

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

NATÁLIA PAGANINI MARQUES

**Produção de Celulases por Fungos Endofíticos e Aplicação das
Enzimas na Sacarificação do Bagaço de Cana-de-Açúcar**

**ARARAQUARA
2017**

NATÁLIA PAGANINI MARQUES

**Produção de Celulases por Fungos Endofíticos e Aplicação das
Enzimas na Sacarificação do Bagaço de Cana-de-Açúcar**

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

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini

ARARAQUARA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

M357p Marques, Natália Paganini
Produção de celulases por fungos endofíticos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar / Natália Paganini Marques. – Araraquara : [s.n.], 2017
151 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Daniela Alonso Bocchini

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


NATÁLIA PAGANINI MARQUES


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

Araraquara, 22 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini - Orientadora
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto


Prof^a. Dr^a. Kelly Johana Dussan Medina
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof. Dr. Jonas Contiero
Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro – SP


Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

DADOS CURRICULARES

Nome: Natália Paganini Marques

Nome em citações bibliográficas: PAGANINI MARQUES, N.;

Formação Acadêmica (2002/2006)

Engenheira Agrônoma

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Atividades acadêmicas relevantes

1. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

Cassia Pereira, Josiani; Paganini Marques, Natalia; Rodrigues, André; de Oliveira, Tássio Brito; Boscolo, Maurício; da Silva, Roberto; Gomes, Eleni; Bocchini Martins, Daniela Alonso. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015. doi:10.1111/jam.12757.

Cassia Pereira, Josiani; Travaini, Rodolfo; Bolado-Rodríguez, Silvia; Paganini Marques, Natalia; Bocchini Martins, Daniela Alonso. 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. doi:10.1016/j.biortech.2015.12.064.

Natália Paganini Marques, Josiani de Cassia Pereira, Eleni Gomes, Roberto da Silva, Angela Regina Araújo, Henrique Ferreira, André Rodrigues, Kelly Johana Dussán, Daniela Alonso Bocchini. Screening of endophytic fungi as new sources of cellulases and xylanases for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**. Manuscript Number: INDCRO-D-17-01009.

2. Participação em eventos científicos:

- 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals

Período: 28 de abril a 01 de maio de 2014

Clearwater Beach, Flórida, Estados Unidos.

Apresentação na forma de painel do trabalho “Physico-chemical characteristics of crude cellulases and xylanases produced by two endophytic fungi *Botryosphaeria* sp. AM01 and *Saccharicola* sp. EJC04. ”

- 7th international Congress on Biocatalysis.

Período: 31 agosto a 4 setembro de 2014.

Hamburg University of Technology, Germany. Book of abstracts.

M. Prearo Grimaldi; N. Paganini Marques; D. Alonso Bocchini Martins.

Co-autoria no trabalho apresentado na forma de painel "Isolation of thermophilic fungi and bioprospecting of hydrolytic and oxidative cellulolytic enzymes".

- XX Simpósio nacional de bioprocessos/ XI Simpósio de hidrólise enzimática de biomassas

Período: 01 a 04 de setembro de 2015 - Fortaleza - CE – Brasil

Josiani Cassia Pereira, Natália Paganini Marques, Olavo Micali Perrone, Eleni Gomes, Daniela Alonso Bocchini Martins.

Co-autoria no trabalho apresentado na forma de painel "Deslignificação de materiais lignocelulósicos pelo co-cultivo dos fungos *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 por fermentação em estado sólido"

- 1º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial - EnqBiotec

Período: 08 a 11 de setembro de 2015 – Ribeirão Preto - SP – Brasil

Minicurso: Planejamento Experimental e Otimização de Bioprocessos.

- 3rd Iberoamerican Congress on Biorefineries (CIAB), 4th Latin American Congress on Biorefineries and 2nd International Symposium on Lignocellulosic Materials

Período: 23 a 25 de novembro de 2015 Concepción, Chile

Apresentação na forma de painel do trabalho "Optimization studies for enhancing cellulases production by co-cultivation of two endophytic fungi and use of the enzymatic extract for sugarcane bagasse saccharification"

- VIII Simpósio de Microbiologia

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP.

Período: 15 a 19 de agosto de 2016

Apresentação na forma de painel do trabalho "Influência de parâmetros de fermentação na produção de celulasas por fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04".

- IV Simpósio de Tecnologia Sucoenergética e de Biocombustíveis

Período: 03 a 07 de outubro de 2016 Jaboticabal, Brasil

Co-autoria no trabalho apresentado na forma de painel "Aplicação de celulasas produzidas pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM 01 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

Apresentação na forma de painel do trabalho "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.

Apresentação na forma de painel do trabalho "Optimization of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse using a blend of enzymatic extracts produced by endophytic fungi *Botryosphaeria* sp. AM01 and *Saccharicola* sp. EJC04" e co-autoria e apresentação na forma de painel do trabalho "Sugarcane bagasse saccharification by cellulases from the endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. AM01".

3. Outros:

Estágio docência

Realizado junto ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, período integral, na Disciplina Bioquímica (Anual), turma prática P3.

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

Número de horas do estágio de docência: 4h/semana; 60h/total.

Atividades desenvolvidas: Observação e auxílio nas aulas práticas, acompanhamento dos seminários.

Regência de classe - Tema: Química dos carboidratos (4h/a).

Co-orientação de Iniciação Científica

Helena Caldas. Bolsista PIBIC IC – Reitoria. Título do Projeto: Produção de celulases por fungos endófitos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana de açúcar *in natura* e submetido a pré-tratamentos. Vigência: 01/04/2016 a 31/07/2016.

*Dedico esta Tese aos meus pais João Marques e Teresinha Marques e
minha irmã Marina Marques.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, e permitir que este trabalho acontecesse.

Aos meus pais João Marques e Teresinha Marques por terem oferecido contínuo apoio todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Minha eterna gratidão.

À minha irmã Marina Marques que, junto a meus pais, é a pessoa mais importante em minha vida. Seu apoio foi essencial. Minha eterna admiração.

À Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins pela confiança, orientação, apoio e incentivo ao meu crescimento científico e intelectual.

À Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina que muito gentilmente auxiliou com os experimentos estatísticos, sempre de portas abertas para o que fosse preciso.

À amiga Josiani de Cassia Pereira Scarpa, por todos os anos de pós graduação, pelo companheirismo, parceria, ensinamentos e o essencial, a amizade.

Às amigas e companheiras de laboratório, Luana Zanchetta Tesche e Naiani Tartarine que sempre estiveram dispostas a ajudar e tornar o ambiente de trabalho um lugar agradável.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química pela condição de desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

Aos colegas e funcionários da seção de pós-graduação, que sempre se demonstraram solícitos e compreensivos ante as necessidades burocráticas que demandamos cotidianamente.

À bibliotecária Maria Isabel Uthman Sitta pela correção e orientação quanto as normas para publicação desta Tese.

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

EPÍGRAFE

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.
Nelson Mandela

RESUMO

Atualmente, há um crescente interesse na produção de bioetanol celulósico como biocombustível de segunda geração, sendo uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis. Fungos tem sido constantemente isolados na busca por novas fontes de celulases e os endofíticos são interessantes para esta finalidade, por serem potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal, incluindo celulases, e pouco estudados neste sentido. O presente estudo teve por finalidade a avaliação da influência das condições de cultivo (isolado e co-cultivo) para a produção de celulases pelos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por meio de metodologias estatísticas, além da utilização dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente com NaOH, otimizando-se também esta etapa empregando-se as ferramentas estatísticas citadas. Para a condição de co-cultivo dos fungos, a quantidade de substrato (5,7g) e a umidade inicial do substrato (60,6%) foram otimizadas visando maximizar a produção de endoglucanase (121,56 U/g). Para o cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, foi possível a produção de endoglucanase (168,99 U/g), empregando a concentração de NaNO₃ a 6,0 g/L e 5,0 g como quantidade de substrato. Para o cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04, obteve-se a condição ótima para produção de β-glicosidase (750,37 U/g) na concentração de ureia de 0,0836 g/L, teor de umidade de 49,2% e quantidade de substrato de 3,84 g. Os extratos enzimáticos obtidos sob as condições ótimas de cultivo foram utilizados na sacarificação do bagaço pré-tratado hidrotérmicamente com NaOH. A caracterização do bagaço pré-tratado indicou 59,52, 31,62 e 11,32% como teores de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. A sacarificação realizada com o extrato enzimático produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01 foi mais eficiente quanto à obtenção de glicose, sendo selecionada para os experimentos envolvendo a otimização deste processo. Sob a condição otimizada de sacarificação (carga de bagaço a 18,82%, carga de enzima de 410,71 U totais de endoglucanase, 50 °C, 280 rpm e 24h) obteve-se a concentração máxima de glicose de 8,05 mg/mL. Quanto à presença de inibidores de fermentação no hidrolisado obtido sob condições otimizadas, observou-se a presença de ácido vanílico e ácido ferúlico nas concentrações de 0,111 e 0,054 g/L respectivamente. Não foi detectada a presença de 5-Hidroximetilfurfural, furfural, ácido siringico e ácido cumárico. Sendo baixas as concentrações dos inibidores presentes no hidrolisado, este apresenta potencial para ser utilizado em processos de fermentação alcoólica. Destaca-se a importância dos resultados obtidos como pesquisa básica, uma vez que não são relatados na literatura estudos quantitativos da produção de celulases pelos gêneros estudados.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, celulases, biomassa vegetal, bagaço de cana, hidrólise.

ABSTRACT

There is a great interest in the production of cellulosic bioethanol as second generation biofuel and it is a promising alternative to fossil fuels. Fungi have been constantly isolated in the search for new sources of cellulases and the endophytes interesting for this purpose, being potential producers of plant material degrading enzymes, including cellulases, and underexploited in this sense. The present study had as purpose the optimization of culture conditions (monoculture and co-cultivation) for the production of cellulases by the endophytic fungi *Botryosphaeria* sp. AM01 and *Saccharicola* sp. EJC04, by statistics methodology, and also the use of enzymatic extracts in saccharification of sugarcane bagasse submitted to hydrothermal pretreatment with NaOH, optimizing this step using those statistical tools. For the fungi co-cultivation, the amount of substrate (5.7g) and the substrate initial moisture (60.6%) were optimized to maximize the production of endoglucanase (121.56 U/g). For the monoculture of *Botryosphaeria* sp. AM01, it was possible to produce endoglucanase (168.99 U/g), using the concentration of NaNO₃ at 6.0 g/L and 5.0 g as substrate amount. For the monoculture of *Saccharicola* sp. EJC04, the optimal condition for β -glucosidase production (750.37 U/g) was obtained using urea at 0.0836 g/L, initial substrate moisture at 49.2% and substrate amount of 3.84 g. The enzymatic extracts obtained under optimized conditions were used in the saccharification of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pretreatment with NaOH. The pre-treated bagasse characterization indicated 59.52, 31.62 and 11.32% as the contents of cellulose, hemicellulose and lignin, respectively. The saccharification performed with the enzymatic extract produced by *Botryosphaeria* sp. AM01 was more efficient in glucose obtainment, being selected for the experiments involving the optimization of this process. Under the optimized saccharification condition (18.828% bagasse load, enzyme loading of 410.71 total U of endoglucanase, at 50 °C, 280 rpm and 24h) the maximum glucose concentration of 8.05 mg/mL was obtained. Regarding the presence of fermentation inhibitors in the hydrolyzate, it was detected the presence of ferulic acid and vanillic acid at the concentrations of 0.111 and 0.054 g/L, respectively. The presence of 5-Hydroxymethylfurfural, furfural, syringic acid and coumaric acid was not detected. Since the concentrations of inhibitors present in the hydrolyzate are low, it has potential to be used in alcoholic fermentation processes. This study highlights the importance of the results obtained as basic research, since quantitative studies of cellulases production by the studied genus are not reported in literature.

Keywords: Endophytic fungi, cellulases, biomass, sugarcane bagasse, hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de estrutura dos constituintes dos resíduos lignocelulósicos..	25
Figura 2 - Representação de uma cadeia de celulose.	26
Figura 3 - A rede de ligações de hidrogênio em microfibrilas de celulose.	27
Figura 4 - Esquema representativo da fibra de celulose.	27
Figura 5 - Estrutura química dos compostos de hemicelulose com cadeia principal formada por xilana (A) e glicomanana (B).	28
Figura 6 - Principais componentes da hemicelulose de madeiras macias: glicomananas e xilanas.	29
Figura 7 - Estrutura de arabino 4-O-metilglicuronoxilana presente em madeiras macias.	30
Figura 8 - Estrutura da O-acetil-4-O-metilglucoronoxilana.	30
Figura 9 - Estrutura dos álcoois a partir dos quais a lignina é sintetizada e suas subunidades.	31
Figura 10 - Fragmento de lignina apresentando as ligações C-O e C-C tipicamente presentes em sua estrutura nativa.	32
Figura 11 - Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano.	35
Figura 12 - Representação esquemática de uma celulase.	36
Figura 13 - Arranjo de partículas de substrato sólido úmido e fase gasosa contínua em sistemas de FES envolvendo um fungo filamentoso.	37
Figura 14 - Representação dos efeitos mais comuns do pré-tratamento na matriz lignocelulósica.	45
Figura 15 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para atividade de endoglucanase e β -glicosidase pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	64
Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento DCCR, na atividade de endoglucanase e β -glicosidase obtidas pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	68
Figura 17 - Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase e β -glicosidase obtidas pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04 em função das variáveis teor de umidade e quantidade de substrato.	70
Figura 18 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis teores de umidade inicial e quantidade de substrato no DCCR para a máxima atividade de endoglucanase pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	71

Figura 19 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para produção de endoglucanase e β -glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	75
Figura 20 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no DCCR, para produção de endoglucanase e β -glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	79
Figura 21 - Superfícies de resposta obtidas para os efeitos da concentração de NaNO_3 e da quantidade de substrato nas atividades de endoglucanase e β -glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	81
Figura 22 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis concentração de NaNO_3 e quantidade de substrato no DCCR para máxima atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	82
Figura 23 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para produção de endoglucanase e β -glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04.....	85
Figura 24 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no DCCR, para produção de endoglucanase e β -glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04.....	89
Figura 25 - Superfícies de resposta obtidas para os efeitos da concentração de ureia e quantidade de substrato na atividade de endoglucanase e quantidade de substrato e teor de umidade na atividade de β -glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	92
Figura 26 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis concentração de ureia, teor de umidade inicial e quantidade de substrato no DCCR para a máxima atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	93
Figura 27 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis nas atividades de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições otimizadas.....	98
Figura 28 - Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do pH e temperatura sobre as atividades de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições otimizadas.....	100
Figura 29 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , na atividade de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições otimizadas.....	101
Figura 30 - Efeito do pH e temperatura sobre a estabilidade de celulases produzidas pelo isolado <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	103
Figura 31 - Efeito da concentração de glicose e etanol na atividade de β -glicosidase produzida por <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições otimizadas.....	105
Figura 32 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	111

- Figura 33** - Superfície de resposta obtida para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato produzido pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01. 113
- Figura 34** - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima endoglucanase na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas..... 114
- Figura 35** - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo cultivo do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições otimizadas. 118
- Figura 36** - Superfícies de resposta obtidas para concentração de glicose em função das variáveis agitação e temperatura, tempo e temperatura, tempo e agitação na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições ótimas. 120
- Figura 37** - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade para concentração de glicose em função das variáveis temperatura, agitação e tempo na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas. 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores utilizados em cada nível dos delineamentos fatoriais fracionados.....	53
Tabela 2 - 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 endoglucanase e β -glicosidase.	57
Tabela 3 - Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 , empregado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.	60
Tabela 4 - Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , empregado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.	60
Tabela 5 - Ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , em níveis codificados e reais (entre parênteses), para a produção de celulases pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo como resposta as atividades enzimáticas de celulases.	63
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para a atividade de endoglucanase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	65
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para a atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	65
Tabela 8 - Estimativa da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas, no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , ao nível de confiança de 90%, sobre as atividades de celulases obtidas pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	66
Tabela 9 - Ensaios do DCCR, em níveis codificados e reais (entre parênteses), empregado para o co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo-se como resposta a atividade de celulases.	67
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de endoglucanase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	69
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.	69
Tabela 12 - Ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , em níveis codificados e reais (entre parênteses), para a produção de celulases pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo como respostas as atividades enzimáticas de celulases.	74
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para a atividade de endoglucanase obtida pelo, obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.	76

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2 ⁸⁻⁴ , para a atividade de β-glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	76
Tabela 15 - Estimativa da porcentagem dos efeitos das variáveis estatisticamente significativas ao nível de confiança de 90% na atividade de celulases pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	77
Tabela 16 - Ensaio do DCCR, em níveis codificados e reais (entre parênteses), empregado para o cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo-se como resposta a atividade de celulases.....	78
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	80
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de β-glicosidase obtidas pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	80
Tabela 19 - Ensaio do planejamento fatorial fracionado 2 ⁸⁻⁴ , em níveis codificados e reais (entre parênteses), para a produção de celulases pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04, obtendo como resposta a atividade de celulases.....	84
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2 ⁸⁻⁴ , para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04.....	86
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2 ⁸⁻⁴ , para a atividade de β-glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04.....	86
Tabela 22 - Estimativa da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas, ao nível de confiança de 90%, no planejamento fatorial fracionado 2 ⁸⁻⁴ , sobre as atividades de celulases obtidas pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	87
Tabela 23 - Ensaio do DCCR, em níveis codificados e reais (entre parênteses), empregado para o cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04 por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo-se como resposta a atividade de celulases.....	88
Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	90
Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de β-glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	90
Tabela 26 - Planejamento fatorial do tipo face centrada 2 ² , valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura e atividades relativas de celulases no extrato enzimático otimizado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	97
Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática de endoglucanase presente no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01, sob condições otimizadas para a produção de endoglucanase.....	99

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática de β -glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01, sob condições otimizadas para a produção de endoglucanase.	99
Tabela 29 - Composição (%) do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado.....	108
Tabela 30 - Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino, utilizando-se os extratos enzimáticos obtidos pelo cultivo dos fungos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04 sob condições otimizadas.....	95
Tabela 31 - Planejamento fatorial do tipo DCCR, com valores codificados e reais das variáveis carga de bagaço de cana-de-açúcar e enzima empregado nos experimentos de otimização da sacarificação, utilizando-se extrato enzimático de <i>Botryosphaeria</i> sp AM01.	110
Tabela 32 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose obtida na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01.....	112
Tabela 33 - Planejamento fatorial do tipo face centrada 2 ³ com valores codificados e reais das variáveis temperatura, agitação e tempo empregado na otimização da sacarificação utilizando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições ótimas de cultivo.	117
Tabela 34 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose obtida na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições ótimas.	119
Tabela 35 - Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica dos extratos enzimáticos dos planejamentos fatoriais fracionados para as condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	127
Tabela 36 - Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica de celulasas dos extratos enzimáticos nos delineamentos compostos centrais para as condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	128
Tabela 37 - Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica de celulasas dos extratos enzimáticos otimizados para as condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>Saccharicola</i> sp. EJC04.....	129

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Resíduo lignocelulósico	25
2.1.1 Celulose	26
2.1.2 Hemicelulose.....	28
2.1.3 Lignina	31
2.2 Celulases	32
2.2.1 Complexo celulolítico microbiano.....	34
2.2.2 Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido (FES).....	36
2.2.3 Fatores que afetam a produção de celulases por FES	40
2.3 Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos e sacarificação enzimática da celulose.....	43
2.4 Fatores que afetam a sacarificação enzimática da celulose	47
3 OBJETIVOS	50
3.1 Geral	50
3.2 Específicos.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Microrganismos.....	51
4.2 Produção de celulases, por FES, em cultivos isolados ou co-cultivo.....	51
4.2.1 Delineamentos experimentais.....	52
4.2.1.1 Planejamento fatorial fracionado.....	52
4.2.1.2 Delineamento composto central rotacional	54
4.3 Determinação das atividades enzimáticas	54
4.3.1 Endoglucanase	54
4.3.2 β -glicosidase	55
4.3.3 Fpase	56
4.4 Caracterização físico-química das celulases	56
4.4.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas	57
4.4.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas	57
4.4.3 Efeito de glicose e etanol sobre a atividade de β -glicosidase	58
4.5 Determinação da concentração de proteínas totais	58
4.6 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino do bagaço de cana-de-açúcar	58

4.7 Caracterização química dos bagaços in natura e pré-tratado.....	58
4.8 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	59
4.8.1 Delineamentos experimentais empregados nos experimentos de sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado.....	59
4.9 Análise Estatística.....	60
4.10 Análise de açúcares e inibidores presentes nos hidrolisados, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Delineamento experimental fatorial fracionado empregado no co-cultivo para a produção de celulasas	62
5.2 Delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) empregado no co-cultivo para a produção de celulasas	67
5.3 Delineamento experimental fatorial fracionado empregado no cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 para a produção de celulasas	74
5.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR) empregado no cultivo isolado de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 para a produção de celulasas.....	78
5.5 Delineamento experimental fatorial fracionado empregado no cultivo isolado de <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04 para a produção de celulasas	84
5.6 Delineamento composto central rotacional (DCCR) empregado no cultivo isolado de <i>Saccharicola</i> sp. EJC04 para a produção de celulasas.....	88
5.7 Sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado.....	95
5.8 Caracterização físico-química de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 sob condições otimizadas.....	97
5.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas	97
5.8.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas	103
5.8.3 Efeito de glicose e etanol sobre a atividade de β -glicosidase	105
5.9 Pré-tratamento e caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar ...	108
5.10 Avaliação dos parâmetros da sacarificação enzimática.....	110
5.10.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliação dos parâmetros carga de bagaço de cana e carga de enzima	110
5.10.2 Delineamento do tipo face centrada para otimização dos parâmetros temperatura, agitação e tempo de sacarificação	116
5.11 Análise de inibidores de fermentação	124

6 CONCLUSÕES	126
APÊNDICE	127
REFERÊNCIAS	130

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda mundial de energia e conseqüente aumento no consumo de combustíveis derivados do petróleo conduzem à busca por fontes renováveis de energia, como os biocombustíveis, incluindo os de segunda geração produzidos a partir de resíduo lignocelulósico (NANDA; MOHAMMAD; REDDY, 2014). A utilização de biocombustíveis resulta em menores impactos ambientais quando comparada ao uso dos combustíveis fósseis. O emprego de resíduo lignocelulósico como matéria-prima parece ser a chave para um fornecimento contínuo de combustíveis renováveis (YUE; YOU; SNYDER, 2014), sem concorrência direta com culturas utilizadas para alimentação (BRETHAUER; STUDER, 2015). O Brasil ocupa uma posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento de resíduo lignocelulósico para a geração de biocombustíveis de segunda geração, por apresentar grande potencial de cultivo de matérias-primas renováveis, culturas agrícolas de grande extensão (destaque para a indústria da cana-de-açúcar), a maior biodiversidade do planeta, intensa radiação solar, água em abundância, diversidade de clima e pioneirismo na produção de bioetanol (SANTOS; BORSCHIVER; COUTO, 2011) e (Centro..., 2010).

Atualmente, há um crescente interesse na produção de bioetanol celulósico como biocombustível de segunda geração, sendo uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis (FERNANDES et al., 2015). Apesar das diversas vantagens ambientais decorrentes do emprego do etanol celulósico, a eficiente degradação enzimática da celulose em glicose representa o principal gargalo a ser superado para a viabilização da produção e comercialização deste biocombustível (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

A heterogeneidade da parede vegetal, a recalcitrância da lignina e da celulose são os principais fatores limitantes da hidrólise enzimática da celulose. Pode, ainda, haver adsorção improdutiva das celulasas à lignina e, além disso, a associação deste polímero à celulose pode impedir o intumescimento das fibras, dificultando ainda mais a hidrólise (KUMAR et al., 2012). Assim, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, a fim de diminuir a cristalinidade da celulose e de remover a lignina, facilitando o acesso e a ação das celulasas sobre seu substrato (GALBE; ZACCHI, 2012). Em geral, os métodos de pré-tratamento se dividem em quatro categorias diferentes, incluindo físico, químico, físico-químico e biológico (MOOD et al., 2013). O

pré-tratamento hidrotérmico alcalino apresenta algumas vantagens em relação aos demais como a remoção de lignina e dos grupos acetil, os quais dificultam o acesso das celulasas à celulose, durante a sacarificação enzimática (LI; HYUN; NGHIEM, 2010). Este método também é conhecido por causar um inchaço químico na fibra de celulose (MOSIER et al., 2005), removendo a lignina presente na biomassa lignocelulósica, aumentando a reatividade dos polissacarídeos restantes, além de remover os grupos acetil e os ácidos urônicos das hemiceluloses, conseqüentemente aumentando a porosidade do resíduo (SUN; CHENG, 2002). Mais especificamente, a ligação de éster entre a lignina e hemicelulose são interrompidas levando a deslignificação (MCINTOSH; VANCOV, 2010). As vantagens deste pré-tratamento incluem a utilização de temperaturas e pressões mais baixas e em menores tempos em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento sendo que os resultados obtidos dependem diretamente da natureza do resíduo, sobretudo seu teor de lignina (MOOD et al., 2013). Os hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são os reagentes mais utilizados em pré-tratamento alcalino. Entre estes, o hidróxido de sódio (NaOH) recebe a maior atenção devido à sua excelente capacidade de deslignificação, o que é essencial para a alta digestão do resíduo (VARG; SZENGYEL; RÉCZEY, 2002).

Uma vez selecionado o método de pré-tratamento, é importante a obtenção de um extrato enzimático de baixo custo, contendo as atividades das principais enzimas do complexo celulolítico: endo e exoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases, as quais atuam sinergicamente na degradação da celulose (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010).

As endoglucanases ou carboximetilcelulasas (CMCases) atuam em regiões de baixa cristalinidade (ou amorfas) das cadeias de celulose, liberando glicooligossacarídeos, diminuindo o grau de polimerização da celulose e fornecendo mais extremidades para a ação das exoglucanases. As exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) hidrolisam as ligações glicosídicas a partir das extremidades redutoras (CBH I) e não redutoras (CBH II) das cadeias de celulose, liberando unidades de celobiose e as β -glicosidases hidrolisam a celobiose, liberando glicose (HAMID; ISLAM; DAS, 2015).

Fungos tem sido constantemente isolados na busca por novas fontes de enzimas hidrolíticas (GUPTA et al., 2015; ROBL et al., 2013a). Os fungos endofíticos estão entre os potencialmente mais interessantes para esta finalidade. Representam

um grupo de organismos muito diversificado e estão presentes na maioria (se não em todas) das plantas de ecossistemas, sem provocar sintomas externos (CORRÊA et al., 2014). São considerados uma excelente fonte de novos compostos naturais bioativos (GUO et al., 2008) e, recentemente, tem despertado interesse por serem potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal, incluindo celulasas (BORGES et al., 2009). Além disso, estudos envolvendo prospecção enzimática pelo cultivo dos fungos endofíticos por fermentação em estado sólido (FES) são pouco frequentes na literatura, especialmente em relação às celulasas, e abordam apenas a produção por alguns gêneros mais estudados (KAPOOR et al., 2010). Desta forma, tais fungos representam uma valiosa fonte de material biológico a ser explorada para a produção de enzimas de degradação de material vegetal (CORRÊA et al., 2014).

FES tem sido definida como o cultivo de microrganismos em substratos sólidos e úmidos, na ausência de uma fase aquosa livre (HOLKER; LENZ, 2005; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013; YAZID et al., 2017). É um processo biotecnológico interessante para a produção de várias substâncias por fungos, tais como antibióticos, enzimas, pigmentos, antioxidantes, agentes anti-tumorais, biosurfactantes e peptídeos bioativos (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). É um processo vantajoso quando comparado à fermentação submersa em alguns aspectos, incluindo rendimentos mais elevados em um tempo mais curto (concentração mais elevada de produtos) e redução de custos pela possibilidade do emprego de resíduos lignocelulósicos baratos e amplamente disponíveis (GHOSHAL; BASU; SHIVHARE, 2012; NARRA et al., 2012).

Os fungos filamentosos são considerados os microrganismos mais adequados para processos de FES, incluindo a produção de enzimas, uma vez que são capazes de se adaptar a uma grande variedade de substratos, suas hifas podem crescer na superfície das partículas e também penetrar nos espaços intra-partículas, colonizando o substrato sólido através da produção de uma grande variedade de enzimas (MIENDA; IDI; UMAR, 2011).

Além do cultivo isolado dos fungos para produção de enzimas (monoculturas), uma condição muito interessante a se estudar é o co-cultivo (culturas mistas). O co-cultivo de fungos que apresentam semelhantes condições de cultivo e necessidades nutricionais proporciona vantagens econômicas devido à redução no custo geral de produção. Pode ser empregado, por exemplo, quando se trabalha com fungos que

diferem na capacidade de produção das enzimas do complexo celulolítico, a fim de se obter um único extrato com atividades satisfatórias das celulases de interesse. A cultura mista de microrganismos já é utilizada para obtenção de enzimas, além de aminoácidos, vitaminas e antibióticos (KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016; LIMA et al., 2016; VINOGRADOVA; KUSHNIR, 2003).

A otimização das condições de cultivo é também uma estratégia interessante para a melhoria da produção de enzimas (SAINI et al., 2015). Diversos fatores influenciam a produção de enzimas pelos microrganismos, tanto quando cultivados isoladamente quanto na condição de co-cultivo. Estes fatores incluem temperatura e tempo de cultivo, pH e teor de umidade do meio, fontes de nitrogênio, quantidade de substrato e de inóculo, entre outros (JADON et al., 2013). Desta forma, a otimização das condições de cultivo se torna essencial para uma maior produção enzimática relevante.

