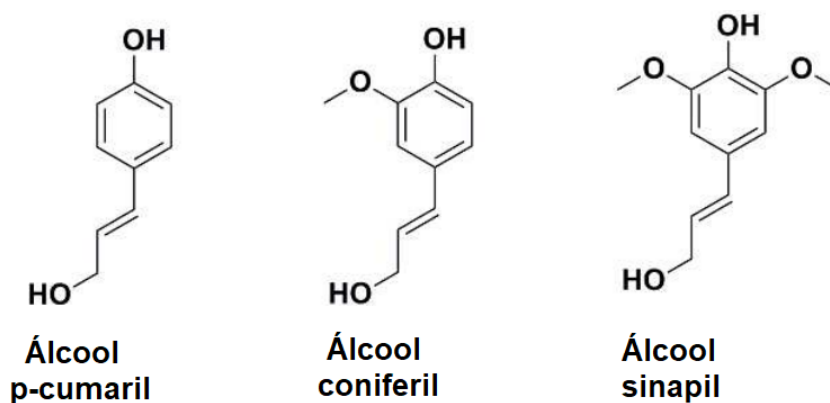
Figura 6 – Estrutura esquemática da lignina de madeira macia.



Fonte: Adaptado de Liu; Jiang; Yu, (2015)

A lignina é polimerizada a partir de três monômeros, sendo eles álcool cumarílico, álcool coniferílico e sinapílico (Figura 7), os quais se unem por ligações éter através do oxigênio do grupo hidroxila do anel fenólico e por ligações carbono-carbono, sendo diferenciados pelo número de metoxilas ligadas ao anel (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Figura 7 – Monômeros fenilpropanóides constituintes da lignina.



Fonte: Adaptado de Liu; Jiang; Yu, (2015)

É um polímero aromático insolúvel em água que fornece impermeabilização bem como resistência mecânica aos vegetais. Assim é responsável por conferir um caráter hidrofóbico à parede celular vegetal e protegê-la contra a degradação enzimática (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

A porcentagem de lignina varia entre as diferentes biomassas vegetais, (RAMOS, 2003). As ligninas derivadas de gramíneas, como a cana-de-açúcar apresentam os três monômeros principais básicos p-cumaril, além de grupos siringil e guaiacil (JØRGENSEN; KRISTENSEN; CLAUS FELBY, 2007). A lignina é um dos principais obstáculos na eficiência da sacarificação enzimática, pois além de impedir o acesso das hidrolases aos seus substratos também é responsável por ocasionar a ligação improdutiva de celulasas (MOSIER et al., 2005).

3.3 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

A obtenção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos tem atraído cada vez mais o interesse da comunidade científica, cujos estudos tem focado o desenvolvimento e a otimização de processos relacionados à conversão dos carboidratos presentes nestes materiais em açúcares fermentescíveis (JØRGENSEN; KRISTENSEN; CLAUS FELBY, 2007). Nos últimos anos, tem crescido o interesse na eficiente utilização de resíduos agroindustriais renováveis, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar, que é gerado após o esmagamento e extração do suco (PANDEY et al., 2000). Existem alguns processos principais envolvidos na produção de etanol celulósico: produção das enzimas microbianas envolvidas na degradação de lignocelulose, pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, a fim de facilitar o acesso dessas das celulasas à celulose, hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada para conversão da celulose, assim a fermentação da glicose em etanol, separação, destilação e tratamento de efluentes. A produção de etanol celulósico tem sido amplamente estudada visando a melhoria no processo como um todo, especialmente no que se refere ao custo das etapas de produção das enzimas e de pré-tratamento, bem como à viabilidade deste último, relacionada à baixa geração de produtos tóxicos ao ambiente e/ou inibidores de fermentação (ALVIRA et al., 2010; KOPPRAM et al., 2014).

3.4 Produção de enzimas de degradação de material vegetal

Cada vez mais tem-se investido em pesquisas e desenvolvimentos no campo de enzimas para aplicações industriais, buscando-se melhoria e redução de custos do processo (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Segundo Ravindran e Jaiswal (2016) o custo da produção de bioetanol celulósico é predominantemente dependente do custo das enzimas utilizadas na hidrólise da celulose. Tendo em vista o alto custo das preparações enzimáticas microbianas comerciais, tem-se buscado novas tecnologias de produção. Uma das alternativas são os processos que utilizam resíduos lignocelulósicos como substratos para o cultivo microbiano e indução da produção das enzimas, o que se torna vantajoso em relação às questões ambientais e econômicas. Tais processos são conhecidos como fermentações em estado sólido (FES).

Microrganismos como fungos filamentosos tem se destacado na produção de enzimas de degradação de materiais lignocelulósicos quando cultivados por FES nestes substratos (MAEDA et al., 2013). Entre estes fungos, os endofíticos são pouco estudados neste sentido e tem potencial para a produção de enzimas de degradação de material vegetal, entre as quais as celulasas e xilanases (ZHENG et al., 2015).

Os fungos endofíticos constituem um grupo de organismos de grande diversidade e estão presentes na maioria (se não em todas) das plantas de ecossistemas naturais, sem provocar sintomas externos (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). Produzem hidrolases extracelulares como parte do seu mecanismo de resistência para poder superar as defesas do hospedeiro ou mesmo para obter nutrientes provenientes do solo (TAN; ZOU, 2001). Por colonizarem os tecidos vegetais, podem produzir enzimas com características interessantes para acesso e ataque aos substratos (KAPOOR et al., 2010).

Nas FES, a fase aquosa é mínima, sendo utilizados substratos sólidos como suporte e/ou fonte de nutrientes para o crescimento microbiano, assim simulando as condições dos *habitats* naturais dos fungos filamentosos (SINGHANIA et al., 2009; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Fatores como temperatura, pH e teor de umidade do meio de cultivo, aeração, substratos indutores, bem como as concentrações dos demais nutrientes são variáveis importantes que influenciam no processo (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

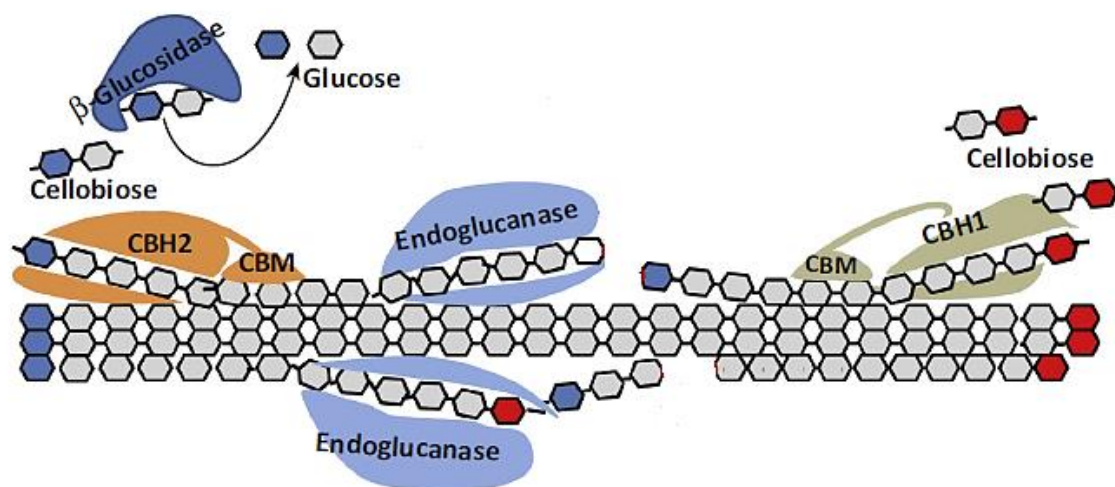
3.4.1 Enzimas do complexo celulolítico

Com a crescente pesquisa na área de biocombustíveis, tem-se investido na produção de enzimas microbianas para a sacarificação da biomassa lignocelulósica, principalmente as celulases, para a obtenção de glicose a partir da celulose presente nessa biomassa. (BINOD et al., 2013).

A sacarificação enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de várias enzimas do complexo celulolítico: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (Figura 8). As endoglucanases ou carboximetilcelulases (CMCase) (EG, endo-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) atuam sobre as ligações internas das cadeias de celulose liberando glicooligossacarídeos. São as responsáveis por iniciar a hidrólise, assim diminuindo o grau de polimerização da celulose e fornecendo extremidades redutoras e não redutoras para a ação das exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- β -D-glucan cellobiodehydrolase, EC 3.2.1.91) (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988). Estas, por sua vez, podem ser do tipo I (CBH I), que atuam em extremidades redutoras e do tipo II (CBH II), que atuam em extremidades não redutores, liberando unidades de celobiose (LYND et al., 2002). Por fim há a ação das β -glicosidases (EC 3.2.1.21) que atuam sobre a celobiose e pequenos oligossacarídeos, liberando glicose (LYND et al., 2002).

As enzimas exoglucanases podem ser inibidas pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, assim como as β -glicosidases podem sofrer inibição pela glicose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Figura 8 – Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano.



Fonte: Adaptado de Gupta et al., (2016)

3.5 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

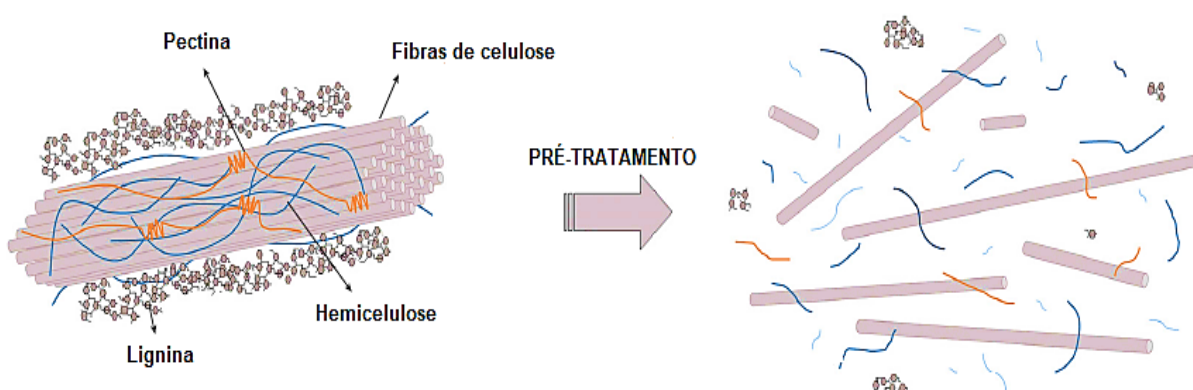
A produção de etanol celulósico apresenta algumas vantagens, especialmente relacionadas ao uso de resíduos agroindustriais. No entanto, a etapa de hidrólise enzimática da celulose em glicose apresenta algumas barreiras físico-químicas e estruturais que diminuem a eficiência das celulasas. Assim faz-se necessário uma etapa de pré-tratamento, responsável por mudanças estruturais e de composição na lignocelulose, essenciais para aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose (ALVIRA et al., 2010; KOPPRAM et al., 2014; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016) (Figura 9). O custo da etapa de pré-tratamento pode representar cerca de um terço do custo global do processo (LYND; ELANDER; WYMAN, 1996), sendo portanto necessário desenvolver tecnologias eficientes e econômicas, a fim de viabilizar a produção do etanol celulósico (KOPPRAM et al., 2014).

Além de buscar um aumento na acessibilidade das celulasas, o pré-tratamento visa a diminuição da cristalinidade da celulose, a desestruturação ou remoção da lignina, a dissociação do complexo lignina-celulose, e o aumento da área superficial da biomassa como um todo (HOANG et al., 2015; MOSIER et al., 2005). Assim, aumenta-se a conversão enzimática da celulose, e consequentemente, se obtém um maior rendimento em etanol (SINGH et al., 2014).

Cada pré-tratamento tem um efeito específico sobre os diferentes componentes da lignocelulose. Desta forma, diferentes métodos e condições devem

ser escolhidos de acordo com objetivo de cada processo, subsequente etapa de hidrólise e fermentação (ALVIRA et al., 2010). De modo geral, o pré-tratamento deve ser eficiente em termos de rendimento, funcionalidade, custo e deve ainda preservar as frações de carboidratos, incluindo a hemicelulose, a partir da qual pode-se obter pentoses, as quais podem também ser utilizadas por microrganismos fermentadores para a obtenção de etanol. Além disso, esta etapa deve evitar e/ou minimizar a formação de compostos inibidores, os quais podem ser prejudiciais na etapa da sacarificação e de fermentação (SINGH et al., 2014).

Figura 9 – Esquema do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Gupta et al., (2016)

Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados como físicos (métodos com moagem, trituração, uso de altas temperaturas, vapor), químicos (com uso de bases, ácidos, solventes orgânicos), biológicos (emprego de enzimas como ligninases). Pode-se ainda empregar combinações destes métodos (SINGH et al., 2014).

Muitos métodos de pré-tratamento têm sido estudados ultimamente, buscando-se maior eficiência e vantagens em termos ambientais e econômicos. Dentre os métodos estudados para a extração de lignina e hemicelulose, o uso de bases ou ácidos tem se mostrado promissor (FASANELLA, 2008). Há também tratamentos mais brandos, como por exemplo, baseados no uso de água sob alta temperatura. Esse tipo de pré-tratamento tem sido alvo de estudos por não gerar altas taxas de inibidores de fermentação que poderiam afetar o rendimento do processo (ESPIRITO SANTO, 2015).

3.5.1 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino

O pré-tratamento é uma das operações fundamentais para a utilização de materiais lignocelulósicos como matéria prima para a produção de etanol celulósico. O objetivo desta etapa é a diminuição da interação dos três principais componentes da parede celular: celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento hidrotérmico com adição de uma base, também conhecido por auto-hidrólise, que utiliza vapor de água como meio de reação (CARVALHO et al., 2015) e tem-se destacado pelo um baixo custo e pouca ou nenhuma geração de produtos inibidores da fermentação (LIMAYEM; RICKE, 2012). Produtos químicos como algumas bases tem sido utilizadas para aumentar a eficácia deste pré-tratamento, levando à menor degradação da celulose, além de contribuem para variações de pH que favorecem a desestruturação da fibra vegetal (CARVALHO et al., 2015; GAO et al., 2013; MARYANA et al., 2014).

Dentre as agentes químicos alcalinos, o hidróxido de sódio tem sido amplamente estudado por levar à degradação da lignina, principalmente pela clivagem das ligações éter. Além disso, promove o inchaço da celulose (PARK; KIM, 2012; XU; LI; MU, 2016), proporcionando diminuição da cristalinidade da mesma, o que leva a um aumento da superfície (MENG; RAGAUSKAS, 2014). Evidencia-se, ainda a dissociação das ligações lignina-carboidrato (FASANELLA, 2008), como as ligações éter entre hemicelulose e lignina, promovendo a solubilização destes polímeros, resultando em maior exposição da celulose às celulasas (SUN et al., 2016).

3.6 Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos

Duas técnicas têm sido empregadas para a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. O processo de hidrólise ácida apresenta vantagens por ser muito eficiente na conversão, porém a principal desvantagem é a necessidade de equipamentos altamente resistentes à corrosão, o que gera um aumento no custo do produto final. Além disso, ao final do processo é necessário a recuperação do ácido usado por razões econômicas e ambientais (SZENGYEL, 2000). A hidrólise enzimática tem sido considerada um processo promissor pela possibilidade de

atingir altos rendimentos de conversão de celulose em glicose, de modo geral sem a formação de subprodutos. As enzimas podem ser produzidas por processos empregando substratos lignocelulósicos baratos e amplamente disponíveis, diminuindo o custo total do processo. (KOPPRAM et al., 2014). Tem sido considerado um processo bem-sucedido devido à especificidade da enzima ao substrato, além da não geração de inibidores em comparação à hidrólise ácida (ZABED et al., 2016).

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade da área superficial da celulose para sua conversão em glicose por ação mediada por enzimas (MOSIER et al., 2005). Após esse pré-tratamento, a celulose, a qual está mais acessível, é então hidrolisada a glicose pela ação das enzimas do complexo celulolítico (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Condições como o pH, temperatura, carga enzimática, carga e tipo de substrato, tempo e agitação podem alterar a eficiência do processo de sacarificação. Vários trabalhos citam o uso de ferramentas estatísticas para a avaliação da influência destes e de outros parâmetros no processo, bem como de suas interações, na busca de melhores rendimentos, com um número reduzido de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2014; SINDHU et al., 2014).

3.6.1 Fatores que afetam a sacarificação enzimática

A sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos pode ser influenciada não apenas pela eficácia das enzimas, mas também pelas características físicas e químicas (SUN et al., 2016). A combinação da composição do substrato, o tipo de pré-tratamento e a carga e eficiência das enzimas utilizadas para a sacarificação têm grande influência na digestibilidade da biomassa (ALVIRA et al., 2010).

Os principais fatores que influenciam a sacarificação enzimática da celulose em matérias-primas lignocelulósicas podem ser divididos em dois grupos: fatores relacionados à enzima e ao substrato (ALVIRA et al., 2010). Dentre os fatores que afetam a atividade da enzima destacam-se inibição do produto final, estabilidade térmica, sinergismo e adsorção (ZHAO; CHENG; LIU, 2009). Estudos demonstraram que a atividade da enzima diminui gradualmente também com o aumento da concentração de biomassa sólida, mesmo quando a relação enzima e substrato

permanece constante (XIMENES et al., 2010). Trabalhos anteriores relataram que a atividade da celulase pode ser inibida por também celobiose, glicose e alguns produtos formados durante o pré-tratamento da biomassa, como ácidos fracos, furfural, hidroximetil furfural e compostos fenólicos solúveis (ANDRIĆ et al., 2009).

Os fatores que estão relacionados ao substrato concentram-se na melhoria da acessibilidade das enzimas à celulose, a qual pode ser afetada por fatores como a cristalinidade de celulose, distribuições da lignina e hemicelulose bem como a área de superfície disponível (ALVIRA et al., 2010).

Estudo anterior relatou que a agitação também é um fator que influencia na sacarificação enzimática, o qual notou-se que com o aumento da agitação, aumentou-se também a desativação da enzima (GANESH; JOSHI; SAWANT, 2000).

3.7 Fermentação alcoólica de hidrolisado celulósico

A produção de etanol celulósico a partir de biomassa lignocelulósica, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* compreende como passos principais a hidrólise da biomassa e fermentação dos açúcares liberados. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido considerada a mais apropriada para esse processo devido ao seu emprego intensivo em processos de fermentação industrial, apresentando assim ótimos desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica (KIRALLY et al., 2003).

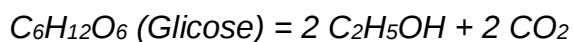
A conversão do bagaço de cana em etanol pode ser realizada de duas formas: simultaneamente ou separadamente. Pode ser realizada a hidrólise do bagaço de cana à glicose e simultaneamente a fermentação alcoólica deste açúcar, ou pode ser realizada separadamente em duas etapas (RABELO, 2010).

Assim a escolha do processo mais adequado depende de vários fatores como propriedades dos microrganismos de fermentação, do tipo de matéria-prima utilizada, além dos aspectos econômicos do processo. O modo mais utilizado e que tem se mostrado mais vantajoso atualmente é o processo em que primeiramente realiza-se a hidrólise enzimática e, posteriormente, a fermentação. Este processo pode ser realizado sob condições ótimas, de acordo com as enzimas e microrganismos utilizados (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

O processo de fermentação pode ser realizado por modos diferentes. A fermentação geralmente é feita em um sistema de cultura fechado, inoculando-se o

microrganismo em um meio com quantidade definida de nutrientes, ocorrendo fermentação até o esgotamento destes. Trata-se do modo mais simples de fermentação onde nada é adicionado após a inoculação da levedura, exceto, possivelmente, adição de ácido ou base para controle de pH (BALAT, 2011).

Durante a fermentação, a conversão microbiana de hexoses como a glicose a etanol ocorre com base na seguinte reação, conforme descrito por Tran; I; Lin, (2013).



Assim, as fermentações realizadas com o emprego de hidrolisados de biomassa lignocelulósica variam quanto ao rendimento em etanol de acordo com o tipo de biomassa, o microrganismo, tipo e concentração de açúcares nos hidrolisados bem como com a possível presença de inibidores de fermentação (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados 8 fungos endofíticos pertencentes à coleção de culturas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do IQ/UNESP (Tabela 1). Tais fungos foram pré-selecionados a partir de trabalho anterior realizado junto ao Grupo de Pesquisa (MARQUES, 2013) como potenciais produtores de celulasas. As culturas de trabalho foram preservadas em frascos de vidro contendo água deionizada estéril segundo metodologia descrita por Castellani (CASTELLANI, 1939). Os fungos também foram preservados por congelamento à -80°C em frascos contendo glicerol 20%. Discos de 8 mm de diâmetro, obtidos a partir do cultivo dos fungos em Agar PDA (*Potato Dextrose Agar*) foram transferidos para os frascos, estes foram fechados com uma rolha de borracha previamente esterilizada e lacrados com uma tampa de alumínio.

Tabela 1 – Fungos endofíticos utilizados e plantas hospedeiras a partir das quais foram obtidos.

Isolado	Gênero	Planta hospedeira
PAJ 03	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Ocotea corymbosa</i>
PAJ 01	<i>Tricoderma viridae</i>	<i>Ocotea corymbosa</i>
CV 04	<i>Ustilaginoidea</i> sp.	<i>Cupania vernalis</i>
SC 04	<i>Phomopsis stipata</i>	<i>Styrax camporum</i>
EJC 04	<i>Saccharicola</i> sp.	<i>Eugenia jambolana</i>
AM 01	<i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01	<i>Alibertia macrophylla</i>
SF 021	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Styrax ferrugineus</i>
XYA 04	<i>Ustilaginoidea</i> sp.	<i>Xylopia aromatica</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Produção das celulasas por fermentação em estado sólido (FES)

Para produção de enzimas, os fungos foram cultivados em diferentes misturas (1:1 p/p) dos seguintes substratos lignocelulósicos: bagaço de cana-de-açúcar (BC) e/ou farelos de trigo (FT), algodão (FA) ou soja (FS). Os farelos de soja, algodão e

trigo foram adquiridos em casa agropecuária na cidade de Araraquara. O bagaço de cana-de-açúcar foi doado pela Usina Virgulino de Oliveira - Planalto – José Bonifácio/SP. Apenas o bagaço foi previamente lavado, seco a 40 °C sob circulação de ar, processado em triturador e peneirado em peneira de 0,59 mm de malha, enquanto os farelos foram utilizados sem lavagem.

As FES foram realizadas em sacos de polipropileno autoclaváveis, de 16 x 22 cm (LOTONG; SUWANARIT, 1983; MERHEB-DINI et al., 2010). Em cada saco foram colocados 5g de mistura de substratos e um espiral de fio de cobre encapado (para evitar a colapso com o meio de cultivo). Como gargalo foi colocado um pedaço de cano de PVC (5 cm de altura x 2,2 cm de diâmetro) vedado com tampão de algodão (Figura 10).