A utilização de metodologias de planejamento experimental contribui para a otimização da produção de enzimas por microrganismos, determinando os fatores que influenciam esta produção, bem como a influência de suas interações (RODRIGUES; IEMMA, 2014). As principais vantagens destas metodologias são a diminuição do número de ensaios, o estudo de um número considerável de fatores, a detecção das interações entre os fatores, a estimativa dos níveis ótimos, além da melhoria da precisão dos resultados (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Diversos métodos estatísticos estão disponíveis para otimização de processos e a escolha do método depende de uma análise profunda (busca na literatura) das variáveis envolvidas nos experimentos, a faixa de estudo de cada variável selecionada e as respostas de interesse (TAHARA; HENRIQUE ROZENFELD, 2014).

Celulases abrangem uma ampla área no mercado global de enzimas de importância industrial e são consideradas a terceira maior classe de enzimas utilizadas industrialmente (YOON et al., 2014). Dentre as diversas aplicações, sua utilização na sacarificação enzimática do resíduo lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentescíveis e produção de etanol de segunda geração (ou etanol 2G) tem se destacado nos últimos anos (SRIVASTAVA et al., 2015). As principais vantagens da hidrólise enzimática em relação à química são as condições moderadas de temperatura e pressão, o que diminui a demanda no consumo de energia, e pouca

ou nenhuma produção de subprodutos tóxicos, devido à alta especificidade enzimática (OGEDA; PETRI, 2010).

Diversos fatores influenciam a eficiência da sacarificação enzimática. Entre eles destacam-se concentrações de substrato e de enzima, temperatura e tempo de hidrólise, além da agitação (DAS et al., 2015). A metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* – RSM) é uma técnica estatística utilizada para modelagem e otimização de múltiplas variáveis e determina as melhores condições do processo estudado, sendo utilizada com sucesso para a otimização da sacarificação enzimática de diversas biomassas lignocelulósicas, visando a maximização da obtenção de açúcares fermentescíveis (BHAGWAT; GIRMA; KUMAR, 2016; MAURYA et al., 2013; NEIFAR et al., 2016; PANDIYAN et al., 2014).

Considerando-se o exposto, pelo presente são apresentados os resultados referentes à otimização da produção de endoglucanase e β -glicosidase, pelo cultivo isolado (monoculturas) e pelo co-cultivo (cultura mista) de dois fungos endofíticos, *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04. Tais fungos se destacaram na produção destas enzimas, quando cultivados como monoculturas em trabalhos anteriores. Bagaços de cana *in natura* e submetido a pré-tratamento alcalino foram caracterizados quanto à celulose, hemicelulose e lignina total (lignina ácida solúvel e lignina ácida insolúvel). O bagaço pré-tratado foi sacarificado utilizando-se os extratos enzimáticos obtidos sob condições otimizadas. O extrato produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01, sob as condições otimizadas para a produção de endoglucanase, foi selecionado e empregado em experimentos de otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado. Nesta etapa foram otimizadas as variáveis carga de substrato e carga de enzima, temperatura, tempo e agitação, utilizando-se metodologias de planejamento experimental e superfície de resposta. Os hidrolisados obtidos foram avaliados em relação à conversão da celulose e xilana a seus respectivos monômeros, e também quanto à presença de inibidores de fermentação.

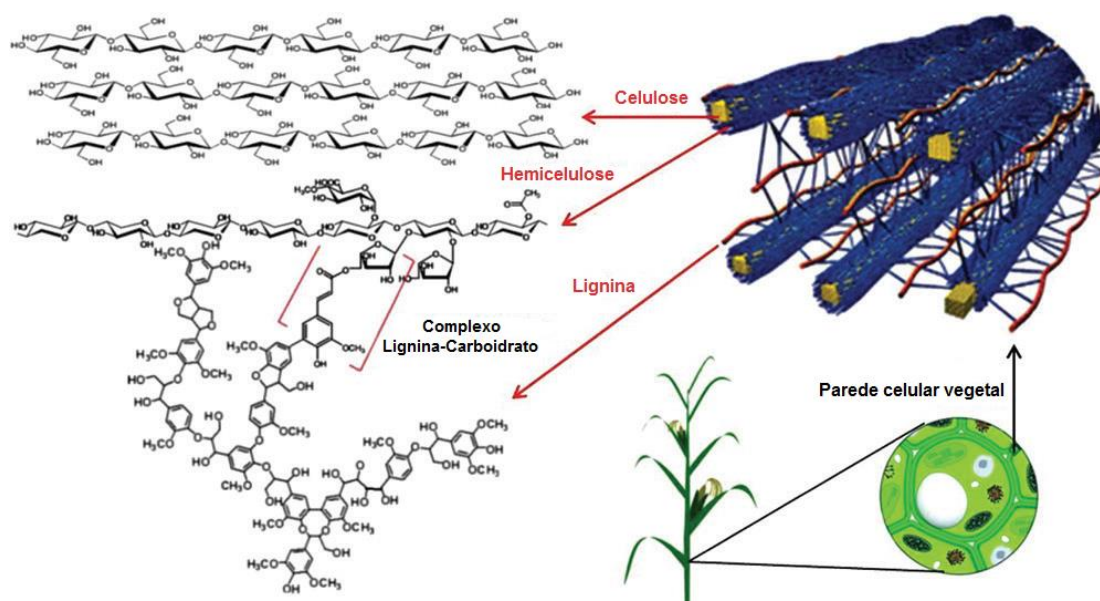
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduo lignocelulósico

O resíduo lignocelulósico representa um recurso promissor a ser utilizado como fonte de energia renovável e as pesquisas nesta área tem sido impulsionadas pela possibilidade de esgotamento dos combustíveis fósseis, bem como pelos efeitos adversos que a queima destes causam ao ambiente (RODRÍGUEZ et al., 2011). Esta biomassa inclui resíduos agrícolas, resíduos florestais, resíduos sólidos municipais e resíduos industriais (VOLYNETS; EIN-MOZAFFARI; DAHMAN, 2017). Além da disponibilidade em larga escala e do baixo custo, a utilização dos resíduos lignocelulósicos viabiliza o desenvolvimento de novas tecnologias, representando uma das mais importantes alternativas à consolidação de um modelo sustentável para a produção de combustíveis renováveis (ZHOU et al., 2011).

A lignocelulose (Figura 1), principal componente destes resíduos, é constituída por celulose (33-55%), hemicelulose (13-33%) e lignina (13-32%) (KIM; LEE; KIM, 2016), representando até 90% do peso seco total, sendo a massa restante atribuída a cinzas, proteínas estruturais e extrativos (BALAT, 2011).

Figura 1 - Modelo de estrutura dos constituintes dos resíduos lignocelulósicos.



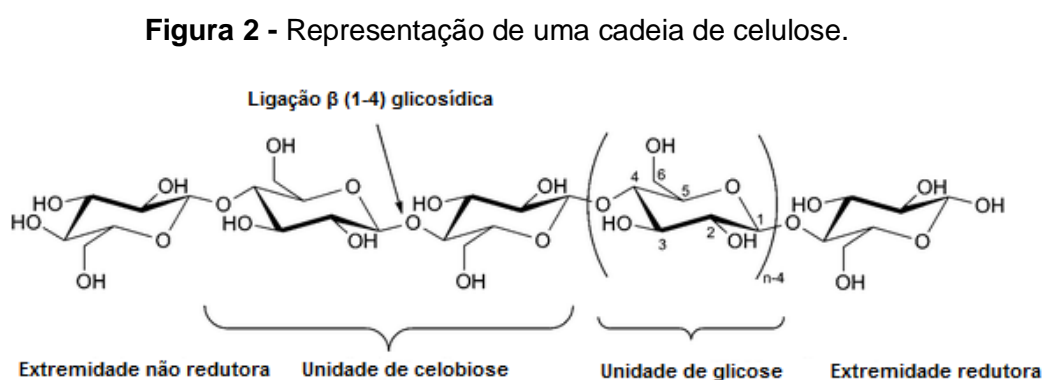
Fonte: Adaptado de Volynets; Ein-Mozaffari; Dahman (2017).

Estruturalmente, os componentes dos resíduos lignocelulósicos estão arranjados de forma que as microfibrilas de celulose e também a hemicelulose são envoltas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactadas por meio de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, que promovem a rigidez da planta (HORN et al., 2012). Os complexos de lignina-carboidratos, entre lignina e hemicelulose formados através de ligações éster e éter entre os ácidos *p*-cumárico e ferúlico, desempenham um papel importante na recalcitrância da biomassa (BURANOV; MAZZA, 2008). Celulose e hemicelulose estão interligadas por meio de ligações de hidrogênio. Além disso, ligações covalentes, principalmente ligações de éter, tem sido propostas estar presentes entre celulose e lignina (JIN et al., 2006; ZHANG et al., 2015a).

As estruturas das paredes celulares vegetais são de natureza altamente complexa e variam significativamente de biomassa para biomassa.

2.1.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear com fórmula molecular $(C_6H_{12}O_6)_n$, constituído de 7.000 a 15.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (BRETHAUER; STUDER, 2015). As unidades de glicose combinam-se para formar um dissacarídeo conhecido como celobiose, que é uma unidade fundamental da celulose (Figura 2).

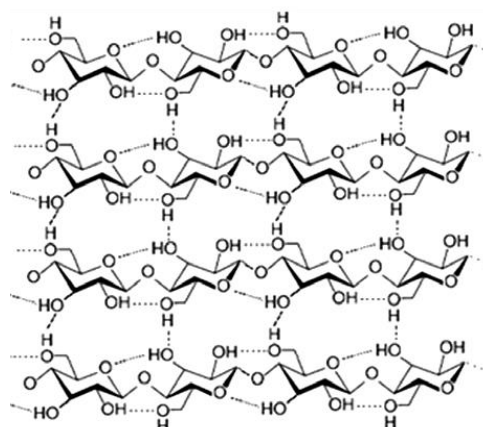


Fonte: Adaptado de Eyley e Thielemans (2014).

A estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que resulta na agregação das cadeias celulósicas em “microfibrilas elementares” (Figura 3). Na

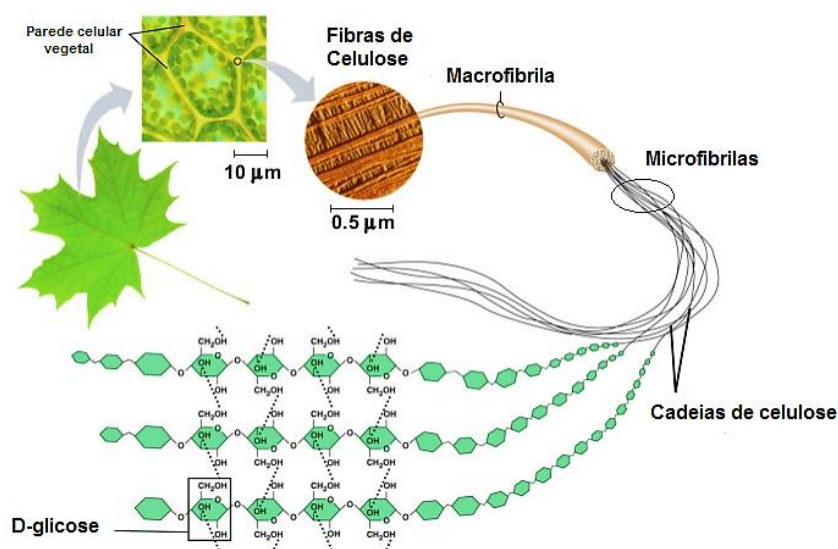
estrutura das microfibrilas são relatados dois tipos de regiões, denominadas cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas são altamente ordenadas e estruturadas e as regiões amorfas apresentam estruturas menos ordenadas (HAMID; ISLAM; DAS, 2015). Ao conjunto de microfibrilas denomina-se *macrofibrilas*, as quais são organizadas em lamelas para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal (Figura 4).

Figura 3 - A rede de ligações de hidrogênio em microfibrilas de celulose.



Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2015)

Figura 4 - Esquema representativo da fibra de celulose.



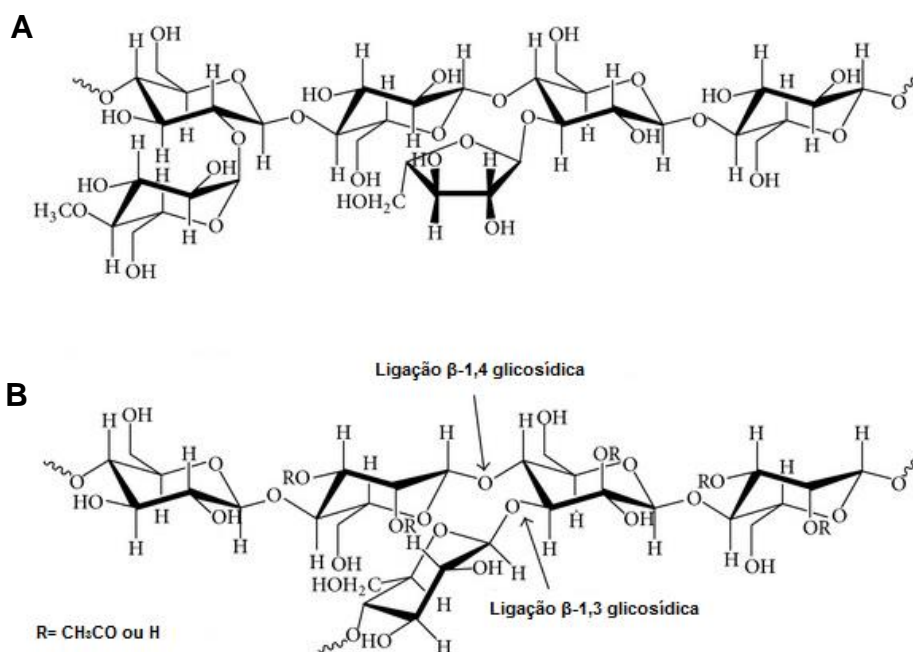
Fonte: Adaptado de Barley e Fitzpatrick (2011).

Devido a sua alta massa molecular a e à baixa flexibilidade das cadeias no polímero, a celulose é insolúvel em água (a solubilidade geralmente é inversamente relacionada ao comprimento do polímero). As ligações de hidrogênio intermoleculares e as superfícies planas e inferiores hidrofóbicas permitem as interações de van der Waals entre as fibrilas, contribuindo para a insolubilidade do polímero na água e na maioria dos solventes orgânicos (BRANDT et al., 2013).

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é composta por heteropolímeros com vários graus de ramificação, constituídos por cinco monômeros diferentes: D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e D-glicose (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). São geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar mais frequente em sua cadeia principal, sendo a xilose e a manose os mais encontrados (Figura 5). Dependendo da espécie da planta, do estágio de desenvolvimento e do tipo de tecido, podem ser encontradas diversas subclasses de hemiceluloses, incluindo glicuronoxilanas, arabinoxilanas, mananas lineares, glucomananas, galactomananas, galactoglicomananas, h-glicanas e xiloglicanas (WYMAN et al., 2005).

Figura 5 - Estrutura química dos compostos de hemicelulose com cadeia principal formada por xilana (A) e glicomanana (B).

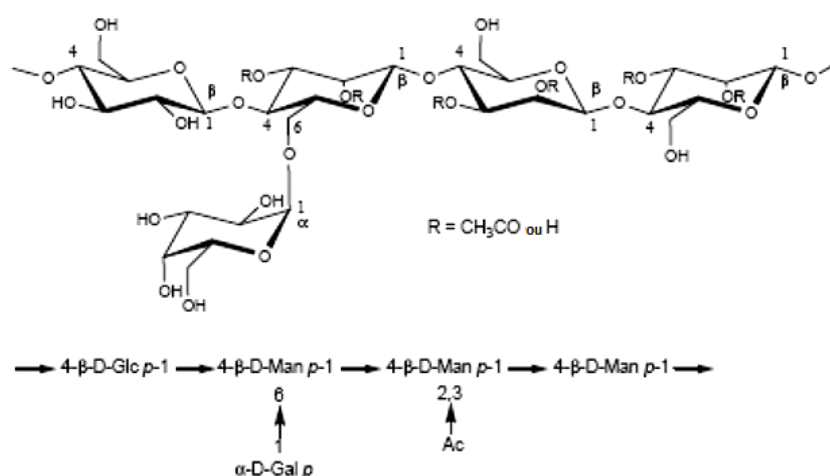


Fonte: Adaptado de Lee; Hamid; Zain (2014).

As hemiceluloses são mais suscetíveis à degradação enzimática quando comparadas com a celulose, porém algumas estruturas de hemiceluloses são recalcitrantes devido a padrões complexos de ramificação e acetilação (AGGER; VIKSØ-NIELSEN; MEYER, 2010). A hemicelulose se liga de forma não covalente à superfície das fibrilas de celulose. Atua como um material de matriz amorfa, mantendo as fibrilas rígidas de celulose unidas (HANSEN; BJÖRKMAN, 1998).

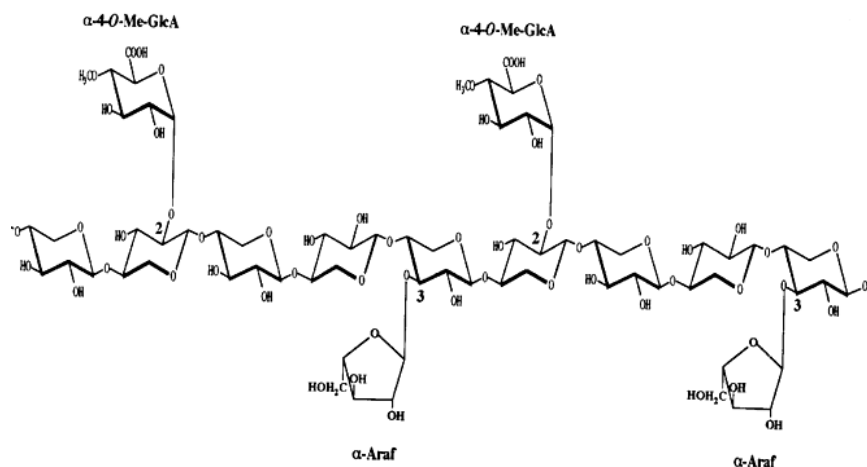
A constituição da hemicelulose varia entre os diferentes tipos de vegetais. Em madeiras macias (árvores coníferas, como os pinhos e cedros), gramíneas e cereais, a hemicelulose é constituída principalmente por glicomananas (cerca de 20%) (Figura 6) e arabinoglicuronoxilanas (cerca de 10%) (Figura 7) (TIMELL, 1967).

Figura 6 - Principais componentes da hemicelulose de madeiras macias: glicomananas e xilanas.



Fonte: Adaptado de Mäki-Arvela et al. (2011).

Figura 7 - Estrutura de arabino 4-O-metilglucuronoxilana presente em madeiras macias.

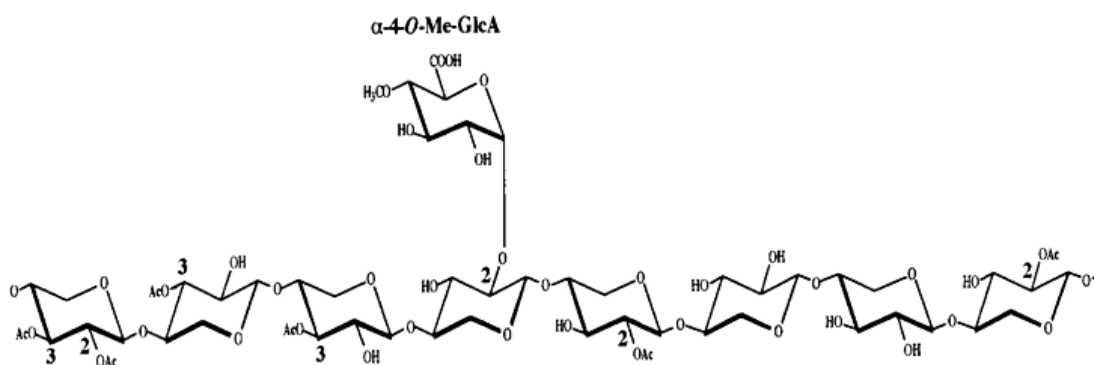


Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes.
 α -araf: arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-O-metilglucurônico.

Fonte: Adaptado de Sunna e Antranikian (1997).

Já em madeiras duras (eucaliptos e carvalhos), a hemicelulose é composta principalmente pelas xilanas (20 a 30%), sendo a O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana a majoritária (90% da composição) (Figura 8) (MÄKI-ARVELA et al., 2011).

Figura 8 - Estrutura da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana.



Os números representam os átomos de carbono em que existem grupos substituintes.
 Ac: grupo acetil; α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-O-metilglucurônico.

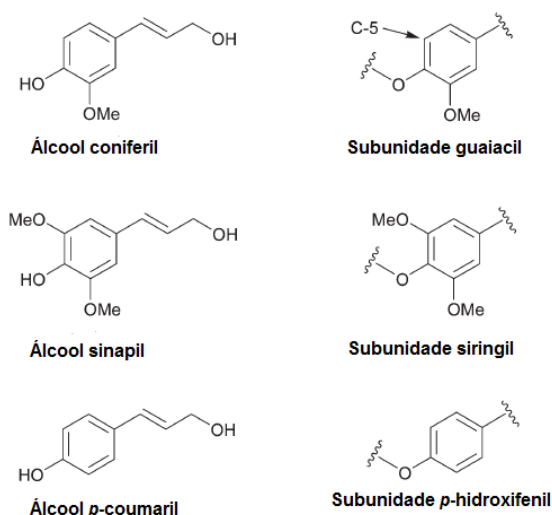
Fonte: Adaptado de Sunna; Antranikian (1997).

Devido à sua natureza não cristalina, a hemicelulose é mais suscetível à despolimerização do que a celulose (especialmente em condições ácidas) (BRANDT et al., 2013).

2.1.3 Lignina

A lignina é um polímero aromático insolúvel em água que fornece impermeabilização, reforço estrutural e resistência ao ataque biológico e físico aos tecidos vegetais. É biossintetizada a partir de três monômeros: álcool coniferílico, sinapil e *p*-coumaril (Figura 9). Uma vez incorporadas no polímero de lignina, as subunidades são identificadas pela sua estrutura de anel aromático e, portanto, chamados subunidades de guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil, respectivamente (XIAO; SUN; SUN, 2001).

Figura 9 - Estrutura dos álcoois a partir dos quais a lignina é sintetizada e suas subunidades.

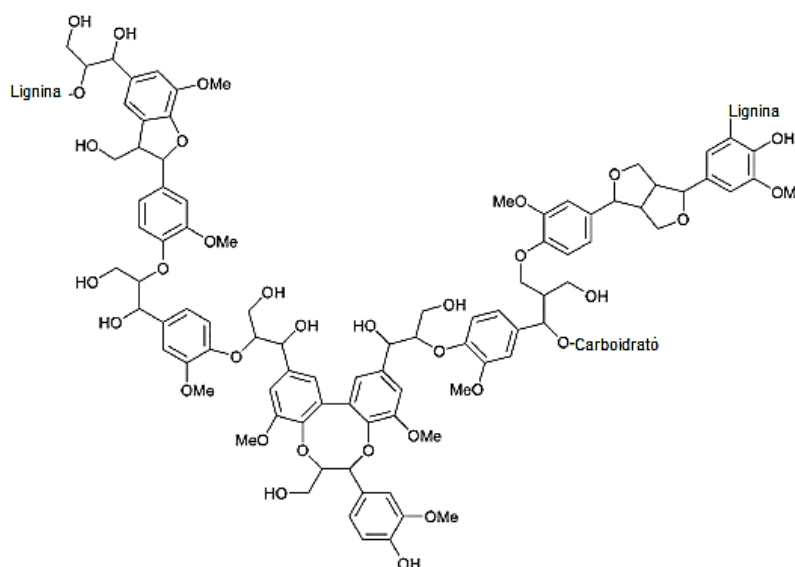


Fonte: Adaptado de Brandt et al. (2013).

O polímero de lignina contém uma ampla gama de ligações (Figura 10). A ligação mais comum é a ligação éter β -O-4. Aproximadamente 50% de todas as ligações entre subunidades são deste tipo e levam a um alongamento linear do polímero. Outras ligações como C-O e C-C estão presentes em menor abundância, e a ramificação ocorre quando a lignificação é avançada (EL HAGEt al., 2009). A lignina representa um dos principais obstáculos para um processo eficiente de hidrólise do resíduo lignocelulósico (MOSIER et al., 2005), não só impedindo o acesso das hidrolases aos seus substratos, mas também ocasionando a ligação improdutiva das celulasas (PAN et al., 2005). Isso acarreta à necessidade de maiores cargas de enzimas na hidrólise enzimática (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Na

etapa de pré-tratamento do resíduo lignocelulósico, a lignina pode ser degradada, resultando em uma variedade de compostos aromáticos que inibem hidrolases e organismos fermentativos, incluindo os ácidos orgânicos (ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido siringico e ácido cumárico) (BERLIN et al., 2006).

Figura 10 - Fragmento de lignina apresentando as ligações C-O e C-C tipicamente presentes em sua estrutura nativa.



Fonte: Adaptado de Brandt et al. (2013).

2.2 Celulases

O campo de pesquisa e desenvolvimento tem constantemente voltado iniciativas para as enzimas, resultando no surgimento de uma série de novos produtos e, ainda, na melhoria do desempenho de vários produtos já existentes. Considerando-se as vantagens ambientais e econômicas do uso das enzimas, quando comparadas com os processos químicos convencionais, estes catalisadores tornaram-se um dos principais alvos de estudos biotecnológicos nas últimas décadas (KUMAR; SHARMA, 2016; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

O mercado global de enzimas industriais atingiu quase US \$ 4,9 bilhões em 2015. A projeção para 2021 é de US \$ 6,3 bilhões (SHALINI SHAHANI DEWAN, 2017). A receita global de enzimas utilizadas na produção de biocombustíveis (incluindo amilases, lipases, celulases e proteases) totalizou US\$ 652,1 milhões em

2015 e foi estimada em US\$ 1,0 bilhão até 2020, em uma taxa de crescimento anual composta (*Compound annual growth rate* - CAGR) de 10,4% (DEWAN, 2015).

As celulasas destacam-se entre as diversas enzimas utilizadas industrialmente, sendo aplicadas nas indústrias de alimentos em processos de fermentação de álcool de grãos, fabricação de cerveja e vinhos, extração de sucos de frutas e vegetais, além de alimentação animal. São também aplicadas nas indústrias de papel e celulose, têxtil e detergentes. Nos últimos anos, o potencial dessas enzimas para sacarificar a celulose presente nos resíduos lignocelulósicos tem sido amplamente estudado, visando o uso de glicose para a produção de etanol celulósico (CAVKA et al., 2014; NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016; VISHWAKARMA; BANERJEE, 2016). Espera-se que o mercado de celulasas se expanda drasticamente quando estas enzimas forem utilizadas em processos de sacarificação de materiais celulósicos pré-tratados, cujos produtos possam ser convertidos para *commodities* como bioetanol e outros biocompostos, em larga escala (CHERRY; FIDANTSEF, 2003).

Muitos organismos, em todos os reinos, evoluíram a maquinaria enzimática necessária para a conversão de celulose em açúcares solúveis, os quais são utilizados como fonte de energia. Dada a complexidade das paredes celulares das plantas, a maioria dos organismos que degradam a celulose, bem como os demais polissacarídeos da biomassa vegetal, empregam um pool de enzimas com função sinérgica (MARTINEZ et al., 2008; MEDIEt al., 2012).

Vários microrganismos produzem celulasas, entre os quais destacam-se os fungos, considerados microrganismos dominantes na reciclagem de celulose na natureza (PAYNE et al., 2015). O isolamento de microrganismos que degradam a celulose em diferentes habitats são metodologias de crucial importância para obtenção de novas celulasas com características únicas (SHARMA et al., 2016). Atualmente, as celulasas industriais são em sua maioria produzidas a partir de fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* selvagens ou modificados geneticamente (ZHANG; ZHANG, 2013). Nos últimos anos, as pesquisas para obtenção de celulasas com maior atividade tem se intensificado pelo isolamento de novos microrganismos produtores, bem como pela identificação de proteínas denominadas expansinas, que causam afrouxamento na parede celular vegetal, permitindo que a fibra se torne mais acessível às enzimas (WILSON, 2009).

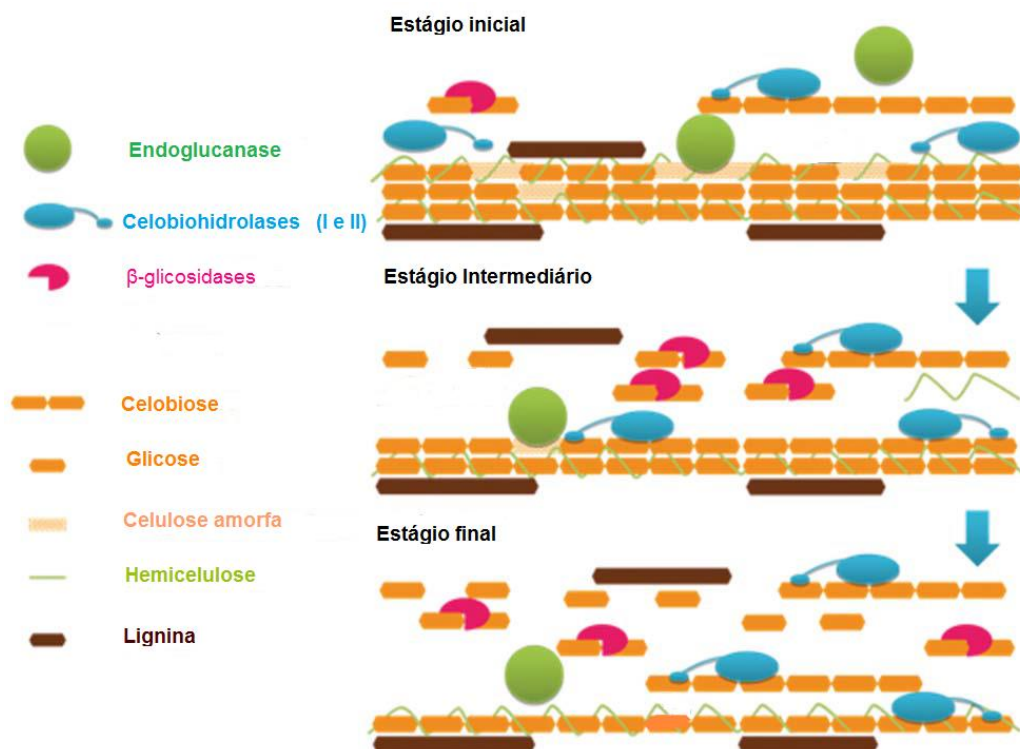
2.2.1 Complexo celulolítico microbiano

Celulases pertencem ao grupo das O-Glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-) e clivam as ligações β -1,4-glicosídicas de celulose por meio de catálise de ácido/base. São agrupadas em famílias com base na sua sequência de aminoácidos e na análise de agrupamento hidrofóbico (HENRISSAT; BAIROCH, 1993; PALOMARES-RIUS et al., 2014).

O sistema celulolítico microbiano é composto por enzimas que atuam sinergicamente e, ainda que as propriedades das enzimas variem entre as espécies, o sistema de degradação da celulose é similar (RABELO, 2010). É composto principalmente pelas hidrolases endo- β -(1,4)-glicanases (EC 3.2.1.4), exo- β -(1,4)-D-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -D-glicosidases (EC 3.2.1.21) (LYND et al., 2002; YANG et al., 2015). As β -glicosidases (BG) (EC 3.2.1.21) não são referidas, frequentemente, como celulases “reais” já que elas hidrolisam as ligações glicosídicas de oligossacarídeos solúveis ou celobiose, não atuando assim na celulose propriamente dita (RABELO, 2010).

As endoglucanases hidrolisam aleatoriamente as ligações β -1,4-glicosídicas intramoleculares da cadeia de celulose, preferencialmente em sua região amorfa, produzindo novas extremidades na cadeia. As exoglucanases clivam processualmente as cadeias de celulose, a partir das extremidades, liberando celobiose solúvel ou glicose. As β -glicosidases hidrolisam celobiose a glicose (RABINOVICH; MELNICK; BOLOBOVA, 2002). Estes três processos de hidrólise ocorrem simultaneamente, como mostrado na Figura 11. A hidrólise primária, que ocorre na superfície de substratos sólidos pela ação das endoglucanases e exoglucanases, libera açúcares solúveis na fase líquida, os quais apresentam menor grau de polimerização. A hidrólise secundária, que ocorre na fase líquida, envolve principalmente a hidrólise da celobiose a glicose pelas β -glicosidases (ZHANG; LYND, 2004).

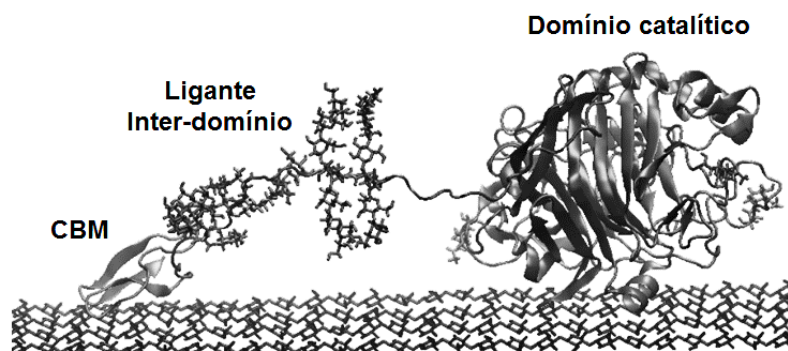
Figura 11 - Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano.



Fonte: Adaptado de Du et al. (2013).

De acordo com os conceitos modernos, a maioria das celulases fúngicas são proteínas modulares que contêm pelo menos três elementos estruturais separados com funções diferentes. Tais elementos são um domínio catalítico (*Catalytic Domain* - CD), um domínio de ligação a celulose (*Carbohydrate Binding Module* - CBM) e um ligante peptídico para manter a separação entre o CD e o CBM (RABINOVICH; MELNICK; BOLOBOVA, 2002). O CD contém o sítio ativo da enzima responsável pela hidrólise de celulose. O CBM é formado por uma sequência de aminoácidos que ancora o CD na superfície da celulose através de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (BORASTON et al., 2004; GUILLÉN; SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ-SANOJA, 2010). A Figura 12 apresenta a estrutura de uma celulase. Os CBMs desempenham um papel muito importante na degradação das regiões cristalinas de celulose, uma vez que podem concentrar as enzimas na superfície celulósica insolúvel e desestabilizam as ligações de hidrogênio (HERVÉ et al., 2010).

Figura 12 - Representação esquemática de uma celulase.



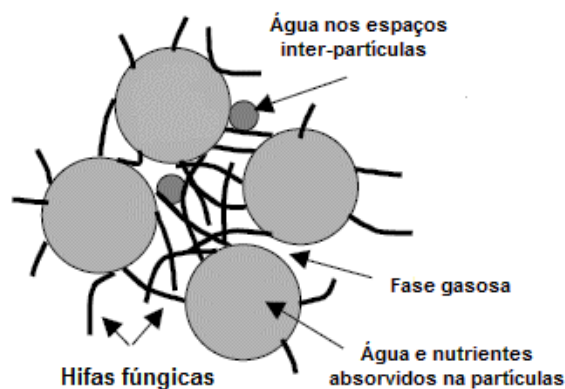
Fonte: Adaptado de Yang et al. (2015).

As enzimas que apresentam apenas o domínio catalítico podem se ligar a celulose, mas com baixa afinidade em relação às enzimas que apresentam os dois domínios (KARLSSON et al., 2002).

2.2.2 Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo que envolve o crescimento de microrganismos em substratos sólidos úmidos, onde os espaços entre as partículas contêm uma fase gasosa contínua e ausência de água livre. Embora exista água entre as partículas e, ainda, possa haver filmes finos de água na superfície das mesmas, a fase líquida entre partículas é descontínua sendo a maior parte do espaço preenchida pela fase gasosa. A maior parte da água no sistema é absorvida pelas partículas sólidas (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006). A Figura 13 apresenta um esquema representando o substrato sólido, a fase gasosa e o crescimento de um fungo filamentoso em processos de FES.

Figura 13 - Arranjo de partículas de substrato sólido úmido e fase gasosa contínua em sistemas de FES envolvendo um fungo filamentoso.



Fonte: Adaptado de Mitchell; Berovič; Krieger (2006).

Fungos filamentosos são considerados os microrganismos mais adequados para utilização em processos de FES, pois apresentam necessidades de atividade de água menores, geralmente em torno de 0,5-06 *aw* (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Assim, a FES fornece a estes microrganismos, especialmente aos fungos filamentosos, um ambiente com características próximas às encontradas em seus *habitats* naturais, pelo uso de substrato sólido e umidade adequados. Este, aparentemente, é o principal fator responsável pelo bom desenvolvimento fúngico em processos de FES, bem como pelos elevados rendimentos enzimáticos são obtidos, quando comparado com a fermentação submersa (FSm), mesmo que realizada em condições ideais de crescimento (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Um fator biológico importante em processos de FES é a baixa repressão catabólica, quando comparada a FSm (CADIRCI; YASA; KOCYIGIT, 2016). O fenômeno da repressão catabólica ocorre devido a formação de uma cascata de sinais no interior da célula, iniciada pela presença da molécula sinal (glicose), causando a ativação da molécula repressora. Esta molécula se liga a região promotora dos genes de celulase e xilanase, bloqueando a transcrição e expressão destes 9 genes (SÁNCHEZ, 2009). Segundo Viniegra-González e Favela-Torres (2006), aparentemente o uso de substratos sólidos favorece o sistema de FES a ser mais resistente a repressão catabólica pela formação de gradientes de açúcar dentro do suporte sólido, criando um microambiente onde a concentração de açúcar é ideal

para crescimento e produção de enzimas. Já em FSm, os açúcares encontram-se dispersos por todo meio líquido, favorecendo a repressão.

Além disso, o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos nos processos de FES agrega valor econômico a estes materiais e contribui para evitar a disposição inadequada dos mesmos no meio ambiente (BINOD et al., 2009).

A FES tem se sido empregada para a obtenção de produtos de elevado valor agregado a partir de resíduos agroindustriais tais como biocombustíveis, biosurfactantes, biopesticidas e enzimas, por exemplo, as celulasas (EL-BAKRY et al., 2015). Muitos fungos filamentosos produzem níveis elevados de celulasas quando cultivados por FES (HIMMEL et al., 2007; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Diversos gêneros e espécies fúngicas como *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani*, *Humicola insolens*, *Penicillium brasilianum*, *Phanerochaete*, *Chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trametes versicolor*, *Penicillium* sp., tem sido reportados na literatura como bons produtores de celulase por este processo (BEHERA; RAY, 2016).

Dentre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos representam um grupo de organismos muito diversificado e apresentam um grande potencial para produção de enzimas industriais, incluindo as celulasas (CORRÊA et al., 2014).

O termo "endófito" refere-se a qualquer organismo que habite os tecidos das plantas, sendo definidos por vários autores como mutualistas que colonizam os tecidos vegetais vivos, sem causar patologias. Os microrganismos endofíticos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que não geram estruturas externas no hospedeiro (grupo I) e aqueles que são capazes de desenvolver estruturas externas, como os nódulos de bactérias fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos (grupo II) (MISHRA et al., 2014).

Esses organismos endofitos em associação com a planta aumentam a resistência do hospedeiro contra os herbívoros e patógenos através da produção de vários metabolitos secundários (RODRIGUEZ et al., 2009).

Grande parte da diversidade desses fungos continua desconhecida, o que os torna interessantes alvos de estudos biotecnológicos, especialmente como potenciais produtores de novas enzimas de degradação de material vegetal (ZABALGOGEAZCOA; OLEAGA; PÉREZ-SÁNCHEZ, 2008). Tais fungos apresentam atividade altamente específica como decompositores primários de substratos lignocelulósicos, uma vez que se adaptaram aos mesmos ao longo do processo

evolutivo, reforçando sua importância como fontes de novas enzimas (HUANG et al., 2008).

A capacidade de 110 fungos endofíticos em produzir enzimas de degradação de resíduo lignocelulósico foi avaliada por Robl et al. (2013). Após cultivo em diferentes substratos (bagaço de cana de açúcar submetido a pré-tratamento, mistura de bagaço de cana e farelo de soja 3:1 p/p, xilana e pectina), foi observado que essas cepas produziram hidrolases com diferentes perfis e a produção foi altamente influenciada pelas fontes de carbono no meio. Toghueo et al., (2017) observaram atividades de amilase, celulase, lipase e lacase produzidas por fungos endofíticos isolados das plantas medicinais *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* e *Cananga odorata*. Nove diferentes cepas de fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Cladosporium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Biosporus* sp., *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Colletotrichum* sp. foram isoladas de sete plantas medicinais por Patil et al., (2015) e apresentaram produção de enzimas extracelulares, como celulase, amilase, protease, e lipase. Sunitha, Devi e Srinivas (2013), por sua vez, isolaram cinquenta cepas destes fungos, também a partir de plantas medicinais (*Alpinia calcarata*, *Bixa orellana*, *Calophyllum inophyllum* e *Catharanthus roseus*) e os mesmos produziram celulase, amilase, lacase, lipase, pectinase e protease em meios sólidos.

Estes e outros estudos demonstram a importância da exploração dos fungos endofíticos como fontes de novas enzimas, incluindo as celulases, especialmente pelo cultivo em resíduos lignocelulósicos como substratos, por FES.

O resíduo lignocelulósico representa um recurso promissor a ser utilizado como fonte de energia renovável. A conversão enzimática de polissacarídeos presentes no resíduo lignocelulósico é uma tecnologia chave em biorefinarias e é objeto de intensa pesquisa (HORN et al., 2012). O alto custo de produção ainda é um dos principais obstáculos a serem superados para a viabilização da aplicação industrial de enzimas microbianas. No âmbito da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, por exemplo, as celulases são insumos que impactam significativamente o processo (LIU; ZHANG; BAO, 2016). Kazi et al., (2010) apontaram que o custo de celulases era de US\$ 0,69/galão de etanol. Em 2012, Klein-Marcuschamer et al., estimaram um custo de US\$ 1,47/galão de etanol. Uma das alternativas para a solução deste problema é o emprego da fermentação em estado sólido (FES), devido à possibilidade do uso de substratos lignocelulósicos de

baixo custo e amplamente disponíveis, como resíduos agrícolas, agroindustriais, florestais e urbanos, que suportam o crescimento microbiano e estimulam a produção das enzimas (BEHERA; RAY, 2016).

Diversos resíduos de origem vegetal tem sido utilizados em processos de FES para a produção de celulases, entre os quais destacam-se farelos de trigo, soja e algodão, palha e farelo de milho e bagaço de cana-de-açúcar (EL-BAKRY et al., 2015).

Kilikian et al., (2014) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e farelo de soja para produção de celulases, por FES, por *Trichoderma reesei* Rut-C30 e *T. reesei* QM9414 (cepas de referência para a produção destas enzimas), por *Trichoderma* sp. IPT778 e *T. harzianum* rifai IPT821 (isolados de uma área de cultivo de cana-de-açúcar) e por *Myceliophthora thermophila* M77. A maior atividade de FPase (10,6 U/g) foi observada no extrato enzimático obtido pelo cultivo de *Myceliophthora thermophila* M77 na mistura de substratos bagaço de cana e farelo de soja (9:1) (4,4 vezes maior do que a produção utilizando apenas farelo de trigo como substrato). Os autores relatam também que a mistura de substratos proporcionou maiores atividades enzimáticas quando comparadas com os cultivos em apenas um substrato.

A produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* cultivado por FES em farelo de trigo foi avaliada por Dhillon et al., (2011). Os resultados foram comparados com os obtidos em estudo que envolveu o cultivo do fungo em mistura de farelo de trigo e palha de arroz (2:3) e, ainda, seu co-cultivo com *Trichoderma reesei*. Os autores observaram que o co-cultivo e a mistura de substratos levaram a maiores atividades das enzimas. Além disso, os autores verificaram que a inclusão de palha de arroz proporcionou uma fonte adicional de carbono exigido pelos microrganismos utilizados.

2.2.3 Fatores que afetam a produção de celulases por FES

As celulases representam uma parcela significativa do mercado mundial de enzimas (JARAMILLO et al., 2015) e, atualmente, as pesquisas científicas sobre estes catalisadores tem focado a sacarificação de resíduos lignocelulósicos para a obtenção de glicose e produção de etanol celulósico. O interesse nesta aplicação das celulases tem sido impulsionado pela escassez de combustíveis fósseis bem como pela

emissão de gases de efeito estufa e poluição do ar decorrentes do uso destes combustíveis (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

Muitas celulasas comerciais estão disponíveis no mercado, entre as quais podem ser citadas Accellerase, Celluclast e Novozyme 188. Porém, o custo de produção ainda é elevado, representando um dos principais obstáculos para o estabelecimento de um processo economicamente viável (SHARMA et al., 2016) (PANDIYAN et al., 2014). Desta forma, é de crucial importância obter celulasas altamente ativas, a baixo custo. Neste sentido, além da busca por novos microrganismos produtores, é necessário ainda adequar a composição dos meios e as condições de cultivo, o que pode ser alcançado por estudos de otimização dos parâmetros envolvidos no processo que influenciam o crescimento microbiano e a produção das enzimas (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010).

Uma vez que a produção de celulasas microbianas é influenciada por diversos parâmetros como pH, concentração de inóculo, temperatura, agitação, concentração de substrato, fontes de nitrogênio e de carbono, entre outros, o uso de RSM tem sido empregado de forma eficiente para otimização destas variáveis (SAJITH et al., 2016).

O substrato é um dos parâmetros mais importantes a serem considerados em processos de FES, pois além de fornecer suporte físico ao crescimento microbiano, está relacionado ao fornecimento de nutrientes para o microrganismos e pode induzir a produção de enzimas (PANDEY, 2003). Além do tipo de substrato utilizado, a quantidade e a proporção de cada substrato em uma mistura tem sido reportadas na literatura como fatores importantes para a otimização das condições de cultivo para a produção de celulasas e outras enzimas (GHOSH et al., 2015; KAR et al., 2013; NARRA et al., 2012; RUIZ et al., 2012).

O teor de umidade do substrato também é um parâmetro muito importante em processos de FES. A água é essencial para o metabolismo microbiano e sua disponibilidade pode afetar a difusão de solutos, gases e alterações osmóticas provocadas por metabolitos excessivos nas proximidades das células (GERVAIS; MOLIN, 2003; TODD, 1972). Durante a FES, índices de umidade altos ou baixos afetam a produtividade. Um nível de umidade mais elevado pode diminuir a porosidade, alterar a estrutura das partículas de substrato, promovendo o desenvolvimento de viscosidade e reduzindo a transferência de oxigênio, enquanto

um menor teor de umidade causa redução na solubilidade dos nutrientes do substrato sólido, menor grau de inchaço e maior tensão da água (MARTINS et al., 2011).

O pH do meio de cultivo é uma variável a ser considerada, pois influencia o crescimento e metabolismo microbiano. A maioria dos fungos filamentosos adaptam-se a uma ampla faixa de pH (2,0 a 9,0) e apresentam crescimento ótimo em pH 3,8-6,0 (BANSAL et al., 2012). Esta versatilidade pode ser explorada de forma benéfica para prevenir ou minimizar a contaminação bacteriana em processos de FES, especialmente quando se utiliza valores de pH menores no início do cultivo (KRISHNA, 2005). Porém, variações de pH muito distantes da faixa ótima para o crescimento podem provocar a desnaturação de enzimas, bem como reduzir a capacidade de síntese enzimática pelo fungo (MAURYA et al., 2012).

A suplementação do meio de cultivo com fontes de nitrogênio pode melhorar as condições de crescimento microbiano e a secreção de enzimas, uma vez que são essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e N-acetil-glucosamina, componente principal da parede celular dos fungos (PEDRI et al., 2015; PHILIPPOUSSIS et al., 2011). Diversos autores reportam na literatura o efeito positivo de diferentes fontes de nitrogênio na produção de celulasas fúngicas (ADELEKE et al., 2012; CALLOW et al., 2015; YADAV; CHAUHAN; GAHLOUT, 2016).

A adição de surfactantes ao meio de cultivo visando a obtenção de enzimas hidrolíticas microbianas é reportada por diversos autores (DESWAL; KHASA; KUHAD, 2011; KAPOOR; NAIR; KUHAD, 2008; LIU et al., 2006). Os surfactantes agem nas membranas celulares, causando maior permeabilidade ou promovendo a liberação de enzimas ligadas a células (REESE; MAGUIRE, 1969). Acredita-se que pelo menos algumas enzimas celulolíticas fúngicas estejam ligadas à parede das hifas ou mantidas em estreita associação com as mesmas, por exemplo, na matriz ou na membrana polissacarídica circundante (PARDO, 1996; RYTIOJA et al., 2014).

No que se refere ao inóculo, observa-se produções de celulasas inferiores quando são utilizadas baixas quantidades de inóculo na fermentação, provavelmente devido ao número insuficiente de células para utilizar o substrato de forma eficiente. Quando se utiliza elevadas quantidades de inóculo pode ocorrer um aumento no crescimento microbiano, com conseqüente aumento no consumo das fontes de carbono e demais nutrientes, o que ocasiona um desequilíbrio nutricional resultando em redução na produção das enzimas (EL-HADI et al., 2014; MOHAMMED, 2013).

2.3 Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos e sacarificação enzimática da celulose

A conversão enzimática dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos será uma tecnologia chave em biorefinarias e atualmente é objeto de intensa pesquisa (SINGH et al., 2016). A conversão bioquímica de biomassa preserva as estruturas dos carboidratos sob a forma de açúcares monoméricos (em contraste com a conversão termoquímica que leva à perda dos mesmos) e é considerada a tecnologia mais sustentável (HORN et al., 2012). No entanto, apesar de intensas pesquisas geradas na última década, a eficiência da hidrólise enzimática destes materiais continua a ser um passo limitante no contexto de biorrefinarias (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). Os fatores que contribuem para esta limitação são a heterogeneidade da parede celular vegetal, bem como a cristalinidade da celulose e recalcitrância da lignina (CHUNDAWAT et al., 2011).

Entre os potenciais resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados como matéria-prima para obtenção de açúcares fermentescíveis para produção de etanol 2G destacam-se o bagaço de cana-de-açúcar, cuja composição em celulose, hemicelulose e lignina está em torno de 36,9-45,7, 25,6-29,6 e 18,9-26,1%, respectivamente (JACKSON et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e gera 185 milhões de toneladas/ano de resíduos sólidos por colheita. O bagaço de cana-de-açúcar é atualmente utilizado como a principal fonte de energia em usinas de açúcar e álcool, sendo também destinado à geração de eletricidade a ser vendida. No entanto, uma parte importante do bagaço é subutilizada, podendo ser direcionada à obtenção de etanol de segunda geração, bem como à outras aplicações como produção de pasta e papel, alimentação animal e furfural (JACKSON et al., 2015). A utilização integral dos componentes do bagaço é desejável por razões econômicas e ambientais, o que gera interesse no uso deste material em bioprocessos (LOH et al., 2013).

No Brasil, estes resíduos e subprodutos agrícolas/agroindustriais são abundantes, o que possibilita a sua utilização em bioprocessos, especialmente no que se refere ao bagaço de cana-de-açúcar. Na safra de 2016/2017, o país produziu 691 milhões de toneladas a partir de uma área cultivada de 9,1 bilhões de hectares, 90% dos quais estão situados na região Centro-Sul do país (CONAB, 2017). É o segundo maior produtor e exportador de etanol, tendo produzido na safra de 2014/2015

aproximadamente 28 bilhões de litros. Em 2015, exportou 1,9 bilhão de litros, 26% superior em relação ao ano de 2014. Deste total, 0,5 bilhão de litros foi representado pelo etanol celulósico (ou etanol de segunda geração), produzido pela fermentação da glicose obtida a partir da celulose presente no bagaço de cana. O restante representa o tradicional etanol de primeira geração, obtido a partir da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar (EPA, 2015).

A produção de etanol de cana-de-açúcar gera dois principais resíduos: o bagaço e a palha. Segundo documento disponibilizado pela União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA, 2015), o processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar gera 270 kg de bagaço, sendo que a maior parte dele é queimado para gerar energia elétrica nas usinas. No entanto, devido à alta eficiência das caldeiras na geração de calor, ainda é gerado um excesso de bagaço, que pode ser reaproveitado para a produção de etanol celulósico. Em relação à palha, estima-se que, para cada tonelada de cana processada sejam gerados 140 kg. Este subproduto era freqüentemente queimado para permitir a colheita manual da cana, porém a prática tem cessado gradativamente em respeito às leis vigentes (Lei Federal Brasileira 2661/98 e Lei Estadual de São Paulo 11241/02), à medida em que a colheita mecânica tem prevalecido. A maior geração de palha resultante desta mudança no modo da colheita permite que o material seja utilizado para fins biotecnológicos, como a obtenção de etanol celulósico (GONÇALVES; SANTOS; MACEDO, 2015).

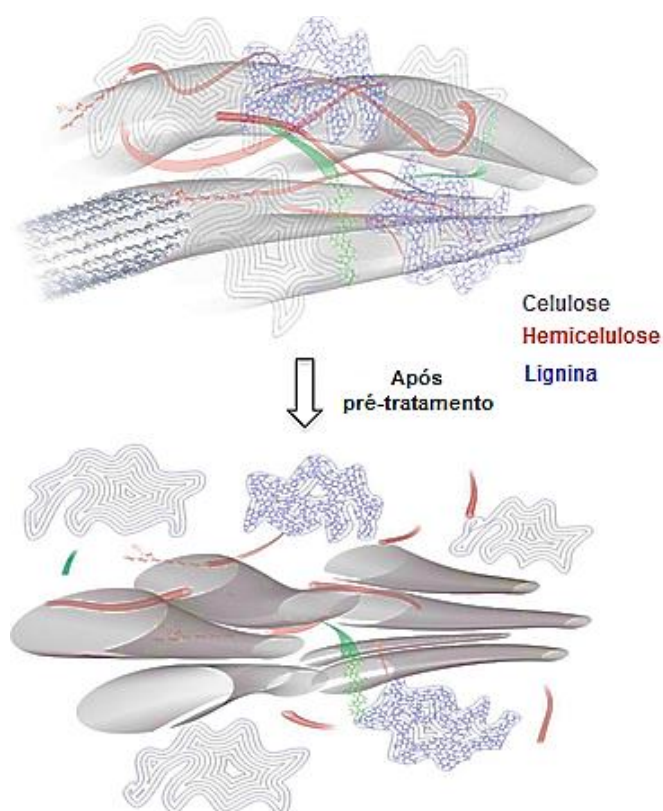
O Brasil conta com três plantas de etanol celulósico em operação: GranBio (São Miguel dos Campos – AL) e Raízen (Piracicaba – SP), em escala comercial, e Centro de Tecnologia Canavieira – CTC (São Manoel – SP), em escala demonstrativa. As respectivas capacidades produtivas anuais são de 82, 42 e 3 milhões de litros (ALMEIDA, 2016). Estudos apontam que o Brasil poderia dobrar a sua produção de etanol por hectare de cana-de-açúcar ao produzir etanol celulósico a partir do bagaço e da palha da cana (DE SOUZA et al., 2014).

Para que a glicose presente no bagaço possa ser utilizada para a produção de etanol celulósico é necessária uma etapa de pré-tratamento, a fim de diminuir a recalcitrância do material melhorando a acessibilidade das celulasas a celulose e, conseqüentemente, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática. Diversos métodos, incluindo físicos, químicos e biológicos têm sido utilizados com sucesso na remoção da lignina e na diminuição da cristalinidade da celulose, aumentando assim a eficiência da sacarificação enzimática de diferentes biomassas lignocelulósicas.

É importante que o método de pré-tratamento minimize a geração de compostos inibitórios para hidrólise enzimática e para o microrganismo fermentador, promova a diminuição da carga enzimática necessária para uma hidrólise eficiente, evite perdas de carboidratos, permita a recuperação da lignina e para conversão adicional em produtos de valor agregado e minimize o uso de energia (REZENDE et al., 2011). Em geral, a escolha de um determinado método de pré-tratamento depende da natureza física, composição química e propriedades de textura da biomassa, bem como da extensão das mudanças desejadas no material escolhido (GALBE; ZACCHI, 2007; PHITSUWAN; SAKKA; RATANAKHANOKCHAI, 2013; YANG et al., 2002).

A Figura 14 representa os efeitos mais comuns do pré-tratamento na estrutura da lignocelulose, como a solubilização parcial da lignina e da hemicelulose (efeitos químicos), bem como a redução do grau de cristalinidade da celulose (efeitos físicos).

Figura 14 - Representação dos efeitos mais comuns do pré-tratamento na matriz lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Silveira et al., (2015).

Huang et al., (2015) submeteram a polpa de bagaço de cana e bagaço de cana pré-tratado com NaOH à hidrólise por celulase produzida por *Penicillium oxalicum* EU2106. Os resultados demonstraram que a polpa de bagaço de cana liberou uma maior quantidade de açúcares redutores, quando comparada com o bagaço de cana pré-tratado. A conversão em glicose atingiu 93,36% após a hidrólise de 96 h da polpa, com uma carga enzimática de 20 FPU/g de sólido. Foi realizada então uma sacarificação e fermentação simultânea da polpa de bagaço de cana para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. Uma quantidade considerável de etanol (18,79 g/L a 0,42 g de etanol/g de celulose) foi obtida.

A sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar ozonizado, realizada pelo uso do extrato enzimático de *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e por enzimas comerciais, foi avaliada por Pereira et al., (2016). As enzimas fúngicas proporcionaram liberação de glicose ligeiramente superior às enzimas comerciais, a 50 °C. Com o aumento da temperatura ocorreu um aumento na concentração de açúcar. Estudos cinéticos mostraram liberação notável de glicose (4,99 g/L, 3% p/p de matéria seca) a 60 °C, 8 h de hidrólise, usando uma carga enzimática de 10 FPU. A fermentação do hidrolisado por *Saccharomyces cerevisiae* proporcionou a obtenção de etanol a 2,81 g/L, a partir de glicose a 8,77 g/L (63% da conversão teórica máxima).

Scheffersomyces stipitis NRRL-Y7124 foi utilizado por Terán-Hilares et al., (2016) para fermentação de açúcares liberados após hidrólise enzimática (realizada com 20 FPU/g de bagaço) de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino com NaOH. Cerca de 50% da celulose e 57% da hemicelulose do bagaço pré-tratado foram hidrolisados e a produção máxima de etanol foi de 23,4 g/L, com um consumo quase completo das pentoses e hexoses presentes no hidrolisado durante a fermentação.