Figura 10 – FES em sacos de polipropileno.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A umidade inicial foi padronizada em 65% (m/v), de acordo com o peso seco do substrato, adicionando-se, antes da autoclavagem, solução nutriente composta por (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5), KH_2PO_4 (3,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), CaCl_2 (0,5) e Tween (MANDELS; STERNBERG, 1976), sendo o pH ajustado para 5,0. O material foi esterilizado em autoclave, a 121 °C por 20 minutos.

Para cada cultivo por FES, os fungos foram pré-cultivados, a 28 °C, em placas de Petri contendo meio PDA (*Potato Dextrose Agar*), por 8 dias. Após este período, 5 discos de micélio de 8,0 mm de diâmetro foram utilizados como inóculo para cada saco de fermentação. Os cultivos foram mantidos a 28 °C, por 8 dias (MARQUES, 2013).

Para extração de enzimas foram adicionados 50 mL de água destilada a cada saco de fermentação. A mistura foi homogeneizada manualmente, transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL e mantida sob agitação de 150 rpm, por 1 hora, sob temperatura ambiente. Após este período, a mistura foi filtrada em tecido de *nylon*, o filtrado foi centrifugado a 10.000 *xg*, a 5 °C, por 15 minutos, e as atividades enzimáticas foram quantificadas no sobrenadante (PEREIRA et al., 2015). As misturas de substratos utilizadas para cada fungo são apresentadas na Tabela 2 e foram definidas a partir de dados obtidos em trabalho anterior realizado junto ao Grupo de Pesquisa (MARQUES, 2013). Nesta etapa foi selecionada a mistura de substrato mais adequada para a produção das enzimas, para cada fungo. Todos os cultivos foram feitos em duplicata.

Tabela 2 – Misturas de substratos utilizadas para o cultivo dos fungos, por FES, a 28 °C, por 8 dias.

Fungos	Misturas de substratos			
<i>C. cladosporioides</i> PAJ 03	BC+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>T. viridae</i> PAJ 01	BC+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>Ustilaginoidea</i> sp. CV 04	BC+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>P. stipata</i> SC 04	BC+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>Saccharicola</i> sp. EJC 04	FA+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01	FA+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>Paecilomyces</i> sp. SF 021	FA+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT
<i>Ustilaginoidea</i> sp. XYA 04	FA+FT	BC+FA	BC+FS	FS+FT

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Determinação das atividades enzimáticas

4.3.1 Endoglucanase

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada de acordo com Moretti et al., (2012). A mistura de reação continha 25 µL do extrato enzimático e 225 µL de solução de substrato carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0). A reação foi incubada a 60 °C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 250 µL do reagente DNS para a

quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva analítica de glicose. O controle da reação foi feito adicionando-se 250 μL do reagente DNS a 225 μL de solução de substrato carboximetilcelulose e, por fim, adicionando-se 25 μL do extrato enzimático. As misturas (reação e controle) foram então submetidas a banho de ebulição, a 100 °C, por 5 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo. Adicionou-se 2,5 mL de água deionizada, homogeneizou-se e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. Como branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi utilizada a mistura de 250 μL de água deionizada e 250 μL de DNS, sendo submetida à fervura e adição de água como descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.3.2 Exoglucanase

A atividade de exoglucanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito no item 4.3.1, porém utilizando-se Avicel Merck K28615431 (10,0 g/L) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas (MORETTI et al., 2012).

4.3.3 β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada como descrito por Leite et al., (2008) utilizando-se p-Nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (pNPG – Sigma-Aldrich) como substrato. A mistura de reação consistiu de 250 μL de solução tampão acetato de sódio (0,1 mol/L, pH 5,0), 250 μL de pNPG (4 mmol/L) e 50 μL de extrato enzimático. A reação foi mantida a 50 °C por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 (2 mol/L). O nitrofenol liberado foi quantificado a partir da curva analítica de p-nitrofenol (Sigma) por espectrofotometria a 410 nm. O tubo controle continha as mesmas quantidades de reagentes do tubo de reação, porém com a adição da solução de Na_2CO_3 antes do extrato enzimático, impedindo a reação. O tubo branco utilizado para zerar o espectrofotômetro continha 250 μL de solução tampão acetato de sódio (0,1 mol/L, pH 5,0), 250 μL de pNPG (4 mmol/L),

50 µL de água deionizada e 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2,0 mol/L). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de nitrofenol por minuto de reação, sob as condições de ensaio citadas.

4.3.4 Fpase

A atividade de celulase em papel de filtro (FPase) foi avaliada como proposto por Ghose, (1987), a 50 °C, utilizando como substrato uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm) em mistura de reação composta por 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação foi mantida a 50 °C, por 1 hora e interrompida pela adição de 3,0 mL do reagente DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva analítica de glicose. O tubo foi então submetido a banho de ebulição a 100 °C, por 5 minutos, e em seguida resfriado em banho de gelo. Foram adicionados 20 mL de água deionizada e a absorbância foi lida a 540 nm. O tubo controle continha 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, 3,0 mL do reagente DNS e 0,5 mL de extrato enzimático. O tubo foi então submetido a banho de ebulição, adição de água e leitura da absorbância como descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.3.5 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de endoglucanase (item 4.3.1), porém utilizando-se xilana Beechwood (Sigma X4252) (10,0 g/L, em solução tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,0) como substrato e curva analítica de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas (MORETTI et al., 2012).

4.3.6 β -xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi avaliada por procedimento idêntico ao descrito para β -glicosidase (item 4.3.3), exceto pela substituição do substrato pelo 4-nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação, sob as condições de ensaio citadas (LEITE et al., 2008).

4.4 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento foi realizado em autoclave, segundo metodologia descrita por Zhuang e colaboradores (ZHUANG et al., 2009). O bagaço de cana-de-açúcar previamente lavado, seco e triturado foi levado a autoclave (5% p/v em solução de NaOH 0,5 mol/L), em frasco Erlenmeyer de 250 mL vedado com papel alumínio, sob temperatura de 120 °C, durante 1 hora, a 1 atm. Após este procedimento, o frasco foi levado a banho de água gelada e, posteriormente, mantido sob temperatura ambiente para a estabilização. A fase sólida foi lavada em água de torneira até que o pH da água de lavagem estivesse próximo à neutralidade e, em seguida, o material foi lavado com água destilada, filtrado para a retirada do excesso de água. Após este procedimento, a fase sólida foi armazenada a 4 °C, para posterior utilização nos experimentos de sacarificação.

4.5 Caracterização química dos bagaços *in natura* e pré-tratado por NaOH

Bagaços *in natura* e pré-tratados foram caracterizados quanto à umidade, lignina total (lignina ácida solúvel e lignina ácida insolúvel), celulose e xilana segundo os métodos desenvolvidos pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory-EUA) (HAMES et al., 2008; SLUITER et al., 2008a, 2008b, 2012).

4.6 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Como uma triagem inicial para a seleção dos fungos com os quais seria dada continuidade ao Projeto, foram realizados experimentos de sacarificação seguindo-

se três Protocolos diferentes, em duplicata e com a mesma relação volume total/volume do frasco (1:5). Cloranfenicol foi utilizado na concentração final de 0,1 mg/mL, afim de evitar contaminação. Após o tempo de sacarificação, o material foi resfriado em banho de gelo e filtrado a vácuo. A fase líquida foi filtrada utilizando-se membranas de 0,22 µm e utilizada para a quantificação dos açúcares liberados, por CLAE.

A concentração de glicose (g/L) nos hidrolisados foi determinada e o rendimento com base nesse açúcar foi expresso em mg de glicose/g de bagaço de cana, segundo cálculo apresentado abaixo (MORETTI et al., 2014b):

$$mg \text{ glicose/g BC} = (g \text{ glicose total/g de celulose total}) * 100$$

4.6.1 Protocolo 1 de sacarificação

Neste Protocolo foram utilizados carga sólida de 10% (peso seco/volume) de bagaço pré-tratado, 20 mL de extrato enzimático e 5,0 mL de solução tampão citrato de sódio (pH 5,0, concentração final de 0,05 mol/L) na quantidade necessária para um volume final de 25 mL. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, sob agitação de 200 rpm, a 50 °C, por 24 horas (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015).

4.6.2 Protocolo 2 de sacarificação

Este Protocolo empregou o material resultante do cultivo do fungo por FES no substrato selecionado (substrato fermentado + crescimento fúngico), carga de 10% de bagaço pré-tratado (peso seco/volume), 100 mL de solução tampão citrato de sódio (pH 5,0, concentração final de 0,05 mol/L). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, sob agitação de 200 rpm, a 50 °C, por 24 horas (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; PIROTA; BALEEIRO; FARINAS, 2013).

4.6.3 Protocolo 3 de sacarificação

Neste Protocolo foi utilizado o material resultante do cultivo do fungo por FES, no substrato selecionado (substrato fermentado + crescimento fúngico), 50 mL de

solução tampão citrato de sódio (pH 5,0, concentração final de 0,05 mol/L). Não foi adicionado bagaço pré-tratado, portanto a carga sólida foi de 10% (p/v) apenas considerando-se os 5,0 g iniciais de substrato usados na FES. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sob 200 rpm, a 50 °C, por 24 horas (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; PIROTA; BALEEIRO; FARINAS, 2013).

4.7 Análise açúcares, etanol e inibidores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação de açúcares glicose e xilose presente nos hidrolisados foi realizada por cromatografia de troca iônica, utilizando-se o *HPAEC-PAD Thermo Scientific* (Dionex) ICS-5000 com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1, a 25°C, com eluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ e desgaseificada com N₂. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min com os solventes A (água ultra pura) e B (solução de NaOH 500 mmol/L), utilizando-se eluição em modo isocrático com 4,8% de B e 95,2% de A durante 25 minutos.

A quantificação de inibidores no hidrolisado também foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de ácidos orgânicos (ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido siríngico e ácido cumárico), 5-Hidroximetilfurfural e furfural nesse hidrolisado. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 15 min, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 22 µm, e 20 µL foi aplicado no cromatógrafo Agilent Tec., modelo 1220 Infinity LC, com bomba binária, com amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. A coluna usada foi uma C18 ZORBAX Eclipse Plus (4.6x250 mm), mantida a temperatura de 25 °C. A separação cromatográfica realizada utilizando fase móvel metanol:ácidoacético:água (10:2:88 v/v) como solvente “A” e metanol:ácido acético:água (90: 2: 8 v/v) como solvente “B” (RODRIGUEZ-DELGADO et al., 2001).

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e etanol nos experimentos de fermentação alcoólica foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Shimadzu LC-30AD. As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm), 85°C, volume de injeção de 20 µL, detector de índice de refração, fase móvel ácido sulfúrico 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

4.8 Caracterização físico-química de endoglucanases e β -glicosidases presentes nos extratos de *Botryosphaeria* sp. AM01 e *P. stipata* SC 04

Foi realizada a caracterização físico-química das enzimas endoglucanase e β -glicosidase presente nos extratos dos fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM01. Ambos foram cultivados por FES nos substratos selecionados bagaço de cana e farelo de soja, por 8 dias, a 28°C.

4.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática

O estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das endoglucanases e β -glicosidases foi realizado através de um delineamento fatorial do tipo face centrada 2², em dois níveis, com 12 ensaios, incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais. A Tabela 3 apresenta os valores codificados e reais utilizados.

Tabela 3 – Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial fracionado do tipo face centrada 2², para estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade de endoglucanases e β -glicosidases.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	+1	
x1 - pH	3,5	5,5	7,5	-
X2 - Temperatura	50	60	70	°C

Fonte: Elaborado pelo autor.

As atividades enzimáticas foram determinadas utilizando-se soluções de substrato em pH 3,5, 5,5 e 7,5. Os tampões utilizados para determinação das atividades enzimáticas de endoglucanase e β -glicosidase foram: tampão McIlvaine (fosfato de sódio 0,2 mol/L; ácido cítrico 0,1 mol/L) para o pH 3,5, tampão MES hydrate (Sigma-Aldrich M8250) para o pH 5,5 e tampão MOPS (Sigma-Aldrich M1254) para o pH 7,5.

A determinação do pH e temperatura ótima foi realizada através da análise da superfície de resposta, utilizando-se o *software* Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa,

Oklahoma, EUA). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos e o intervalo de confiança adotado foi de 95%.

4.8.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas

A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas, por 24h, a temperatura ambiente, em soluções tampão de pH 3,5 a 10,5 e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação. Os tampões utilizados foram: tampão McIlvaine (fosfato de sódio 0,2 mol/L; ácido cítrico 0,1 mol/L) para pH de 3,5 a 5,0, tampão MES hydrate (Sigma-Aldrich M8250) para pH 5,5 a 6,5, tampão MOPS (Sigma-Aldrich M1254) pH de 7,0 a 7,5, tampão TAPS (Sigma-Aldrich T5130) para pH de 8,0 a 9,0 e tampão CAPS (Sigma-Aldrich C2632) para pH de 9,5 a 10,5. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas, por 1h, a temperaturas de 30 a 80 °C, seguindo determinação da atividade residual, sob as condições ótimas.

4.8.3 Efeito de glicose e etanol sobre as atividades de β -glicosidases

As atividades de β -glicosidases foram quantificadas, como descrito no item 2.11.2, sob condições ótimas, na presença de glicose e etanol em concentrações de 2 a 20 mMol/L, e 5,0 a 20,0% respectivamente, a fim de se avaliar o efeito dos mesmos na atividade das enzimas.

4.9 Delineamentos experimentais empregados visando a otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado

Após os experimentos iniciais de sacarificação do bagaço pré-tratado, foram selecionados os Protocolos de sacarificação (e respectivos fungos utilizados) que levaram às maiores concentrações de glicose nos hidrolisados, sendo: Protocolos 1 e 2, utilizando-se *P. stipata* SC 04, e Protocolo 2 utilizando-se *Botryosphaeria* sp. AM 01. A partir deste ponto, os experimentos de sacarificação envolveram o uso de ferramentas de planejamento experimental, visando a otimização do processo pelo emprego de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. As

variáveis avaliadas e seus níveis foram selecionados com base em dados reportados na literatura.

4.9.1 Protocolo 1 de sacarificação utilizando o extrato de *Phomopsis stipata* SC 04

Inicialmente foi realizado um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³, em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis codificados e reais são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo *P. stipata* SC 04.

Variável	Níveis					Unidade
	-1,68	-1	0	1	1,68	
x1 - Bagaço	8,64	10	12	14	15,36	%
x2 - Endoglucanase	98,87	150	225	300	351,13	U Totais
x3 - Tween 80	0,003	0,04	0,095	0,15	0,187	%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Escolheu-se avaliar a carga de enzima baseando-se na atividade de endoglucanase, em consequência da dificuldade de avaliação da atividade de FPase pelo método estabelecido de Ghose (GHOSE, 1987), como já reportado em literatura e justificado mais adiante, nos resultados.

Em seguida, realizou-se um delineamento fatorial do tipo face centrada 2³ em três níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis codificados e reais são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo *P. stipata* SC04.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	1	
x1 - Temperatura	50	55	60	°C
x2 - Agitação	200	240	280	rpm
x3 - Tempo	8	16	24	horas

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.2 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo de *Phomopsis stipata* SC 04

Visando a otimização das condições de sacarificação segundo este Protocolo, realizou-se inicialmente um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *P. stipata* SC04.

Variável	Níveis					Unidade
	-1,41	-1	0	1	1,41	
x1 - Bagaço	3,96	5	7,5	10	11,04	%
x2 - Tween 80	0,008	0,17	0,56	0,95	1,11	%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em sequência, foi realizado um delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em três níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. Na Tabela 7 são apresentadas as respectivas variáveis e seus níveis estudados.

Tabela 7 - Delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *P. stipata* SC04.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	1	
x1 – Temperatura	50	55	60	°C
x2 – Agitação	180	200	220	rpm
x3 – Tempo	8	16	24	horas

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9.3 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o extrato de *Botryosphaeria* sp. AM 01

Dando continuidade nos delineamentos experimentais de sacarificação, agora utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01, realizou-se inicialmente um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01.

Variável	Níveis					Unidade
	-1,41	-1	0	1	1,41	
x1 - Bagaço	4,34	6	10	14	15,66	%
x2 - Tween 80	0,008	0,17	0,56	0,95	1,11	%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em sequência foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. Na Tabela 9 são apresentadas as respectivas variáveis e seus níveis estudados.

Tabela 9 - Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01.

Variável	Níveis					Unidade
	-1,68	-1	0	1	1,68	
x1 – Temperatura	46,59	50	55	60	63,40	°C
x2 – Agitação	166,36	1580	200	220	233,63	rpm
x3 – Tempo	2,54	8	16	24	29,45	horas

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Fermentação alcoólica

Para realização da fermentação alcoólica utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 cedida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Inicialmente, uma alçada de cultura da levedura foi pré-inoculada em meio YEPD (*Yeast Extract-Peptide-Dextrose*), contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, por 24 horas, a 30°C, sob agitação de 175 rpm. Os ensaios de fermentação alcoólica foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo o hidrolisado selecionado, suplementado com 4 g/L de extrato de levedura, 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L KH_2PO_4 e 0,75 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (WANDERLEY et al., 2013), inoculado com amostra do pré-inóculo (5,5% v/v, o que correspondeu a $5,9 \times 10^8$ células totais) com pH inicial 5,5. Os frascos foram fechados com rolhas de látex e a fermentação ocorreu com o oxigênio presente no espaço vazio do mesmo, sendo mantida por 24 horas, a 30°C, sob agitação de 175 rpm (PEREIRA et al., 2016). Foi realizada análise de açúcar redutor antes da inoculação e ao final da fermentação, a fim de se verificar o consumo dos açúcares, segundo metodologia proposta por Miller (1959). O experimento foi realizado em triplicata.

4.11 Análise estatística

A análise dos dados dos delineamentos experimentais foi realizada utilizando-se o *software* estatístico Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos e o intervalo de confiança adotado foi de 95% em todos delineamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da produção das enzimas pelo cultivo dos fungos por FES

Os fungos endofíticos, os substratos utilizados nas FES e o tempo de cultivo foram selecionados com base nos resultados obtidos por Marques (2013), durante o desenvolvimento de seu Projeto de Mestrado junto ao Grupo de Pesquisa. Os 8 fungos foram selecionados por serem bons produtores de celulasas e, no presente trabalho, foram utilizadas misturas de substratos diferentes das já avaliadas por Marques (2013), visando a obtenção de maiores atividades enzimáticas.

Todos os fungos cresceram nos substratos utilizados, indicando que secretaram enzimas para despolimerizar as fontes complexas de carbono, uma vez que nenhuma fonte adicional prontamente assimilável foi utilizada. As atividades enzimáticas obtidas nestes cultivos são apresentadas nas Figuras 11 a 18.

Segundo RIBEIRO e colaboradores (2008), o farelo de trigo é um substrato que contém baixo teor de lignina (3,63%), o que pode favorecer a produção de celulasas, uma vez que torna-se menos recalcitrante e mais acessível como fonte de nutrientes para os microrganismos, além da presença da própria celulose como indutor. Apresenta ainda outros compostos, como os açúcares livres e ácidos orgânicos, que podem ser utilizados pelo microrganismo (ELISASHVILI et al., 2009; SUN et al., 2008). No presente trabalho o farelo de trigo apresentou um maior teor de lignina ($11,14 \pm 0,34\%$), porém não foi um dos melhores indutores da produção de celulasas. O farelo de soja também apresenta um baixo teor de lignina (9,78%) (COUTO; SANROMAN, 2005), sendo também relativamente de fácil acesso como fonte de nutrientes pelos microrganismos. Entretanto no presente trabalho o farelo de soja apresentou um maior teor de lignina ($18,38 \pm 1,74\%$). Por outro lado, o bagaço de cana apresenta um maior teor de lignina (19-24%) (SOCCOL et al., 2010), o que o torna mais recalcitrante. Desta forma, nos cultivos do presente trabalho, foi levada em conta também a composição dos farelos na escolha das misturas de substratos. O bagaço de cana foi utilizado em algumas misturas por apresentar celulose em sua composição, sendo assim um indutor da produção de celulasas (MORETTI et al., 2012; PEREIRA et al., 2015), além de ser amplamente

disponível. A composição de cada substrato utilizado está representada na Tabela 10

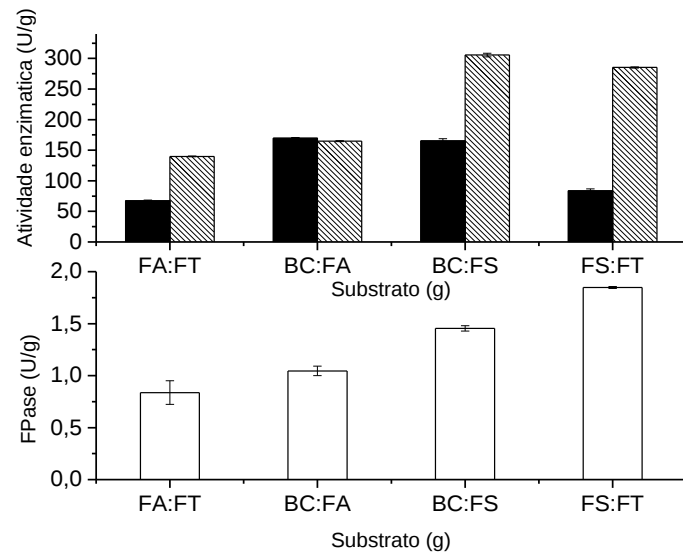
Tabela 10 – Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana) e lignina dos substratos utilizados.

Substratos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Total (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Acetil (%)
Bagaço de cana	46,64 ± 1,65	28,92 ± 0,59	21,51 ± 0,32	2,51 ± 0,45	8,72 ± 0,00	0,70 ± 0,05
Farelo de Trigo	38,29 ± 0,59	28,04 ± 0,48	11,14 ± 0,34	4,20 ± 0,18	34,56 ± 0,00	0,51 ± 0,02
Farelo de Algodão	17,68 ± 0,52	31,11 ± 0,45	34,47 ± 0,94	4,65 ± 0,16	22,84 ± 0,00	0,14 ± 0,00
Farelo de Soja	9,04 ± 0,11	17,36 ± 0,89	18,38 ± 1,74	6,50 ± 0,05	46,54 ± 0,00	2,48 ± 0,24

Fonte: Elaborado pelo autor.