O uso de soluções alcalinas no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos proporciona maior digestibilidade da celulose devido à remoção de lignina ou quebra de ligações do complexo lignina-carboidrato. Este método é realizado em condições menos drásticas do que as utilizadas para hidrólise ácida, resulta em menores perdas de carboidratos (celulose e hemicelulose) e sua eficácia depende do teor de lignina na biomassa. Outros fatores importantes a serem considerados são menores problemas de corrosão quando comparado ao pré-tratamento com ácido concentrado e baixa formação de inibidores (ALVIRA et al., 2010). Basicamente, o mecanismo de

deslignificação envolve a quebra das ligações aril-éter e a solubilização de fragmentos de lignina após ionização e solvatação de grupos hidroxila aromáticos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). A temperatura de reação e o tempo de residência são dois parâmetros muito importantes para a ruptura da estrutura lignocelulósica (CHEN; TU; SHEEN, 2011). O uso de soluções alcalinas a elevada temperatura e pressão aumenta a eficiência do pré-tratamento do resíduo lignocelulósico (PAN et al., 2005).

Os catalisadores mais utilizados no pré-tratamento alcalino das biomassas são hidróxidos de sódio (NaOH), potássio (KOH), cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e amônio (NH_4OH). O NaOH causa inchaço nas fibras, aumenta a superfície interna da celulose e diminui o grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca a ruptura da estrutura da lignina (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Khuong et al., (2014) relataram que bagaço de cana submetido a pré-tratamento alcalino com NaOH (5% p/v, 121 °C, 60 min) aumentou a digestibilidade da celulose de 40,7 para 67,7% e reduziu o teor de lignina de 23,4 para 5,2%. Costa et al., (2014) removeram aproximadamente 80% do teor de lignina do bagaço de cana-de-açúcar utilizando pré-tratamento alcalino (130 °C, 20 min, NaOH 1 mol/L). Maitan-Alfenas et al., (2015) realizaram pré-tratamento alcalino hidrotérmico (NaOH 1% p/v, 120 °C, 60 min,) e observaram uma redução de 44% no teor de lignina.

2.4 Fatores que afetam a sacarificação enzimática da celulose

A otimização do processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas é de grande importância para a obtenção de elevado rendimento em açúcares que possam ser convertidos em bioetanol por processo de fermentação (JEYA et al., 2009).

A otimização pode ser realizada por técnicas convencionais, empregando-se a metodologia do “um fator por vez” (one factor at time – OFAT). No entanto, esse tipo de método é demorado e não revela os efeitos interativos entre as variáveis (PANDIYAN et al., 2014). A metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology- RSM*) é uma técnica estatística para a modelagem e otimização de variáveis múltiplas, que determina as melhores condições do processo em questão, através da combinação de delineamentos experimentais com interpolação por

equações polinomiais de primeira ou segunda ordem em um procedimento de teste sequencial (YÜCEL; GÖYCINCIK, 2015).

Os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática da celulose presente nas biomassas lignocelulósicas são relacionados à enzima e relacionados ao substrato, embora muitos deles estejam inter-relacionados durante o processo de hidrólise (BINOD et al., 2011). Parâmetros como carga de enzima, carga de substrato, temperatura, agitação e tempo são importantes para otimização do processo (MADADI; TU; ABBAS, 2017).

Em relação às celulasas, influenciam na sacarificação a concentração e a adsorção das enzimas, o sinergismo, a inibição pelo produto final, a desativação mecânica (tensão de cisalhamento do fluido ou interface gás-líquido), a inativação térmica e a ligação irreversível (não produtiva) à lignina (ARANTES; SADDLER, 2011).

A temperatura tem um efeito pronunciado na conversão enzimática do resíduo lignocelulósico, influenciando também a adsorção da celulase. Binod et al. (2011) relataram uma relação positiva entre adsorção e sacarificação do substrato celulósico a temperaturas inferiores a 60 °C. As atividades de adsorção acima de 60 °C diminuíram, possivelmente devido à perda de conformação enzimática que conduz à desnaturação da enzima.

Com relação aos fatores relacionados ao substrato, a taxa de hidrólise enzimática da lignocelulose é profundamente afetada pelas características estruturais da celulose que incluem cristalinidade, grau de polimerização, área de superfície disponível/acessível, organização estrutural, isto é, macroestrutura (fibra) e microestrutura (microfibrilas elementares), tamanho de partícula e presença de materiais associados, tais como hemicelulose e lignina (OLSEN et al., 2016).

A concentração de substrato é um dos principais fatores que afetam o rendimento e a taxa inicial de hidrólise enzimática da celulose. Manter elevadas concentrações de sólidos ao longo do processo de conversão de biomassa é importante a partir do ponto de vista de viabilidade econômica, pois uma alta concentração de substrato permite a obtenção de uma solução concentrada de açúcares, que por sua vez é benéfica para a subsequente fermentação (MODENBACH; NOKES, 2013). É necessária uma concentração de açúcar de pelo menos 8% (p/p) para obter um rendimento de etanol de 4% (p/p) pelo qual a energia

necessária para a destilação pode ser significativamente reduzida (BINOD et al., 2011).

Em cargas sólidas elevadas, a resistência de transferência de massa e calor resultante da alta viscosidade representa uma séria limitação na distribuição enzimática e a hidrólise enzimática da lignocelulose (HUANG et al., 2011). Portanto, a mistura eficiente de enzima e substrato é útil para melhorar a eficiência de hidrólise (JØRGENSEN et al., 2007).

A influência de diferentes velocidades de agitação na hidrólise enzimática da celulose também tem sido investigada em várias cargas sólidas. Velocidades de agitação baixas podem não promover uma homogeneidade no sistema, não garantindo um contato eficiente entre o substrato e as enzimas, além de não promoverem a transferência de calor e massa no ambiente de reação. Por outro lado, velocidades de agitação muito elevadas podem causar desnaturação das enzimas pela força de cisalhamento. Desta forma a otimização deste parâmetro se faz necessária (INGESSON et al., 2001).

O efeito da carga bagaço de cana e da carga enzimática, do tempo de incubação e da concentração de surfactante na sacarificação enzimática foi avaliado por Sindhu et al., (2014) utilizando metodologia de superfície de resposta de acordo com o design de Box-Behnken. As condições ótimas para a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com NaOH foram a carga de biomassa 15% (p/p), carga enzimática 50 FPU, concentração de surfactante 0,125% (p/p) e tempo de incubação de 60 h com rendimento de açúcar redutor de 0,775 g/g de bagaço.

Vásquez et al., (2007) otimizaram as condições de sacarificação enzimática utilizando metodologia de superfície de resposta. As condições ótimas das variáveis carga de enzima, carga de substrato e temperatura foram 25,9 FPU/g de celulignina pré-tratada, 10% e 47 °C, respectivamente.

O rendimento máximo de glicose (0,376 g/g de bagaço de cana) foi observado por Maurya et al., (2013) em condições ótimas de 10% de carga de biomassa (pré-tratada), 100 FPU/g de carga de celulase, 0,04% (p/p) de concentração de surfactante e 72h de sacarificação.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a otimização das condições de cultivo para a produção de celulases pelo cultivo isolado (monoculturas) e pelo co-cultivo (culturas mistas) dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, utilizando-se metodologias de planejamento experimental e superfície de resposta, além de utilizar os extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico com NaOH.

3.2 Específicos

Como objetivos específicos, destacam-se:

- Produção de celulases, por FES, em cultivos isolados e co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, avaliando os efeitos das condições de cultivo;
- Utilização dos extratos enzimáticos, obtidos nas melhores condições de cultivo, na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado;
- Seleção do melhor extrato enzimático, com base na concentração de glicose presente nos hidrolisados;
- Caracterização físico-química e bioquímica das celulases do extrato enzimático selecionado;
- Caracterização química dos bagaços *in natura* e submetido a pré-tratamento hidrotérmico com NaOH quanto à lignina total (lignina ácida solúvel e lignina ácida insolúvel), celulose e hemicelulose;
- Avaliação das condições de sacarificação do bagaço pré-tratado, utilizando-se o extrato enzimático selecionado;
- Análise dos hidrolisados obtidos sob nas melhores condições de sacarificação: avaliação da conversão da celulose e xilana a seus respectivos monômeros e avaliação da presença de inibidores de fermentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados os fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, pertencentes à coleção de culturas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do IQ/UNESP. *Botryosphaeria* sp. AM01 foi isolado de folhas sadias de *Alibertia macrophylla*, coletadas no Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica de Mogi Guaçu, antiga Fazenda Campininha, localizada no distrito de Martinho Prado Junior, no município de Mogi Guaçu (SP), nas coordenadas geográficas 22°18'S e 47°11'W. *Saccharicola* sp. EJC04 foi isolado de *Eugenia jambolana*, coletadas na cidade de Araraquara-SP, nas coordenadas geográficas 21°45'51.9"S 48°09'56.8"W. Durante todo o trabalho, as culturas foram preservadas em frascos de vidro contendo água deionizada estéril, segundo metodologia descrita por Castellani (1939). Os fungos também foram preservados por congelamento a -80 °C. Neste método, discos de aproximadamente 8 mm de diâmetro tomados a partir de culturas em placa contendo meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) foram transferidos para frascos contendo solução de glicerol a 20%, fechados com uma rolha de borracha e lacrados hermeticamente com uma tampa de alumínio.

4.2 Produção de celulases, por FES, em cultivos isolados ou co-cultivo

Os fungos foram individualmente pré-inoculados em placas de Petri contendo meio PDA e mantidos a 28 °C, por 6 dias, para a obtenção dos discos de inóculo de 8 mm de diâmetro. As FES foram realizadas como cultivos isolados (monoculturas) ou co-cultivo (culturas mistas), em embalagens de polipropileno (16 x 22 cm) vedados com rolha de algodão (LOTONG; SUWANARIT, 1983; MERHEB-DINI et al., 2010), a 28 °C, por 8 dias. Como substratos foram utilizadas as misturas de farelo de algodão e farelo de trigo (MARQUES, 2013) e as proporções de cada substrato foram 1:1 (p/p) para monocultura de *Botryosphaeria* sp. AM01 e para o co-cultivo e 1:2 (p/p) para o cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04, como definido em experimentos preliminares. Às misturas de substratos, foi adicionada (antes da esterilização em

autoclave, a 121 °C, por 20 minutos, a 1 atm) solução nutriente na quantidade necessária para se obter a umidade desejada, de acordo com o planejamento experimental. Esta solução foi composta por (g/L): KH_2PO_4 (3,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); CaCl_2 (0,5) e solução de sais (0,1%) (MANDELS; STERNBERG, 1976; MORETTI et al., 2014a). A composição da solução de sais foi (mg/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4); CoCl_2 (2,0) (PEREIRA et al., 2015).

A extração das enzimas foi realizada com adição de água deionizada (1:10 p/v) 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. Após este período, o material foi filtrado em tecido de *nylon*, o filtrado foi centrifugado a 10.000 xg, a 4 °C, por 15 minutos e as atividades enzimáticas foram quantificadas no sobrenadante (PEREIRA et al., 2015).

Modelos de planejamento experimental foram empregados, visando a otimização da produção das enzimas, tanto por co-cultivo quanto pelos cultivos isolados. Inicialmente, foi avaliada a influência de 8 variáveis através de um delineamento fatorial fracionado, tendo como resposta as atividades de endoglucanase e β -glicosidase tanto para os cultivos isolados quanto para o co-cultivo. Em seguida, os níveis destas variáveis foram otimizados utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR). A atividade de FPase foi também determinada em todos os experimentos, porém não foi avaliada como resposta nos delineamentos experimentais, como justificado ao longo do texto.

4.2.1 Delineamentos experimentais

4.2.1.1 Planejamento fatorial fracionado

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , em dois níveis. As variáveis avaliadas e seus níveis foram definidos a partir de experimentos preliminares, realizados com base em referências bibliográficas (BANSAL et al., 2012; DAS et al., 2013; RANA; JANVEJA; SONI, 2013; SANDHU et al., 2013; ZHAO et al., 2011) e são apresentados na Tabela 1. As respostas avaliadas foram as atividades de endoglucanase, β -glicosidase e FPase.

Tabela 1 - Valores utilizados em cada nível dos delineamentos fatoriais fracionados.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	+1	
x ₁ - Ureia	0,1	0,2	0,3	g/L
x ₂ - (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	1,5	2,0	g/L
x ₃ - NaNO ₃	2,0	4,0	6,0	g/L
x ₄ - pH inicial do meio	4,0	5,0	6,0	-
x ₅ - *Quantidade de inóculo	3	6	9	discos
x ₆ - Teor de umidade	50	60	70	%
x ₇ - Tween 80	0,25	0,5	0,75	%
x ₈ - Quantidade de substrato	5,0	10,0	15,0	g

*No caso do co-cultivo foram utilizados 2, 4 e 6 discos de inóculo de cada fungo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para evitar introdução de erros no sistema (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996; PEREIRA FILHO, 2015a). Por se tratar de processo biológico, foi adotado o nível de confiança de 90% sendo consideradas significativas as variáveis que apresentaram p-valor menor que 10% ($p < 0,1$), o que já é reportado em literatura (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Os efeitos das variáveis individuais sobre a produção de celulasas foram calculados pela seguinte equação (Equação 1):

$$e = (\Sigma+\mu - \Sigma-\mu)/n \quad (1)$$

Onde, "e" é o efeito da variável em estudo, "+μ" e "-μ" são respostas (atividades enzimáticas) dos ensaios onde as variáveis são empregadas em seus níveis maior e menor, respectivamente, e "n" o número total de ensaios. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos significativos na produção de celulasas. A fim de se identificar quais efeitos são mais relevantes, uma alternativa é verificar qual a porcentagem que cada quadrado dos efeitos exerce sobre a soma dos quadrados dos mesmos (PEREIRA FILHO, 2015b). O cálculo da porcentagem de contribuição que cada quadrado exerce sobre a soma é apresentado pela Equação 2:

$$\text{Porcentagem (P}_i\text{)} = (\text{Efeito}_i^2 / \Sigma \text{Efeito}_i^2) \times 100 \quad (2)$$

Determinou-se, então, que apenas as variáveis com efeitos acima de 40% seriam selecionadas para realização de um próximo planejamento para otimização da produção das enzimas, de acordo com metodologia proposta por Pereira Filho, (2015).

4.2.1.2 Delineamento composto central rotacional

Após análise dos dados e seleção das variáveis que apresentaram efeito significativo na produção de celulasas em cada condição de cultivo (cultivos isolados e co-cultivo), realizou-se um novo planejamento experimental buscando-se a otimização. Para as condições de co-cultivo e cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM 01, duas variáveis apresentaram maior influência na produção de enzimas. Já para o cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04 três variáveis foram mais influentes. Sendo assim, optou-se pelo planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), onde o efeito das variáveis foi estudado em cinco níveis. As respostas foram modeladas por uma equação polinomial de segunda ordem. A equação do modelo utilizado para a análise das variáveis é apresentada abaixo (Equação 3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \dots \beta_k X_k + \beta_{kk} X_k^2 + \varepsilon \quad (3)$$

Onde, Y é a resposta predita; β_0 é o termo de intercepto; β_1 , β_2 são os efeitos lineares; β_{11} , β_{22} são os efeitos quadráticos; β_{12} são os efeitos de interação; x_1 , x_2 são as variáveis independentes, k é o número de variáveis independentes e 'ε' é o erro experimental. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos e o nível de confiança adotado foi de 90%.

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 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 β-glicosidase

A atividade de β-glicosidase foi determinada como descrito por Leite et al., (2008) utilizando p-Nitrofenil β-D-glicopiranosídeo (pNPG – Sigma-Aldrich) como substrato. A 50 µL do extrato enzimático foram adicionados 250 µL de solução tampão acetato de sódio (0,1 mol/L, pH 5,0) e 250 µL de solução de pNPG (4 mmol/L). A reação foi mantida a 60 °C para o isolado *Botryosphaeria* sp. AM 01 e 75 °C para o isolado *Saccharicola* sp. EJC 04, temperaturas ótimas determinadas por Marques (2013) por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2,0 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 Na₂CO₃ antes do extrato enzimático, impedindo a reação enzimática. 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 solução 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.

4.3.3 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, não sendo adicionada a tira de papel de filtro (substrato), conseqüentemente não ocorrendo reação. O tubo foi então submetido a banho de ebulição, adição de água e leitura da absorbância como descrito acima. O tubo branco utilizado para zerar o espectrofotômetro continha 1,5 mL de água deionizada, 3,0 mL do reagente DNS e foi submetido 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.

4.4 Caracterização físico-química das celulases

O extrato enzimático produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições otimizadas de cultivo para produção de endoglucanase, foi selecionado com base em sacarificação prévia do bagaço pré-tratado para dar continuidade aos experimentos de sacarificação do bagaço de cana, envolvendo então o uso de ferramentas de planejamento experimental, visando a otimização do processo. Sendo assim endoglucanase e β-glicosidase presentes neste extrato foram caracterizadas quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das mesmas. FPase não foi caracterizada devido as dificuldades encontradas na avaliação de sua atividade pelo método de Ghose (1987).

4.4.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

O estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade de endoglucanase e β -glicosidase foi realizado através de um delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , em dois níveis, com 12 ensaios, incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais. A Tabela 2 apresenta os valores codificados e reais das variáveis estudadas.

Tabela 2 - 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 endoglucanase e β -glicosidase.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	+1	
x_1 - pH	3,5	5,5	7,5	-
x_2 - Temperatura	50	60	70	°C

Fonte: Elaborado pelo autor.

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 ótimos foi realizada através da análise da superfície de resposta.

4.4.2 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 de 25 °C, em soluções tampão de pH entre 3,5 e 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 3,5-5,0, tampão MES hydrate (Sigma-Aldrich M8250) para pH 5,5-6,5, tampão MOPS (Sigma-Aldrich M1254) para pH 7,0-7,5, tampão TAPS (Sigma-Aldrich T5130) para pH 8,0-9,0 e tampão CAPS (Sigma-Aldrich C2632) para pH 9,5-10,5. A termoestabilidade foi avaliada incubando-se as enzimas, por 1h, a temperaturas entre 30 e 80 °C, seguida da determinação da atividade residual, sob as condições ótimas.

4.4.3 Efeito de glicose e etanol sobre a atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase produzida por *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições otimizadas de cultivo, foi quantificada como descrito no item 4.3.2, sob condições ótimas de reação, 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.

4.5 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas nos extratos enzimáticos obtidos pelos cultivos realizados utilizando-se delineamentos experimentais (item 4.2) foi determinada pelo método de Lowry, modificado por Hartree (LOWRY et al., 1951), utilizando-se curva analítica de albumina de soro bovino. A partir dos dados de concentração de proteína foram realizados cálculos das atividades enzimáticas específicas de endoglucanase e β -glicosidase (U/mg de proteína). Os resultados se encontram no Apêndice desta Tese.

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

O pré-tratamento foi realizado em autoclave, segundo metodologia descrita por 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 em água gelada e, posteriormente, mantido sob temperatura de 25 °C para a estabilização. A fase sólida foi lavada em água de torneira até que o pH da água de lavagem estivesse próximo a neutralidade e, em seguida, o material foi lavado com água destilada, filtrado retirando-se todo o excesso de água e a fase sólida foi armazenada a 4 °C para posterior utilização nos experimentos de sacarificação.

4.7 Caracterização química dos bagaços *in natura* e pré-tratado

Bagaços *in natura* e pré-tratado 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).

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

Inicialmente, a sacarificação do bagaço pré-tratado foi realizada empregando-se os extratos enzimáticos obtidos pelo cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 sob condições otimizadas, a fim de selecionar o melhor extrato e, posteriormente, utilizá-lo nos experimentos de sacarificação envolvendo planejamento experimental.

A sacarificação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL vedados com rolha de látex, contendo 1,25 g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (carga sólida de 5% peso seco/volume) de, 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). Os experimentos foram realizados em triplicata, sob agitação de 200 rpm, a 50 °C, por 24 horas.

Os frascos foram incubados em agitador orbital com temperatura controlada. Em todos os experimentos de sacarificação foi adicionado o antibiótico Cloranfenicol, na concentração final de 0,1 mg/mL, a fim de se evitar contaminações. Após o tempo de sacarificação, o material foi resfriado em banho de gelo, 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. São apresentados os dados referentes à concentração de glicose (g/L) nos hidrolisados e ao rendimento, expresso em mg de glicose/g de bagaço de cana (MORETTI et al., 2014b), segundo cálculo apresentado abaixo:

$$\text{mg glicose/g BC} = (\text{g glicose total/g de celulose total}) * 1000$$

4.8.1 Delineamentos experimentais empregados nos experimentos de sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado

O extrato enzimático de *Botryosphaeria* sp. AM01, otimizado para a produção de endoglucanase foi selecionado, a partir dos experimentos citados no item 4.8, para dar seguimento aos experimentos de sacarificação envolvendo, agora, delineamentos experimentais para a otimização do processo, tendo como resposta a concentração de glicose obtida. A busca pela otimização da sacarificação do bagaço de cana-de-

açúcar foi realizada com o uso de ferramentas de planejamento experimental, empregando-se a metodologia de superfície de resposta. Inicialmente foram avaliadas condições químicas que poderiam influenciar no processo como carga de bagaço de cana-de-açúcar (%) e carga de enzima (U Totais de endoglucanase), por um planejamento fatorial completo 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais. Em seguida um novo delineamento foi realizado para avaliar a influência das condições físicas temperatura ($^{\circ}\text{C}$), agitação (rpm) e tempo (horas), por um planejamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 4 pontos centrais. As variáveis e os níveis selecionados foram baseados em dados reportados na literatura (GAO et al., 2014; MORETTI et al., 2014b; PEREIRA et al., 2016).

Os valores reais e codificados dos níveis para cada uma das variáveis são apresentados nas Tabela 3 e 4.

Tabela 3 - Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 , empregado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Variável	Níveis					Unidade
	-1,41	-1	0	+1	+1,41	
x₁ - Bagaço	10,34	12,0	16,0	20,0	21,66	%
x₂ - Endoglucanase	269,29	290,0	340,0	390,0	410,71	U totais

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^3 , empregado na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	+1	
x₁ - Temperatura	45	50	55	$^{\circ}\text{C}$
x₂ - Agitação	200	240	280	rpm
x₃ - Tempo	8	16	24	horas

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Análise Estatística

A análise dos dados dos delineamentos experimentais foi realizada 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 90% nos delineamentos para produção de celulases e 95% nos delineamentos de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

4.10 Análise de açúcares e inibidores presentes nos hidrolisados, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Todas as análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), câmpus de São José do Rio Preto, pela doutoranda Josiani de Cássia Pereira Scarpa.

A quantificação de açúcares (glicose e xilose) 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 e eluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ desgaseificada com N₂. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min com os solventes A (água ultra pura) e B (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 produzido na sacarificação enzimática foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de ácidos orgânicos (ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido siringico e ácido cumárico), 5-Hidroximetilfurfural e furfural nas amostras. 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, 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).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos fatores influenciam o crescimento e o metabolismo de microrganismos, como a composição do meio e as condições de cultivo. Consequentemente, tais fatores são de grande importância na produção de enzimas microbianas, incluindo as extracelulares. Desta forma, diversas variáveis foram estudadas no presente trabalho (ureia, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , pH inicial do meio, quantidade de inóculo, teor de umidade, Tween 80, quantidade de substrato). Devido ao elevado número de variáveis, optou-se por utilizar inicialmente um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para a triagem das mais importantes. Segundo Rodrigues e lemma (2014), este tipo de planejamento é bem adequado para se estimar os efeitos principais, selecionar as variáveis mais significativas e redefinir os níveis das mesmas para um novo planejamento, em busca das condições otimizadas.

5.1 Delineamento experimental fatorial fracionado empregado no co-cultivo para a produção de celulases

Tanto para este delineamento quanto para todos os demais realizados visando a otimização das condições de cultivo para a produção das enzimas, as respostas avaliadas foram as atividades de endoglucanase, β -glicosidase. As atividades de FPase foram determinadas em todos os experimentos envolvendo planejamento experimental, porém não foram levadas em consideração para a escolha das melhores condições de cultivo. Isso justifica-se pelo fato de que durante o presente trabalho e em demais trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa, baixas atividades desta enzima foram muitas vezes observadas em extratos enzimáticos com altas atividades de endoglucanase e β -glicosidase. Tal fato pode ter ocorrido devido às dificuldades na avaliação da atividade de FPase pelo método de Ghose (GHOSE, 1987). Dificuldades na avaliação da atividade de FPase pelo método de Ghose tem sido reportadas por vários autores (DASHTBAN et al., 2010; FENG; JIANG; ZHU, 2009; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). De acordo com Dashtban et al., (2010), este protocolo requer uma taxa fixa de conversão do substrato de 2,0 mg de glicose (baseado na quantificação de açúcares redutores pelo método do DNS) liberados a partir de 50 mg de papel de filtro, em 60 minutos. Entretanto, devido à heterogeneidade do papel de filtro (celulose amorfa/cristalina) os rendimentos de

açúcares redutores durante a hidrólise não podem ser associados a uma função linear da atividade de celulasas totais no experimento (ZHANG et al., 2009).

Os fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 destacaram-se na produção de endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente, durante o desenvolvimento de trabalhos anteriores (MARQUES, 2013). Assim, o co-cultivo dos fungos foi realizado visando a obtenção de um extrato que apresentasse atividade de ambas as enzimas, o que contribuiria para a redução nos custos do processo. A Tabela 5 apresenta as atividades enzimáticas obtidas nos 16 ensaios do primeiro delineamento experimental realizado, um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} .

Tabela 5 - Ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , em níveis codificados e reais (entre parênteses) (entre parênteses), para a produção de celulasas pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo como resposta as atividades enzimáticas de celulasas.

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	-1 (50)	-1 (0,25)	+1 (15)	132,57	85,39	1,15
2	+1 (0,3)	-1 (1)	-1 (2)	-1 (4)	+1 (9)	+1 (70)	-1 (0,25)	-1 (5)	130,57	120,75	1,20
3	-1 (0,1)	+1 (2)	-1 (2)	-1 (4)	+1 (9)	+1 (70)	+1 (0,75)	-1 (5)	134,57	146,33	0,87
4	+1 (0,3)	+1 (2)	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	-1 (50)	+1 (0,75)	+1 (15)	140,56	110,97	0,94
5	-1 (0,1)	-1 (1)	+1 (6)	-1 (4)	+1 (9)	-1 (50)	+1 (0,75)	-1 (5)	147,55	168,53	1,57
6	+1 (0,3)	-1 (1)	+1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	+1 (70)	+1 (0,75)	+1 (15)	122,58	69,22	1,04
7	-1 (0,1)	+1 (2)	+1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	+1 (70)	-1 (0,25)	+1 (15)	124,58	48,53	0,97
8	+1 (0,3)	+1 (2)	+1 (6)	-1 (4)	+1 (9)	-1 (50)	-1 (0,25)	-1 (5)	167,53	166,65	1,26
9	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (2)	+1 (6)	-1 (3)	+1 (70)	+1 (0,75)	-1 (5)	120,58	173,04	0,83
10	+1 (0,3)	-1 (1)	-1 (2)	+1 (6)	+1 (9)	-1 (50)	+1 (0,75)	+1 (15)	151,55	133,92	0,91
11	-1 (0,1)	+1 (2)	-1 (2)	+1 (6)	+1 (9)	-1 (50)	-1 (0,25)	+1 (15)	138,56	143,70	0,84
12	+1 (0,3)	+1 (2)	-1 (2)	+1 (6)	-1 (3)	+1 (70)	-1 (0,25)	-1 (5)	118,58	135,05	1,18
13	-1 (0,1)	-1 (1)	+1 (6)	+1 (6)	+1 (9)	+1 (70)	-1 (0,25)	+1 (15)	60,29	48,15	1,07
14	+1 (0,3)	-1 (1)	+1 (6)	+1 (6)	-1 (3)	-1 (50)	-1 (0,25)	-1 (5)	136,56	148,59	1,44
15	-1 (0,1)	+1 (2)	+1 (6)	+1 (6)	-1 (3)	-1 (50)	+1 (0,75)	-1 (5)	160,54	144,08	1,32
16	+1 (0,3)	+1 (2)	+1 (6)	+1 (6)	+1 (9)	+1 (70)	+1 (0,75)	+1 (15)	63,29	45,89	0,81
17	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	132,57	144,45	1,20
18	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	129,57	137,30	1,13
19	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	133,57	140,69	1,02
20	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	130,57	138,43	1,09

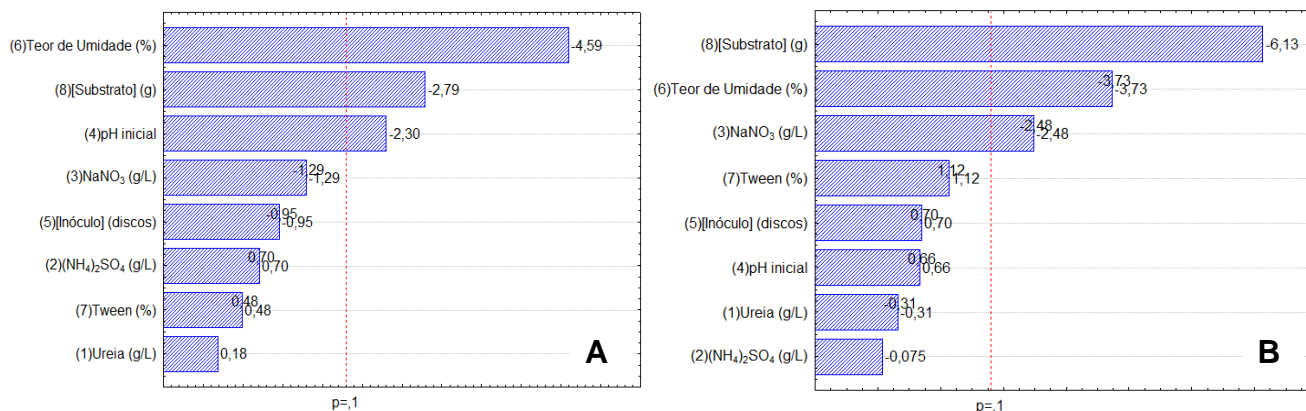
x₁ - Ureia (g/L); x₂ - (NH₄)₂SO₄ (g/L); x₃ - NaNO₃ (g/L); x₄ - pH; x₅ - Inóculo (discos); x₆ - Umidade (%); x₇ - Tween 80 (%); x₈ - Substrato (g); Y₁ - Endoglucanase (U/g); Y₂ - β -glicosidase (U/g); Y₃ - FPase (FPU/g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As atividades máximas obtidas foram 167,53 U/g (16,75 U/mL), 173,04 U/g (17,30 U/mL) e 1,57 FPU/g para endoglucanase, β -glicosidase e FPase, respectivamente. Observa-se, pelos dados apresentados na Tabela 5 que a condição de cultivo que proporcionou a maior atividade de endoglucanase (ensaio 8), proporcionou uma atividade de β -glicosidase muito próxima da máxima obtida (ensaio 9).

O efeito quantitativo estimado que cada variável analisada exerceu sobre as atividades enzimáticas de endoglucanase e β -glicosidase é apresentado pelo Diagrama de Pareto (Figura 15) e foi confirmado pela análise de variância (ANOVA) (Tabelas 6 e 7). Os valores dos coeficientes de determinação do modelo (R^2) foram 0,77 e 0,84 para endoglucanase e β -glicosidase respectivamente. As variáveis teor de umidade inicial do substrato, quantidade de substrato e pH inicial do meio de cultivo apresentaram efeitos significativos ($p < 0,1$) na produção de endoglucanase. Já para a produção de β -glicosidase, as variáveis quantidade de substrato, teor de umidade inicial do substrato e concentração de NaNO_3 apresentaram efeitos significativos.

Figura 15 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para atividade de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴, para a atividade de endoglucanase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)	8,98	1	8,982	0,034	0,858
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	131,99	1	131,986	0,494	0,497
(3)NaNO ₃ (g/L)	447,49	1	447,485	1,674	0,222
(4)pH inicial	1416,57	1	1416,571	5,300	0,042
(5)Inóculo(discos)	245,21	1	245,215	0,918	0,359
(6)Teor de Umidade (%)	5639,99	1	5639,995	21,103	0,001
(7)Tween (%)	63,87	1	63,872	0,239	0,635
(8)Substrato(g)	2082,04	1	2082,039	7,790	0,018
Erro	2939,83	11	267,257		
Total SQ	12975,98	19			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴, para a atividade de β-glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)	8,982	1	8,982	0,034	0,858
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	131,986	1	131,986	0,494	0,497
(3)NaNO ₃ (g/L)	447,485	1	447,485	1,674	0,222
(4)pH inicial	1416,571	1	1416,571	5,300	0,042
(5)Inóculo(discos)	245,215	1	245,215	0,918	0,359
(6)Teor de Umidade (%)	5639,995	1	5639,995	21,103	0,001
(7)Tween (%)	63,872	1	63,872	0,239	0,635
(8)Substrato(g)	2082,039	1	2082,039	7,790	0,018
Erro	2939,830	11	267,257		
Total SQ	12975,976	19			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizado o cálculo da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas sobre a atividade das enzimas endoglucanase e β-glicosidase e determinou-se, como descrito no item 4.2.1., que apenas as

variáveis cujos efeitos tiveram contribuição acima de 40% sobre a produção de cada enzima seriam selecionadas para realização de um próximo planejamento (PEREIRA FILHO, 2015b) (Tabela 8).

Tabela 8 - Estimativa da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas, no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , ao nível de confiança de 90%, sobre as atividades de celulasas obtidas pelo co-cultivo dos fungos endófitos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

Variáveis	Endoglucanase		β-glicosidase	
	Efeito	Efeito (%)	Efeito	Efeito (%)
NaNO ₃	-10,57	4,46	-26,19	10,28
pH inicial	-18,81	14,11	7,00	0,74
Teor de Umidade	-37,55	56,20	-39,35	23,22
Quantidade de substrato	-22,81	20,75	-64,65	62,65

*valores em negrito, % de efeito sobre a variável >40%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As variáveis teor de umidade e quantidade de substrato apresentaram os maiores efeitos sobre a atividade das enzimas endoglucanase e β-glicosidase, respectivamente. Tais efeitos indicaram que ao aumentar o teor de umidade e quantidade de substrato ocorreu uma diminuição nas atividades de endoglucanase e β-glicosidase, respectivamente. Sendo assim, estas variáveis foram empregadas em níveis inferiores no planejamento seguinte.

As demais variáveis avaliadas, apesar de não apresentarem efeito estatisticamente significativo sobre a produção das enzimas nestes ensaios, foram mantidas em seus níveis centrais no planejamento seguinte por serem biologicamente importantes. Em relação a estas variáveis, provavelmente os níveis avaliados não possibilitaram a identificação de seus efeitos sobre as respostas.

Brijwani et al., (2010), visando a produção de celulasas pelo co-cultivo de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae*, por FES, utilizando casca de soja e farelo de trigo como substratos observaram em condições otimizadas das variáveis teor de umidade (70%), temperatura de incubação (30 °C) e pH inicial do meio (5), as atividades máximas 10,78 FPU/g e 10,71 U/g de β-glicosidase após o período de incubação de 96 horas (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010).

5.2 Delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) empregado no co-cultivo para a produção de celulases

Após avaliação prévia da influência das variáveis na atividade das enzimas, pelo delineamento fatorial fracionado, foi possível selecionar aquelas que apresentaram efeito significativo e dar continuidade ao processo de otimização das condições de cultivo.

Para a condição de co-cultivo dos fungos, as variáveis selecionadas foram teor de umidade inicial do substrato e quantidade de substrato, sendo agora empregadas em um (DCCR) 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis não selecionadas a partir do delineamento fatorial fracionado foram agora mantidas em seus pontos centrais. Os níveis codificados e reais das variáveis avaliadas no DCCR e as respostas obtidas para cada ensaio do delineamento estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Ensaios do DCCR, em níveis codificados e reais (entre parênteses), empregado para o co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC 04, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo-se como resposta a atividade de celulases.

Ensaios	x_1	x_2	Y_1	Y_2	Y_3
1	-1 (35)	-1 (4)	61,64	261,32	0,94
2	+1 (65)	-1 (4)	103,62	345,71	0,82
3	-1 (35)	+1 (6)	104,60	104,76	1,23
4	+1 (65)	+1 (6)	109,62	201,03	1,39
5	0 (50)	0 (5)	115,58	173,54	0,85
6	0 (50)	0 (5)	114,59	175,55	0,83
7	0 (50)	0 (5)	112,59	172,04	0,83
8	-1,41 (29)	0 (5)	87,61	156,49	0,96
9	+1,41 (71)	0 (5)	115,55	300,94	0,99
10	0 (50)	-1,41 (3,6)	79,61	285,64	0,84
11	0 (50)	+1,41 (6,4)	105,58	195,44	1,36

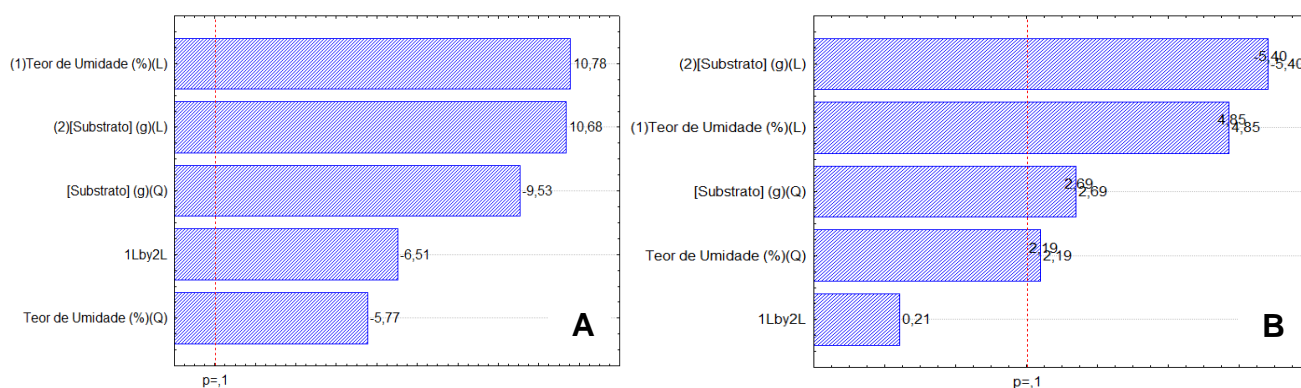
x_1 - Teor de Umidade (%); x_2 - Substrato(g); Y_1 - Endoglucanase (U/g); Y_2 - β -glicosidase (U/g); Y_3 - FPase (FPU/g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que as atividades de endoglucanase, β -glicosidase e FPase variaram de 61,64 a 115,58 U/g, de 104,76 a 345,70 U/g e de e 0,81 a 1,38 FPU/g, respectivamente. Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre as atividades enzimáticas de endoglucanase e β -glicosidase são apresentados pelo

Diagrama de Pareto (Figura 16) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentada nas Tabelas 10 e 11. Os dados estatísticos sobre a atividade de FPase não foram apresentados pois não foram levados em consideração na otimização das variáveis para produção das enzimas, apenas a equação do modelo previsto para determinação da atividade será apresentada. Como pode ser observado pelo diagrama de Pareto, para a enzima endoglucanase as duas variáveis e a interação entre elas foram significativas ao nível de confiança de 90%. Para β -glicosidase, a interação entre as variáveis não foi significativa.

Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento DCCR, na atividade de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) obtidas pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os coeficientes de determinação do modelo (R^2) foram 0,98 e 0,92 para endoglucanase e β -glicosidase respectivamente, indicando bom ajuste aos dados experimentais. Pela análise de variância (Tabelas 10 e 11), os efeitos lineares e quadráticos das duas variáveis, bem como a interação entre elas, foram significativos para a atividade de endoglucanase. Para β -glicosidase, os efeitos lineares e quadráticos das duas variáveis foram significativos ao nível de confiança de 90%.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de endoglucanase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) Teor de Umidade (%) (L)	935,606	1	935,60	116,345	0,000
Teor de Umidade (%) (Q)	268,073	1	268,07	33,336	0,002
(2) Substrato (g) (L)	917,844	1	917,84	114,136	0,000
Substrato (g) (Q)	731,698	1	731,69	90,989	0,000
1L*2L	341,308	1	341,30	42,443	0,001
Erro puro	40,208	5	8,04		
Total	3044,221	10			

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

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de β -glicosidase obtida pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) Teor de Umidade (%) (L)	18522,984	1	18522,98	23,576	0,005
Teor de Umidade (%) (Q)	3787,114	1	3787,11	4,820	0,080
(2) Substrato (g) (L)	22982,464	1	22982,46	29,252	0,003
Substrato (g) (Q)	5714,271	1	5714,27	7,273	0,043
1L*2L	35,307	1	35,31	0,045	0,840
Erro puro	3928,344	5	785,67		
Total	52874,667	10			

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

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a atividade prevista de endoglucanase (Eq. 4), β -glicosidase (Eq. 5) e FPase (Eq. 6), em função das variáveis independentes avaliadas. As equações são apresentadas abaixo, todas em níveis reais:

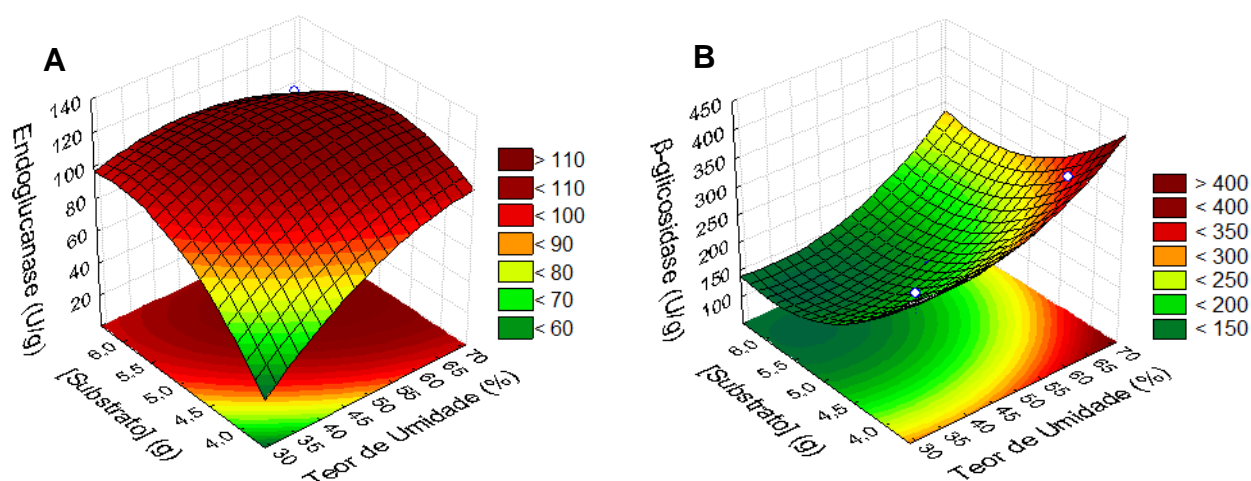
$$Y_1 = -490,435 + 6,862 \cdot x_1 - 0,031 \cdot x_1^2 + 155,332 \cdot x_2 - 11,383 \cdot x_2^2 - 0,616 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (4)$$

$$Y_2 = 1413,825 - 9,292 \cdot x_1 + 0,115 \cdot x_1^2 - 381,606 \cdot x_2 + 31,810 \cdot x_2^2 + 0,198 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (5)$$

$$Y_3 = 5,563 - 0,060 \cdot x_1 + 0,00037 \cdot x_1^2 - 1,499 \cdot x_2 + 0,147 \cdot x_2^2 + 0,005 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (6)$$

As superfícies de respostas geradas pelo modelo, considerando-se apenas os efeitos significativos, são apresentadas na Figura 17, a fim de se demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma, buscando-se a otimização das condições para a obtenção de atividades máximas das enzimas.

Figura 17 - Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) obtidas pelo co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 em função das variáveis teor de umidade e quantidade de substrato.



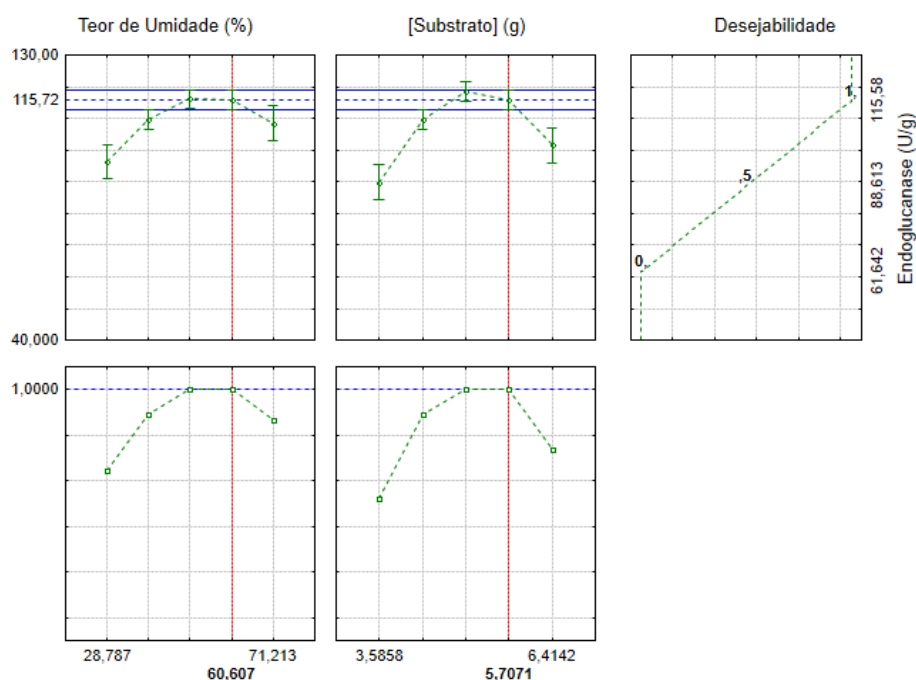
Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando-se a superfície, quando a resposta é a atividade de endoglucanase (Figura 17A), podemos verificar a existência de uma região ótima para a atividade da enzima, a qual corresponde à faixa de combinações de teor inicial de umidade dos substratos de 50 a 70% e quantidade de substrato de 4,5 a 5,8 g, sugerindo que maiores atividades são alcançadas quando estas variáveis estão em seus níveis mais altos. Para atividade de β -glicosidase a superfície indica que o aumento da atividade ocorreu quando as variáveis teor de umidade e quantidade de substrato foram empregadas em seus níveis mais alto e mais baixo, respectivamente, sendo que a curvatura do modelo se encontra em uma região de baixa atividade da enzima (Figura 17B). Sendo assim não foi possível a otimização das condições de

cultivo para a produção desta enzima mas, utilizando-se o modelo de regressão obtido, pode-se prever a atividade de β -glicosidase quando as variáveis teor de umidade e quantidade de substrato estão em seus valores otimizados para produção de endoglucanase.

Utilizando a função de desejabilidade do *software* STATISTICA 10.0, foi possível prever as condições ótimas para atividade de endoglucanase, levando-se em conta as duas variáveis independentes teor de umidade e quantidade de substrato, bem como prever as atividades máximas (Figura 18).

Figura 18 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis teor de umidade inicial e quantidade de substrato no DCCR para a máxima atividade de endoglucanase pelo co-cultivo dos fungos endófitos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 18, a função de desejabilidade sugeriu como condição ótima 5,7g de substrato a 60,6% de umidade inicial, a partir da qual previu-se uma atividade máxima de endoglucanase de 115,72 U/g. Considerando-se tal condição de cultivo, as atividades previstas para β -glicosidase e FPase podem ser representadas pelo modelo proposto (Equações 5 e 6 respectivamente), sendo 213,39 U/g e 1,13 FPU/g, respectivamente. A validação experimental dos resultados foi realizada por cultivos sob as condições otimizadas para as variáveis teor de

umidade inicial do substrato e quantidade de substrato. Os resultados obtidos foram 121,56 U/g \pm 4,13 para atividade de endoglucanase, 218,96 U/g \pm 3,94 para β -glicosidase e 0,92 FPU/g \pm 0,14 para FPase, indicando reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo.

Em co-cultivo prévio dos fungos, sem a avaliação da influência das variáveis, observou-se atividades inferiores de endoglucanase (42,50 U/g) e β -glicosidase (56,55 U/g), sendo estas atividades 2,8 e 3,8 vezes inferiores às obtidas no presente cultivo. Esses resultados sugerem a importância da avaliação da influência das variáveis em um cultivo para produção de enzimas.

O teor de umidade do substrato é um parâmetro muito importante em processos de FES. A água é essencial para o metabolismo microbiano e sua disponibilidade pode afetar a difusão de solutos, gases e alterações osmóticas provocadas por metabolitos excessivos nas proximidades das células (GERVAIS; MOLIN, 2003; TODD, 1972). Durante a FES, índices de umidade altos ou baixos afetam a produtividade. Um nível de umidade mais elevado pode diminuir a porosidade, alterar a estrutura das partículas de substrato, promovendo o desenvolvimento de viscosidade e reduzindo a transferência de oxigênio, enquanto um menor teor de umidade causa redução na solubilidade dos nutrientes do substrato sólido, menor grau de inchaço e maior tensão da água (MARTINS et al., 2011). A quantidade de umidade necessária está diretamente relacionada com a estrutura do substrato lignocelulósico. A porosidade e a área superficial específica das partículas sólidas influenciam a eficiência da difusão do ar e capacidade de retenção de água do substrato (CHEN HONGZHANG, 2013).

Bansal et al., (2012), utilizando farelo de trigo como substrato na FES para produção de enzimas por *Aspergillus niger* NS-2, obtiveram maiores atividades de celulasas em um teor de umidade inicial de 60%, dentro da faixa ótima observada no presente trabalho. Maurya et al., (2012), observaram que a máxima atividade de endoglucanase de *Trichoderma reesei* quando cultivado por FES em farelo de trigo foi obtida com um teor de umidade inicial do substrato de 70%, corroborando os resultados do presente trabalho. A produção de enzimas por *Aspergillus fumigatus* ABK9 em FES, na mistura de farelo de trigo e de algodão, foi otimizada por Das et al., (2013) e, entre 11 parâmetros avaliados, a quantidade de substrato de 10,5 g influenciou significativamente a atividade de celulasas, diferentemente do observado

no presente trabalho para a condição de co-cultivo, onde quantidades menores de substrato proporcionaram maiores atividades enzimáticas.

5.3 Delineamento experimental fatorial fracionado empregado no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 para a produção de celulases

A segunda condição estudada foi o cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, seguindo-se o planejamento experimental fatorial fracionado 2^{8-4} citado anteriormente. As variáveis selecionadas, seus níveis codificados e reais e as respostas obtidas em relação a produção das celulases são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Ensaio do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , em níveis codificados e reais (entre parênteses), para a produção de celulases pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo como respostas as atividades enzimáticas de celulases.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	-1 (50)	-1 (0,25)	+1 (15)	255,44	80,88	0,85
2	+1 (0,3)	-1 (1)	-1 (2)	-1 (4)	+1 (9)	+1 (70)	-1 (0,25)	-1 (5)	272,42	103,82	1,19
3	-1 (0,1)	+1 (2)	-1 (2)	-1 (4)	+1 (9)	+1 (70)	+1 (0,75)	-1 (5)	205,43	108,34	1,12
4	+1 (0,3)	+1 (2)	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	-1 (50)	+1 (0,75)	+1 (15)	196,44	86,14	1,04
5	-1 (0,1)	-1 (1)	+1 (6)	-1 (4)	+1 (9)	-1 (50)	+1 (0,75)	-1 (5)	287,40	128,65	0,93
6	+1 (0,3)	-1 (1)	+1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	+1 (70)	+1 (0,75)	+1 (15)	278,39	76,74	1,08
7	-1 (0,1)	+1 (2)	+1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	+1 (70)	-1 (0,25)	+1 (15)	290,40	73,35	0,93
8	+1 (0,3)	+1 (2)	+1 (6)	-1 (4)	+1 (9)	-1 (50)	-1 (0,25)	-1 (5)	302,38	132,79	0,97
9	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (2)	+1 (6)	-1 (3)	+1 (70)	+1 (0,75)	-1 (5)	179,53	108,72	0,81
10	+1 (0,3)	-1 (1)	-1 (2)	+1 (6)	+1 (9)	-1 (50)	+1 (0,75)	+1 (15)	195,47	91,03	0,87
11	-1 (0,1)	+1 (2)	-1 (2)	+1 (6)	+1 (9)	-1 (50)	-1 (0,25)	+1 (15)	201,50	85,77	0,77
12	+1 (0,3)	+1 (2)	-1 (2)	+1 (6)	-1 (3)	+1 (70)	-1 (0,25)	-1 (5)	197,46	105,71	0,87
13	-1 (0,1)	-1 (1)	+1 (6)	+1 (6)	+1 (9)	+1 (70)	-1 (0,25)	+1 (15)	282,33	51,54	0,81
14	+1 (0,3)	-1 (1)	+1 (6)	+1 (6)	-1 (3)	-1 (50)	-1 (0,25)	-1 (5)	195,38	105,71	0,64
15	-1 (0,1)	+1 (2)	+1 (6)	+1 (6)	-1 (3)	-1 (50)	+1 (0,75)	-1 (5)	212,45	112,85	0,60
16	+1 (0,3)	+1 (2)	+1 (6)	+1 (6)	+1 (9)	+1 (70)	+1 (0,75)	+1 (15)	228,50	66,21	0,98
17	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	243,57	101,19	1,00
18	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	246,56	99,31	0,97
19	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	245,57	100,44	0,98
20	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	244,56	98,93	0,98

x₁ - Ureia (g/L); x₂ - (NH₄)₂SO₄ (g/L); x₃ - NaNO₃ (g/L); x₄ - pH; x₅ - Inóculo (discos); x₆ - Umidade (%); x₇ - Tween 80 (%); x₈ - Substrato (g); Y₁ - Endoglucanase (U/g); Y₂ - β-glicosidase (U/g); Y₃ - FPase (FPU/g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

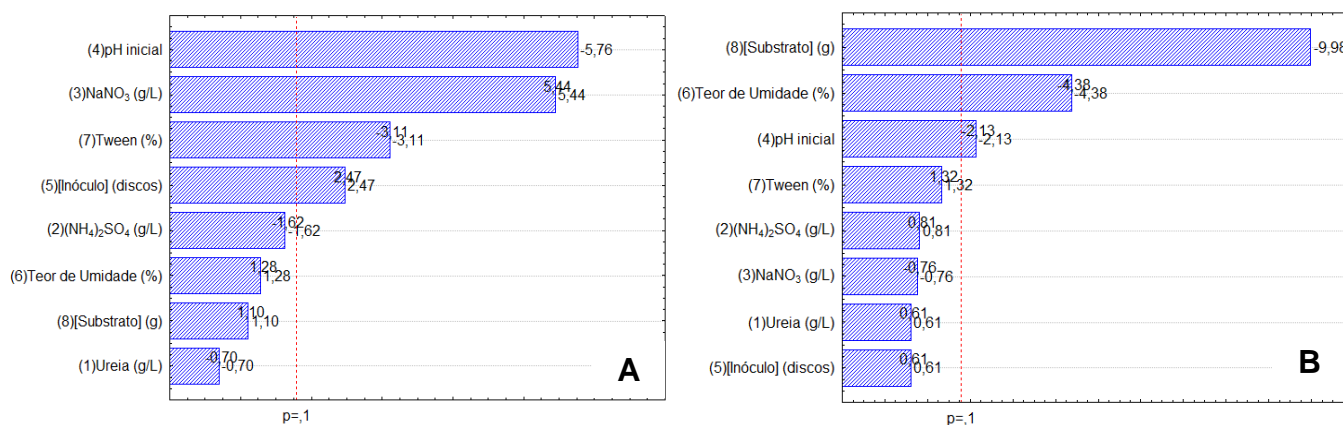
As atividades máximas obtidas foram 302,38 U/g (30,23 U/mL), 132,79 U/g (13,27 U/mL) e 1,19 FPU/g para endoglucanase, β-glicosidase e FPase,

respectivamente. As maiores atividades de endoglucanase e β -glicosidase foram obtidas utilizando-se as condições de cultivo do ensaio 8 (Tabela 12).

Os efeitos estimados que cada uma das variáveis analisadas exerceu sobre as atividades enzimáticas são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 19) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentadas nas Tabelas 13 e 14. Os coeficientes de determinação do modelo (R^2) foram 0,88 e 0,92 para endoglucanase, β -glicosidase, respectivamente.

Observou-se que, no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, as variáveis que apresentaram efeitos significativos na atividade de endoglucanase foram pH inicial do meio, concentração de NaNO_3 , porcentagem de Tween e quantidade de inóculo. Já para a atividade de β -glicosidase, apresentaram efeitos significativos as variáveis quantidade de substrato, teor de umidade inicial dos substratos e pH inicial do meio.

Figura 19 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para produção de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴, para a atividade de endoglucanase obtida pelo, obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)	144,228	1	144,228	0,490	0,498
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	781,261	1	781,261	2,656	0,131
(3)NaNO ₃ (g/L)	8721,153	1	8721,153	29,644	0,000
(4)pH inicial	9785,281	1	9785,281	33,261	0,000
(5)Inóculo (discos)	1804,595	1	1804,595	6,134	0,031
(6)Teor de Umidade (%)	484,044	1	484,044	1,645	0,226
(7)Tween (%)	2854,292	1	2854,292	9,702	0,010
(8)Substrato(g)	361,285	1	361,285	1,228	0,291
Erro	3236,121	11	294,193		
Total SQ	28172,259	19			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴, para a atividade de β-glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)	20,377	1	20,377	0,374	0,553
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	36,226	1	36,226	0,664	0,432
(3)NaNO ₃ (g/L)	31,839	1	31,839	0,584	0,461
(4)pH inicial	249,620	1	249,620	4,576	0,056
(5)Inóculo (discos)	20,377	1	20,377	0,374	0,553
(6)Teor de Umidade (%)	1046,593	1	1046,593	19,188	0,001
(7)Tween (%)	95,659	1	95,659	1,754	0,212
(8)Substrato(g)	5436,173	1	5436,173	99,665	0,000
Erro	599,987	11	54,544		
Total SQ	7536,853	19			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi realizado o cálculo da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas sobre a atividade das enzimas endoglucanase e β-glicosidase (Tabela 15). A variável quantidade de substrato foi selecionada para a

continuidade do trabalho, visando a otimização das condições de cultivo para a atividade de β -glicosidase, uma vez que a porcentagem de efeito sobre a atividade desta enzima foi muito expressiva em relação às demais (78,37%). No planejamento seguinte, níveis inferiores desta variável foram empregados, uma vez que seu efeito foi significativo no nível (-1).