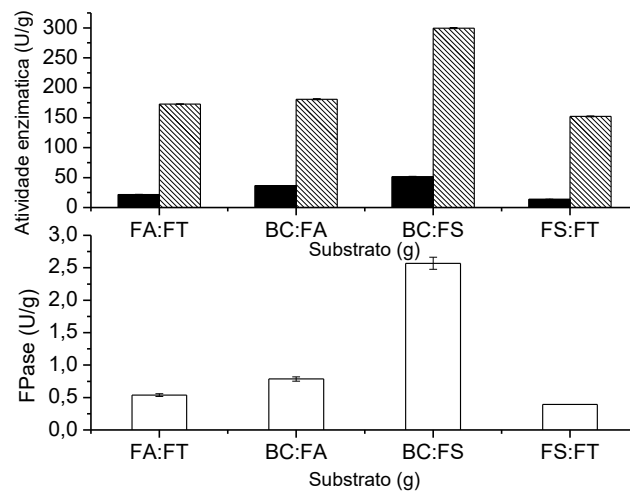
Em relação à atividade de endoglucanase, o fungo que mais se destacou foi *Botryosphaeria* sp. AM 01, quando cultivado na mistura de substratos bagaço de cana e farelo de algodão (169,64 U/g). Porém, na mistura BC:FS a atividade da enzima foi muito próxima (165,40 U/g) (Figura 11). Em relação à atividade de β -glicosidase os fungos que mais se destacaram foram *Botryosphaeria* sp. AM 01 (305,64 U/g) (Figura 11), *Ustilaginoidea* sp. XYA 04 (299,70 U/g) (Figura 12) e *P. stipata* SC 04 (297,20 U/g) (Figura 13), todos cultivados na mistura de substratos bagaço de cana e farelo de soja. Não foi detectada atividade de exoglucanase em nenhum dos extratos.

Figura 11 – Produção de celulases pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01.
Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

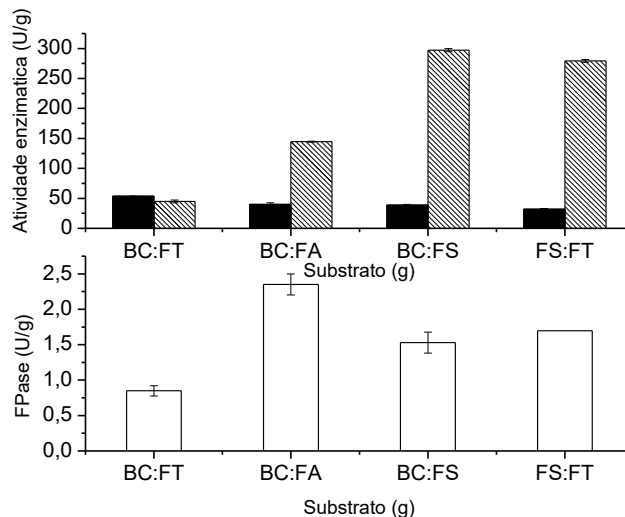


* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

Figura 12 – Produção de celulases pelo fungo *Ustilaginoidea* sp. XYA 04.
Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).



* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

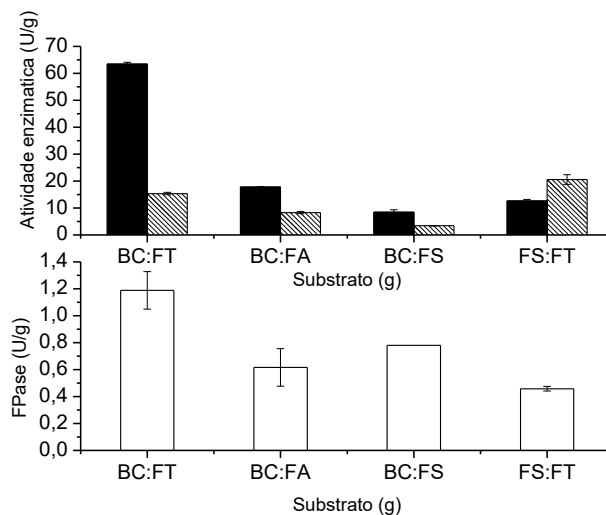
Figura 13 – Produção de celulases pelo fungo *P. stipata* SC 04.Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

Em relação à FPase não houve destaque para nenhum fungo, uma vez que as atividades obtidas foram baixas quando comparadas com a maioria dos dados de literatura, mesmo nos extratos enzimáticos que se destacaram com boas atividades de endoglucanase e β -glicosidase. Este fato pode estar relacionado às dificuldades da determinação da atividade de FPase pelo método de Ghose (1987), tradicionalmente utilizado, como já reportado por alguns autores (DASHTBAN et al., 2010; FENG; JIANG; ZHU, 2009; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Por este motivo, a seleção dos substratos não foi feita tomando-se por base a atividade desta enzima.

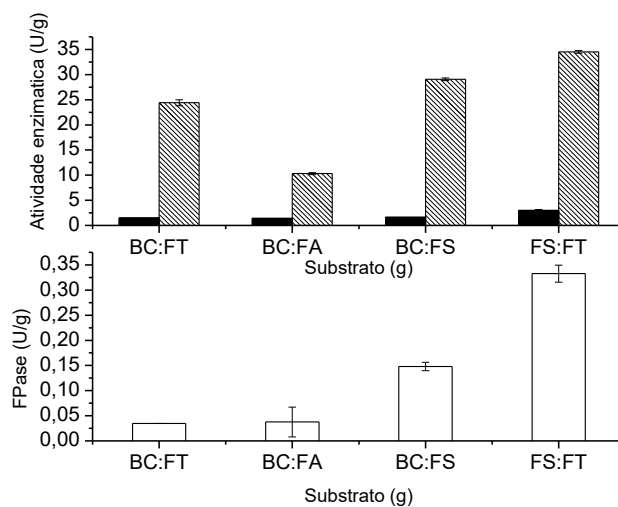
Pela análise dos resultados apresentados nas Figuras 11 a 13 foi selecionada a mistura de substratos BC:FS, por ter proporcionado as maiores atividades de β -glicosidase e de endoglucanase para os fungos *Botryosphaeria* sp. AM 01, *Ustilagoidea* sp. XYA 04 e *P. stipata* SC 04.

Para o fungo *T. viridae* PAJ 01 foi escolhida a mistura BC:FT, por ter proporcionado a maior atividade de endoglucanase (63,45 U/g) (Figura 14).

Figura 14 – Produção de celulases pelo fungo *T. viridae* PAJ 01.Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

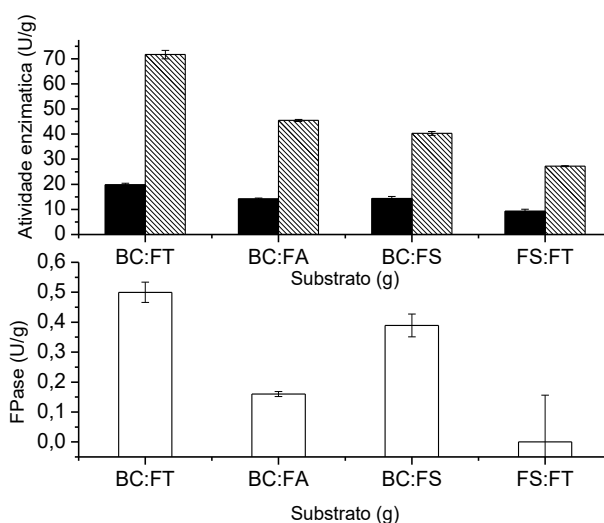
Em relação ao fungo *C. cladosporioides* PAJ 03, as maiores atividades de celulases foram obtidas pelo cultivo na mistura FS:FT (2,99, 34,51 e 0,33 U/g para endoglucanase, β -glicosidase e Fpase, respectivamente) (Figura 15), a qual foi selecionada para prosseguir os estudos com este fungo.

Figura 15 – Produção de celulases pelo fungo *C. cladosporioides* PAJ 03.Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

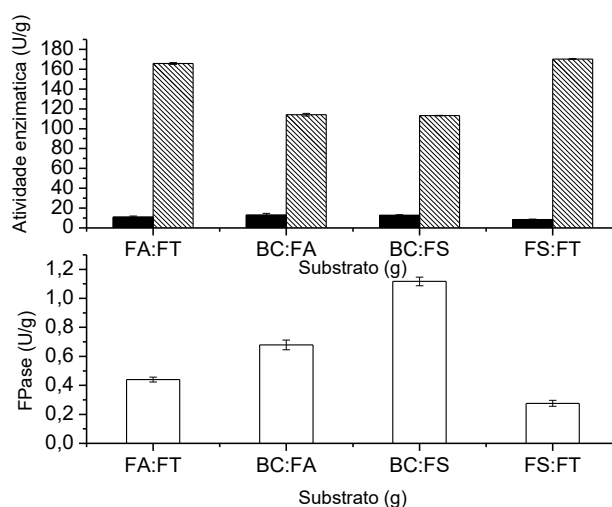
A mistura BC:FT foi a que proporcionou a maior atividade de β -glicosidase (71,66 U/g) quando utilizada para o cultivo de *Ustilaginoidea* sp. CV 04, em comparação com as demais misturas estudadas (Figura 16), sendo selecionada para os cultivos subsequentes deste fungo.

Figura 16 – Produção de celulases pelo fungo *Ustilaginoidea* sp. CV 04.
Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

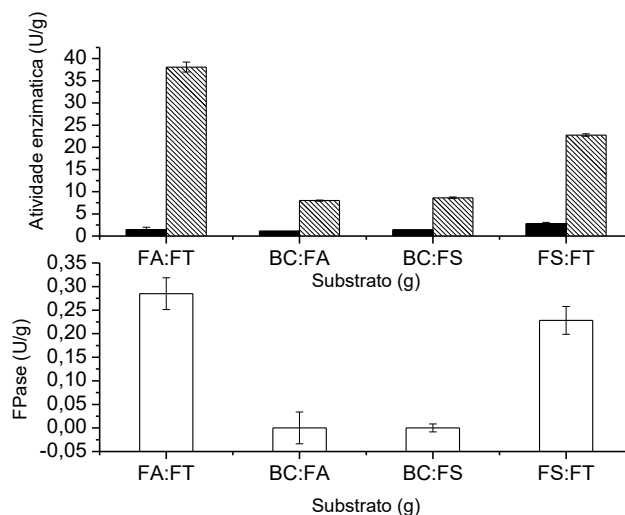


* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

A escolha do melhor substrato para o cultivo do fungo *Saccharicola* sp. EJC 04 foi feita com base nas atividades de β -glicosidase. A mistura escolhida foi BC:FS, por ter proporcionado atividade próxima das máximas (165,83 e 170,28 U/g em FA:FT e FS:FT, respectivamente) (Figura 17), por empregar bagaço, um subproduto amplamente disponível a partir das atividades sucroalcooleiras e, ainda, por diferir das misturas selecionadas por Marques (2013).

Figura 17 – Produção de celulases pelo fungo *Saccharicola* sp. EJC 04.Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

Figura 18 – Produção de celulases pelo fungo *Paecilomyces* sp. SF 021.Endoglucanase (■); β -glicosidase (▨); FPase (□).

* BC – bagaço de cana-de-açúcar; FA – farelo de algodão; FT – farelo de trigo; FS – farelo de soja

Pelos resultados obtidos a partir dos cultivos do fungo *Paecilomyces* sp. SF 021 observa-se que a mistura FA:FT levou à maior atividade de β -glicosidase (38,08 U/g), porém, a atividade de endoglucanase (1,44 U/g) foi baixa. Assim, foi selecionada a mistura FS:FT farelo de soja e farelo de trigo, a qual proporcionou a segunda maior atividade de β -glicosidase e a maior de endoglucanase (22,75 e 2,77

U/g, respectivamente). A Tabela 11 apresenta um resumo dos resultados obtidos nesta etapa do trabalho, incluindo os substratos selecionados para cada fungo e as atividades enzimáticas obtidas. Todos os cultivos subsequentes foram realizados utilizando-se os substratos selecionados.

Tabela 11 – Substratos selecionados para cada fungo e respectivas atividades enzimáticas obtidas pelos cultivos por FES, a 28°C, por 8 dias.

Fungos	Substratos Selecionados	Atividades enzimáticas (U/g) / (U/mL)	
		Endoglucanase	β-glicosidase
<i>C. cladosporioides</i> PAJ 03	FS:FT	3,0 / 0,30	34,5 / 3,45
<i>T. viridae</i> PAJ 01	BC:FT	63,50 / 6,35	15,4 / 1,54
<i>Ustilaginoidea</i> sp. CV 04	BC:FT	19,8 / 1,98	71,7 / 7,17
<i>P. stipata</i> SC 04	BC:FS	38,7 / 3,87	297,2 / 29,72
<i>Saccharicola</i> sp. EJC 04	BC:FS	12,8 / 1,28	113,2 / 11,32
<i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01	BC:FS	165,4 / 16,54	305,6 / 30,56
<i>Paecilomyces</i> sp. SF 021	FS:FT	28,0 / 0,28	22,8 / 2,28
<i>Ustilaginoidea</i> sp. XYA 04	BC:FS	51,3 / 5,13	299,7 / 29,97

Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns autores citam a indução da produção de celulasas fúngicas quando se utiliza farelos como substratos para FES (AHMED et al., 2009; JECU, 2000; PEREIRA et al., 2015). A mistura de farelos com outros substratos lignocelulósicos é também citada para a produção de celulasas por fungos filamentosos (DAS; GHOSH, 2009; XIAOBO et al., 2006).

Jecu (2000) obteve atividade de endoglucanase de 14,80 U/mL pelo cultivo de *Aspergillus niger* 38 por FES, em 96h, em mistura de palha e farelo de trigo (9:1 p/p) com um teor de umidade inicial de 74%. Sukumaran e colaboradores (2009) cultivaram o fungo *Trichoderma reesei* RUT C30 (tradicionalmente utilizado para a obtenção de celulasas) por FES em farelo de trigo e obtiveram atividades de FPase, endoglucanase e β-glicosidase de 1,14 FPU/mL, 14,98 U/mL e de 0,22 U/mL, respectivamente. Já os cultivos de *Aspergillus niger* MTCC 7956 realizados por

estes autores proporcionaram atividades enzimáticas inferiores para FPase e endoglucanase (0,22 FPU/mL e 6,77 U/mL, respectivamente). Entretanto, *A. niger* MTCC mostrou-se melhor produtor de β -glicosidase (2,84 U/mL).

A atividade máxima de β -glicosidase (1,54 U/mL) obtida pelo cultivo de *Trichoderma viridae* PAJ 01, no presente trabalho (Tabela 11), foi ligeiramente maior à citada por Sukumaran e colaboradores (2009), os quais utilizaram uma linhagem mutante de *T. reesei*. Em comparação aos fungos estudados por Jecu (2009) Jecu (2000) e Sukumaran e colaboradores (2009), *Botryosphaeria* sp. AM 01 se mostrou mais eficiente na produção de endoglucanase e β -glicosidase (16,54 e 30,56 U/mL respectivamente) quando cultivado por FES em bagaço de cana e farelo de soja.

5.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado

A complexa estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica é resistente à bioconversão. Devido a essa complexidade, vários pré-tratamentos têm sido desenvolvidos com a finalidade de alterar ou remover a lignina e, ainda, a hemicelulose, aumentando assim a área superficial da celulose acessível às enzimas (SANTOS et al., 2012).

A composição do bagaço de cana *in natura* e submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino é apresentada na Tabela 12, segundo análise realizada empregando-se metodologia proposta pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory – EUA) (SLUITER et al., 2008c).

Tabela 12 – Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana) e lignina do bagaço de cana-de-açúcar.

Bagaço de cana-de-açúcar		
Composição (%)	<i>In natura</i>	Pré-tratado
Celulose	46,64 ± 1,65	59,52 ± 0,42
Hemicelulose	28,92 ± 0,59	31,62 ± 1,44
Lignina	21,51 ± 0,32	11,32 ± 1,68
Acetil	0,70 ± 0,05	0,81 ± 0,05
Extrativos	8,72 ± 0,00	-
Cinzas	2,51 ± 0,45	0,54 ± 0,04
Total	109,00	103,81

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que antes do pré-tratamento o bagaço de cana-de-açúcar apresentava 46,64% de celulose, 28,92% de hemicelulose e 21,51% de lignina. Após a realização do pré-tratamento hidrotérmico a porcentagem de celulose foi de 46,64% para 52,59%, a de hemicelulose de 28,92% para 31,62, e a porcentagem de lignina foi de 21,51% para 11,32%. Estes dados indicam que o pré-tratamento foi eficaz na remoção da lignina, aumentando a disponibilidade da celulose e da hemicelulose, o que é importante para a sacarificação enzimática do material. O hidróxido de sódio é responsável por aumentar a superfície interna da celulose, diminuir o seu grau de polimerização e cristalinidade deste carboidrato e romper a estrutura da lignina (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A eficiência do pré-tratamento alcalino depende do substrato e das condições submetidas, o qual é mais eficaz para biomassa de baixo teor de lignina, como os resíduos agrícolas (SINGH et al., 2014).

Maeda e colaboradores (2011) realizaram pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana, na presença de H₂SO₄ (1,0%) e, posteriormente, pré-tratamento hidrotérmico alcalino empregando NaOH a 4,0%. Estes autores reportaram uma diminuição de 10,1% no teor de lignina (9,3% no bagaço pré-tratado). Entretanto, houve também uma redução no teor de hemicelulose (de 29,6 para 12,2%) após os pré-tratamentos. A proporção de celulose, por sua vez, passou de 34,1 para 68,0%.

Costa e colaboradores (2014), utilizando pré-tratamento alcalino (NaOH a 1 mol/L), a 130 °C, por 20 minutos, conseguiram uma redução de aproximadamente 80% no teor de lignina do bagaço de cana-de-açúcar.

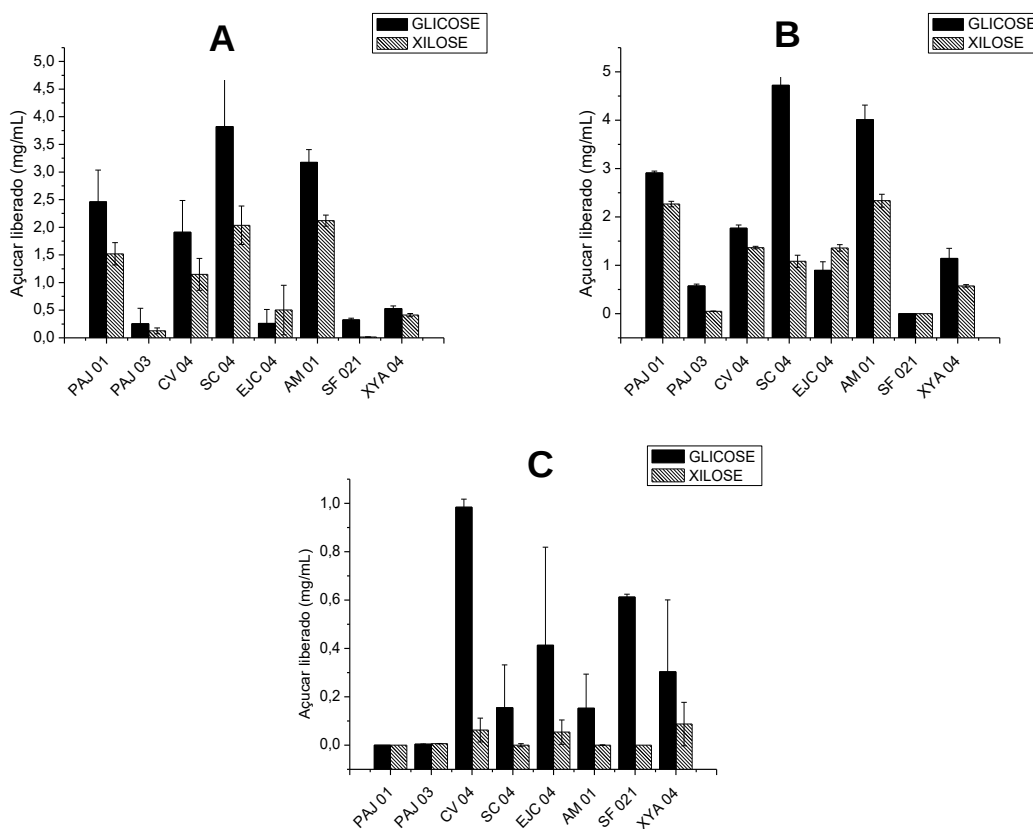
5.3 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-açúcar

A análise dos resultados dos experimentos prévios de sacarificação do bagaço pré-tratado realizados neste trabalho (item 4.6) indicou que nem todos os Protocolos levaram a concentrações de glicose e xilose satisfatórias nos hidrolisados.

Em relação à concentração de glicose nos hidrolisados obtidos, destacaram-se os seguintes fungos: *P. stipata* SC 04 (4,72 e 3,82 mg/mL, pelos Protocolos 2 e 1, respectivamente) e *Botryosphaeria* sp. AM 01 (4,01 mg/mL, pelo Protocolo 2) (Figura 19 A e B).

Os mesmos fungos destacaram-se na liberação de xilose: *Botryosphaeria* sp. AM 01 (2,34 mg/mL, pelo Protocolo 2) (Figura 19B) e *P. stipata* SC 04 (2,04 mg/mL, pelo Protocolo 1) (Figura 19A), além de *T. viridae* PAJ 01 (2,27, pelo Protocolo 2) (Figura 19B).

Figura 19 – Concentrações de glicose e xilose nos hidrolisados obtidos a partir dos experimentos iniciais de sacarificação do bagaço de cana de açúcar pré-tratado. (A): Protocolo 1; (B): Protocolo 2; (C): Protocolo 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O Protocolo 3 foi realizado na intenção de verificar se haveria possibilidade de se obter glicose e xilose em concentrações consideráveis tendo como substrato a ser hidrolisado o material fermentado, sem a adição de bagaço pré-tratado. Entretanto, baixas concentrações destes açúcares foram obtidas e foi dada continuidade ao trabalho buscando-se a otimização dos experimentos de sacarificação pelos sob as seguintes condições:

- Protocolo 1, utilizando-se o extrato enzimático de *P. stipata* SC 04, pela maior concentração de glicose no hidrolisado e, ainda, para efeito comparativo com o Protocolo 2. Embora o uso do fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01 no Protocolo 1 de sacarificação tenha levado a uma concentração de glicose muito próxima, esta condição não foi selecionada por já ser estudada em Projeto de Doutorado desenvolvido junto ao Grupo de Pesquisa;

- Protocolo 2 utilizando-se, isoladamente, os fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01.