Tabela 15 - Estimativa da porcentagem dos efeitos das variáveis estatisticamente significativas ao nível de confiança de 90% na atividade de celulasas pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

Variáveis	Endoglucanase		β -glicosidase	
	Efeito	Efeito (%)	Efeito	Efeito (%)
pH inicial	-49,46	39,24	-7,90	3,60
NaNO₃	46,69	34,97	-2,82	0,46
Tween	-26,71	11,45	4,89	1,38
Quantidade de inóculo	21,24	7,24	2,26	0,29
Teor de Umidade	11,00	1,94	-16,18	15,09
Quantidade de substrato	9,50	1,45	-36,87	78,37

*Valores em negrito, % de efeito sobre a variável >40%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a atividade de endoglucanase, a maioria das variáveis apresentou porcentagens de efeito baixas em relação aos 40% tomados como base para escolha das variáveis, justificado no item 5.1.1.2. Apesar da porcentagem de efeito do pH sobre a atividade de endoglucanase ser próxima aos 40% preconizados inicialmente, esta variável não foi selecionada para o próximo planejamento. Isso justifica-se pelo fato do efeito desta variável ser negativo, indicando que seria necessário diminuir o valor do pH inicial dos meios nos próximos planejamentos. O menor valor de pH utilizado no planejamento fatorial fracionado foi 4 e sabe-se que valores de pH abaixo de 4 podem não ser tão favoráveis para o desenvolvimento do fungo (MAURYA et al., 2012).

A variável NaNO₃ apresentou efeito significativo em seu nível (+1) sobre a atividade de endoglucanase, ou seja, o aumento da concentração desta fonte de nitrogênio levou à maior atividade enzimática. Embora a porcentagem de efeito desta variável (34,97%) tenha sido inferior a 40%, a mesma foi selecionada para os

próximos experimentos, já que as demais apresentaram porcentagens muito inferiores.

As variáveis não selecionadas foram mantidas no planejamento seguinte, por serem biologicamente importantes para o crescimento e metabolismo dos fungos, sendo então utilizadas em seus níveis centrais.

Goyal et al. (2014) realizando a otimização de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de celulases por *Trichoderma viride*, verificaram que a atividade enzimática foi superior quando se utilizou NaNO_3 em relação às outras fontes de nitrogênio avaliadas, corroborando a importância do estudo da influência deste composto na produção das enzimas.

5.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR) empregado no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 para a produção de celulases

As variáveis concentração de NaNO_3 e quantidade de substrato, selecionadas como descrito acima, foram empregadas em um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 16). As demais variáveis foram mantidas em seus níveis centrais.

Tabela 16 - Ensaios do DCCR, em níveis codificados e reais (entre parênteses), empregado para o cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01, por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo-se como resposta a atividade de celulases.

Ensaios	x_1	x_2	Y_1	Y_2	Y_3
1	-1 (4,5)	-1 (3,0)	109,59	208,65	0,75
2	+1 (7,5)	-1 (3,0)	129,57	236,74	0,90
3	-1 (4,5)	+1 (7,0)	118,58	295,92	0,74
4	+1 (7,5)	+1 (7,0)	107,59	311,97	0,47
5	0 (6,0)	0 (5,0)	151,55	286,90	0,77
6	0 (6,0)	0 (5,0)	150,55	287,90	0,77
7	0 (6,0)	0 (5,0)	152,55	289,40	0,79
8	-1,41 (3,9)	0 (5,0)	137,56	285,39	0,48
9	+1,41 (8,1)	0 (5,0)	146,55	310,97	0,71
10	0 (6,0)	-1,41 (2,2)	80,62	141,44	0,79
11	0 (6,0)	+1,41 (7,8)	111,59	301,94	0,80

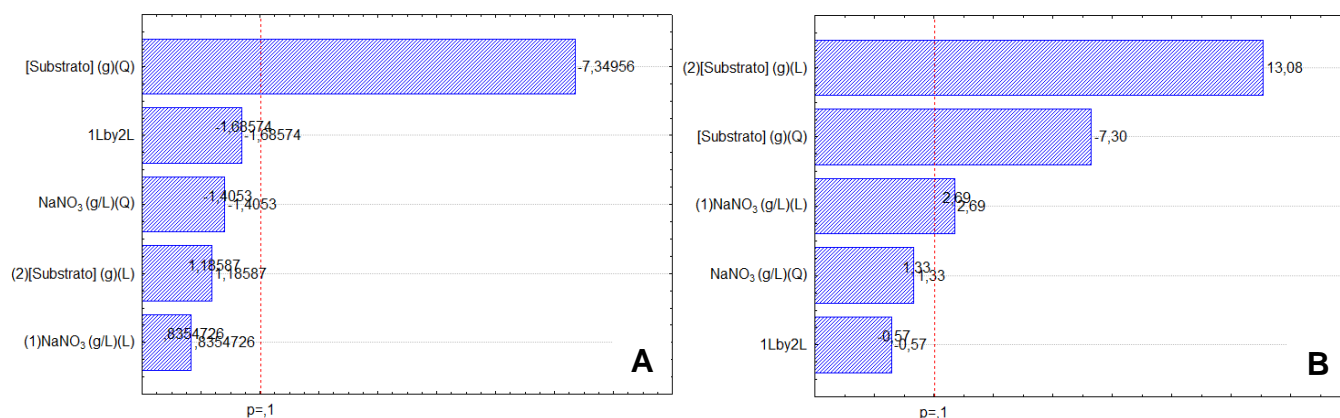
x_1 - NaNO_3 (g/L); x_2 - Substrato(g); Y_1 - Endoglucanase (U/g); Y_2 - β -glicosidase (U/g); Y_3 - FPase (FPU/g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste planejamento, a atividade das enzimas variou de 80,62 a 152,55 U/g para endoglucanase, de 141,44 a 311,97 U/g para β -glicosidase e 0,47 a 0,90 FPU/g para FPase (Tabela 16).

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre as atividades enzimáticas, são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 20) e foram confirmados pelas análises de variância (ANOVA), apresentadas nas Tabelas 17 e 18. Como pode ser observado pelo diagrama de Pareto, para endoglucanase, apenas a variável quantidade de substrato apresentou efeito significativo ao nível de confiança de 90%. Para atividade de β -glicosidase, as variáveis quantidade de substrato e concentração de NaNO_3 foram significativas. A interação entre as variáveis não teve efeito significativo na atividade das enzimas. Pode-se observar claramente a influência da quantidade de substrato para a atividade das enzimas.

Figura 20 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no DCCR, para produção de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os coeficientes de determinação do modelo do modelo (R^2) foram 0,92 e 0,98 para endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente, concluindo-se que o modelo se ajusta aos dados experimentais. Pela análise de ANOVA (Tabela 17) verifica-se que, para a enzima endoglucanase, apenas o efeito quadrático da quantidade de substrato foi significativo. Os efeitos lineares da concentração de NaNO_3 e quantidade de substrato, bem como o efeito quadrático da quantidade de substrato foram significativos para a atividade de β -glicosidase (Tabela 18).

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)NaNO ₃ (g/L)(L)	58,895	1	58,89	0,698	0,4415
NaNO ₃ (g/L)(Q)	166,630	1	166,63	1,974	0,2189
(2)Substrato(g)(L)	118,656	1	118,66	1,406	0,2890
Substrato(g)(Q)	4557,608	1	4557,61	54,016	0,0007
1L*2L	239,770	1	239,77	2,841	0,1527
Erro	421,875	5	84,38		
Total SQ	5449,641	10			

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

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de β-glicosidase obtidas pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)NaNO ₃ (g/L)(L)	806,281	1	806,28	7,281	0,043
NaNO ₃ (g/L)(Q)	196,832	1	196,83	1,778	0,240
(2)Substrato(g)(L)	18962,937	1	18962,94	171,246	0,000
Substrato(g)(Q)	5906,358	1	5906,36	53,338	0,001
1L*2L	36,226	1	36,23	0,327	0,592
Erro puro	553,675	5	110,73		
Total	27734,570	10			

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

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

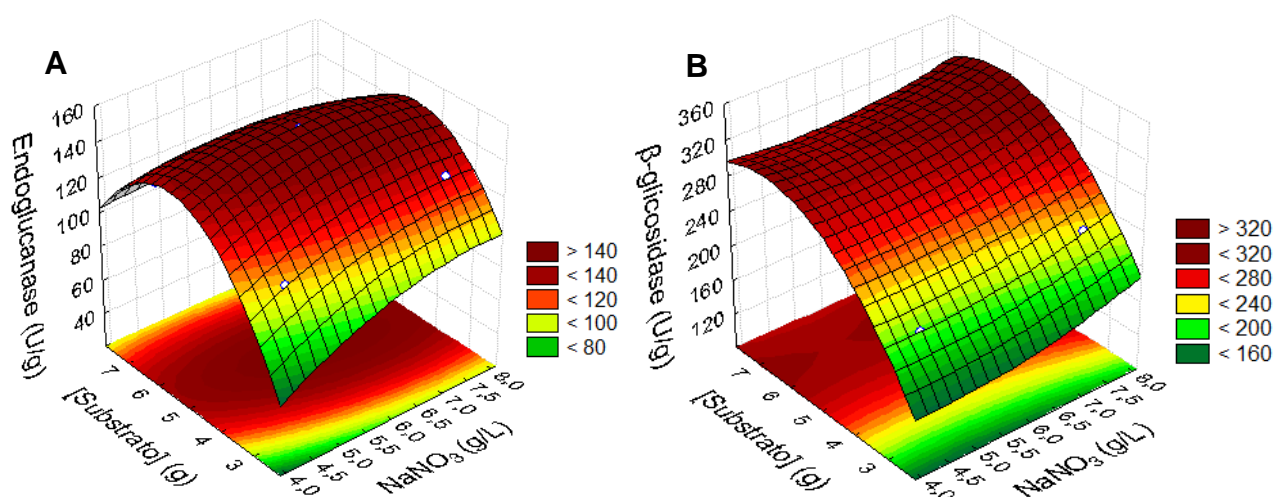
Os dados foram avaliados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a atividade prevista de endoglucanase (Eq. 7) e β-glicosidase (Eq. 8) em função das variáveis independentes avaliadas. As equações do modelo utilizado para a análise das duas variáveis, para cada enzima, são apresentadas abaixo:

$$Y_1 = - 210,825 + 43,684*x_1 - 2,414*x_1^2 + 88,433*x_2 - 7,102*x_2^2 - 2,581*x_1*x_2 \quad (7)$$

$$Y_2 = - 11,567 - 19,778*x_1 + 2,623*x_1^2 + 111,213*x_2 - 8,085*x_2^2 - 1,003*x_1*x_2 \quad (8)$$

As superfícies de respostas geradas pelo modelo, considerando-se apenas os efeitos significativos (Figura 21), demonstram os efeitos de interação das variáveis, bem como os níveis ideais de cada parâmetro para alcançar as máximas atividades enzimáticas.

Figura 21 - Superfícies de resposta obtidas para os efeitos da concentração de NaNO_3 e da quantidade de substrato nas atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.



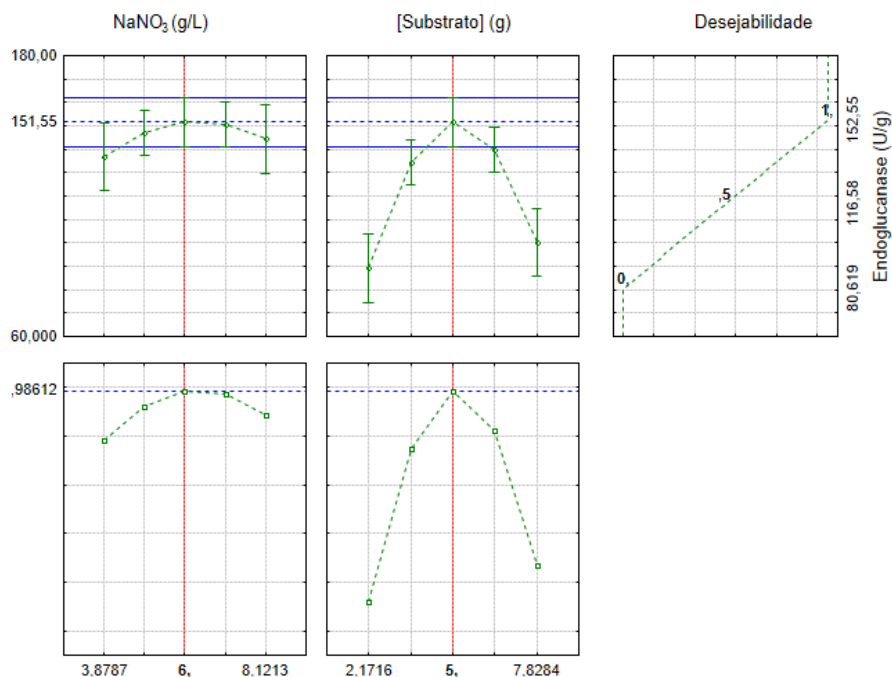
Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando-se a superfície de resposta para a atividade de endoglucanase, pode-se verificar a existência de uma região ótima para a atividade da enzima na faixa de concentração de NaNO_3 entre 5,0 e 7,8 g/L e na faixa de quantidade de substrato entre 4,5 e 5,8 g, sugerindo que maiores atividades são alcançadas quando as variáveis estão em seus níveis mais altos (Figura 21A). Para atividade de β -glicosidase, a superfície indica que o aumento da atividade ocorreu quando as variáveis concentração de NaNO_3 e quantidade de substrato estavam em seus níveis mais altos (7,2 a 8,0 g/L e 5,5 a 8,0 g, respectivamente) (Figura 21B). Estes resultados possibilitam a escolha de um ponto ótimo em comum para validação do método.

A função de desejabilidade do *software* STATISTICA 10.0 foi utilizada para otimização das variáveis na atividade de endoglucanase. Após simulação no *software* fixando-se os níveis previstos/otimizados para a atividade desta enzima, verificou-se que a atividade de β -glicosidase se mantém satisfatória. Por outro lado, otimizando-se a atividade de β -glicosidase, a atividade de endoglucanase seria reduzida. A Figura

22 apresenta os perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e os valores otimizados da atividade de endoglucanase.

Figura 22 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis concentração de NaNO_3 e quantidade de substrato no DCCR para máxima atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 22, para otimização da atividade de endoglucanase o uso da concentração de 6,0 g/L de NaNO_3 e da quantidade de 5,0 g de substrato são apontados pela função de desejabilidade como a condição que levaria a máxima atividade desta enzima (nesse caso, 151,55 U/g). Considerando-se estes valores para condição otimizada, a atividade prevista de β -glicosidase pode ser representada pelo modelo proposto, substituindo-se os valores na equação 8. O valor predito calculado pelo software para β -glicosidase foi 288,06 U/g.

A validação experimental dos resultados foi realizada com ensaios em triplicata nas condições otimizadas para as variáveis concentração de NaNO_3 e quantidade de substrato, quando se tem como resposta a atividade de endoglucanase. Os resultados obtidos foram $168,99 \pm 12,33$ U/g para atividade de endoglucanase e $275,90 \pm 8,59$ U/g para β -glicosidase, indicando reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo.

Comparando-se as atividades obtidas no cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01 com aquelas observadas em cultivo prévio sem avaliação da influência das variáveis, pode-se observar um aumento de 1,6 e 2,3 vezes nas atividades de endoglucanase (102,54 para 168,99 U/g) e β -glicosidase (116,23 para 275,90 U/g), respectivamente.

Como citado anteriormente, as condições de cultivo influenciam o crescimento e o metabolismo microbiano. Conseqüentemente, o estudo destas condições é de grande importância para produção de enzimas microbianas, incluindo as extracelulares. Em relação às fontes de nitrogênio, tanto a natureza quanto a concentração influenciam o crescimento microbiano, uma vez são essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e N-acetil-glucosamina, um dos componentes principais da parede celular (PEDRI et al., 2015; PHILIPPOUSSIS et al., 2011). Estudos apontam também a importância da suplementação de fontes de nitrogênio na composição do meio de cultivo de fungos, pois estão diretamente relacionadas com o metabolismo dos microrganismos, podendo estimular ou inibir a produção de enzimas, incluindo as lignocelulolíticas, como as celulasas (KACHLISHVILI et al., 2006) (DESWAL; KHASA; KUHAD, 2011; SANDHU et al., 2013; YADAV; CHAUHAN; GAHLOUT, 2016). Diversos autores reportam na literatura o efeito positivo de diferentes fontes de nitrogênio na produção de celulasas fúngicas (ADELEKE et al., 2012; CALLOW et al., 2015; SANDHU et al., 2013; YADAV; CHAUHAN; GAHLOUT, 2016).

5.5 Delineamento experimental fatorial fracionado empregado no cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC 04 para a produção de celulases

A terceira e última condição a ser estudada foi o cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04, inicialmente por um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} . As variáveis selecionadas, seus níveis codificados e reais e as respostas obtidas quanto a produção de celulases são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , em níveis codificados e reais (entre parênteses), para a produção de celulases pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC 04, obtendo como resposta a atividade de celulases.

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	-1 (50)	-1 (0,25)	+1 (15)	18,25	129,15	0,23
2	+1 (0,3)	-1 (1)	-1 (2)	-1 (4)	+1 (9)	+1 (70)	-1 (0,25)	-1 (5)	8,46	233,87	0,18
3	-1 (0,1)	+1 (2)	-1 (2)	-1 (4)	+1 (9)	+1 (70)	+1 (0,75)	-1 (5)	13,25	276,85	0,06
4	+1 (0,3)	+1 (2)	-1 (2)	-1 (4)	-1 (3)	-1 (50)	+1 (0,75)	+1 (15)	10,46	136,92	0,15
5	-1 (0,1)	-1 (1)	+1 (6)	-1 (4)	+1 (9)	-1 (50)	+1 (0,75)	-1 (5)	18,65	300,81	0,29
6	+1 (0,3)	-1 (1)	+1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	+1 (70)	+1 (0,75)	+1 (15)	13,46	105,86	0,18
7	-1 (0,1)	+1 (2)	+1 (6)	-1 (4)	-1 (3)	+1 (70)	-1 (0,25)	+1 (15)	15,46	104,11	0,09
8	+1 (0,3)	+1 (2)	+1 (6)	-1 (4)	+1 (9)	-1 (50)	-1 (0,25)	-1 (5)	11,86	258,87	0,20
9	-1 (0,1)	-1 (1)	-1 (2)	+1 (6)	-1 (3)	+1 (70)	+1 (0,75)	-1 (5)	10,96	204,25	0,12
10	+1 (0,3)	-1 (1)	-1 (2)	+1 (6)	+1 (9)	-1 (50)	+1 (0,75)	+1 (15)	15,15	176,80	0,21
11	-1 (0,1)	+1 (2)	-1 (2)	+1 (6)	+1 (9)	-1 (50)	-1 (0,25)	+1 (15)	15,46	168,47	0,13
12	+1 (0,3)	+1 (2)	-1 (2)	+1 (6)	-1 (3)	+1 (70)	-1 (0,25)	-1 (5)	9,56	162,95	0,06
13	-1 (0,1)	-1 (1)	+1 (6)	+1 (6)	+1 (9)	+1 (70)	-1 (0,25)	+1 (15)	16,15	142,38	0,20
14	+1 (0,3)	-1 (1)	+1 (6)	+1 (6)	-1 (3)	-1 (50)	-1 (0,25)	-1 (5)	17,25	194,98	0,27
15	-1 (0,1)	+1 (2)	+1 (6)	+1 (6)	-1 (3)	-1 (50)	+1 (0,75)	-1 (5)	20,45	236,33	0,18
16	+1 (0,3)	+1 (2)	+1 (6)	+1 (6)	+1 (9)	+1 (70)	+1 (0,75)	+1 (15)	9,36	151,30	0,09
17	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	11,16	210,66	0,17
18	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	10,76	212,54	0,15
19	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	0 (60)	0 (0,5)	0 (10)	11,96	210,66	0,16
20	0 (0,2)	0 (1,5)	0 (4)	0 (5)	0 (6)	00	0 (0,5)	0 (10)	10,56	213,17	0,15

x₁ - Ureia (g/L); x₂ - (NH₄)₂SO₄ (g/L); x₃ - NaNO₃ (g/L); x₄ - pH; x₅ - Inóculo (discos); x₆ - Umidade (%); x₇ - Tween 80 (%); x₈ - Substrato (g); Y₁ - Endoglucanase (U/g); Y₂ - β-glicosidase (U/g); Y₃ - FPase (FPU/g)

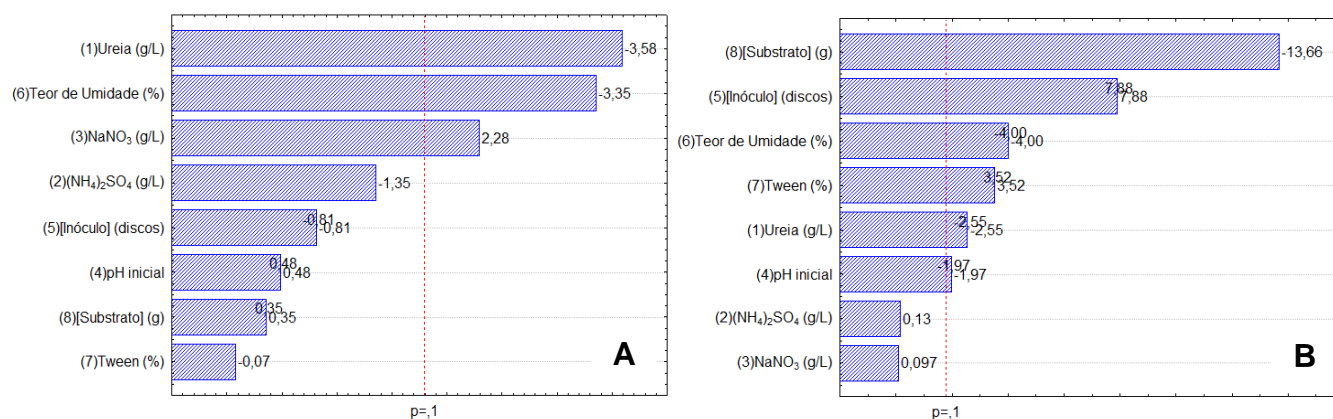
Fonte: Elaborado pelo autor.

As atividades máximas observadas foram 20,45 U/g (2,04 U/mL) de endoglucanase, 300,80 U/g (30,08 U/mL) de β-glicosidase e 0,29 FPU/g de FPase (Tabela 19). Observa-se que a atividade máxima de β-glicosidase obtida neste

planejamento foi cerca de duas vezes superior às máximas obtidas nos planejamentos anteriores, referentes ao co-cultivo e ao cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01. Entretanto, a atividade máxima de endoglucanase obtida foi muito baixa. Cultivos realizados em trabalhos anteriores (Marques, 2013), indicaram que *Saccharicola* sp. EJC04 destaca-se na produção de β -glicosidase e que *Botryosphaeria* sp. AM01 é um bom produtor de endoglucanase, o que incentivou o estudo da otimização de co-cultivo, a fim de se obter uma boa produção das duas enzimas. Os estudos sobre otimização das condições de cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04 realizados no presente trabalho foram importantes, uma vez que proporcionaram aumento considerável da atividade de β -glicosidase, podendo direcionar trabalhos futuros que objetivem a produção desta enzima em particular.

Os efeitos estimados que cada uma das variáveis analisadas exerceu sobre as atividades enzimáticas de endoglucanase e β -glicosidase são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 23) e podem ser confirmados pelas análises de variância (ANOVA) apresentadas nas Tabelas 20 e 21. Os valores dos coeficientes de regressão (R^2) foram 0,95 e 0,96 para endoglucanase e β -glicosidase respectivamente.

Figura 23 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , para produção de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) pelo cultivo isolado do fungo endófito *Saccharicola* sp. EJC 04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴, para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC 04.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)	90,563	1	90,56	117,699	0,000
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	14,990	1	14,99	19,481	0,001
(3)NaNO ₃ (g/L)	12,401	1	12,40	16,116	0,002
(4)pH inicial	0,016	1	0,01	0,020	0,889
(5)Inóculo(discos)	1,264	1	1,26	1,643	0,226
(6)Teor de Umidade (%)	41,823	1	41,82	54,354	0,000
(7)Tween (%)	2,034	1	2,03	2,643	0,132
(8)Substrato(g)	1,153	1	1,15	1,499	0,246
Erro puro	8,464	11	0,76		
Total	172,707	19			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴, para a atividade de β-glicosidase pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC 04.

β-glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)	1238,974	1	1238,97	6,514	0,027
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	3,681	1	3,68	0,019	0,892
(3)NaNO ₃ (g/L)	1,804	1	1,80	0,009	0,924
(4)pH inicial	742,178	1	742,17	3,902	0,074
(5)Inóculo(discos)	11814,804	1	11814,80	62,117	0,000
(6)Teor de Umidade (%)	3046,417	1	3046,41	16,017	0,002
(7)Tween (%)	2360,315	1	2360,31	12,409	0,005
(8)Substrato(g)	35525,750	1	35525,75	186,779	0,000
Erro puro	2092,227	11	190,20		
Total	56826,150	19			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança (p < 0,1)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste cultivo as variáveis que apresentaram efeitos significativos sobre a atividade de endoglucanase, ao nível de 90% de confiança (p<0,1), foram concentrações de ureia, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃ e teor de umidade inicial do substrato. As variáveis concentração de ureia, quantidade de substrato, quantidade de inóculo, teor

de umidade inicial do substrato e porcentagem de Tween, apresentaram efeitos significativos na atividade de β -glicosidase.

Foi realizado o cálculo da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas sobre a atividade das enzimas e optou-se por selecionar aquelas que apresentassem um valor acima de 40% de efeito (Tabela 22), como já justificado anteriormente.

Tabela 22 - Estimativa da porcentagem de contribuição de cada efeito das variáveis estatisticamente significativas, ao nível de confiança de 90%, no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , sobre as atividades de celulases obtidas pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC04.

Variáveis	Endoglucanase		β -glicosidase	
	Efeito	Efeito (%)	Efeito	Efeito (%)
Ureia	-4,13	39,98	-17,60	2,26
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-1,56	5,70	0,96	0,01
NaNO_3	2,64	16,26	0,67	0,00
pH inicial	0,56	0,74	-13,62	1,36
Quantidade de inóculo	-0,94	2,06	54,35	21,59
Teor de Umidade	-3,86	34,84	-27,60	5,57
Tween	-0,09	0,02	24,29	4,31
Quantidade de substrato	0,41	0,40	-94,24	64,91

*Valores em negrito, % de efeito sobre a variável >40%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Através do cálculo da porcentagem dos efeitos, as variáveis que apresentaram maior influência na atividade das enzimas foram ureia e quantidade de substrato. O teor de umidade inicial dos substratos apresentou efeito de 34,84%, porém foi também selecionado para o próximo planejamento, por ser um dos fatores mais importantes em processos de FES, influenciando o crescimento e atividade metabólica do microrganismo (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). A análise indicou que as variáveis selecionadas apresentaram efeitos negativos sobre a produção das enzimas, ou seja, seus níveis devem ser reduzidos em um próximo planejamento, a fim de que maiores atividades enzimáticas sejam obtidas. As demais variáveis foram mantidas no planejamento seguinte por serem biologicamente importantes para o cultivo dos fungos e seus níveis foram mantidos nos valores centrais. Singhanian et al., (2007) em estudo para a produção de celulase por *Trichoderma reesei* RUT C30 em farelo de trigo, por FES, utilizaram planejamento experimental Plackett Burman e também verificaram que um maior teor de umidade

inicial do meio teve um efeito negativo sobre a atividade das enzimas. Wahid et al. (2011), avaliando parâmetros que afetavam a produção de endoglucanase por *T. reesei* RUT C-30, por FES em fibra de côco, também verificaram que, entre outros fatores, o teor de umidade teve um efeito significativo na atividade desta enzima. Maeda et al., (2010), tendo como objetivo maximizar a produção de celulase por *Penicillium funiculosum* utilizando metodologia planejamento experimental, verificaram que ureia e extrato de levedura apresentaram efeitos significativos na atividade das enzimas. Zhang e Sang (2012) em estudo para otimização da produção de celulasas por *Penicillium chrysogenum* QML-2, por FES, utilizaram planejamento experimental do tipo Plackett Burman e verificaram que a quantidade de substrato teve efeito significativo na produção das enzimas, além do pH inicial do meio e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.6 Delineamento composto central rotacional (DCCR) empregado no cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04 para a produção de celulasas

Para a condição de cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04, as variáveis que apresentaram efeito significativo na atividade de celulasas foram concentração de ureia, teor de umidade inicial do substrato e quantidade de substrato. Para otimização das variáveis foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 incluindo 6 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios avaliando 5 níveis diferentes. Os níveis das variáveis selecionadas nos ensaios experimentais são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Ensaios do DCCR, em níveis codificados e reais (entre parênteses), empregado para no cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC 04 por FES em farelo de trigo e algodão (1:1 p/p), durante 8 dias a 28 °C, obtendo-se como resposta a atividade de celulasas.

Ensaios	x ₁	x ₂	x ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	-1 (0,03)	-1 (40)	-1 (2,5)	35,63	610,34	0,31
2	+1 (0,07)	-1 (40)	-1 (2,5)	32,14	425,08	0,38
3	-1 (0,03)	1 (50)	-1 (2,5)	36,13	600,00	0,36
4	+1 (0,07)	1 (50)	-1 (2,5)	31,83	688,40	0,20
5	-1 (0,03)	-1 (40)	+1 (3,5)	30,54	300,94	0,34
6	+1 (0,07)	-1 (40)	+1 (3,5)	31,44	690,28	0,49
7	-1 (0,03)	1 (50)	+1 (3,5)	28,94	631,97	0,47
8	+1 (0,07)	1 (50)	+1 (3,5)	29,14	695,92	0,41
9	0 (0,05)	0 (45)	0 (3,0)	29,34	731,66	0,21

Tabela continua

Continuação da Tabela

10	0 (0,05)	0 (45)	0 (3,0)	28,64	733,54	0,24
11	0 (0,05)	0 (45)	0 (3,0)	28,74	729,78	0,23
12	-1,68 (0,02)	0 (45)	0 (3,0)	29,64	675,24	0,36
13	+1,68 (0,08)	0 (45)	0 (3,0)	27,55	770,22	0,38
14	0 (0,05)	-1,68 (37)	0 (3,0)	29,34	476,49	0,30
15	0 (0,05)	+1,68 (53)	0 (3,0)	28,84	578,37	0,29
16	0 (0,05)	0 (45)	-1,68 (2,2)	33,84	363,64	0,29
17	0 (0,05)	0 (45)	+1,68 (3,8)	28,94	600,00	0,54

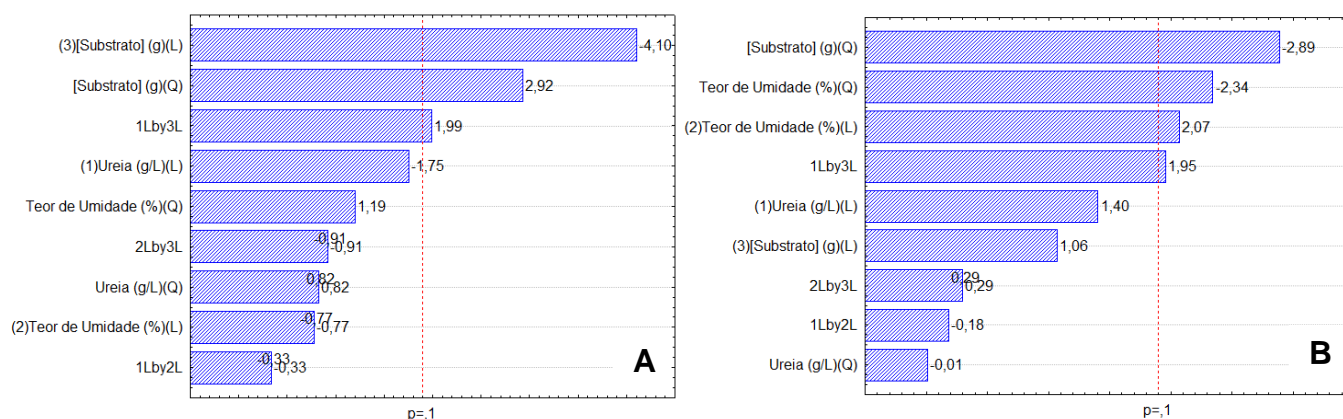
x_1 - Ureia (g/L); x_2 - Teor de umidade (%); x_3 - Substrato(g);
 Y_1 - Endoglucanase (U/g); Y_2 - β -glicosidase (U/g); Y_3 - FPase (FPU/g)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste planejamento, as atividades das enzimas variaram de 27,55 a 36,13 U/g para endoglucanase, de 300,94 a 770,22 para β -glicosidase e de 0,20 a 0,54 FPU/g para FPase. Os efeitos que cada uma das variáveis e suas interações exerceram sobre as atividades enzimáticas são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 24) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentadas nas Tabelas 24 e 25.

Como pode ser observado pelo diagrama de Pareto (Figura 24), para a enzima endoglucanase a quantidade de substrato e sua interação com ureia foram significativos ao nível de confiança de 90%. Para β -glicosidase, a quantidade de substrato, o teor de umidade e a interação entre ureia e quantidade de substrato foram significativos. Novamente observa-se a importância da quantidade de substrato para atividade das enzimas.

Figura 24 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis no DCCR, para produção de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) pelo cultivo isolado do fungo endófito *Saccharicola* sp. EJC 04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os coeficientes de determinação do modelo (R^2) foram 0,82 e 0,77 para endoglucanase e β -glicosidase respectivamente, concluindo-se que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Pelas análises de ANOVA (Tabelas 24 e 25) verifica-se que, para a enzima endoglucanase, os efeitos lineares e quadráticos da quantidade de substrato e a interação entre ureia e substrato foram significativos. Os efeitos lineares e quadráticos do teor de umidade, o efeito quadrático da quantidade de substrato e a interação entre ureia e substrato foram significativos para a atividade de β -glicosidase.

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de endoglucanase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC04.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)(L)	7,653	1	7,65	3,072	0,123
Ureia (g/L)(Q)	1,682	1	1,68	0,675	0,438
(2)Teor de Umidade (L)	1,504	1	1,50	0,604	0,463
Teor de Umidade (Q)	3,568	1	3,57	1,432	0,270
(3)Substrato(g)(L)	41,900	1	41,90	16,818	0,005
Substrato(g)(Q)	21,348	1	21,35	8,569	0,022
1L*2L	0,281	1	0,28	0,113	0,747
1L*3L	9,886	1	9,89	3,968	0,087
2L*3L	2,093	1	2,09	0,840	0,390
Erro	17,439	7	2,49		
Total SQ	102,450	16			

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

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) do planejamento DCCR, para a atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC04.

β -glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)Ureia (g/L)(L)	19513,368	1	19513,37	1,976	0,203
Ureia (g/L)(Q)	1,148	1	1,15	0,000	0,992
(2)Teor de Umidade (L)	42421,988	1	42421,99	4,295	0,077
Teor de Umidade (Q)	54327,229	1	54327,23	5,500	0,051
(3)Substrato(g)(L)	11284,072	1	11284,07	1,142	0,321
Substrato(g)(Q)	82522,612	1	82522,61	8,355	0,023
1L*2L	334,423	1	334,42	0,034	0,859

Tabela continua

Continuação tabela

1L*3L	37834,055	1	37834,05	3,830	0,091
2L*3L	875,692	1	875,69	0,089	0,775
Erro	69142,927	7	9877,56		
Total SQ	303957,092	16			

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

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a atividade de endoglucanase (Eq. 9), β -glicosidase (Eq. 10) e FPase (Eq. 11) em função das variáveis independentes avaliadas. As equações dos modelos utilizados para a análise das duas variáveis são apresentadas abaixo:

$$Y_1 = 126,626 - 383,222*x_1 + 966,869*x_1^2 - 1,387*x_2 + 0,023*x_2^2 - 32,928*x_3 + 5,512*x_3^2 - 1,876*x_1*x_2 + 111,164*x_1*x_3 - 0,205*x_2*x_3 \quad (9)$$

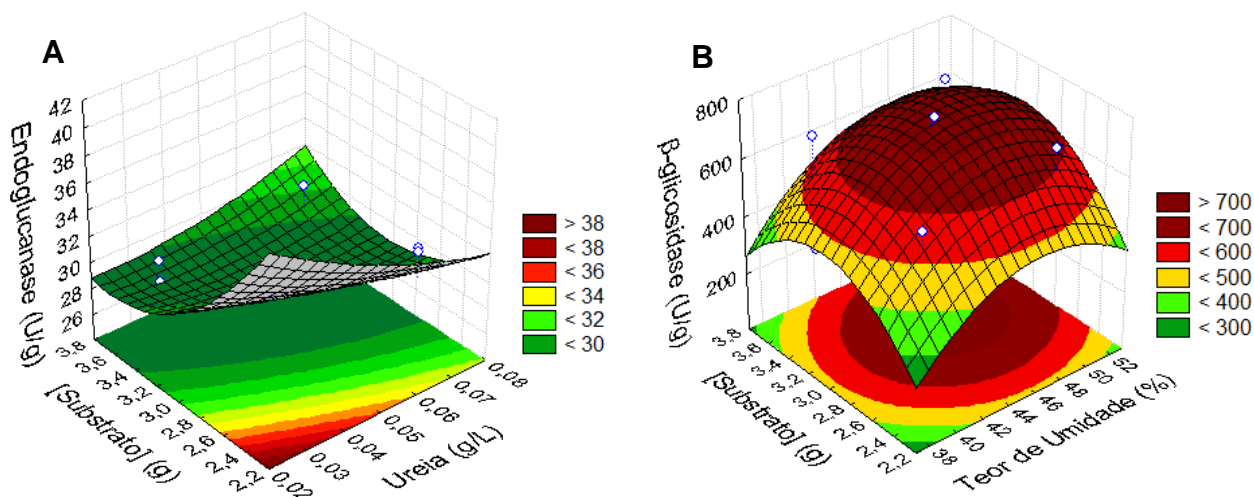
$$Y_2 = -7304,114 - 15750,682*x_1 - 798,830*x_1^2 + 252,084*x_2 - 2,781*x_2^2 + 581,559*x_3 - 342,703*x_3^2 - 64,655*x_1*x_2 + 6876,959*x_1*x_3 + 4,185*x_2*x_3 \quad (10)$$

$$Y_3 = 4,826 + 6,659*x_1 + 127,429*x_1^2 - 0,088*x_2 + 0,001*x_2^2 - 1,958*x_3 + 0,264*x_3^2 - 0,564*x_1*x_2 + 2,048*x_1*x_3 + 0,008*x_2*x_3 \quad (11)$$

As superfícies de respostas geradas pelo modelo para endoglucanase e β -glicosidase são apresentadas na Figura 25. Para a atividade de endoglucanase, apenas as variáveis concentração de ureia e quantidade de substrato foram significativas. Pode-se observar que as maiores atividades são obtidas quando as duas variáveis estão em seus níveis mais baixos (ureia a 0,02 a 0,03 g/L e 2,2 a 2,3 g de substrato), porém a curvatura do modelo se encontra em uma região de baixa atividade da enzima (Figura 25A). Sendo assim não foi possível a otimização das condições de cultivo para a produção desta enzima mas, utilizando-se o modelo de regressão obtido, pode-se prever a atividade de endoglucanase quando as variáveis teor de umidade e quantidade de substrato estão em seus valores otimizados para produção de β -glicosidase (Figura 25B). Para atividade de β -glicosidase, os efeitos das três variáveis foram significativos. A superfície de resposta indica que a região

ótima de atividade da enzima ocorre na interação entre teor de umidade inicial e quantidade de substrato nas faixas de 44 a 50% e 2,8 - 3,4 g, respectivamente, com a concentração de ureia em seu nível central (Figura 25B).

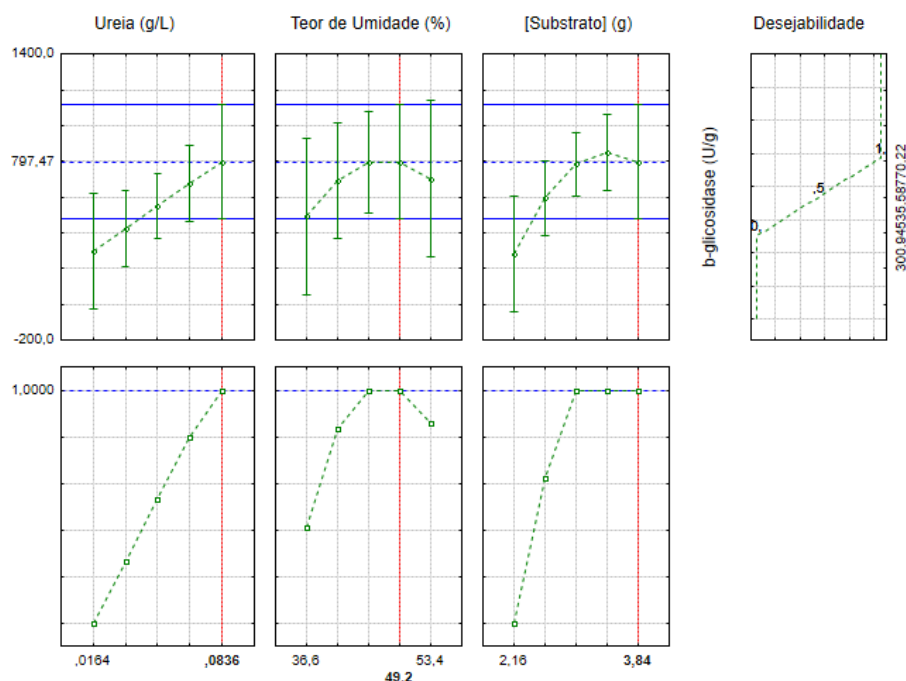
Figura 25 - Superfícies de resposta obtidas para os efeitos da concentração de ureia e quantidade de substrato na atividade de endoglucanase (A) e quantidade de substrato e teor de umidade na atividade de β -glicosidase (B) pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC04



Fonte: Elaborado pelo autor.

A função de desejabilidade do *software* STATISTICA 10.0 foi utilizada para otimização das variáveis sobre a atividade de β -glicosidase, a qual permite prever os valores ótimos dos parâmetros investigados. A Figura 26 apresenta os perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e a atividade otimizada prevista de β -glicosidase.

Figura 26 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis concentração de ureia, teor de umidade inicial e quantidade de substrato no DCCR para a máxima atividade de β -glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Saccharicola* sp. EJC04.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 26, a concentração de ureia em 0,0836 g/L, o teor de umidade de 49,2 % e a quantidade de 3,84 g de substrato são apontados pela função de desejabilidade como os valores que levariam a máxima atividade de β -glicosidase (nesse caso, 797,47 U/g). Considerando-se estes valores para condição otimizada, as produções previstas de endoglucanase e FPase podem ser representadas pelo modelo proposto, substituindo-se os valores nas equações 9 e 11 respectivamente, sendo 31,81 U/g e 0,69 FPU/g, respectivamente. A validação experimental dos resultados foi realizada com ensaios em triplicata nas condições otimizadas para a atividade de β -glicosidase em relação às variáveis concentração de ureia, teor de umidade inicial do substrato e quantidade de substrato. Os resultados obtidos foram $26,47 \pm 3,77$ U/g para atividade de endoglucanase, $750,37 \pm 33,30$ U/g para β -glicosidase e $0,80 \pm 0,08$ FPU/g para atividade de FPase, indicando reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo.

Comparando-se os resultados obtidos sob as condições ótimas de cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04 com aqueles obtidos sem a avaliação da influência

das variáveis, pode-se observar que, sob condições ótimas, houve um aumento de 2,1 e 2,3 vezes nas atividades de endoglucanase (12,14 para 26,47 U/g) e β -glicosidase (326,01 para 750,37 U/g), respectivamente.

Pelos resultados obtidos, observa-se que a relação entre a quantidade de substrato e teor de umidade teve acentuada influência na produção das enzimas, sendo importante a otimização desta condição. Tais variáveis influenciam a porosidade e aeração do meio, podendo prejudicar o crescimento do fungo e, conseqüente, a produção de enzimas (ELLAIHAH et al., 2002).

Em relação à ureia, em interação com a quantidade de substrato teve efeito na atividade das enzimas, diferentemente do observado na condição de cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, onde uma fonte de nitrogênio inorgânico (NaNO_3) teve efeito sobre a atividade das enzimas. Alguns autores relatam que fontes de nitrogênio orgânico proporcionam efeito significativo na atividade de celulasas (DAROIT et al., 2007; JUN et al., 2009; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Por outro lado, alguns estudos relatam que uma fonte de nitrogênio inorgânico resultou em aumento na produção das enzimas (KALOGERIS et al., 2003; KUMAR; GAUTAM; DUTT, 2016). Desta forma, muitas questões ainda permanecem em relação ao papel que o nitrogênio exerce sobre a produção de enzimas por diferentes fungos (RODRIGUEZ-GOMEZ; HOBLEY, 2013). Ilmén et al., (1997) demonstraram que o uso de peptona não exerceu um efeito indutor na produção de celulasas, apenas favorecendo o crescimento de *Trichoderma reesei* QM9414 o que, por sua vez, resultou em um aumento nos níveis de celulase nas condições estudadas. Segundo Haapala et al., (1994) o nitrogênio pode afetar significativamente o pH do meio durante o cultivo, influenciando assim o metabolismo microbiano.

No presente trabalho, em todos os cultivos realizados foi possível observar que houve um aumento nas atividades de celulasas quando comparadas com aquelas obtidas a partir de cultivos onde não se avaliou a influência das variáveis envolvidas no processo de FES. Esta avaliação é importante, uma vez que muitos fatores podem influenciar na obtenção de um extrato enzimático com elevadas atividades das enzimas de interesse e, definindo seus níveis, ótimos é possível validar modelos para produção das mesmas.

5.7 Sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado

Os extratos enzimáticos obtidos sob as condições de cultivo otimizadas foram utilizados na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, segundo descrito no item 4.8, a fim de se selecionar aquele que proporcionasse maior concentração de glicose nos hidrolisados e, então, utilizá-lo nos experimentos subsequentes de otimização da sacarificação. A mistura (1:1 v/v) dos extratos enzimáticos obtidos pelos cultivos isolados dos fungos, sob condições otimizadas, também foi avaliada. As unidades totais de endoglucanase e β -glicosidase empregadas em cada sacarificação, bem como as concentrações de glicose obtidas nos hidrolisados, são apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26 - Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino, utilizando-se os extratos enzimáticos obtidos pelo cultivo dos fungos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04 sob condições otimizadas.

Extrato enzimático	Unidades Totais		Glicose (mg/mL)
	Endoglucanase	β -glicosidase	
Co-Cultivo	1.292,36 \pm 0,35	4.348,58 \pm 0,53	2,06 \pm 0,01
<i>Botryosphaeria</i> sp. AM01	1.421,20 \pm 0,35	3.468,33 \pm 0,53	2,74 \pm 0,04
<i>Saccharicola</i> sp. EJC04	342,715 \pm 0,28	4.965,51 \pm 1,77	1,13 \pm 0,01
Mistura de extratos enzimáticos	1.190,80 \pm 0,35	3.438,24 \pm 1,59	2,31 \pm 0,03

Fonte: Elaborado pelo autor.

A maior concentração de glicose (2,74 mg/mL) foi obtida na sacarificação que empregou o extrato enzimático produzido pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM01, sob as condições de cultivo otimizadas para a produção de endoglucanase. As sacarificações com os extratos produzidos na condição de co-cultivo e com a mistura de extratos apresentaram concentrações semelhantes de glicose (2,06 e 2,31 mg/mL, respectivamente).

Quando o extrato enzimático de *Saccharicola* sp. EJC04 foi utilizado isoladamente, a concentração de glicose obtida no hidrolisado foi a mais baixa entre todas (1,13 mg/mL). Em relação ao uso dos demais extratos, concentrações de glicose semelhantes foram observadas nos hidrolisados obtidos. Cabe ressaltar que tais extratos apresentaram atividades mais elevadas de endoglucanase (4 a 5 vezes superior em relação ao extrato produzido por *Saccharicola* sp. EJC04) e que

assemelham-se em relação à atividade de β -glicosidase. Neste momento não é possível inferir se tais dados relacionam-se à importância da maior atividade endoglucanase nestes experimentos ou, então, à diferença na eficácia das β -glicosidases.

O extrato produzido pelo cultivo isolado de *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições ótimas de cultivo para produção de endoglucanase, foi selecionado para as etapas seguintes do trabalho, visto que apresentou o melhor desempenho na sacarificação. Além disso, os dados indicaram que não é necessário o cultivo de dois microrganismos para obtenção de um extrato enzimático com quantidades satisfatórias das enzimas do complexo celulolítico, o que reduz os custos do processo.

5.8 Caracterização físico-química de endoglucanase e β -glicosidase presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo de *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas

5.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

Para avaliação do pH e temperatura ótima das enzimas foi utilizado um planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. Os valores codificados e reais e as respostas obtidas são apresentados na Tabela 27. Foi considerado como 100% a maior atividade enzimática encontrada.

Tabela 27 - Planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura e atividades relativas de celulasas no extrato enzimático otimizado de *Botryosphaeria* sp. AM01.

Ensaio	x_1	x_2	Atividade Relativa (%)	
			Y_1	Y_2
1	-1 (3,5)	-1 (50)	11,04	24,11
2	+1 (7,5)	-1 (50)	30,31	34,57
3	-1 (3,5)	+1 (70)	6,26	4,43
4	+1 (7,5)	+1 (70)	12,68	34,4
5	-1 (3,5)	0 (60)	10,44	23,61
6	+1 (7,5)	0 (60)	28,07	50,93
7	0 (5,5)	-1 (50)	36,28	54,47
8	0 (5,5)	+1 (70)	32,4	94,44
9	0 (5,5)	0 (60)	99,51	100,00
10	0 (5,5)	0 (60)	99,25	99,66
11	0 (5,5)	0 (60)	99,21	99,49
12	0 (5,5)	0 (60)	100	99,83

x_1 - pH; x_2 - Temperatura ($^{\circ}$ C); Y_1 - Endoglucanase; Y_2 - β -glicosidase
*100% = 66,35 e 223,07 U/g para endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente.

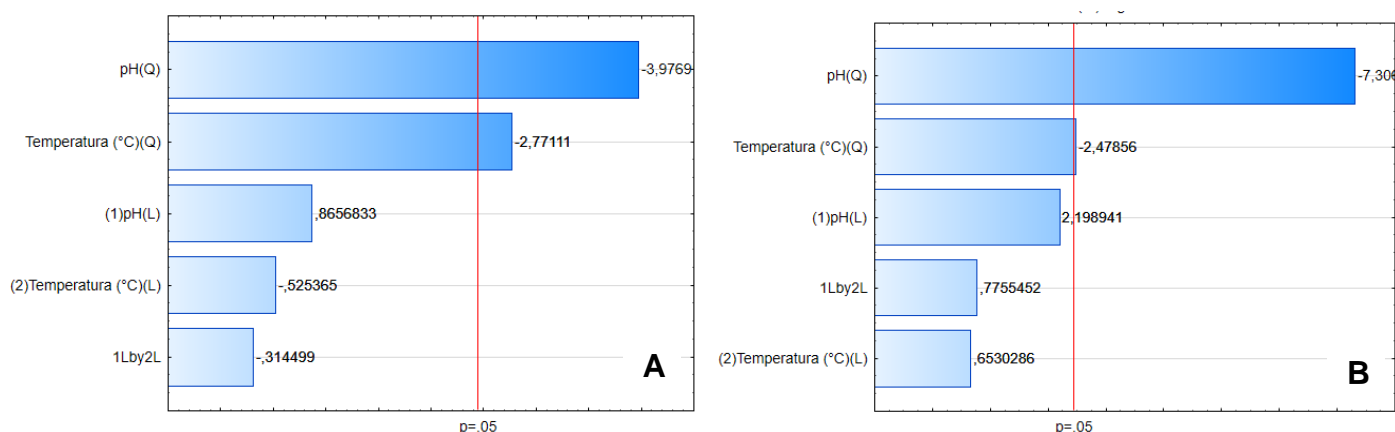
Fonte: Elaborado pelo autor.

As atividades relativas variaram de 7,75% a 100% para endoglucanase e de 4,43% a 100% para β -glicosidase, demonstrando a grande influência das variáveis estudadas sobre as atividades das enzimas. Os efeitos que cada uma das variáveis e suas interações exerceram sobre as atividades enzimáticas são apresentados pelo

Diagrama de Pareto (Figura 27) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 27.

Como pode ser observado pelo diagrama de Pareto (Figura 27), as variáveis pH e temperatura foram significativos ao nível de 95% de confiança para as enzimas endoglucanase e β -glicosidase e a interação entre as variáveis não foi significativa.

Figura 27 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis nas atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os coeficientes de determinação do modelo (R^2) foram 0,85 e 0,93 para endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente, concluindo-se que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Pela análise de ANOVA (Tabelas 27 e 28) verifica-se que, para a endoglucanase e β -glicosidase, os efeitos quadráticos das variáveis pH e temperatura foram significativos. Os efeitos lineares e a interação entre pH e temperatura não foram significativos para a atividade de ambas enzimas.

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática de endoglucanase presente no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições otimizadas para a produção de endoglucanase.

Endoglucanase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pH (L)	312,77	1	312,77	0,749	0,419
pH (Q)	6600,83	1	6600,83	15,819	0,007
(2) Temperatura (°C)(L)	115,19	1	115,194	0,276	0,618
Temperatura (°C)(Q)	3204,89	1	3204,895	7,679	0,032
1L*2L	41,28	1	41,281	0,098	0,763
Erro	2504,14	6			
Total SQ	17454,42	11			

*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 ($p < 0,1$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática de β -glicosidase obtida pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições otimizadas para a produção de endoglucanase.

β -glicosidase					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) pH (L)	765,01	1	765,010	4,83534	0,070205
pH (Q)	8445,38	1	8445,377	53,38002	0,000335
(2) Temperatura (°C)(L)	67,47	1	67,469	0,42645	0,537941
Temperatura (°C)(Q)	971,94	1	971,936	6,14324	0,047899
1L*2L	95,16	1	95,160	0,60147	0,467475
Erro	949,27	6	158,212		
Total SQ	14620,16	11			

*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 ($p < 0,1$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

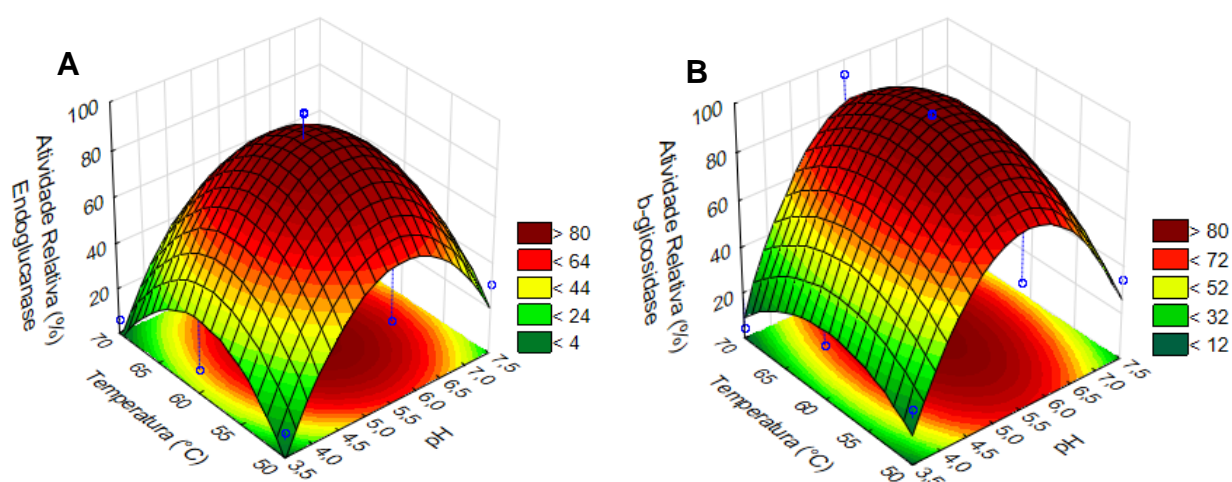
Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e equações polinomiais de segunda ordem foram derivadas para representar a atividade de endoglucanase (Eq. 13) e β -glicosidase (Eq. 14) em função das variáveis independentes avaliadas. As equações dos modelos utilizados para a análise das duas variáveis são apresentadas abaixo:

$$Y_1 = -1581,523 + 150,066*x_1 - 12,438*x_1^2 + 42,046*x_2 - 0,346*x_2^2 - 0,160 *x_1*x_2 \quad (13)$$

$$Y_2 = - 985,888 + 145,773*x_1 - 14,069 *x_1^2 + 21,903 *x_2 - 0,190 *x_2^2 + 0,243*x_1*x_2 \quad (14)$$

As superfícies de respostas geradas pelo modelo para endoglucanase e β -glicosidase são apresentadas na Figura 28. Pode-se observar que as maiores atividades das enzimas são obtidas quando as duas variáveis estão em seus níveis centrais (Figura 28A e 28B). A superfície de resposta indica que as regiões ótimas de atividade das enzimas ocorrem na faixa de combinação entre pH e temperatura de 5,0 a 6,0 e 55 – 65 °C, respectivamente. Nos níveis superiores e inferiores das variáveis são observadas as menores atividades das enzimas.