Maitan-Alfenas e colaboradores (2015) também empregaram o pré-tratamento hidrotérmico alcalino em autoclave, a 120 °C, por 1 hora, utilizando NaOH a 1,0%. A composição do bagaço após o pré-tratamento, em relação à celulose, hemicelulose e lignina, foi de 47,99, 25,47 e 18,52%, respectivamente, sendo o valor referente à celulose próximo ao obtido no presente trabalho. O bagaço pré-tratado (8% de matéria seca, p/v) foi sacarificado utilizando-se extrato enzimático produzido por *Chrysosporthe cubensis*, por FES em farelo de trigo. A carga enzimática foi fixada em 10 FPU/g de biomassa seca, e os ensaios foram mantidos sob 250 rpm e 50 °C, por 72 horas. Foram obtidos 3,0 g/L de glicose em 24h, concentração superior à obtida quando os autores utilizaram as enzimas comerciais Multifect CL (2,8 g/L) e Accellerase (2,0 g/L). No presente estudo, a liberação de glicose utilizando-se o extrato enzimático de *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1 foi ligeiramente superior àquela obtida pelos autores citados ($3,82 \pm 0,9094$ mg/mL), empregando-se uma carga menor de enzima (3,30 unidades totais de FPase).

Em estudo recente, Pereira e colaboradores (2016) realizaram experimentos de sacarificação do bagaço de cana ozonizado utilizando o extrato enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4. A maior liberação de glicose (4,99 mg/mL) foi obtida nos experimentos de sacarificação que utilizaram 3,0% de matéria seca (p/v), carga enzimática de 10 unidades totais de FPase, a 60°C, em 8 horas de hidrólise. Pode-se comparar esta liberação de glicose com a observada na sacarificação realizada no presente trabalho, segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *P. stipata* SC 04 (4,72 mg/mL), considerando-se a vantagem deste Protocolo não empregar a etapa de extração das enzimas, o que representa menor custo do processo como um todo. Entretanto, tal resultado foi obtido em um tempo maior (24h), o qual pode ser reduzido a partir dos experimentos de otimização da sacarificação.

Os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus awamori* por fermentação submersa foram utilizados na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor por Gottschalk; Oliveira; Bon, (2010). Os experimentos de sacarificação foram realizados utilizando-se carga de bagaço a 2,0%, em tampão de citrato de sódio, pH 4,8, a 50 mmol/L, incubadas a 50 °C e 200 rpm, durante 72 horas. A carga enzimática foi fixada em 10 FPU/g de

bagaço pré-tratado. As atividades de CMCase e FPase no extrato enzimático de *Trichoderma reesei* foram 4 vezes maiores quando comparadas às do extrato obtido pelo cultivo de *Aspergillus awamori*, resultando em uma maior liberação de glicose na sacarificação (aproximadamente 3,0 e 6,0 g/L em 24 e 72 horas, respectivamente). No presente trabalho, o emprego do fungo *Tricoderma viridae* PAJ 01 e do Protocolo 2 de sacarificação levou à concentração de glicose de aproximadamente 3,0 g/L no hidrolisado, em 24 horas, o que ressalta a vantagem da utilização de um Protocolo que exclui a etapa de extração das enzimas.

Soares e colaboradores (2011), com o objetivo de avaliar a liberação de glicose e xilose pela hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, utilizaram as preparações enzimáticas comerciais Celluclast (Endoglucanases/Celobiohidrolases 1,5 L) e Novozyme 188 (β -glicosidase). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, sob agitação de 200 rpm e 50 °C. A maior concentração de glicose (2,3 mg/mL) foi obtida em 72 horas. As celulasas produzidas pelos fungos estudados no presente trabalho se mostraram mais eficientes em relação às enzimas comerciais citadas por estes autores, uma vez que foram obtidas maiores concentrações de glicose, em menor tempo de sacarificação

5.4 Caracterização físico-química das celulasas

As celulasas produzidas pelos fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01, por FES, na mistura de bagaço de cana e farelo de soja (1:1 p/p), por 8 dias a 28°C, foram caracterizadas quanto à temperatura e pH ótimos de atividade e, ainda, quanto à estabilidade a estes dois fatores.

5.4.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas de *P. stipata* SC 04

O estudo dos efeitos do pH e da temperatura sobre as atividades de endoglucanase e β -glicosidase produzidas por *P. stipata* SC 04 foi realizado através de delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , em dois níveis, com 12 ensaios, incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais.

A Tabela 13 apresenta o planejamento com os valores reais e codificados, bem como as respostas analisadas (atividades relativas). Foi considerado como 100% a maior atividade enzimática encontrada, calculando-se a partir disso a atividade relativa.

Tabela 13 – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais das variáveis pH e temperatura, obtendo-se como resposta as atividades de endoglucanase e β -glicosidase do extrato enzimático de *P. stipata* SC 04.

Ensaios	x_1	x_2	Atividade Relativa (%)	
			Y_1	Y_2
1	-1 (3,5)	-1 (50)	14,41	31,12
2	+1 (7,5)	-1 (50)	12,95	15,91
3	-1 (3,5)	+1 (70)	12,79	16,77
4	+1 (7,5)	+1 (70)	9,59	14,28
5	-1 (3,5)	0 (60)	14,74	29,84
6	+1 (7,5)	0 (60)	12,19	16,34
7	0 (5,5)	-1 (50)	70,71	82,77
8	0 (5,5)	+1 (70)	72,61	81,35
9	0 (5,5)	0 (60)	99,19	99,29
10	0 (5,5)	0 (60)	100,00	99,64
11	0 (5,5)	0 (60)	99,46	100,00
12	0 (5,5)	0 (60)	97,83	100,00

x_1 - pH; x_2 – Temperatura ($^{\circ}$ C); Y_1 - Endoglucanase; Y_2 - β -glicosidase

*100% = 186,77 U/g de endoglucanase e 352,97 U/g de β -glicosidase

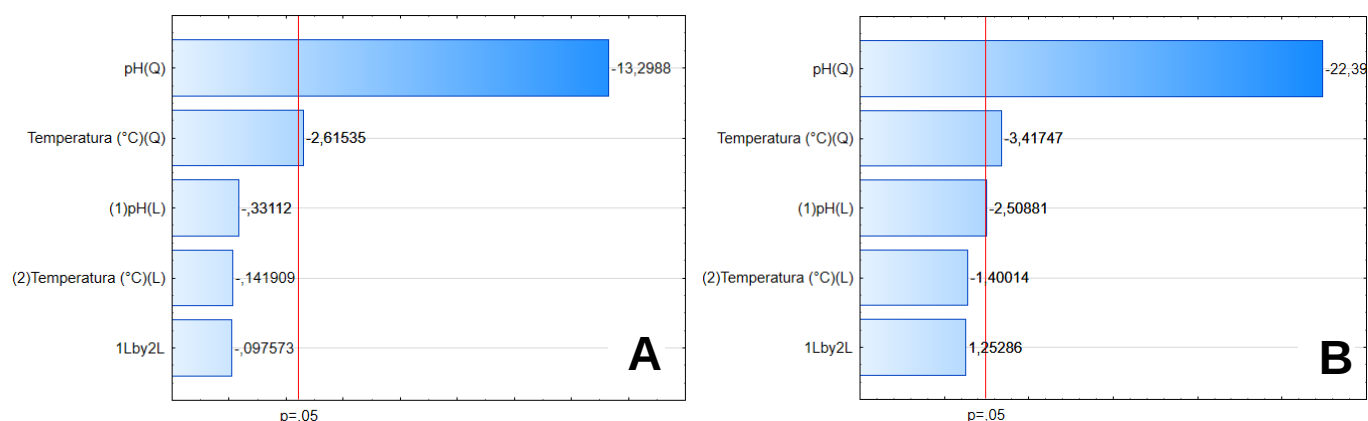
Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que, conforme a variação de pH e temperatura, há uma grande diferença nos valores das atividades obtidos. As atividades de endoglucanase variaram de 9,59% a 100% enquanto as atividades de β -glicosidase variam de 14,28 a 100%. Os efeitos que cada variável, bem como suas interações, exerceram nas atividades enzimáticas foram analisadas pelo Diagrama de Pareto (Figura 20, sendo confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabelas 14 e 15).

Analisando-se os Diagramas de Pareto pode-se destacar que, para a atividade de endoglucanase, os efeitos quadráticos das duas variáveis estudadas

foram significativos. Porém, a interação entre as mesmas não foi significativa ao nível de 95% de confiança. Para as atividades de β -glicosidase, tiveram influência também o efeito quadrático das duas variáveis e o efeito linear da variável pH.

Figura 20 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) obtidas pelo fungo *P. stipata* SC 04.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Nota-se que, para as duas enzimas estudadas, a variável pH foi a que teve maior influência sobre os resultados.

Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da endoglucanase de *P. stipata* SC 04.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pH (L)	8,67	1	8,67	0,1096	0,751812
pH (Q)	13993,34	1	13993,34	176,8591	0,000011
(2)Temperatura (°C)(L)	1,59	1	1,59	0,0201	0,891797
Temperatura (°C)(Q)	541,20	1	541,20	6,8401	0,039834
1L*2L	0,75	1	0,75	0,0095	0,925449
Erro	474,73	6	79,12		
Total SQ	18901,06	11			
R² = 0,974 / R² adj.= 0,954					

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p < 0,05)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da β -glicosidase de *P. stipata* SC 04.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pH (L)	162,14	1	162,14	6,2941	0,045977
pH (Q)	12914,60	1	12914,60	501,3450	0,000001
(2) Temperatura (°C)(L)	50,50	1	50,50	1,9604	0,211003
Temperatura (°C)(Q)	300,85	1	300,85	11,6791	0,014188
1L*2L	40,43	1	40,43	1,5697	0,256872
Erro	154,56	6	25,76		
Total SQ	16753,36	11			

$$R^2 = 0,990 / R^2 \text{ adj.} = 0,983$$

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

As porcentagens de variação (R^2) para endoglucanase e para β -glicosidase indicam que o modelo se ajusta em 97,4 e 99,0% respectivamente, aos experimentos realizados.

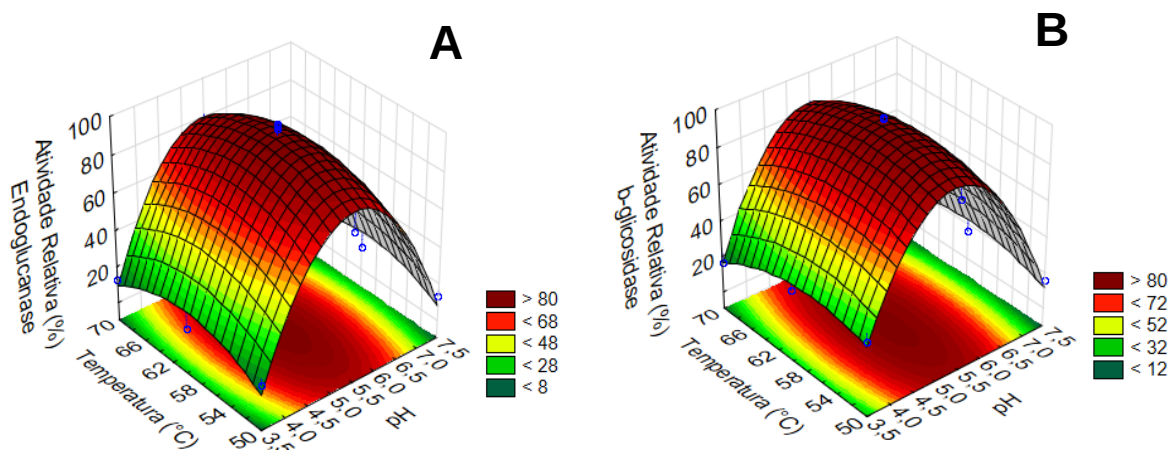
Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a atividade de endoglucanase (Eq. 1) e β -glicosidase (Eq. 2) em função das variáveis avaliadas. As equações dos modelos utilizados para a análise das duas variáveis são apresentadas abaixo:

$$Y_1 = - 966,729 + 199,910 \cdot x_1 - 18,110 \cdot x_1^2 + 17,163 \cdot x_2 - 0,142 \cdot x_2^2 - 0,022 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (1)$$

$$Y_2 = - 727,120 + 179,239 \cdot x_1 - 17,398 \cdot x_1^2 + 11,582 \cdot x_2 - 0,106 \cdot x_2^2 + 0,159 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (2)$$

Foi possível, então, gerar as superfícies de resposta que são apresentadas na Figura 21.

Figura 21 – Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B), presentes no extrato enzimático de *P. stipata* SC 04, em função das variáveis pH e temperatura, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 .

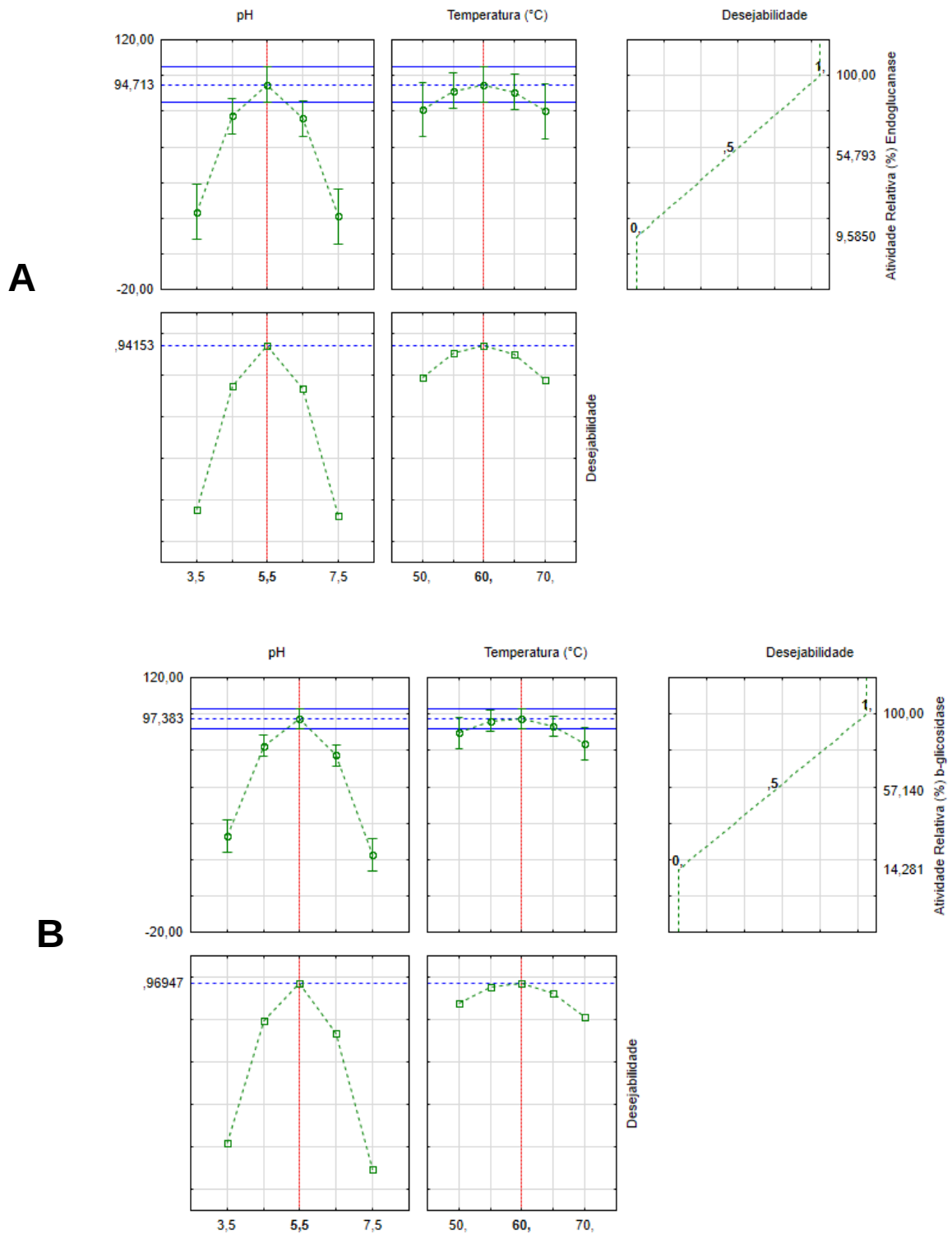


Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Analisando as superfícies de resposta podemos verificar que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando as reações foram feitas em pH 4,0 a 6,0, sob temperatura de 60°C. Nota-se, a partir das superfícies, que as atividades sofreram queda quando os ensaios foram realizados em pH ácido (3,5) e em pH básico (7,5). Sabe-se que valores extremos de pH podem alterar a estrutura da enzima como um todo e, principalmente, alterar a ionização dos aminoácidos catalíticos, o que leva a esta diminuição da atividade.

Através da função de desejabilidade do *Software* STATISTICA 10, foi possível prever o valor ótimo para as atividades enzimáticas, bem como os valores otimizados das variáveis independentes (Figura 22).

Figura 22 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e Temperatura no delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 empregado na caracterização da endoglucanase (A) e β -glicosidase (B), utilizando-se o extrato enzimático de *P. stipata* SC 04.



Fonte: Elaborado pelo autor. Software STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Os gráficos da função de desejabilidade sugerem uma condição ótima para as atividades de endoglucanase e β -glicosidase: pH 5,5 e 60°C. Sob tal condição, as atividades máximas previstas para estas enzimas são 94,71 e 96,94%, respectivamente. A validação experimental foi realizada em triplicata e os resultados obtidos foram $93,76 \pm 0,98$ para endoglucanase e $97,56 \pm 0,80$ para β -glicosidase, indicando que o modelo proposto modelou com sucesso os experimentos realizados.

5.4.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas de *Botryosphaeria* sp. AM 01

Para a avaliação do efeito do pH e temperatura sobre as atividades de endoglucanase e β -glicosidase produzidas pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01 foi empregado um delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , em dois níveis, com 12 ensaios, incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais. Os valores reais e codificados, bem como as respostas avaliadas (atividades enzimáticas) são apresentados na Tabela 16. Foi considerado como 100% a maior atividade da enzima encontrada.

Tabela 16 – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais das variáveis pH e temperatura, obtendo-se como resposta as atividades de endoglucanase e β -glicosidase do extrato enzimático de *Botryosphaeria* sp. AM 01.

Ensaios	x_1	x_2	Atividade Relativa (%)	
			Y_1	Y_2
1	-1 (3,5)	-1 (50)	7,05	23,25
2	+1 (7,5)	-1 (50)	15,63	25,25
3	-1 (3,5)	+1 (70)	6,26	10,21
4	+1 (7,5)	+1 (70)	7,00	22,36
5	-1 (3,5)	0 (60)	6,07	29,45
6	+1 (7,5)	0 (60)	13,23	37,93
7	0 (5,5)	-1 (50)	52,17	51,51
8	0 (5,5)	+1 (70)	44,81	68,15
9	0 (5,5)	0 (60)	99,26	99,56
10	0 (5,5)	0 (60)	100,00	100,00
11	0 (5,5)	0 (60)	97,79	99,41
12	0 (5,5)	0 (60)	98,77	98,81

x_1 - pH; x_2 – Temperatura ($^{\circ}$ C); Y_1 - Endoglucanase; Y_2 - β -glicosidase

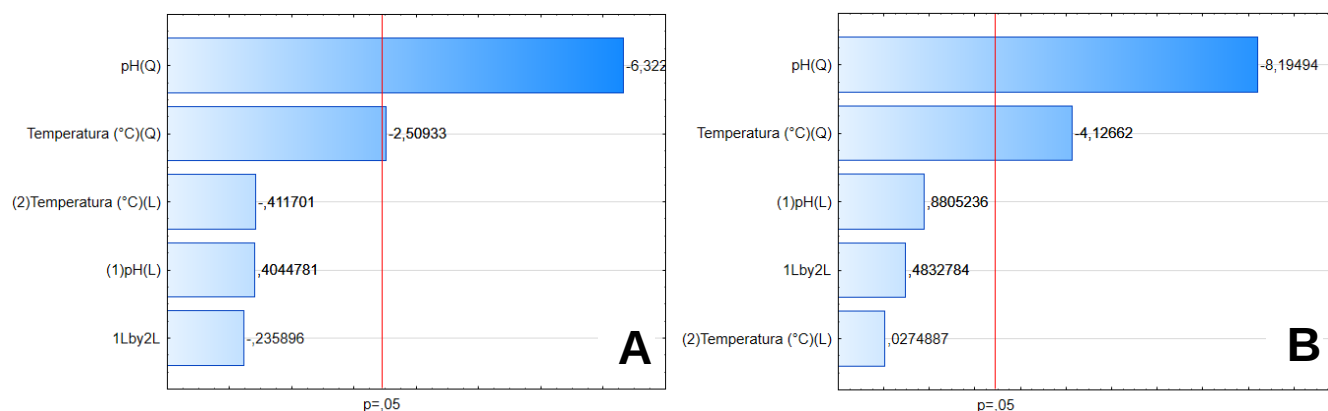
*100% = 206,53 U/g de endoglucanase e 550,15 U/g de β -glicosidase

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que houve uma grande variação nos valores das atividades enzimáticas de endoglucanase (6,07% a 100%) e β -glicosidase (10,21% a 100%), em relação à variação do pH e da temperatura. Os efeitos que cada variável, bem como suas interações, exerceram nas atividades enzimáticas podem ser analisados pelo Diagrama de Pareto (Figura 23), os quais foram confirmados pela análise de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 17 e 18.

Os Diagramas de Pareto indicam que, tanto para endoglucanase quanto para β -glicosidase, foram significativos os efeitos quadráticos das duas variáveis estudadas, ao nível de 95% de confiança. Em nenhum caso a interação entre as variáveis foi significativa.

Figura 23 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) obtidas pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Novamente, para as duas enzimas estudadas a variável pH foi a que teve maior influência sobre as respostas avaliadas. Os efeitos das variáveis e de suas interações são confirmados pela análise de variância (ANOVA) nas Tabelas 17 e 18 respectivamente.

Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase de *Botryosphaeria* sp. AM 01.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pH (L)	45,28	1	45,28	0,16360	0,699885
pH (Q)	11061,83	1	11061,83	39,96789	0,000732
(2)Temperatura (°C)(L)	46,91	1	46,91	0,16950	0,694862
Temperatura (°C)(Q)	1742,73	1	1742,73	6,29673	0,045945
1L*2L	15,40	1	15,40	0,05565	0,821359
Erro	1660,61	6	276,77		
Total SQ	19466,33	11			

$$R^2 = 0,914 / R^2 \text{ adj.} = 0,843$$

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da β -glicosidase de *Botryosphaeria* sp. AM 01.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pH (L)	85,37	1	85,372	0,77532	0,412452
pH (Q)	7394,74	1	7394,740	67,15710	0,000178
(2) Temperatura (°C)(L)	0,08	1	0,083	0,00076	0,978961
Temperatura (°C)(Q)	1875,08	1	1875,083	17,02902	0,006170
1L*2L	25,72	1	25,717	0,23356	0,646027
Erro	660,67	6	110,111		
Total SQ	13993,15	11			

$$R^2 = 0,952 / R^2 \text{ adj.} = 0,913$$

*Termos lineares estão associados a letra L e termos quadráticos a letra Q

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

As porcentagens de variação (R^2) foram 0,914 e 0,952 para endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente, o que indica que o modelo se ajusta em 91,4% e 95,2% aos experimentos realizados.

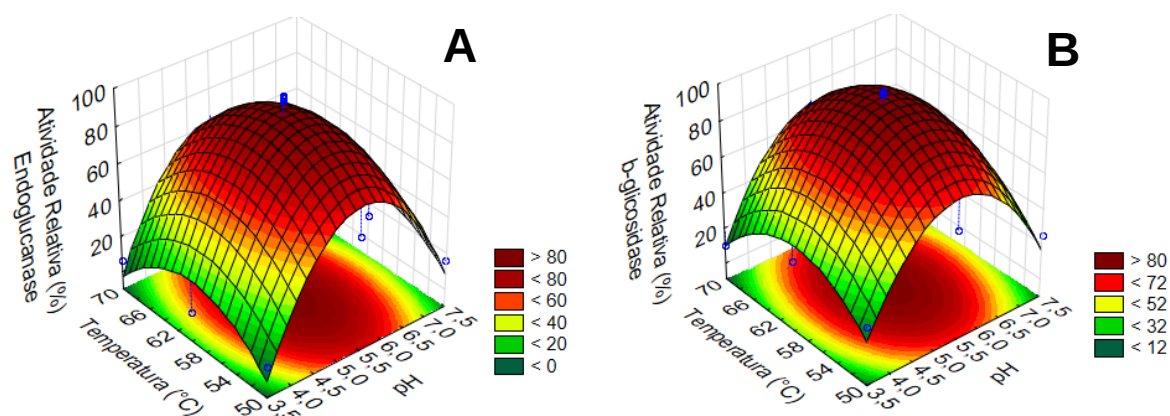
Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a atividade de endoglucanase (Eq. 3) e β -glicosidase (Eq. 4) em função das variáveis avaliadas. As equações dos modelos utilizados para a análise das duas variáveis são apresentadas abaixo:

$$Y_1 = - 1339,88 + 184,38*x_1 - 16,10*x_1^2 + 30,94*x_2 - 0,26*x_2^2 - 0,10*x_1*x_2 \quad (3)$$

$$Y_2 = - 1227,02 + 139,09*x_1 - 13,16*x_1^2 + 31,13*x_2 - 0,27*x_2^2 + 0,13*x_1*x_2 \quad (4)$$

As superfícies de resposta geradas são apresentadas na Figura 24.

Figura 24 – Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B), presentes no extrato enzimático de fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01, em função das variáveis pH e temperatura, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 .

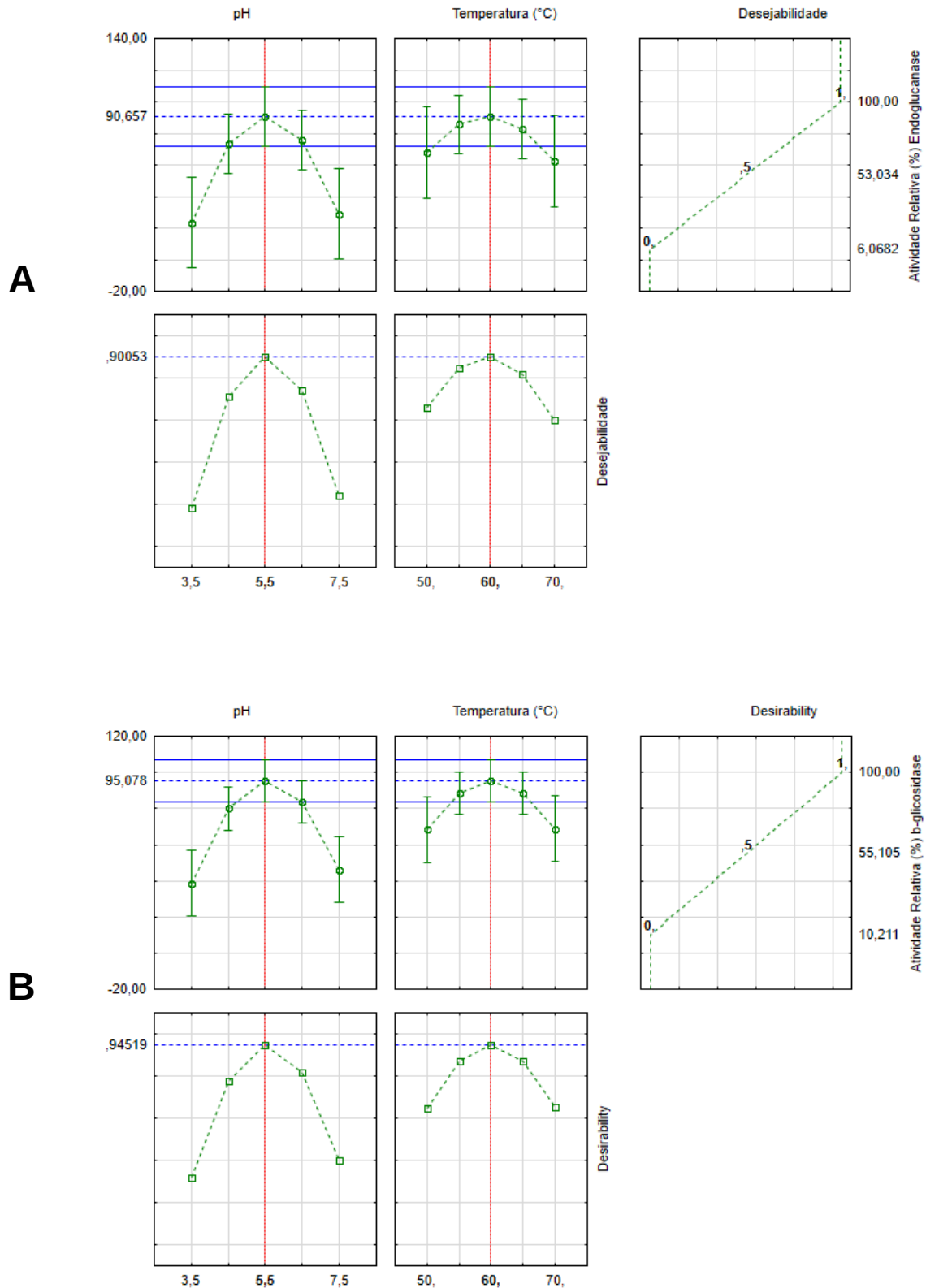


Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

A análise das superfícies de resposta indica que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando os ensaios foram realizados em pH 5,0 a 6,0, sob temperatura de 58 a 62°C. Considerável queda nas atividades foi observada em valores extremos de pH e temperatura.

De acordo com os gráficos gerados pela função de desejabilidade do *Software* STATISTICA 10 (Figura 25), os valores ótimos previstos para as atividades de endoglucanase e β -glicosidase foram 90,65 e 95,07%, respectivamente, sob as condições de pH 5,5 e 60°C. A validação experimental foi realizada em triplicata e os resultados obtidos foram $93,21 \pm 1,72$ para endoglucanase e $96,39 \pm 0,31$ para β -glicosidase, indicando que o modelo proposto modelou com sucesso os experimentos realizados.

Figura 25 – Perfis dos valores previstos/otimizizados e de desejabilidade das variáveis pH e Temperatura sobre as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) presentes no extrato enzimático de *Botryosphaeria* sp. AM 01.



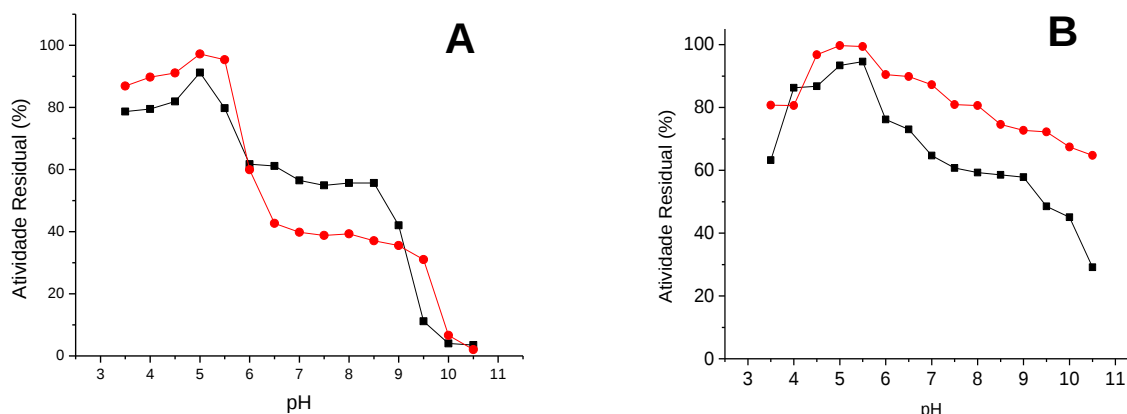
Fonte: Elaborado pelo autor. Software STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

5.4.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas dos fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01

Na Figura 26 são apresentados os gráficos de estabilidade das enzimas dos fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 sobre efeito de pH. Foi considerado como 100% a atividade da enzima no seu pH e temperatura ótima de atividade, antes do período de incubação.

Após incubação, por 24h, em soluções tampão de diferentes valores de pH, as maiores atividades residuais (próximas a 100%) das enzimas dos dois fungos foram observadas na faixa de pH 5,0 a 5,5 (Figura 26 A e B).

Figura 26 – Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades de endoglucanase e β -glicosidase presentes nos extratos enzimáticos dos fungos *P. stipata* SC 04 (A) e *Botryosphaeria* sp. AM 01 (B) (-■- Endoglucanase; -●- β -glicosidase).



*SC 04 - 100% = 181,45 U/g de endoglucanase e 370,21 U/g de β -glicosidase

*AM 01 - 100% = 187,28 U/g de endoglucanase e 555,04 U/g de β -glicosidase

Fonte: Elaborado pelo autor.

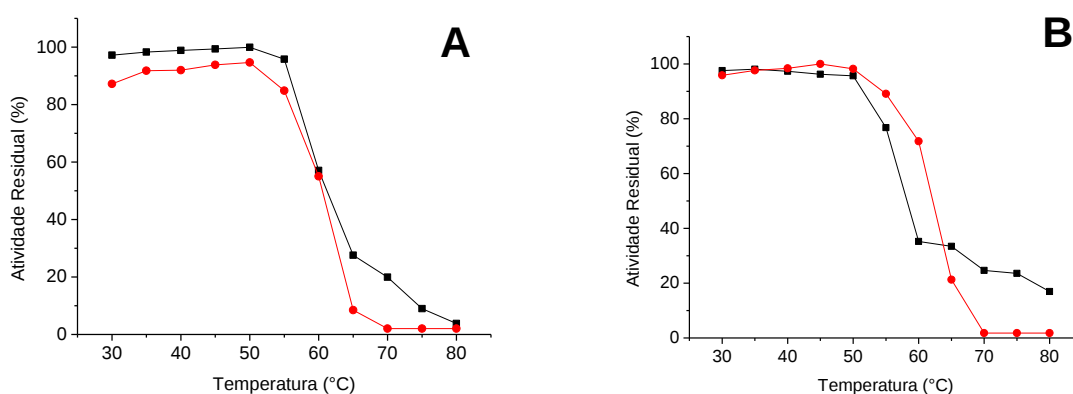
Endoglucanases e β -glicosidases produzidas pelo fungo *Myceliophthora heterothallica* foram caracterizadas por Silva e colaboradores (2016). O efeito do pH na estabilidade das enzimas foi analisado na faixa de pH 2,5-10 por 24 horas em temperatura ambiente. As enzimas se mostraram estáveis na faixa de pH 4,0 – 9,0, mantendo aproximadamente 80% de sua atividade. A atividade residual caiu fortemente

em valores de pH mais ácidos ou alcalinos. Já as enzimas do presente trabalho tiveram uma faixa de estabilidade diferente, na qual as enzimas do fungo *P. stipata* SC 04 se manterão estáveis em pH de 3,0 – 6,0 aproximadamente (em torno de 80% da atividade).

Xu e colaboradores (2014) ao estudar o efeito do pH por 1 hora a 25°C sobre a estabilidade da enzima endoglucanase de *Aspergillus fumigatus* notou que a mesma manteve sua atividade residual acima de 80% na faixa de pH 3,0-7,0. Já a atividade residual de endoglucanase produzida pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01 no presente trabalho foi acima de 80% em pH de 4,0-5,5.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas de *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 foi também avaliado (Figura 27 A e B). Em relação às endoglucanases, a produzida por *P. stipata* SC 04 foi ligeiramente mais estável quando incubada sob temperaturas até 50°C. A incubação sob temperaturas superiores levou à queda brusca na atividade das endoglucanases. De 30 a 50°C, todas as enzimas apresentaram uma atividade residual em torno de 90%, o que é muito importante do ponto de vista da possibilidade de aplicação em diferentes processos biotecnológicos.

Figura 27 – Efeito da temperatura sobre a estabilidade das atividades de endoglucanase e β -glicosidase obtidas pelos fungos *P. stipata* SC 04 (A) e *Botryosphaeria* sp. AM 01 (B) (-■- Endoglucanase; -●- β -glicosidase).



*SC 04 - 100% = 181,45 U/g de endoglucanase e 370,21 U/g de β -glicosidase

*AM 01 - 100% = 187,28 U/g de endoglucanase e 555,04 U/g de β -glicosidase

Fonte: Elaborado pelo autor.

A estabilidade de uma enzima pode ser afetada pela temperatura e por uma série de fatores. Um fator que pode ajudar a estabilização são os substratos, que podem proteger a enzima do calor, assim evitando sua desnaturação. Porém dependendo do tempo e da temperatura que as mesmas forem incubadas, podem sofrer a desnaturação por serem proteínas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004)

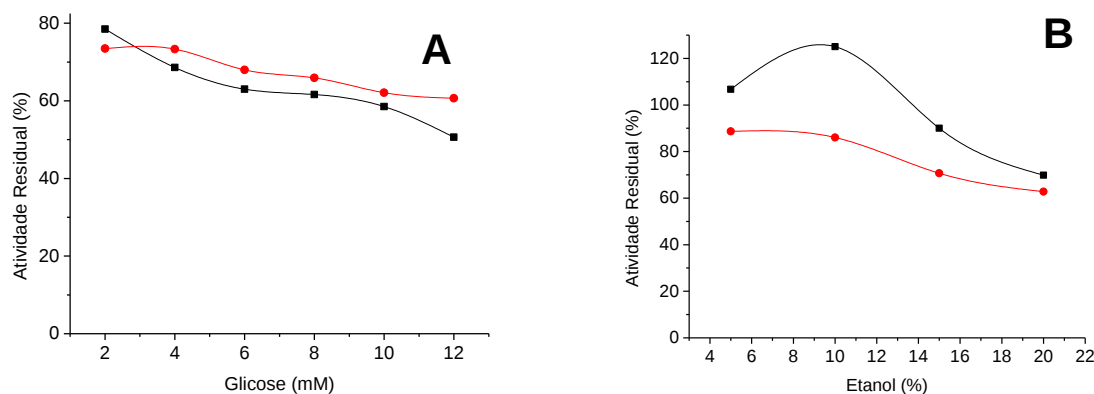
Moretti e colaboradores (2012) avaliaram a termoestabilidade das endoglucanases produzidas por *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *Myceliophthora thermophila* M.7.7, e reportaram que as enzimas mantiveram aproximadamente 90% de sua atividade original quando incubadas a 65°C, por 1 hora. Já as enzimas produzidas pelos fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 no presente trabalho apresentaram ser um pouco menos termoestáveis levando em consideração que as maiores atividades residuais foram até 50°C, enquanto que em 65°C as atividades residuais foram inferiores a 40%.

Silva e colaboradores (2016), ao estudarem a termoestabilidade das celulasas produzidas pelo fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, observaram que as endoglucanases apresentaram atividade residual acima de 100%, quando incubadas a 50 °C por 1 hora. Já a enzima β -glicosidase se mostrou ser mais termoestável mantendo sua atividade residual próxima a 90% até 60°C.

5.4.4 Efeito de glicose e etanol sobre as atividades das β -glicosidases

As atividades das β -glicosidases foram determinadas na presença de glicose e etanol. Como mostra a Figura 28, a partir de 4,0 mmol/L, o efeito inibidor da glicose foi mais acentuado para a enzima de *P. stipata* SC 04. Utilizando-se glicose a 12 mmol/L, a atividade residual da enzima deste fungo foi reduzida a 50%, enquanto que a β -glicosidase de *Botryosphaeria* sp. AM 01 manteve 60% de sua atividade original.

Figura 28 – Efeito de glicose (A) e etanol (B) sobre as atividades das β -glicosidases presentes nos extratos enzimáticos dos fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01.



■- *P. stipata* SC 04 (100% = 370,21 U/g de β -glicosidase)

●- *Botryosphaeria* sp. AM 01 (100% = 555,04 U/g de β -glicosidase)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A glicose frequentemente inibe a atividade de β -glicosidases microbianas (DAROIT, 2007; SARRY; GÜNATA, 2004; WOODWARD, 1982; ZANOELO et al., 2004). Daroit (2007), ao estudar a estabilidade de β -glicosidase do ascomiceto *Monascus purpureus* NRRL1992, observou redução a 42% da atividade residual enzimática de β -glicosidase, em 10 mmol/L de glicose. Esta atividade foi inferior à observada no presente trabalho.

Leite e colaboradores (2008), ao estudarem as celulasas de *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus auranticus*, também relataram forte inibição por glicose, uma vez que em 5% deste açúcar nenhuma atividade enzimática foi observada.

A Figura 28 B indica que as enzimas apresentaram comportamentos bem distintos em relação à presença de etanol no meio reacional. O efeito inibidor do álcool sobre a atividade da enzima de *Botryosphaeria* sp. AM 01 foi mais evidente em concentrações acima de 10%. Já a atividade de β -glicosidase de *P. stipata* SC 04 foi estimulada na presença de etanol a 10% e manteve cerca de 90% de sua atividade residual quando na presença de etanol a 14%.

O aumento na atividade de β -glicosidases na presença de etanol pode ser devido à atuação da enzima como uma β -glicosiltransferase. O etanol pode atuar como os primeiros aceptores dos resíduos glicosil, assim substitui a água dando origem a outros glicosídeos (etil-glicosídeos) (BARBAGALLO et al., 2004; LUCAS et

al., 2000). O processo de hidrólise e a transglicosilação ocorrem através de uma rota comum, sendo diferenciadas pela natureza do acceptor final (água ou outra molécula, respectivamente) (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). Porém os álcoois se mostram associar-se melhor ao sítio ativo do que a água (KURASHIMA et al., 2003). Assim podemos ressaltar uma grande estabilidade da β -glicosidase produzida pelo fungo *P. stipata* SC 04 do presente trabalho, o que se torna vantajoso quando estas enzimas são empregadas em processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

O aumento da atividade de β -glicosidase na presença de etanol foi reportado por Marques (2013) ao estudar a enzima de *Botryosphaeria* sp. AM 01, obtida pelo cultivo por FES em substrato diferente (farelo de algodão e farelo de trigo (1:1 p/p). A atividade reportada pela autora foi de 140%, na presença de etanol a 10%. O mesmo fungo, cultivado no presente trabalho em substratos diferentes (bagaço de cana e farelo de soja) teve a atividade de β -glicosidase inibida desde pequenas concentrações de etanol.

O efeito adverso do etanol sobre a atividade enzimática pode ser explicado por alterações na estrutura da enzima relacionadas com a alteração na polaridade do meio (BARBAGALLO et al., 2004).

Pereira (2013) reportou inibição de β -glicosidase por pequenas concentrações de etanol (10%) ao estudar o fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 (atividade reduzida a apenas 30%). Já a β -glicosidase do fungo *Rhizopus orizae* DABM 11/45 manteve aproximadamente 58% de sua atividade original em 20% de etanol. Dados semelhantes são reportados para as β -glicosidasas do fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01 no presente trabalho (aproximadamente 60% de sua atividade original em 20% de etanol).

5.5 Delineamentos experimentais empregados para a otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado

5.5.1 Protocolo 1 de sacarificação utilizando-se o extrato de *Phomopsis stipata* SC 04

Buscando-se a otimização desta condição de sacarificação optou-se por avaliar a influência das variáveis carga de bagaço, carga de enzima e surfactante

Tween 80 em um delineamento composto central rotacional (DCCR) (item 4.9.1), tendo como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados (Tabela 19). O tempo e a temperatura de sacarificação foram mantidos em 24h e 50°C, respectivamente. A agitação foi alterada, utilizando-se nestes experimentos 280 rpm.

Tabela 19 – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³, em níveis codificados e reais, empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo *P. stipata* SC 04.

Ensaio	x1	x2	x3	Glicose (mg/mL)
1	-1 (10)	-1 (150)	-1 (0,04)	5,85
2	1 (14)	-1 (150)	-1 (0,04)	6,59
3	-1 (10)	1 (300)	-1 (0,04)	7,91
4	1 (14)	1 (300)	-1 (0,04)	8,29
5	-1 (10)	-1 (150)	1 (0,150)	6,25
6	1(14)	-1 (150)	1 (0,150)	6,49
7	-1 (10)	1 (300)	1 (0,150)	7,85
8	1(14)	1 (300)	1 (0,150)	7,93
9	-1,68 (8,64)	0 (225)	0 (0,095)	6,95
10	1,68 (15,36)	0 (225)	0 (0,095)	7,65
11	0 (12)	-1,68 (98,87)	0 (0,095)	4,94
12	0 (12)	1,68 (351,13)	0 (0,095)	7,44
13	0 (12)	0 (225)	-1,68 (0,003)	6,16
14	0 (12)	0 (225)	1,68 (0,187)	5,96
15	0 (12)	0 (225)	0 (0,095)	7,85
16	0 (12)	0 (225)	0 (0,095)	7,78
17	0 (12)	0 (225)	0 (0,095)	7,61
18	0 (12)	0 (225)	0 (0,095)	7,87

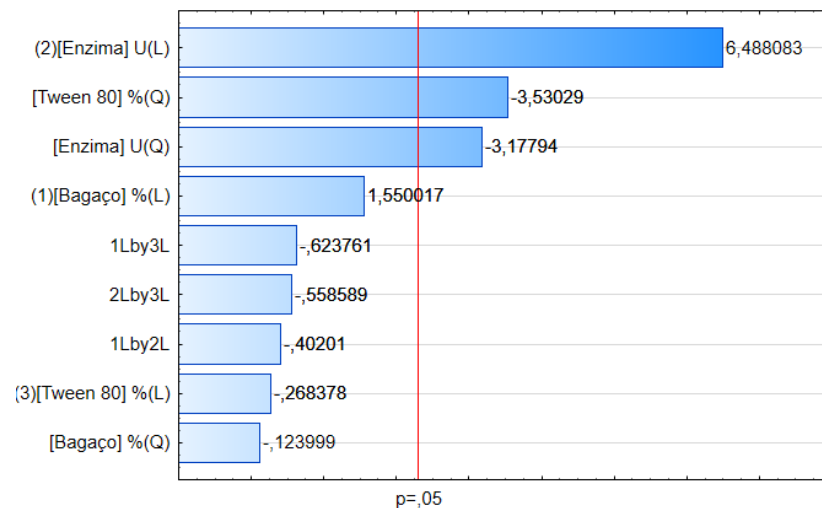
*x1 – Bagaço; x2 – Enzima Endoglucanase; x3 – Tween 80

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que a liberação de glicose variou de 4,94 a 8,29 mg/mL. Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre a concentração de glicose são representados pelo Diagrama de Pareto (Figura 29) e podem ser

confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 20. Pode-se observar que as variáveis carga de Endoglucanase e Tween 80 foram significativas ao nível de 95% de confiança, sendo a variável carga de enzima a de maior significância, enquanto as demais variáveis estudadas e suas interações não foram significativas.

Figura 29 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis carga de bagaço, carga de endoglucanase e carga de Tween 80 na concentração de glicose obtida a partir dos experimentos de sacarificação empregando o fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo1.



Fonte: Elaborado pelo autor. Software STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando o fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1.

<i>Phomopsis stipata</i> SC04 - PROTOCOLO 1					
Variáveis	Soma	Graus de	Média	F	p
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
(1)[Bagaço] %(L)	0,50499	1	0,504993	2,40255	0,15973
[Bagaço] %(Q)	0,00323	1	0,003232	0,01538	0,90438
(2)[Enzima] U(L)	8,848	1	8,847998	42,0952	0,00019
[Enzima] U(Q)	2,12278	1	2,12278	10,0993	0,01304
(3)[Tween 80] %(L)	0,01514	1	0,015139	0,07203	0,7952
[Tween 80] %(Q)	2,61959	1	2,619586	12,4629	0,00773
1L by 2L	0,03397	1	0,033969	0,16161	0,6982
1L by 3L	0,08178	1	0,08178	0,38908	0,55015
2L by 3L	0,06558	1	0,065584	0,31202	0,59173
Error	1,68152	8	0,21019		
Total SS	15,40186	17			

$$R^2 = 0,890 / R^2 \text{ adj.} = 0,768$$

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p < 0,05)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

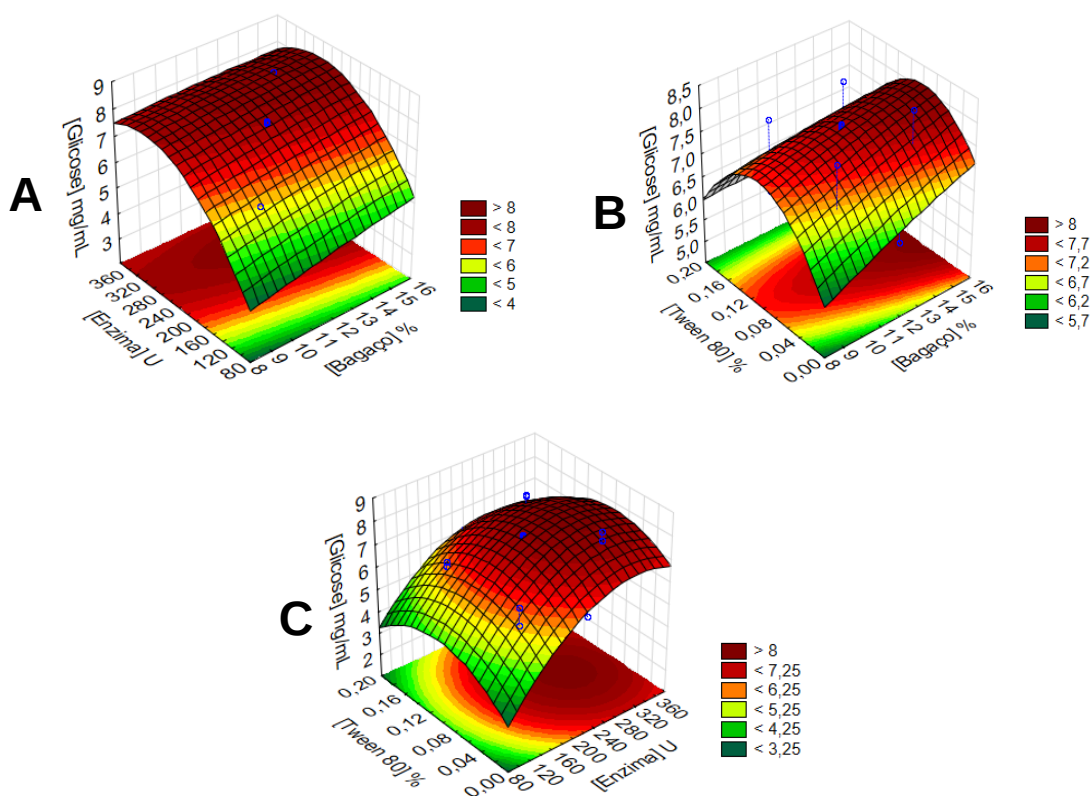
A porcentagem de variação (R^2) indica o modelo se ajusta em 89% aos experimentos. Pela análise de variância (Tabela 20), os efeitos lineares e quadráticos da variável enzima Endoglucanase, bem como o efeito quadrático da variável Tween 80, foram significativos para a concentração de glicose ao nível de confiança de 95%.

Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a quantidade de glicose em função das variáveis independentes avaliadas. A equação do modelo utilizado para a análise das três variáveis está representada abaixo (Eq. 5):

$$Y_1 = - 4,078 + 0,377 \cdot x_1 - 0,004 \cdot x_1^2 + 0,051 \cdot x_2 - 0,000 \cdot x_2^2 + 43,947 \cdot x_3 - 150,439 \cdot x_3^2 - 0,000 \cdot x_1 \cdot x_2 - 0,919 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,022 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (5)$$

Foram então geradas as superfícies de resposta as quais são apresentadas na Figura 30.

Figura 30 – Superfícies de resposta para concentração de glicose empregando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *P. stipata* SC 04 – Protocolo 1, em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima endoglucanase (A), Tween 80 e carga de bagaço (B), Tween 80 e carga de enzima endoglucanase (C).



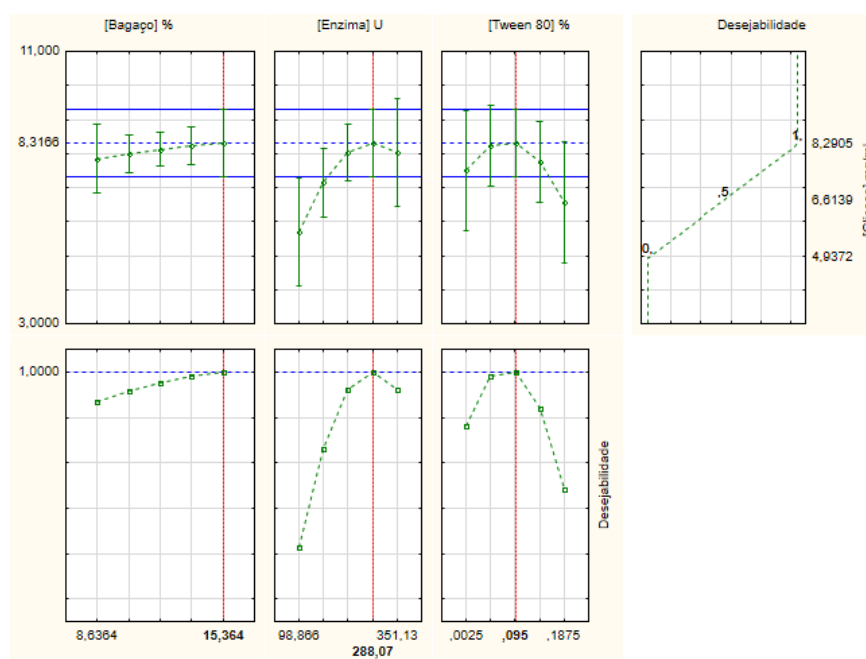
Fonte: Elaborado pelo autor. Software STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Observa-se que o uso do surfactante Tween 80 e o aumento da agitação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar obteve-se um relevante aumento na liberação de glicose (aumentou-se 4,47 mg/mL (117%)) em comparação com a sacarificação inicial realizada (Figura 19A).

Analisando-se a Figura 30C, verifica-se que a região ótima se encontra na condição da variável Endoglucanase em seus maiores níveis e da variável Tween 80 próxima ao seu nível central, onde ocorreu a curvatura do modelo.

Utilizando a função de desejabilidade do *Software* STATISTICA 10, foi possível prever o valor máximo para a concentração de glicose utilizando extrato enzimático do fungo *P. stipata* SC 04 – Protocolo 1. Na Figura 31, observa-se a função de desejabilidade e os respectivos valores otimizados das variáveis independentes.

Figura 31 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço, carga de Endoglucanase e surfactante Tween 80 no planejamento composto central rotacional para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático do fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

A Figura 31 indica que foi possível a otimização das variáveis carga de enzima Endoglucanase e concentração do Tween 80. Porém a variável bagaço não foi otimizada devido à impossibilidade de aumento na carga deste sólido, considerando-se o volume do frasco utilizado. Então sugere-se a condição de 15,364% de bagaço, 288,07 U Totais de Endoglucanase e 0,095% de Tween para a obtenção da máxima concentração de glicose na sacarificação, a qual é prevista como 8,3166 mg/mL. A validação experimental realizada em triplicata levou à obtenção de glicose a $9,03 \pm 0,47$ mg/mL (112 mg de glicose/g bagaço de cana), indicando que o modelo é

robusto aos experimentos de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Como próximo passo, realizou-se um planejamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , afim de avaliar a influência do tempo, da temperatura e da agitação na sacarificação, fixando-se as demais variáveis nos níveis ótimos encontrados no planejamento anterior (item 4.9.1). Nestes experimentos, as variáveis carga de enzima, carga de bagaço e surfactante foram empregadas em seus níveis otimizados. Os níveis codificados e reais das variáveis estudadas e a resposta analisada (concentração de glicose) são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais, empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04.

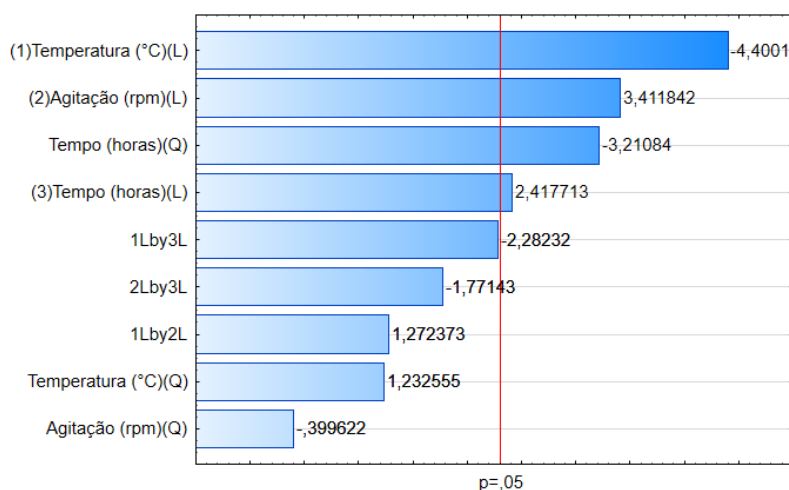
Ensaio	x1	x2	x3	Glicose (mg/mL)
1	-1 (50)	-1 (200)	-1 (8)	3,51
2	1 (60)	-1 (200)	-1 (8)	2,68
3	-1 (50)	1 (280)	-1 (8)	6,19
4	1 (60)	1 (280)	-1 (8)	6,36
5	-1 (50)	-1 (200)	1 (24)	8,11
6	1 (60)	-1 (200)	1 (24)	3,70
7	-1 (50)	1 (280)	1 (24)	7,87
8	1 (60)	1 (280)	1 (24)	5,74
9	-1 (50)	0 (240)	0 (16)	10,31
10	1 (60)	0 (240)	0 (16)	4,85
11	0 (55)	-1 (200)	0 (16)	5,84
12	0 (55)	1 (280)	0 (16)	7,51
13	0 (55)	0 (240)	-1 (8)	4,98
14	0 (55)	0 (240)	1 (24)	5,26
15	0 (55)	0 (240)	0 (16)	6,41
16	0 (55)	0 (240)	0 (16)	6,98
17	0 (55)	0 (240)	0 (16)	6,86
18	0 (55)	0 (240)	0 (16)	6,93

*x1 – Temperatura; x2 – Agitação; x3 – Tempo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com este planejamento, a máxima concentração de glicose obtida foi de 10,31 mg/mL, cerca de 14% superior à máxima obtida no planejamento anterior. Os efeitos que as variáveis e suas interações exerceram sobre a concentração de glicose são representados pelo Diagrama de Pareto (Figura 32) o qual mostra que as três variáveis tiveram significância ao nível de 95%, porém as interações entre as mesmas não foram significativas. O Diagrama de Pareto pode ser confirmado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 22.

Figura 32 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis temperatura, tempo e agitação na concentração de glicose obtida a partir dos experimentos de sacarificação empregando o fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1.



Fonte: Elaborado pelo autor. Software STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Tabela 22 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando o fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1.

<i>Phomopsis stipata</i> SC04 - PROTOCOLO 1					
Variáveis	Soma	Graus de	Média	F	p
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
(1)Temperatura (°C)(L)	16,01409	1	16,01409	19,36096	0,002286
Temperatura (°C)(Q)	1,25657	1	1,25657	1,51919	0,252733
(2)Agitação (rpm)(L)	9,62838	1	9,62838	11,64067	0,009198
Agitação (rpm)(Q)	0,13209	1	0,13209	0,15970	0,699892
(3)Tempo (horas)(L)	4,83487	1	4,83487	5,84534	0,042000
Tempo (horas)(Q)	8,52731	1	8,52731	10,30948	0,012409
1L by 2L	1,33907	1	1,33907	1,61893	0,238974
1L by 3L	4,30853	1	4,30853	5,20899	0,051883
2L by 3L	2,59552	1	2,59552	3,13797	0,114436
Error	6,61707	8	0,82713		
Total SS	56,87563	17			

$$R^2 = 0,883 / R^2 \text{ adj.} = 0,753$$

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p < 0,05)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

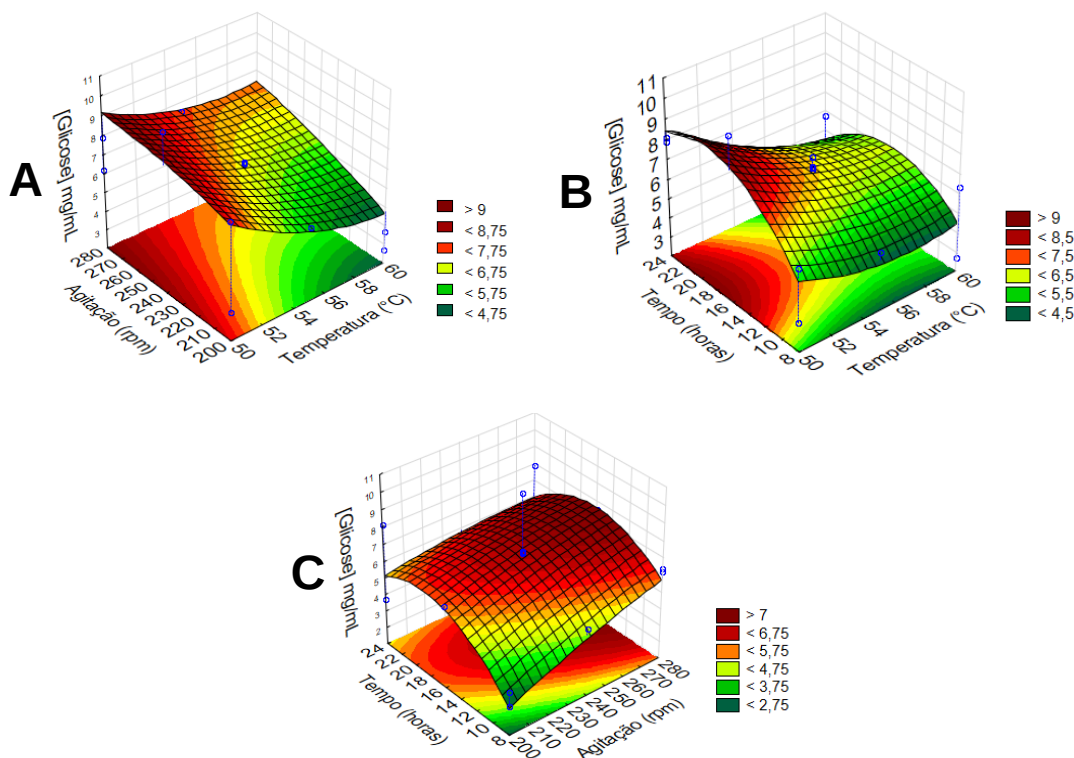
A porcentagem de variação (R^2) de 0,883 indica que o modelo se ajusta em 88% aos experimentos realizados. Nota-se, pela análise de variância apresentada na Tabela 22, que os efeitos lineares e quadráticos da variável Tempo e o efeito linear das variáveis Temperatura e Agitação foram significativos ao nível de 95% de confiança.

Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a quantidade de glicose em função das variáveis independentes avaliadas. A equação do modelo utilizado para a análise das três variáveis está representada abaixo (Eq. 6):

$$Y_1 = 84,86453 - 3,44681*x_1 + 0,02724*x_1^2 + 0,00674*x_2 - 0,00014*x_2^2 + 2,41017*x_3 - 0,02772*x_3^2 + 0,00205*x_1*x_2 - 0,01835*x_1*x_3 - 0,00178*x_2*x_3 \quad (6)$$

Foram geradas as superfícies de resposta, apresentadas na Figura 33.

Figura 33 – Superfícies de resposta da concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1, em função das variáveis Agitação e Temperatura (A), Tempo e Temperatura (B), Tempo e Agitação (C).



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

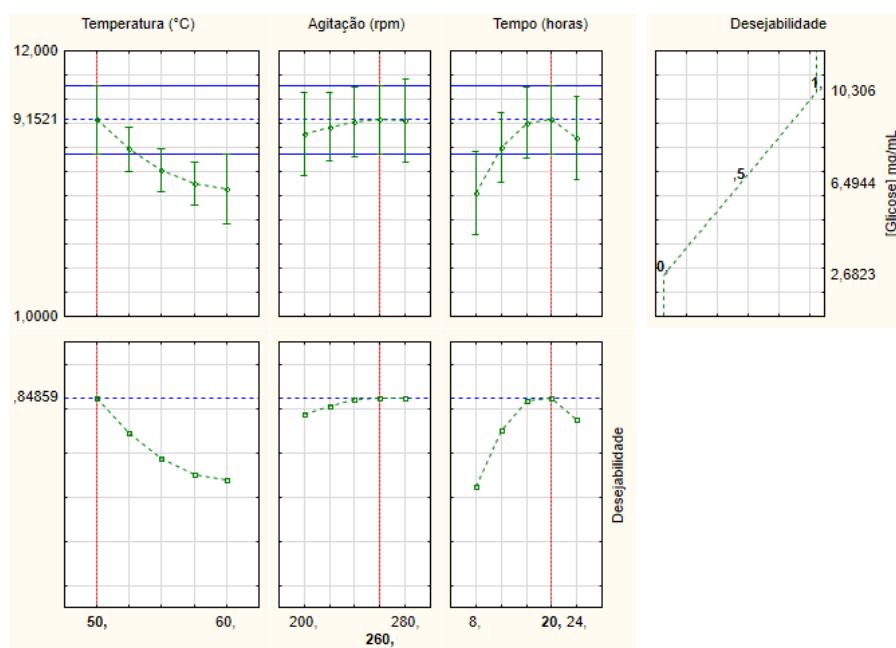
A partir das superfícies podemos notar que as maiores concentrações de glicose foram obtidas quando a variável Temperatura estava em seu nível mais baixo (50 °C), a variável Agitação no seu nível mais alto (280 rpm) e o Tempo próximo ao nível mais alto. A Figura 33C, apresentando a superfície da interação entre a variável Tempo e Agitação, indica como região ótima a condição de Tempo próximo ao ponto central e Agitação próxima ao seu nível mais alto, onde ocorreu a curvatura do modelo.

Através da função de desejabilidade, foi possível prever o valor máximo para a concentração de glicose, como podemos ver na Figura 34, são apresentados os valores das variáveis independentes que proporcionam esta condição otimizada.

Como observado nos gráficos gerados pela função de desejabilidade, do *Software* STATISTICA 10 (Figura 34), a condição de 50°C, 260 rpm e 20 horas é a

ótima sugerida para a obtenção da concentração máxima de glicose, a qual foi prevista como 9,1521 mg/mL (113 mg de glicose/g bagaço de cana).

Figura 34 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis Temperatura, Agitação e Tempo no delineamento fatorial do tipo face centrada para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático do fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo 1.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

A validação experimental, realizada em triplicata, levou à concentração de glicose de $9,25 \pm 0,84$ mg/mL, indicando que o modelo proposto se ajustou com sucesso aos experimentos realizados. Destaca-se que, após a otimização das condições de sacarificação, a concentração de glicose aumentou em 2,42 vezes em comparação com a sacarificação prévia, sendo obtida em menor tempo e mantendo-se a menor temperatura entre as avaliadas, o que indica economia do processo como um todo.

5.5.2 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo *Phomopsis stipata* SC 04

A sacarificação do bagaço segundo o Protocolo 2, empregando-se o fungo *P. stipata* SC 04, mostrou-se promissora quanto à liberação de glicose, quando comparada com a sacarificação prévia realizada (Figura 19B). Uma vez que este utiliza todo o material resultante do cultivo do fungo por FES (substrato fermentado + crescimento fúngico), optou-se por avaliar no delineamento experimental a influência das variáveis carga de bagaço pré-tratado e quantidade do surfactante Tween 80, a partir de um delineamento composto central rotacional em busca da otimização. Tempo, agitação e temperatura de sacarificação foram mantidos conforme a sacarificação prévia realizada (item 4.6.2) (50°C, 200 rpm por 24h).

Para a análise da influência das variáveis químicas, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios. As variáveis estudadas, seus respectivos níveis codificados e reais e a resposta avaliada (concentração de glicose nos hidrolisados) são apresentados na Tabela 22.

Tabela 23 – Ensaios do delineamento composto central rotacional, em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.

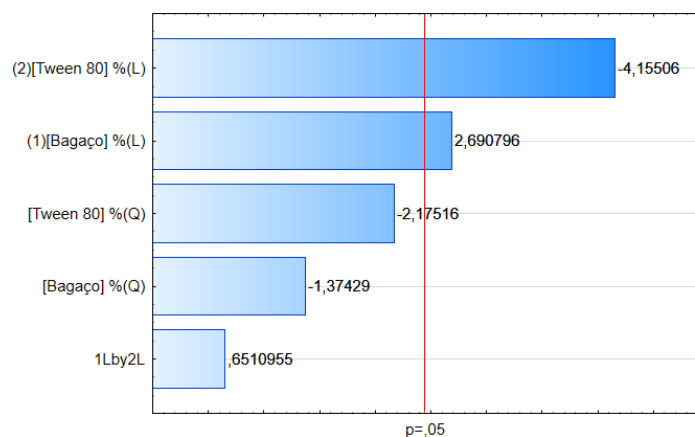
Ensaios	x1	x2	Glicose (mg/mL)
1	-1 (5)	-1 (0,17)	4,82
2	1 (10)	-1 (0,17)	5,53
3	-1 (5)	1 (0,95)	3,89
4	1 (10)	1 (0,95)	5,15
5	-1,41 (3,96)	0 (0,56)	4,14
6	1,41(11,04)	0 (0,56)	5,03
7	0 (7,5)	-1,41 (0,008)	5,61
8	0 (7,5)	1,41 (1,11)	3,03
9	0 (7,5)	0 (0,56)	5,19
10	0 (7,5)	0 (0,56)	5,24
11	0 (7,5)	0 (0,56)	5,28
12	0 (7,5)	0 (0,56)	5,28

*x1 – Bagaço; x2 – Tween 80

Fonte: Elaborado pelo autor.

A liberação de glicose a partir do bagaço pré-tratado variou de 3,03 a 5,61 mg/mL. Os efeitos das variáveis e suas respectivas interações são representados pelo Diagrama de Pareto (Figura 35), onde nota-se que as duas variáveis estudadas foram significativas ao nível de 95% de confiança. Entretanto, as interações entre as mesmas não foram significativas.

Figura 35 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis sobre a concentração de glicose empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Estes efeitos e as interação das variáveis apresentados pelo Diagrama de Pareto podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 24).

Tabela 24 – Análise de variância (ANOVA) para a liberação de glicose empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04.

<i>Phomopsis stipata</i> SC04 - PROTOCOLO 2					
Variáveis	Soma	Graus de	Média	F	p
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
(1)[Bagaço] %(L)	1,294582	1	1,294582	7,24038	0,036014
[Bagaço] %(Q)	0,337697	1	0,337697	1,88868	0,218475
(2)[Tween 80] %(L)	3,086900	1	3,086900	17,26452	0,005977
[Tween 80] %(Q)	0,845962	1	0,845962	4,73133	0,072544
1L by 2L	0,075798	1	0,075798	0,42393	0,539105
Error	1,072801	6	0,178800		
Total SS	6,528939	11			
$R^2 = 0,835 / R^2 \text{ adj.} = 0,699$					

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

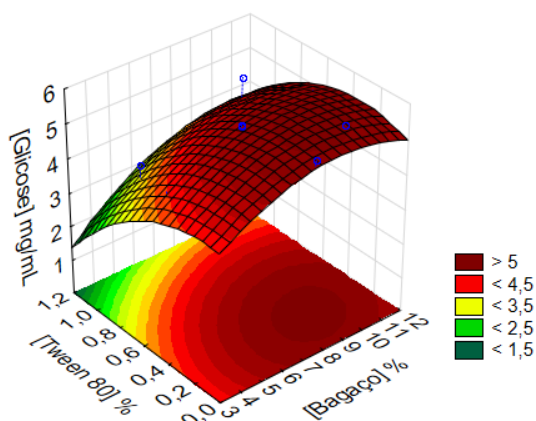
A porcentagem de variação (R^2) indica que os experimentos se ajustam em 83,5% ao modelo. Nota-se que apenas os efeitos lineares foram significativos nesse delineamento.

Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a quantidade de glicose em função das variáveis independentes avaliadas. A equação do modelo utilizado para a análise das duas variáveis está representada abaixo (Eq. 7):

$$Y_1 = 2,71044 + 0,63194 \cdot x_1 - 0,03668 \cdot x_1^2 + 0,02899 \cdot x_2 - 2,39415 \cdot x_2^2 + 0,14119 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (7)$$

A superfície de resposta gerada, que mostra a interação entre as duas variáveis, está apresentada na Figura 36.

Figura 36 – Superfície de resposta para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e Tween 80, empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Pela análise da superfície de resposta, observa-se que a maior concentração de glicose foi obtida quando se utilizou carga de bagaço e Tween 80 em seus níveis maior e menor, respectivamente. Nota-se quando comparado com os resultados obtidos no delineamento experimental empregado para a sacarificação segundo o

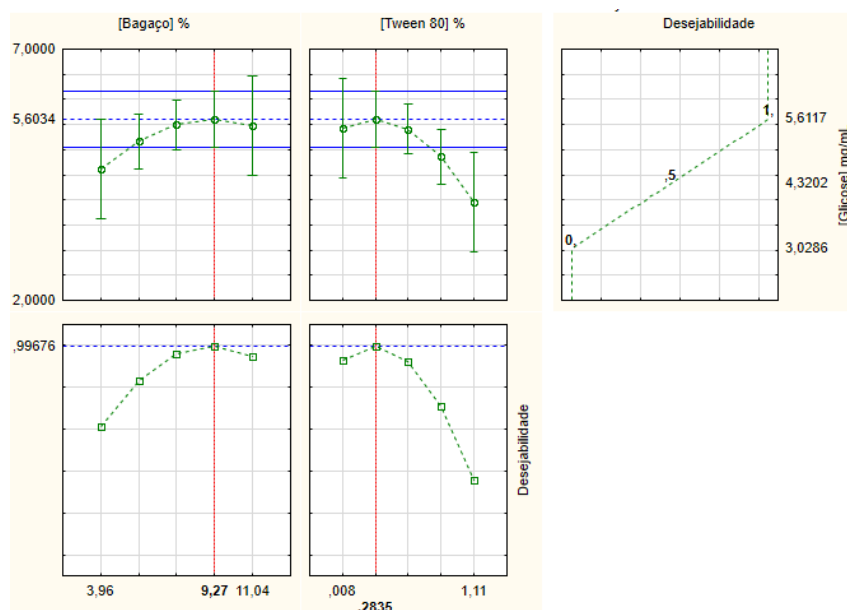
Protocolo 1, utilizando-se o extrato enzimático deste mesmo fungo, que o melhor nível da variável bagaço foi semelhante.

É possível verificar através das superfícies de respostas, que a maior liberação de glicose foi obtida quando a variável bagaço estava em seu nível mais alto, porém quando o surfactante Tween 80 estava em seu nível mais baixo. Um dos principais fatores que afetam a eficiência da hidrólise enzimática são as cargas de substrato e de enzima. Empregando-se cargas de biomassa menores, obtém-se uma sacarificação mais eficiente, por haver mais enzimas em relação ao substrato. Entretanto, o rendimento de açúcares é menor, exatamente pela menor quantidade de celulose disponível. Consequentemente, presume-se que uma maior carga de biomassa levará a maiores concentrações de açúcares (FELBY et al., 2008; WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003).

A melhor sacarificação observada na presença de Tween 80 pode ser explicada pela proteção enzimática causada pelo surfactante, que impede a ligação improdutiva a outros substratos que não a celulose (MORANDO et al., 2014).

Através da função de desejabilidade do *Software* STATISTICA 10, foi possível prever o valor máximo para a concentração de glicose a ser obtido sob as condições otimizadas das variáveis em estudo (Figura 37).

Figura 37 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço e carga de Tween 80 no DCCR para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o fungo *P. stipata* SC 04 no Protocolo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Após gerados os gráficos pela função de desejabilidade, a condição sugerida para a máxima concentração de glicose prevista (5,6034 mg/mL) foi carga de bagaço e Tween 80 a 9,27 e 0,283%, respectivamente. A validação experimental realizada em triplicata levou à obtenção de glicose a $5,79 \pm 0,53$ mg/mL (118 mg de glicose/g bagaço de cana), indicando que o modelo proposto modelou com sucesso os experimentos realizados. Após a otimização das variáveis estudadas, deu-se continuidade ao trabalho realizando-se um delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em três níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios, avaliando-se a influência das variáveis temperatura, agitação e tempo. Os níveis codificados e valores reais das variáveis, bem como os ensaios experimentais e a resposta obtida (concentração de glicose) são representados na Tabela 25.

Tabela 25 – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico *P. stipata* SC 04, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.

Ensaios	x1	x2	x3	Glicose (mg/mL)
1	-1 (50)	-1 (180)	-1 (8)	4,40
2	1 (60)	-1 (180)	-1 (8)	0,49
3	-1 (50)	1 (220)	-1 (8)	4,56
4	1 (60)	1 (220)	-1 (8)	4,09
5	-1 (50)	-1 (180)	1 (24)	5,05
6	1(60)	-1 (180)	1 (24)	0,03
7	-1 (50)	1 (220)	1 (24)	6,20
8	1 (60)	1 (220)	1 (24)	5,25
9	-1 (50)	0 (200)	0 (16)	4,55
10	1 (60)	0 (200)	0 (16)	3,53
11	0 (55)	-1 (180)	0 (16)	4,29
12	0 (55)	1 (220)	0 (16)	3,40
13	0 (55)	0 (200)	-1 (8)	3,05
14	0 (55)	0 (200)	1 (24)	1,55
15	0 (55)	0 (200)	0 (16)	4,46
16	0 (55)	0 (200)	0 (16)	4,14
17	0 (55)	0 (200)	0 (16)	4,30
18	0 (55)	0 (200)	0 (16)	4,34

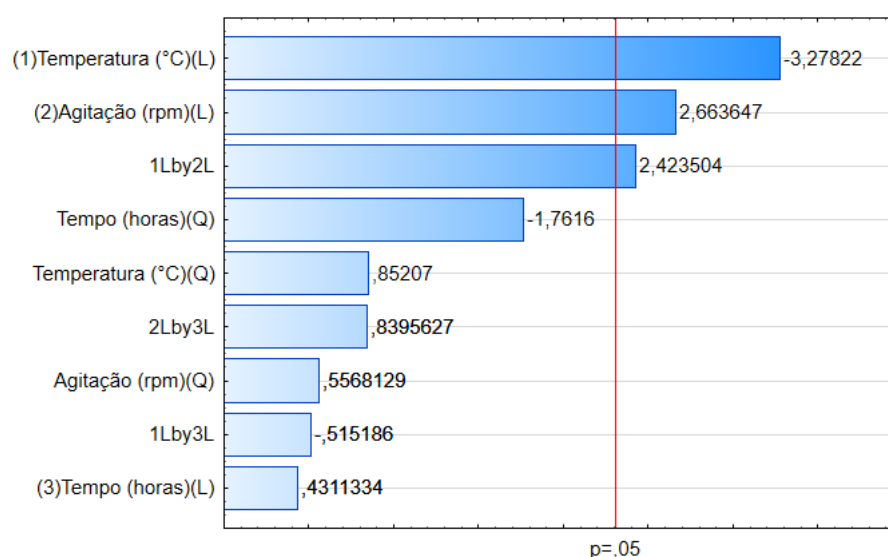
*x1 – Temperatura; x2 – Agitação; x3 – Tempo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como mostra a Tabela 25, a concentração de glicose variou de 0,03 a 6,20 mg/mL o que nos mostra uma ampla variação, conforme a mudança nos níveis das variáveis estudadas. Os efeitos que essas variáveis e suas interações exerceram são representados pelo Diagrama de Pareto (Figura 38), pelo qual pode-se observar que as variáveis temperatura, agitação e tempo foram significativas, bem como a interação entre as variáveis temperatura, agitação e tempo, ao nível de 95%.

Figura 38 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis físicas na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endófito *P. stipata*

SC 04 – Protocolo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Os efeitos e as interação das variáveis podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 26).

Tabela 26 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico *P. stipata* SC 04 – Protocolo 2.

<i>Phomopsis stipata</i> SC04 - PROTOCOLO 2					
Variáveis	Soma	Graus de	Média	F	p
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
(1)Temperatura (°C)(L)	12,92332	1	12,92332	10,74676	0,011218
Temperatura (°C)(Q)	0,87307	1	0,87307	0,72602	0,418951
(2)Agitação (rpm)(L)	8,53199	1	8,53199	7,09502	0,028643
Agitação (rpm)(Q)	0,37283	1	0,37283	0,31004	0,592886
(3)Tempo (horas)(L)	0,22352	1	0,22352	0,18588	0,677753
Tempo (horas)(Q)	3,73173	1	3,73173	3,10322	0,116164
1L by 2L	7,06292	1	7,06292	5,87337	0,041622
1L by 3L	0,31917	1	0,31917	0,26542	0,620352
2L by 3L	0,84762	1	0,84762	0,70487	0,425530
Error	9,62026	8	1,20253		
Total SS	43,33772	17			

$$R^2 = 0,778 / R^2 \text{ adj.} = 0,528$$

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p < 0,05)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

A porcentagem de variação (R^2) indica que o modelo se ajusta apenas 77,8% aos experimentos realizados. Nota-se, pela análise de variância (Tabela 26), que os efeitos lineares das variáveis temperatura e agitação foram significativos ao nível de 95% de confiança, assim como a interação entre as duas variáveis.

Assim, devido a porcentagem de variação ter sido relativamente baixa, mostra-se que não é possível a otimização do mesmo. Entretanto, pode-se observar que a condição do ensaio 7 (Tabela 25) levou à maior concentração de glicose no hidrolisado (6,20mg/mL).

5.5.3 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01

A liberação de glicose, pelo Protocolo 2 de sacarificação, empregando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01, foi superior à obtida quando se utilizou o extrato enzimático do mesmo fungo, no Protocolo 1 na sacarificação prévia.

Então foi realizado um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios. Os níveis da variável carga de bagaço desse planejamento foram escolhidos com base a planejamentos anteriores testados com esse fungo (dados não mostrados) que não levaram a otimização e que indicaram o aumento dos níveis destas variáveis (carga de bagaço e de Tween 80). As condições de tempo, agitação e temperatura foram mantidas nos níveis empregados na sacarificação prévia (50°C, 24 horas, 200 rpm).

As variáveis utilizadas e seus níveis são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.

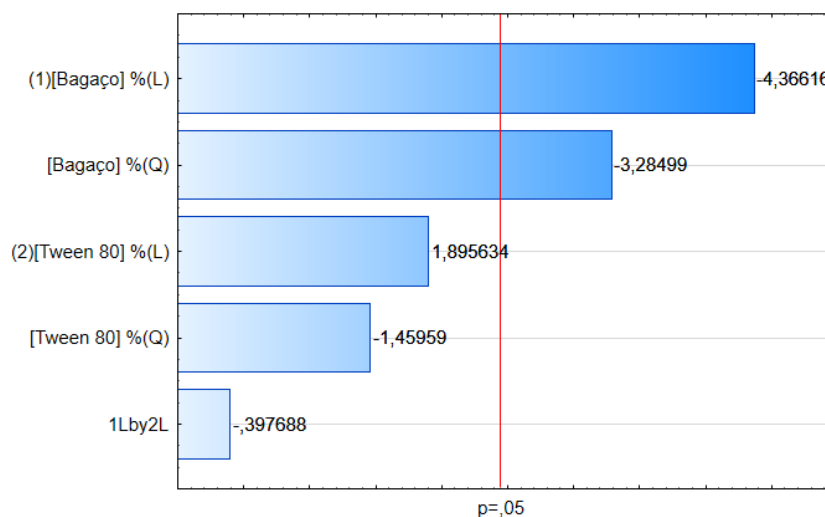
Ensaios	x1	x2	Glicose (mg/mL)
1	-1 (6)	-1 (0,17)	6,31
2	1 (14)	-1 (0,17)	4,60
3	-1 (6)	1 (0,95)	6,62
4	1 (14)	1 (0,95)	4,57
5	-1,41 (4,34)	0 (0,56)	5,63
6	1,41(15,66)	0 (0,56)	4,53
7	0 (10)	-1,41 (0,008)	4,98
8	0 (10)	1,41 (1,11)	6,42
9	0 (10)	0 (0,56)	6,21
10	0 (10)	0 (0,56)	6,05
11	0 (10)	0 (0,56)	6,39
12	0 (10)	0 (0,56)	6,40

*x1 – Bagaço; x2 – Tween 80

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como mostra a Tabela 27, a concentração de glicose variou de 4,53 a 6,62 mg/mL. Os efeitos das variáveis e suas respectivas interações são representados pelo Diagrama de Pareto, na Figura 39, onde pode-se notar que apenas a variável carga de bagaço, tanto para efeito linear quanto para quadrático, foi significativa ao nível de 95% de confiança. Já a Tween 80 e a interação entre as elas não foram significativas.

Figura 39 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM 01 – Protocolo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Estes efeitos e as interação das variáveis apresentados pelo Diagrama de Pareto foram confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 28).

Tabela 28 – Análise de variância (ANOVA) para a liberação de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM 01 – Protocolo 2.

<i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2.					
Variáveis	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)[Bagaço] %(L)	3,529791	1	3,529791	19,06339	0,004739
Bagaço] %(Q)	1,998098	1	1,998098	10,79116	0,016718
(2)[Tween 80] %(L)	0,665362	1	0,665362	3,59343	0,106814
[Tween 80] %(Q)	0,394466	1	0,394466	2,13040	0,194693
1L by 2L	0,029284	1	0,029284	0,15816	0,704623
Error	1,110964	6	0,185161		
Total SS	7,460767	11			

$$R^2 = 0,851 / R^2 \text{ adj.} = 0,727$$

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

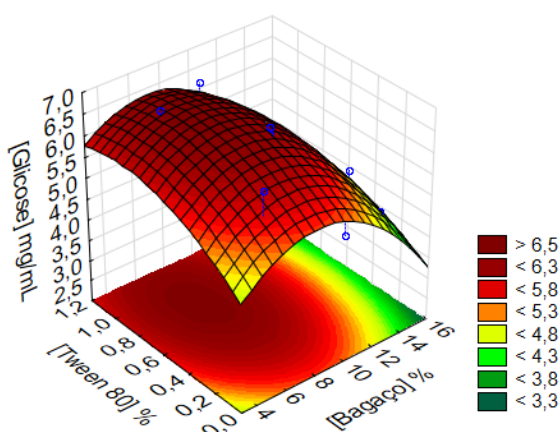
A porcentagem de variação (R^2) indica que os experimentos se ajustam em 85,1% ao modelo.

Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a quantidade de glicose em função das variáveis independentes avaliadas. A equação do modelo utilizado para a análise das duas variáveis está representada abaixo (Eq. 8):

$$Y_1 = 3,20246 + 0,56249 \cdot x_1 - 0,03489 \cdot x_1^2 + 3,11923 \cdot x_2 - 1,63474 \cdot x_2^2 - 0,05485 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (8)$$

A superfície de resposta gerada, que mostra a interação entre as duas variáveis, está apresentada na Figura 40.

Figura 40 – Superfície de resposta para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço pré-tratado e Tween 80, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01.

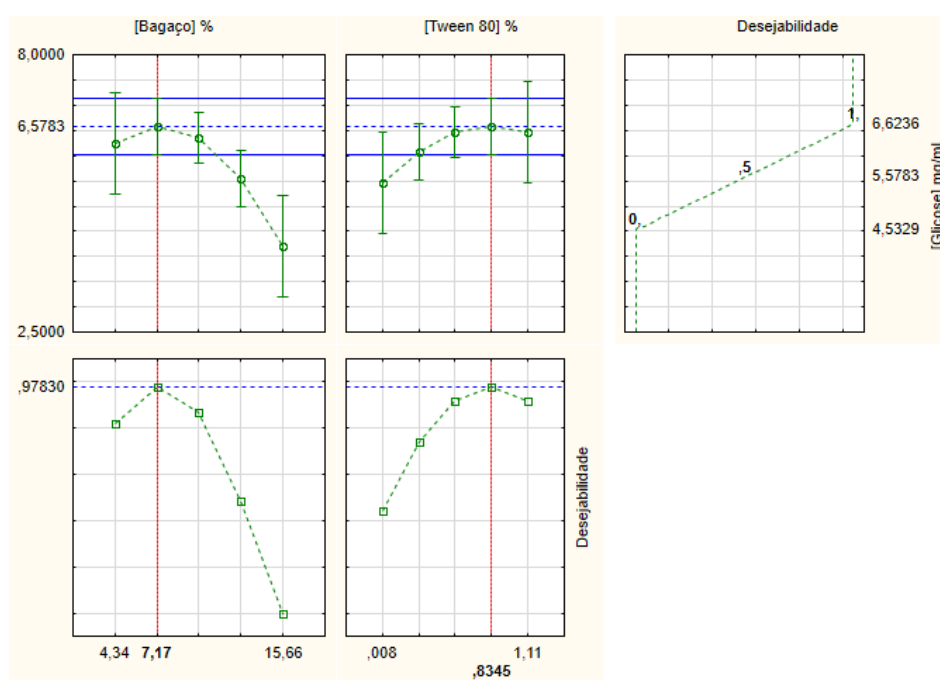


Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

A análise da superfície de resposta (Figura 40) indica que as maiores concentrações de glicose foram obtidas quando se utilizou carga de bagaço pré-tratado a aproximadamente 8% e Tween 80 próximo ao seu nível mais alto (aproximadamente 0,9%), ou seja, onde ocorreu a curvatura do modelo.

Utilizando a função de desejabilidade do *Software* STATISTICA 10, foi possível prever o valor ótimo para a concentração de glicose. Na Figura 41, observa-se a função de desejabilidade e os respectivos valores otimizados das variáveis independentes que proporcionam esta condição otimizada.

Figura 41 – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço e carga de Tween 80 no DCCR 2² para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01 no Protocolo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

A análise dos gráficos gerados pela função de desejabilidade indica como melhor condição o uso de carga de bagaço e Tween 80 a 7,17 e 0,8345%, respectivamente, para obtenção da condição ótima na concentração de glicose prevista (6,5783 mg/mL). A validação experimental, realizada em triplicata, levou à obtenção de glicose a $6,43 \pm 0,70$ mg/mL (170 mg de glicose/g bagaço de cana), indicando que o modelo proposto modelou com sucesso os experimentos realizados.

Observa-se que o emprego deste delineamento levou a um aumento de 4,01 para 6,43 mg/mL na concentração de glicose, quando comparado com a sacarificação inicial realizada (Figura 19B).

O aumento da carga da biomassa é vantajoso para liberação de glicose quando há um grande número de enzimas para hidrolisar a mesma, porém para o delineamento do fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01 esse aumento não foi satisfatório.

Algumas estratégias são utilizadas para aumentar o rendimento de hidrólise quando a carga de enzima não é o suficiente em relação a quantia de substrato. Uma dessas é a adição de emulsionantes como Tween 80 antes da adição de enzima, uma vez que diminui a adsorção não-específica e não-produtiva da celulose sobre a lignina, aumentando assim o rendimento da sacarificação (HELLE; DUFF; COOPES, 1993; KRISTENSEN et al., 2007; KRISTENSEN; FELBY; JORGENSEN, 2009; MYAT; RYU, 2014; QING; WYMAN, 2010).

Assim, após a otimização das variáveis químicas estudadas, deu-se continuidade realizando um delineamento composto central rotacional 2^3 , onde avaliou-se o efeito das variáveis temperatura, agitação e tempo em cinco níveis, com 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. As variáveis carga de bagaço e de tween foram mantidas nos níveis ótimos encontrados no planejamento anterior.

Os níveis codificados e valores reais das variáveis, bem como as respostas obtidas (concentração de glicose) são representados na Tabela 29.

Tabela 29 – Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³, em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados.

Ensaios	x1	x2	x3	Glicose (mg/mL)
1	-1 (50)	-1 (180)	-1 (8)	5,07
2	1 (60)	-1 (180)	-1 (8)	2,08
3	-1 (50)	1 (220)	-1 (8)	4,54
4	1 (60)	1 (220)	-1 (8)	2,00
5	-1 (50)	-1 (180)	1 (24)	5,60
6	1(60)	-1 (180)	1 (24)	2,68
7	-1 (50)	1 (220)	1 (24)	6,30
8	1 (60)	1 (220)	1 (24)	3,00
9	-1,68 (46,59)	0 (200)	0 (16)	5,49
10	1,68 (63,40)	0 (200)	0 (16)	1,59
11	0 (55)	-1,68 (166,36)	0 (16)	2,06
12	0 (55)	1,68 (233,63)	0 (16)	1,89
13	0 (55)	0 (200)	-1,68 (2,54)	1,60
14	0 (55)	0 (200)	1,68 (29,45)	3,21
15	0 (55)	0 (200)	0 (16)	2,76
16	0 (55)	0 (200)	0 (16)	2,67
17	0 (55)	0 (200)	0 (16)	2,51
18	0 (55)	0 (200)	0 (16)	2,53

*x1 – Temperatura; x2 – Agitação; x3 – Tempo

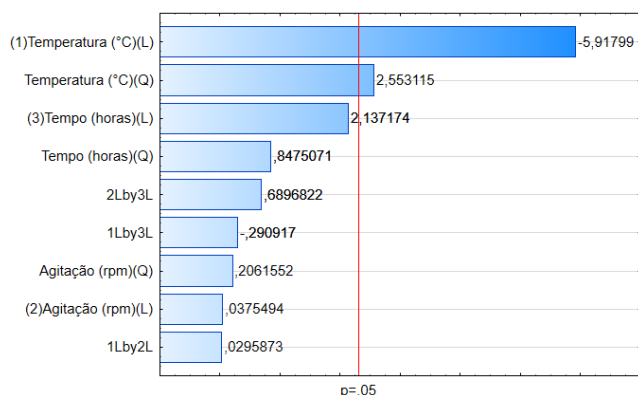
Fonte: Elaborado pelo autor.

Como apresentado na Tabela 29, a concentração de glicose variou de 1,59 a 6,30 mg/mL, o que representa uma ampla variação conforme a mudança das variáveis físicas temperatura, tempo e agitação.

Os efeitos que essas variáveis e suas interações exerceram são representados pelo Diagrama de Pareto (Figura 42), onde observa-se que apenas a variável temperatura se mostrou significativa ao nível de 95%. As interações entre as variáveis também não foram significativas.

Figura 42 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis físicas na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico

Botryosphaeria sp. AM 01 – Protocolo 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Os efeitos linear e quadrático da variável temperatura foram também significativos. Os efeitos e as interação das variáveis foram confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 30).

Tabela 30 – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM 01 – Protocolo 2.

<i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 - PROTOCOLO 2					
Variáveis	Soma	Graus de	Média	F	p
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
(1)Temperatura (°C)(L)	24,56959	1	24,56959	35,02266	0,000354
Temperatura (°C)(Q)	4,57288	1	4,57288	6,51840	0,034009
(2)Agitação (rpm)(L)	0,00099	1	0,00099	0,00141	0,970967
Agitação (rpm)(Q)	0,02982	1	0,02982	0,04250	0,841819
(3)Tempo (horas)(L)	3,20427	1	3,20427	4,56751	0,065062
Tempo (horas)(Q)	0,50389	1	0,50389	0,71827	0,421342
1L by 2L	0,00061	1	0,00061	0,00088	0,977121
1L by 3L	0,05937	1	0,05937	0,08463	0,778514
2L by 3L	0,33369	1	0,33369	0,47566	0,509901
Error	5,61227	8	0,70153		
Total SS	38,53626	17			

$$R^2 = 0,854 / R^2 \text{ adj.} = 0,690$$

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor. *Software* STATISTICA 10, (StatSoft 2010).

Verifica-se que modelo se ajusta em 85,4% aos experimentos realizados, de acordo com a porcentagem de variação (R^2). Assim, devido ao baixo ajuste dos experimentos ao modelo, não foi possível a otimização das variáveis.

A condição que levou à maior concentração de glicose (6,30 mg/mL) foi a empregada no experimento 7: 50°C, 24 horas e agitação de 220 rpm. Uma vez que a diferença entre a concentração de glicose obtida sob esta condição e aquela obtida quando a sacarificação foi realizada sob a condição fixadas no planejamento anterior (6,43 mg/mL), optou-se por manter esta última (50°C, 200 rpm por 24 horas).

Morando e colaboradores (2014) em busca de uma condição otimizada de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, utilizando peróxido de hidrogênio alcalino 4,7% com ácido diluído, avaliaram os efeitos da carga de celulase (unidade de papel de filtro 3,4-5,6 (FPU) / g sólido), carga de β -glicosidase (unidade 15-27 β -glicosidase CBU) / g de sólido) e a concentração de Tween 80 (0,11-1,7% p / v) na liberação de glicose durante a hidrólise enzimática. Pela análise de superfície de resposta Box-Behnken da hidrólise de 120 horas, utilizando uma preparação de celulase comercial de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1,5 L) com uma atividade de 70 FPU / g, suplementada com β -glucosidase de *Aspergillus niger* (Novozyme 188) observou-se que as maiores liberações de glicose foram obtidas com 4,1 FPU / g de sólidos para celulase, 18,2 CBU / g de sólidos para β -glicosidase e 0,95% / V para Tween 80, o que correspondeu um aumento de 29% na liberação de glicose em comparação com nenhuma adição de Tween 80. Assim como no presente trabalho, o uso do surfactante Tween 80 foi significativo para o aumento da concentração de glicose nos experimentos de sacarificação.

Em busca de melhores condições na realização de experimento de sacarificação, Giese e colaboradores (2013) relataram os melhores resultados na liberação de glicose usando 0,15 g/g do surfactante Tween 80, quando utilizou-se Cellulase AF28918 300 U/mL, Cellobiase 80 U/mL, com carga de 5% (p/v) de bagaço pré-tratado, o que nos mostra que o uso do surfactante e a menor carga de substrato foram significativos para o aumento da liberação do açúcar, tendo em vista que os autores realizaram experimentos sem o uso do surfactante e com cargas maiores de bagaço de cana, obtendo-se uma liberação de glicose inferior. Assim, conclui-se que nem sempre a maior carga de substrato levará a uma maior concentração de glicose, como observado nos experimentos de otimização das

variáveis químicas empregados para o Protocolo 2, utilizando-se o fungo *Botryosphaeria* sp. AM 01.

5.5.4 Seleção do hidrolisado a ser utilizado na fermentação alcoólica

Ao final dos experimentos de sacarificação envolvendo planejamentos experimentais, os hidrolisados obtidos foram comparados quanto à concentração de glicose e estas foram ainda comparadas com a obtida nas sacarificações prévias (Tabela 31).

Tabela 31 – Comparação da concentração de glicose nos hidrolisados obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado.

Experimento	Sacarificação Prévia (mg/mL)	Condições otimizadas (mg/mL)	Aumento
<i>Phomopsis stipata</i> SC 04 Protocolo 1	3,82	9,25	2,42X
<i>Phomopsis stipata</i> SC 04 Protocolo 2	4,72	5,79	1,22X
<i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 Protocolo 2	4,01	6,43	1,6X

Fonte: Elaborado pelo autor

O hidrolisado obtido no experimento de sacarificação empregando-se o extrato enzimático de *Phomopsis stipata* SC 04, realizado segundo o Protocolo 1, foi selecionado por apresentar a maior concentração de glicose. A análise de inibidores presentes neste hidrolisado foi realizada e, posteriormente, este foi utilizado como meio para a fermentação alcoólica.

5.6 Análise de inibidores e ensaios de fermentação alcóolica

Componentes que inibem a fermentação alcóolica podem ser classificados em inibidores presentes na biomassa e inibidores que são produzidos em condições severas durante o pré-tratamento dessa biomassa (RABELO, 2010). O tipo e a concentração de compostos fenólicos variam de acordo com a matéria-prima, sendo altamente dependente da mesma, uma vez que a estrutura química bem como o

teor de lignina diferem entre uma biomassa lignocelulósica e outra (TOMÁS-PEJÓ et al., 2011).

O hidrolisado utilizado nos ensaios de fermentação alcoólica apresentou baixas concentrações de alguns compostos fenólicos, derivados da decomposição de lignina durante o pré-tratamento: de ácido vanílico e ácido ferúlico (0,115 e 0,078 g/L, respectivamente). Não foi detectada a presença de furfural, hidroximetilfurfural e demais compostos inibidores, o que está de acordo com os dados de literatura, que indicam pouca ou nenhuma geração de produtos inibidores de fermentação pelo pré-tratamento hidrotérmico (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Após verificação da baixa presença de inibidores, realizou-se então a fermentação alcoólica, utilizando-se o hidrolisado selecionado, complementado como descrito no item 2.9. A concentração de açúcares redutores, glicose, xilose e arabinose presentes neste meio de fermentação e após a fermentação são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 – Açúcares presentes antes e após o experimento de fermentação alcoólica.

Açúcares (g/L)	Tempo de fermentação (h)	
	0	24
Redutores	34,53 ± 0,11	14,47 ± 0,32
Glicose	13,89 ± 0,40	1,97 ± 0,36
Xilose	14,09 ± 0,48	13,72 ± 0,55
Arabinose	1,93 ± 0,09	1,90 ± 0,01

Fonte: Elaborado pelo autor

Após 24 horas de fermentação, a concentração de açúcares redutores diminuiu para 14,47 ± 0,32 g/L, o que indica o consumo de aproximadamente 58% pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para o açúcar glicose pode-se também observar uma redução de 85,8% em sua concentração, e os demais foram mantidos na mesma proporção, mostrando o consumo de apenas hexoses pela levedura. Sendo esse consumo provavelmente favorecido pela baixa concentração de inibidores no hidrolisado utilizado. Assim, destaca-se a produção de etanol ao final da fermentação a 5,22 ± 0,95g/L, destacando a possibilidade de produção do etanol celulósico.

Nigam (2001) ao estudar a produção de etanol a partir de hidrolisado de palha de trigo por *Pichia stipitis* observou um consumo de 20,5 % de açúcares redutores, considerado baixo devido principalmente à presença de componentes tóxicos que inibem o crescimento e a atividade de fermentação da levedura.

Pereira et al. (2016) também realizou a fermentação de hidrolisado obtido através de enzimas produzidas pelo fungo *M. thermophila* JCP 1-4, onde utilizou-se 10% de carga de bagaço pré-tratado e obteve-se 3,15 g/L de etanol a partir de 10,19 g/L de glicose, que são semelhantes as proporções do presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

Destaca-se primeiramente a importância dos resultados obtidos como pesquisa básica como o estudo da produção de celulases pelos gêneros estudados bem como a hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos que são pouco apresentados na literatura.

Pelos dados apresentados, conclui-se que todos fungos avaliados são potenciais produtores de ao menos uma das enzimas do complexo celulolítico. A exploração de diferentes materiais lignocelulósicos como substratos para o cultivo dos fungos mostrou que alguns deles são capazes de induzir significativamente a produção das enzimas por alguns fungos, permitindo a escolha do melhor substrato. Observou-se também que grandes quantidades de enzimas (celulases) não necessariamente levam a melhor sacarificação enzimática.

Os resultados dos experimentos de sacarificação indicaram que as enzimas de *Phomopsis stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 levaram aos melhores resultados em termos de concentração de glicose a partir do bagaço pré-tratado. As enzimas de *Phomopsis stipata* SC 04 se mostraram eficientes nos dois Protocolos de sacarificação durante o delineamento experimental, aumentando significativamente a concentração de glicose liberada o que se conclui que a avaliação dos parâmetros de sacarificação se mostrou uma importante ferramenta para esse processo.

Cabe ressaltar que os fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 obtiveram significativas concentrações de glicose ao utilizar-se o Protocolo 2 de sacarificação que não envolve a etapa de extração das enzimas, indicando que a escolha desse Protocolo foi importante.

As β -glicosidases dos mesmos apresentaram relativamente uma boa estabilidade quanto à presença de glicose e etanol, características desejáveis quando se visa aplicações industriais;

Assim o uso de enzimas microbianas na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico com NaOH levou a obtenção de hidrolisado com características adequadas para a utilização como fonte de glicose para produção de etanol celulósico, o que permitiu que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* realizasse o consumo da glicose bem como a produção de etanol durante a fermentação.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. et al. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 1411-1419, 2009.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- AMANDE, T. et al. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 59-62, 2013.
- ANDRIĆ, P. et al. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 280-297, 2009.
- ARIAS, J. M. et al. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 5, p. 1222-1229, 2016.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BARBAGALLO, R. N. et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BINOD, P. et al. Industrial enzymes - present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. da. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173-181, 2015.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, D. M. de. et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.

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

CHILIVERI, S. R.; KOTI, S.; LINGA, V. R. Retting and degumming of natural fibers by pectinolytic enzymes produced from *Bacillus tequilensis* SV11-UV37 using solid state fermentation. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 559-576, 2016.

COUGHLAN, M. P. .; LJUNGDAHL, L. G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. **FEMS Symposium-Federation of European Microbiological Societies**, n. 43, p. 11-30, 1988.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DAS, A.; GHOSH, U. Solid-state fermentation of waste cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for production and characterization of cellulases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 68, n. 8, p. 714-718, 2009.

DASHTBAN, M. et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

DIAS, M. O. S. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Pulp and paper chemistry and Technology. In:_____. **Pulping chemistry and technology**. Berlim: Walter de Gruyter GmbH & Co, 2009. p. 297-333.

ELISASHVILI, V. et al. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2009.

ESPIRITO SANTO, M. C. do. **Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de- açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

- FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- FELBY, C. et al. Cellulose - water interactions during enzymatic hydrolysis as studied by time domain NMR. **Cellulose**, v. 15, p. 703-710, 2008.
- FENG, Y.; JIANG, J. X.; ZHU, L. W. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. **Forestry Studies in China**, v. 11, n. 3, p. 202-207, 2009.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions.** 2nd ed. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, T. V. et al. Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2575-2579, 2009.
- GANESH, K.; JOSHI, J. B.; SAWANT, S. B. Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 2, p. 137-141, 2000.
- GAO, Y. et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, 2013.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GIESE, E. C. et al. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 7, p. 1266-1272, 2013.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. da S. Cellulases, xylanases, b-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.
- GUPTA, V. K. et al. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.
- GURGEL, L. V. A. **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina:** preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (VI) e Cu (II)). 2007. 179 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciências exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.
- HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HAMES, B. et al. **Preparation of samples for compositional analysis**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008. 12 p. Technical Report NREL/TP-510-42620.

HARMSSEN, P. F. H. et al. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Wageningen: Wageningen UR Food & Biobased Research, 2010.

HASSUANI, S. J.; LEAL, M. R. L. V.; MACEDO, I. de C. **Biomass power generation sugar cane bagasse and trash**. Piracicaba: PNUD-CTC, 2005.

HELLE, S. S.; DUFF, S. J. B.; COOPES, D. G. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 611-617, 1993.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Agrícola) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HOANG, N. V. et al. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2015. doi:10.3389/fbioe.2015.00182.

J. RETTENMAIER & SÖHNE GMBH + CO KG. **Innovative features of JRS products**. Figure: Fibrillar structure of a cellulose fiber. Rosenberg. Disponível em: <http://www.jrs.eu/jrs_en/innovative-functionality/functions-jrs-products/>. Acesso em: 04 set. 2017.

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

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 3, p. 119-134, 2007.

KAPOOR, N. et al. Production of cellulase enzyme by chaetomium sp. using wheat straw in solid state fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1199-1206, 2010.

KIM, J.; YUN, S. Discovery of cellulose as a smart material. **Macromolecules**, v. 39, p. 4202-4206, 2006.

KIRALLY, C., LEIMER, K. H. E, ROSSELL, C. E. V. *Fermentability of hydrolyzate from sugarcane bagasse*. Report on Semester Project, March-August, 2003.

KLEMM, D. et al. **Comprehensive cellulose chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International sugar journal**, v. 106, p. 147-150, 2004.

KOGEL, K.-H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KOPPRAM, R. et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2014.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 1-10, 2009.

KRISTENSEN, J. B. et al. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 888-895, 2007.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249-272, 2016.

KURASHIMA, K. et al. Enzymatic β -glycosidation of primary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1/2, p. 87-98, 2003.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LIU, W.-J.; JIANG, H.; YU, H.-Q. Thermochemical conversion of lignin to functional materials: a review and future directions. **Green Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 4888-4907, 2015.

LOTONG, N.; SUWANARIT, P. Production of soy sauce koji mold spore inoculum in plastic bags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1224-1226, 1983.

LUCAS, R. et al. β -glucosidase from *chalaria p aradoxa* CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3698-3703, 2000.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 741-761, 1996.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New York: Prentice Hall International, 2004.

MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.

MAEDA, R. N. et al. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013.

MAITAN-ALFENAS, G. P. et al. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: a comparative study. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 670-676, 2015.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MARQUES, N. P. **Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MARYANA, R. et al. Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. **Energy Procedia**, v. 47, p. 250-254, 2014.

MAURYA, D. P. et al. Optimization of enzymatic saccharification of microwave pretreated sugarcane tops through response surface methodology for biofuel. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 992-996, 2013.

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.

MERHEB-DINI, C. et al. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 87-93, 2010.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 324-329, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosaiicyic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORANDO, L. E. N. et al. Statistical optimization of alkaline hydrogen peroxide pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic saccharification with Tween 80 using response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 4, n. 1, p. 15-23, 2014.

MORETTI, M. M. de S. et al. Fibrolytic enzyme production of *Myceliophthora thermophila* M.7.7. using inexpensive carbon sources and mineral nutrients. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 52, p. 4013-4019, 2014a.

MORETTI, M. M. de S. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p. 189-195, 2014b.

MORETTI, M. M. de S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1062-1071, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MYAT, L.; RYU, G. Optimization of enzyme dosages for hydrolysis of destarched corn fiber subjected to acid and alkaline pretreatments for improved fermentable sugar yield. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 50, p. 791-802, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2014.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARK, Y. C.; KIM, J. S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 47, p. 31-35, 2012.

PEREIRA, J. de C. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes produtores de celulases e xilanases e aplicação dos extratos enzimáticos na sacarificação**. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

PEREIRA, J. de C. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PEREIRA, J. de C. et al. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122-129, 2016.

PIROTA, R. D. P. B.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013.

QING, B. Y. Q.; WYMAN, C. E. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5941-5951, 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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

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.

RIBEIRO, R. D. X. et al. Capim-tanzânia ensilado com níveis de farelo de trigo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 631-640, 2008.

RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. et al. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and uorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 249-257, 2001.

ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Ed. Unicamp, 2005.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.

SCHEUFELE, F. B. et al. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 310-321, 2012.

SCHWARTZ, S. A commonwealth within itself. the early brazilian sugar industry, 1550-1670. **Revista de Indias**, v. 65, n. 233, p. 79-116, 2005.

SILVA, V. de C. T. da et al. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and β -glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 2016. doi:10.1155/2016/9781216.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.

SINDHU, R. et al. Physicochemical characterization of alkali pretreated sugarcane tops and optimization of enzymatic saccharification using response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 62, p. 362-368, 2014.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713-728, 2014.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SLUITER, A. et al. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008a. 11 p. Technical report NREL/TP-510-42623.

SLUITER, A. et al. **Determination of ash in biomass**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008b. 5 p. Technical report NREL/TP-510-42622.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2012. 15 p. Technical report NREL/TP-510-42618.

SOARES, I. B. et al. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 3, p. 670-675, 2011.

SOCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SUHAS et al. Cellulose: a review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1066-1076, 2016.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016.

SUN, X. et al. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1/3, p. 119-128, 2008.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. **Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**. *Biomass and Bioenergy*, 10(5/6):367-375, 1996.

SZENGYEL, ZSOLT. **Ethanol from wood cellulose enzyme production**. Sweden: Dept. of Chemical Engineering, Lund University, 2000. Doctoral dissertation.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

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

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: _____. **Biofuels**: alternative feedstocks and conversion processes. Amsterdam: Elsevier, 2011. Chap. 7, p. 149-176.

TRAN, D.-T.; I, Y.-P.; LIN, C.-W. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 762-769, 2013.

TRIANA, C. A. R. Energetics of Brazilian ethanol: comparison between assessment approaches. **Energy Policy**, v. 39, n. 8, p. 4605-4613, 2011.

VASANTHI, N. S.; MEENAKSHISUNDARAM, P. Optimization of pectinase enzyme production by using sour orange peel as substrate in solid state fermentation. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, p. 8-13, 2012.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2016/2017**. 2016. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1884&safra=2016%2F2017&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CR>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

WANDERLEY, M. C. de A. et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448-453, 2013.

WANG, X. et al. Hydrolyzability of xylan after adsorption on cellulose: exploration of xylan limitation on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 362-370, 2016.

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

WOODWARD, J. Fungal and other beta-D-glucosidases their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 73-79, 1982.

XIAOBO, Z. et al. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from *Xylaria* sp. 2508 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 293-298, 2006.

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170-176, 2010.

XU, H.; LI, B.; MU, X. Review of alkali-based pretreatment to enhance enzymatic saccharification for lignocellulosic biomass conversion. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 32, p. 8691-8705, 2016.

XU, J. et al. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 166-173, 2014.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016.

ZANOELO, F. F. et al. Beta-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 137-143, 2004.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Z.; SONG, J.; HAN, B. Catalytic transformation of lignocellulose into chemicals and fuel products in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6834-6880, 2017.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-827, 2009.

ZHENG, Y.-K. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 529-542, 2015.

ZHUANG, X. et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p. 578-582, 2009.