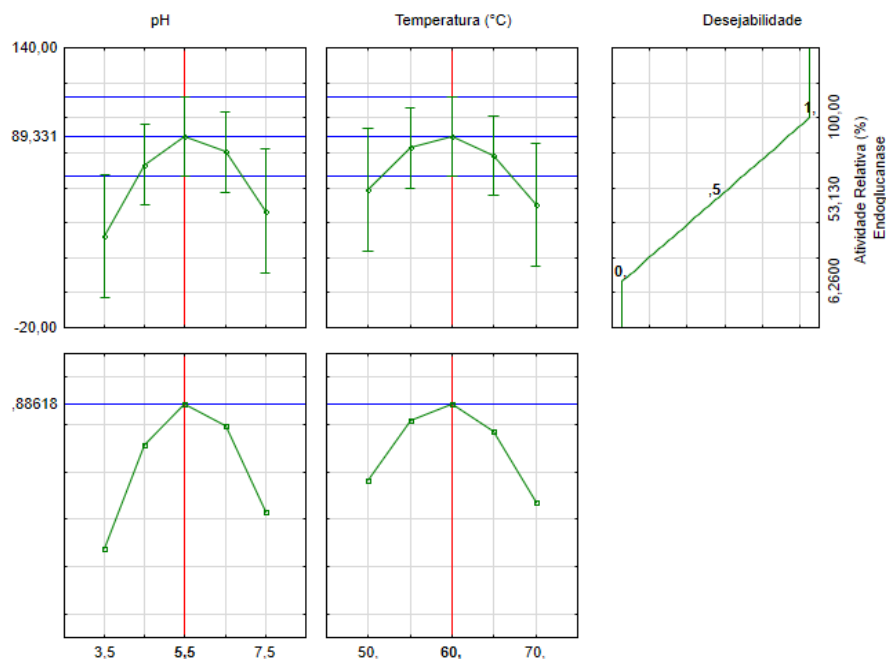
Figura 28 - Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do pH e temperatura sobre as atividades de endoglucanase (A) e β -glicosidase (B) presentes no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

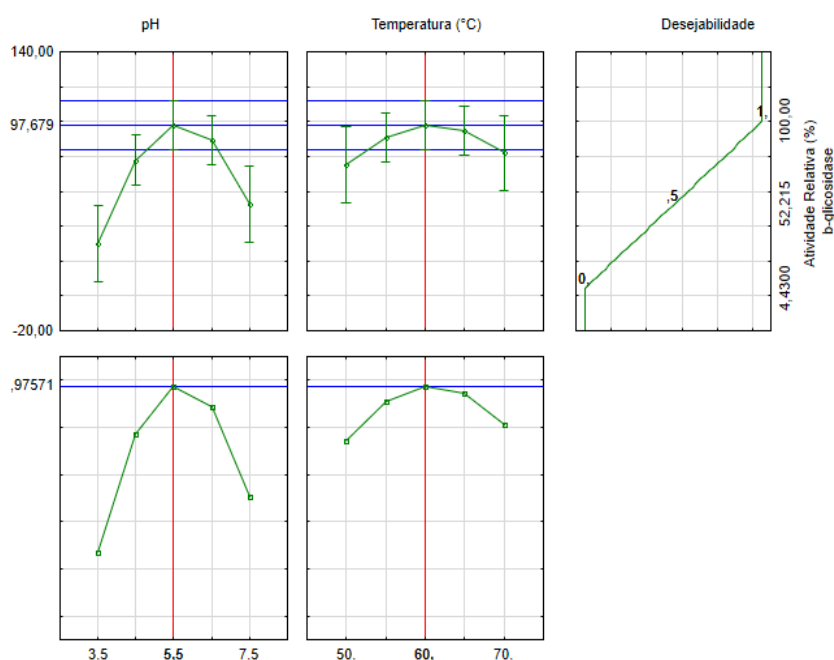
A função de desejabilidade do *software* STATISTICA 10.0 foi utilizada para prever os valores ótimos das condições de pH e temperatura de reação. A Figura 29 apresenta os perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e as atividades enzimáticas relativas previstas (89,33 e 97,67 % para endoglucanase e β -glicosidase, respectivamente) sob as condições ótimas.

Figura 29 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , na atividade de endoglucanase presente no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , na atividade de β -glicosidase presente no extrato enzimático obtido pelo cultivo isolado do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Figura 29 e 30, o pH 5,5 e temperatura de 60 °C são apontados pela função de desejabilidade como os valores ótimos que levariam a uma máxima atividade de endoglucanase e β -glicosidase. A validação experimental dos resultados foi realizada com ensaios de reação enzimática em triplicata, sob estas condições. Os resultados obtidos foram $99,07 \pm 0,71$ % para atividade residual de endoglucanase e $99,75 \pm 0,21$ para β -glicosidase, indicando reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo.

Avaliar a influência de pH e temperatura sobre a atividade enzimática pelo uso de metodologia de superfície de resposta é muito interessante, pois é possível identificar faixas de pH e temperatura ótimos, o que permite que variações dentro desta faixa sejam empregadas, sem que as atividades obtidas saiam da condição otimizada (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Isto é fundamental para determinação de condições que possam reduzir custos sem afetar o rendimento e qualidade final de um processo.

Como já se é conhecido, as enzimas por serem proteínas são afetadas pelo pH do meio. O efeito do pH na catálise enzimática ocorre devido à variação da concentração em H^+ e, conseqüentemente, à variação dos estados de ionização da enzima como um todo, mas principalmente em relação aos aminoácidos do sítio catalítico. Assim, o efeito do pH na velocidade das reações enzimáticas pode ser devido às alterações da estabilidade da enzima, da afinidade da enzima com o substrato e da transformação catalítica em si. Estes três fatores podem atuar de um modo isolado ou combinado (TIPTON; DIXON, 1979). Pode-se notar que, para celulasas fúngicas, as melhores atividades são observadas em pH ácido (entre 4,0 e 5,0), segundo os dados de literatura. Em pH alcalino, a perda da atividade é elevada.

A temperatura pode atuar sobre a atividade catalítica de uma enzima alterando a estabilidade da mesma, a velocidade de transformação do complexo enzima-substrato e a afinidade entre substrato e enzima. Como toda reação, as enzimas, sofrem incremento na cinética com o aumento da temperatura. Porém esse comportamento ocorre até a temperatura de máxima atividade. A partir dessa, o incremento de temperatura diminui a cinética enzimática devido à desnaturação. (DANIEL et al., 2008).

Características semelhantes às apresentadas pelas celulasas do presente trabalho são reportadas na literatura. Endoglucanases produzidas *Rhizopus oryzae* e

Trichoderma reesei foram caracterizadas por Kupsi et al., (2014) e apresentaram pH ótimo de atividade 5,0 e 6,0 respectivamente, e temperaturas ótimas de 60 °C.

O complexo enzimático produzido por uma cepa de *Aspergillus fumigatus* foi caracterizado em termos de pH e temperatura ótimos por Delabona et al., (2013). Endoglucanase e β -glicosidase apresentaram atividades ótimas em pH 3,5 e 4,0 e 65 e 50 °C, respectivamente.

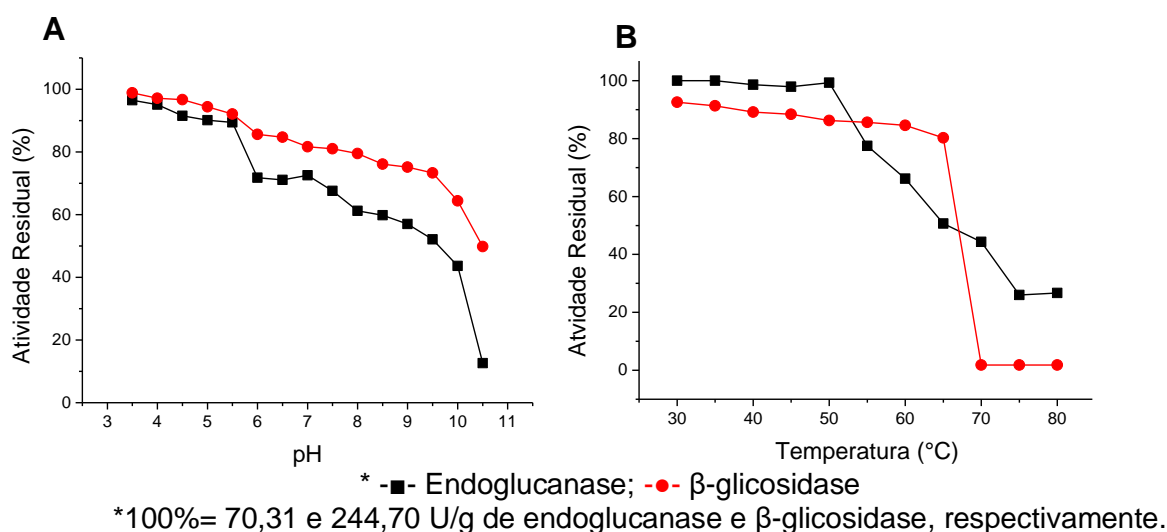
A caracterização de endoglucanase produzida por *Aspergillus terreus* em palha de arroz, por FES, determinou atividade ótima da enzima a 50 °C e pH 4,8 (NARRA et al., 2014).

β -glicosidase produzida por *Penicillium verruculosum*, cultivado em casca de maracujá como substrato, apresentou atividade ótima a 65 °C e pH 4,5, (ALMEIDA et al., 2015).

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

A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade de endoglucanases e β -glicosidases, as mesmas foram incubadas, por 24h, a temperatura de 25 °C, em soluções tampão na faixa de pH de 3,5 - 10,5 e, após este período, a atividade residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação de cada enzima. Foi considerado como 100% a atividade da enzima quantificada no seu pH e temperatura ótima de atividade, antes do período de incubação.

Figura 31 - Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre a estabilidade de celulases produzidas pelo isolado *Botryosphaeria* sp. AM01.



Fonte: elaborado pelo autor

A estabilidade de celulasas em relação ao pH e temperatura afeta o potencial de aplicação das mesmas em processos de hidrólise enzimática da celulose em grande escala (DELABONA et al., 2013). Pode-se notar que tanto endoglucanase quanto β -glicosidase apresentaram comportamento semelhantes quanto a estabilidade ao pH e temperatura. Em relação ao pH (Figura 30A), as enzimas mantiveram cerca de 98 a 90% e sua atividade após 24h de incubação em valores de pH entre 3,5 e 5,5. Endoglucanase apresentou uma queda mais acentuada de atividade na faixa de pHs de 6,0 a 9,5 (71 a 52% de atividade), e β -glicosidase foi pouco mais estável mantendo cerca de 85 a 70% de sua atividade na mesma faixa de pH citada.

Pode-se verificar que em pH 5,0 ambas as enzimas avaliadas apresentaram boa estabilidade, sendo este pH selecionado para avaliação da termoestabilidade. Desta forma cada enzima foi incubada, por 1 h, em pH 5,0 sob temperaturas de 30 a 80 °C, seguindo-se determinação da atividade residual sob as condições ótimas.

A enzima endoglucanase foi estável quando incubada por 1 hora entre 30 a 50 °C (Figura 30B), mantendo 100% de sua atividade quando incubada nesta faixa. Porém, apresentou queda acentuada de atividade em temperaturas entre 55 e 80 °C (77 a 26% de sua atividade). Já a enzima β -glicosidase foi menos estável, mantendo cerca de 80 a 92% de sua atividade após incubação entre 30 e 65 °C (Figura 30B), perdendo drasticamente sua atividade quando incubada em temperaturas acima de 70 °C.

Endoglucanase de *Aspergillus fumigatus* foi caracterizada por Xu et al. (2014). Uma atividade residual de mais de 80% foi observada na faixa de pH de 3,0 a 7,0, e a enzima manteve mais de 95% de sua atividade inicial quando incubada, por 1 h, na faixa de pH de 3,0 a 6,0. Quanto à estabilidade térmica, a enzima manteve 62% de sua atividade original quando incubada, por 40 minutos, a temperaturas variando de 40 a 70 °C. Após incubação a 80 e 90 °C, a atividade da enzima diminuiu para 17% e 9%, respectivamente. A estabilidade quanto ao pH foi semelhante à observada para a endoglucanase de *Botryosphaeria* sp. AM01. Em relação à termoestabilidade, a enzima estudada no presente trabalho se mostrou mais estável em comparação aquela produzida por *Aspergillus fumigatus*.

As estabilidades térmica e ao pH de β -glicosidase produzidas por *Penicillium verruculosum* foram investigadas por Almeida et al. (2015). A enzima se mostrou estável quando incubada em uma ampla faixa de pH (3,5 a 8,0), mantendo em torno

de 90% de sua atividade residual. Quanto à estabilidade térmica, a enzima foi estável entre 55 e 60 °C, após incubação por 1 h, mantendo aproximadamente 80 e 70% de sua atividade, respectivamente. β -glicosidase avaliadas no presente trabalho apresentaram estabilidade ao pH semelhantes as observadas por Almeida et al. e estabilidade térmica em uma faixa pouco superior de temperatura (até 65 °C).

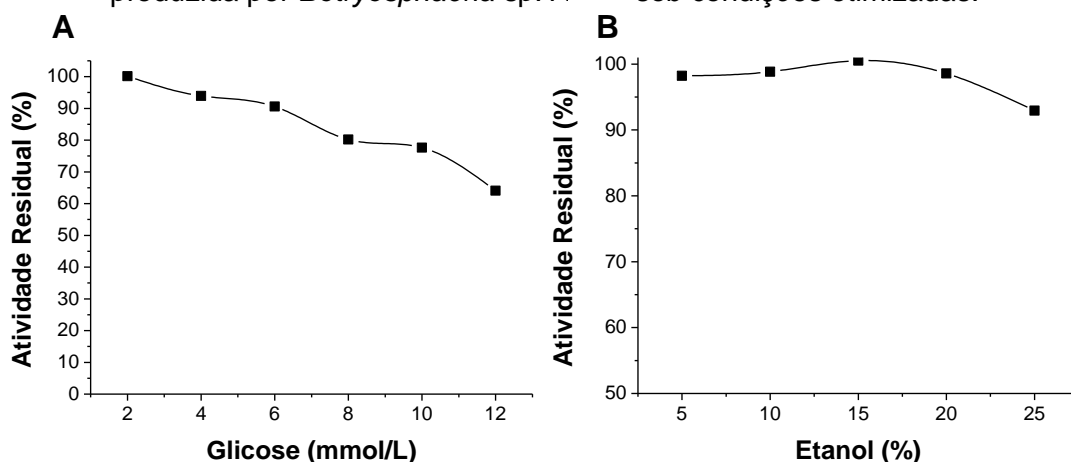
Endoglucanases produzidas por *Penicillium* sp. CR-316 foram caracterizadas por Picart, Diaz e Pastor (2007). Os ensaios de termoestabilidade mostraram que a enzima manteve-se estável a 60 °C e pH 4,5 durante pelo menos 3 h, enquanto que a 65 °C, a enzima perdeu 75% de sua atividade após 1 hora de incubação.

5.8.3 Efeito de glicose e etanol sobre a atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi quantificada, como descrito no item 4.3.2 sob condições ótimas de pH e temperatura, na presença de glicose ou etanol, em concentrações de 2 a 12 mmol/L e 5 a 20% (v/v), respectivamente, a fim de se avaliar o efeito dos açúcares e álcool na atividade da enzima. A atividade observada sem adição de glicose ou etanol foi tomado como 100%.

Pode-se notar que, com o aumento da concentração de glicose, houve uma redução nas atividades residuais de β -glicosidases (Figura 31A) demonstrando que a enzima sofreu inibição pelo produto. A atividade da enzima foi reduzida a aproximadamente 65% na concentração de 12 mmol/L de glicose.

Figura 32 - Efeito da concentração de glicose (A) e etanol (B) na atividade de β -glicosidase produzida por *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



*100%= 300 U/g de β -glicosidase

Fonte: elaborado pelo autor.

Celulases atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose à glicose, e o passo final dessa conversão envolve a ação de β -glicosidases sobre a celobiose. A celobiose é um forte inibidor de endoglucanases e celobiohidrolases, e a ação das β -glicosidases pode reduzir esse efeito. No entanto, a maioria das β -glicosidases relatadas até o momento são inibidas competitivamente pela glicose produzida, o que limita sua atividade (SINGHANIA et al., 2016).

A inibição por glicose, comumente observada em β -glicosidases microbianas (SINGHANIA et al., 2013; ZANOELO et al., 2004), constitui uma barreira importante para o desenvolvimento de um processo comercial de hidrólise enzimática da celulose em glicose.

β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 manteve 90% da sua atividade original na concentração de glicose de 100 mmol/L (PEREIRA et al., 2015).

O aumento das concentrações de glicose reduziu drasticamente a atividade de β -glicosidase de *Pichia anomala* MDD24 (em torno de 80% na concentração 150 mmol/L de glicose) (SWANGKEAW et al., 2009).

Sorensen et al. (2012) verificaram que, na concentração de glicose de 100 mmol/L, a atividade da enzima β -glicosidase de *Aspergillus saccharolyticus* foi reduzida a 50% da sua atividade original.

Embora a glicose tenha atuado como um inibidor da atividade de β -glicosidases produzidas no extrato otimizado de *Botryosphaeria* sp. AM01, essa inibição poderia ser superada por um processo de sacarificação e fermentação simultâneas, onde a glicose é rapidamente convertida em etanol pela levedura (OHGREN et al., 2007).

Outro importante fator a ser avaliado é o efeito da concentração de álcoois sobre β -glicosidase uma vez que as enzimas são utilizadas em diversas aplicações industriais e podem ser expostas a diferentes concentrações destes compostos (SØRENSEN et al., 2013).

Observou-se que a enzima β -glicosidase de *Botryosphaeria* sp. AM01 manteve sua atividade inicial em concentrações de até 15% etanol (Figura 31B). Com o aumento da concentração de etanol, ocorreu uma queda na atividade sendo observado 98% e 92% de sua atividade inicial nas concentrações de 20% e 25% de álcool.

As características dessa enzima contribuem para seu emprego em processos fermentativos para a produção de etanol, considerando que as concentrações finais

de etanol dos caldos fermentados obtidos tanto em processos tradicionais (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008) como na produção de etanol 2G (ELLISTON et al., 2013) ficam em torno de 10 a 12%.

Há diversos relatos na literatura sobre o efeito de álcoois na atividade de β -glicosidases. As atividades de β -glicosidases extracelulares de *Mucor racemosus* f. *chibinensis*, *Rhizomucor miehei* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* foram avaliadas por Takó et al. (2010) e apresentaram tolerância ao etanol até 20% (v/v). O etanol também ativou a enzima nessas linhagens sugerindo atividade de glicosiltransferase.

Nguyen et al. (2010) observaram que etanol a 5% (v/v) aumentaram a atividade de β -glicosidase de *Stereum hirsutum* cerca de 30%. Mesmo em concentrações de 10-15%, o etanol ainda estimulou a atividade da enzima.

Efeito adverso foi observado por Pereira et al. (2015), no qual a β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 apresentaram baixa atividade na presença de etanol, mantendo apenas 30% de sua atividade original em concentrações de etanol de 10%.

5.9 Pré-tratamento e caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

No resíduo lignocelulósico, a hidrólise enzimática dos carboidratos a açúcares fermentescíveis é dificultada por fatores relacionados à composição e estrutura destes materiais, os quais referem-se principalmente à presença de lignina e à cristalinidade da celulose (BEHERA et al., 2014). Desta forma, o pré-tratamento do resíduo lignocelulósico é um dos passos essenciais nas pesquisas sobre bioetanol (MARYANA et al., 2014), sendo realizado a fim de alterar ou remover a lignina, aumentar a área superficial para a ação das enzimas e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, visando facilitar a ação das enzimas e, conseqüentemente, maiores rendimentos em açúcares fermentescíveis (SANTOS et al., 2012).

No presente trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino (solução de NaOH 0,5 mol/L) foram quimicamente caracterizados e os resultados são apresentados na Tabela 30. As porcentagens de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram calculados com base em peso seco.

Tabela 30 - Composição (%) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado.

Bagaço de cana	<i>In natura</i>	Hidrotérmico alcalino
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.

A celulose foi quantificada com base em glicose. Para os cálculos da porcentagem de hemicelulose foram levados em conta as quantidades de xilose e arabinose, enquanto que a quantidade total de lignina foi calculada somando-se as concentrações de ligninas solúveis e insolúveis. A fração de cinzas representa os componentes inorgânicos remanescentes após a amostra de bagaço ser carbonizada em um mufla.

O fechamento em massa foi obtido pela soma de porcentagens de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas, acetil e extrativos (em materiais *in natura*) para cada amostra e o valor total obtido é apresentado na Tabela 30.

Observa-se que após o pré-tratamento ocorreram alterações na composição da biomassa, com diminuição de $21,51 \pm 0,32$ para $11,32 \pm 1,68$ % no teor de lignina e aumento na porcentagem de celulose de $46,64 \pm 1,65$ para $59,52 \pm 0,42$ e hemicelulose de $28,92 \pm 0,59$ para $31,62 \pm 1,44$. Como a lignina está associada covalentemente à hemicelulose, seu conteúdo é reconhecido como o fator mais importante na determinação da recalcitrância do bagaço de cana na hidrólise (SAFIRZADEH et al., 2017). As variações nas frações químicas do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento causam alterações na estrutura e composição do bagaço, tendo um efeito pronunciado sobre a acessibilidade das enzimas ao substrato, resultando em um aumento da taxa de hidrólise de celulose (BI et al., 2016).

As composições químicas do bagaço de cana *in natura* e pré tratado avaliadas no presente estudo estão de acordo com as relatadas na literatura para essa biomassa (GAO et al., 2013; JACKSON et al., 2015; YU et al., 2013)

O pré-tratamento alcalino do bagaço de cana remove a parte da lignina e aumenta a disponibilidade da celulose e hemicelulose à degradação enzimática (BALI et al., 2015). O pré-tratamento com hidróxido de sódio é um dos métodos mais comuns e tem sido amplamente estudado na bioconversão de resíduo lignocelulósico, sendo reportado como muito eficaz para a melhora na hidrólise enzimática de materiais mais recalcitrantes, como madeira, até resíduos agrícolas com baixo teor de lignina (GUPTA; LEE, 2010). Xu et al. (2010) relataram que este pré-tratamento proporciona alta deslignificação, sendo eficaz em temperaturas reduzidas.

5.10 Avaliação dos parâmetros da sacarificação enzimática

O extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas foi selecionado, a partir de experimentos preliminares de sacarificação (item 5.6) para dar seguimento ao trabalho, buscando-se a otimização das condições de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

A otimização da sacarificação enzimática foi realizada com uso de planejamento experimental, inicialmente avaliando-se a influência dos parâmetros carga de bagaço e carga de enzima (U de endoglucanase) e, em seguida, temperatura, agitação e tempo.

5.10.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliação dos parâmetros carga de bagaço de cana e carga de enzima

A influência das variáveis carga de bagaço e carga de enzima citadas acima foi avaliada por um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios. As variáveis tempo, temperatura e agitação de sacarificação foram mantidos em 24h, 50 °C e 200 rpm, respectivamente.

Tabela 31- Planejamento fatorial do tipo DCCR, com valores codificados e reais das variáveis carga de bagaço de cana-de-açúcar e enzima empregado nos experimentos de otimização da sacarificação, utilizando-se extrato enzimático de *Botryosphaeria* sp. AM01.

Ensaio	x_1	x_2	Y_1
1	-1 (12,0)	-1 (290,0)	6,11
2	+1 (20,0)	-1 (290,0)	5,40
3	-1 (12,0)	+1 (390,0)	6,95
4	+1 (20,0)	+1 (390,0)	8,14
5	-1,41 (10,34)	0 (340,0)	6,24
6	+1,41 (21,66)	0 (340,0)	6,18
7	0 (16,0)	-1,41 (269,29)	5,82
8	0 (16,0)	+1,41 (410,71)	6,97
9	0 (16,0)	0 (340,0)	7,19
10	0 (16,0)	0 (340,0)	7,18
11	0 (16,0)	0 (340,0)	7,20
12	0 (16,0)	0 (340,0)	7,17

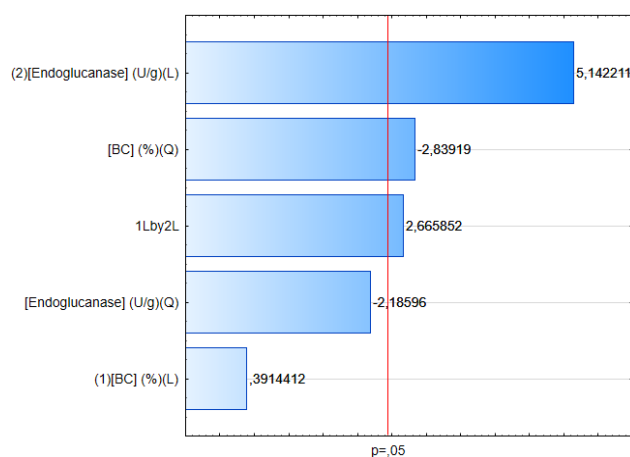
x_1 - Carga de bagaço (%); x_2 - Carga de enzima (U/g de Endoglucanase); Y_1 - Glicose (mg/mL)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A carga de enzima foi definida com base na atividade de endoglucanase (MORETTI et al., 2014b), devido à dificuldade de determinação da atividade de FPase pelo método estabelecido por Ghose (1987).

As concentrações de glicose obtidas na sacarificação variaram de 5,40 a 8,14 mg/mL. O efeito quantitativo estimado que cada variável analisada exerceu e suas interações são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 33) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 32).

Figura 33 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de determinação do modelo (R^2) foi 0,88, indicando que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Pelo diagrama de Pareto pode-se observar que as variáveis carga de enzima, carga de bagaço e a interação entre elas foram significativas ao nível de 95% de confiança. Pela análise de ANOVA (Tabela 32) confirma-se que os efeitos quadráticos das variáveis carga de bagaço e carga de enzima, o efeito linear de carga de enzima e a interação entre as variáveis foram significativos.

Tabela 32 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose obtida na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

Fonte de Variação	[Glicose] (mg/mL)			F	p
	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática		
(1) [BC] (%) (L)	0,010	1	0,02	0,153	0,709
[BC] (%) (Q)	1,030	1	1,03	8,061	0,030
(2) [Endoglucanase] (U/mL)(L)	3,380	1	3,39	26,442	0,002
[Endoglucanase] (U/mL)Q)	0,610	1	0,61	4,778	0,071
1L*2L	0,900	1	0,91	7,107	0,037
Erro	0,760	6	0,13		
Total SQ	6,460	11			

*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 ($p < 0,05$)

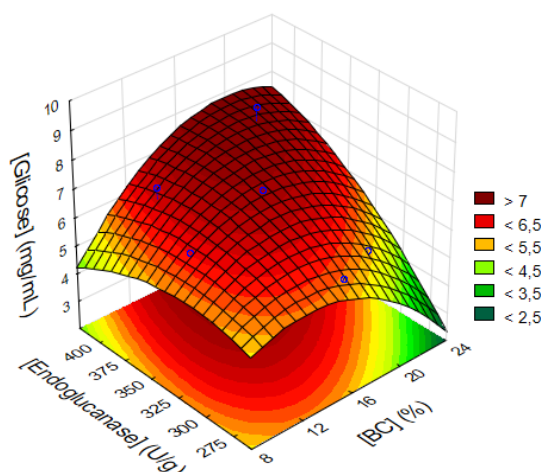
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados experimentais foram analisados por regressão múltipla e uma equação polinomial de segunda ordem foi derivada para representar a concentração de glicose (Eq. 15) em função das variáveis independentes avaliadas. As equações dos modelos utilizados para a análise das duas variáveis são apresentadas abaixo:

$$Y_1 = - 5,18501 + 0,00472*x_1 - 0,02510*x_1^2 + 0,05895*x_2 - 0,00012*x_2^2 - 0,00238 *x_1*x_2 \quad (15)$$

A superfície de resposta gerada pelo modelo para concentração de glicose é apresentada na Figura 34. Pode-se observar que as maiores concentrações de glicose são obtidas quando a variável carga de enzima está em seus níveis mais altos (acima de 400 U de endoglucanase) e carga de bagaço entre 16 e 20% (Figura 34).

Figura 34 - Superfície de resposta obtida para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato produzido pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01.

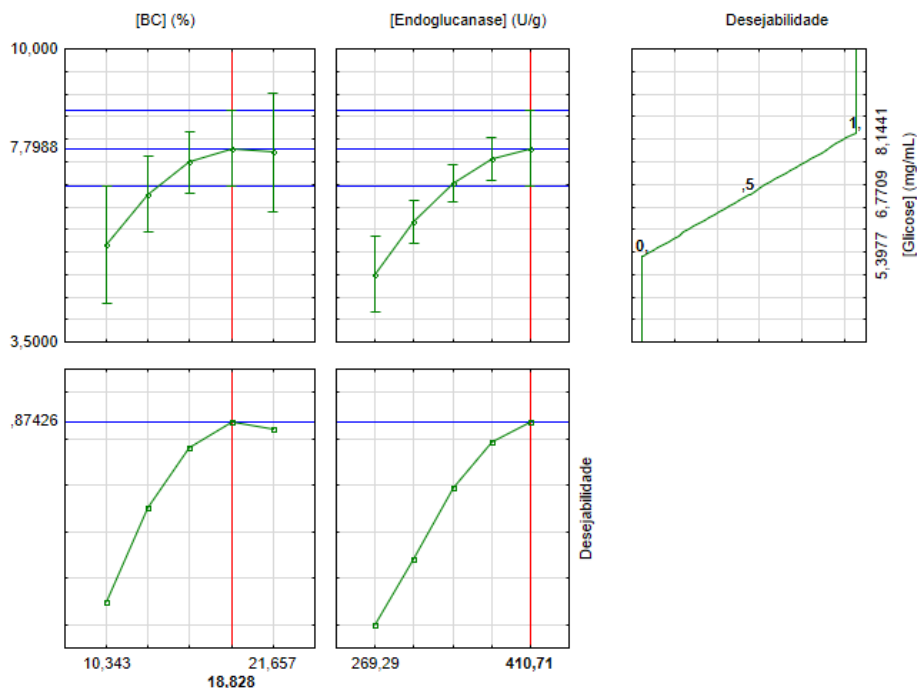


Fonte: Elaborado pelo autor.

A função de desejabilidade do *software* STATISTICA 10.0 foi utilizada para prever os valores ótimos dos parâmetros investigados, os quais são indicados pela Figura 34 como 18,82% e 410,71 U de carga de bagaço e carga de enzima endoglucanase, respectivamente. Sob tais condições, a concentração máxima de glicose prevista foi de 7,79 mg/mL.

O experimento de validação foi realizado em triplicada, sob condições ótimas acima mencionadas para cada variável. O resultado experimental obtido foi de $7,71 \pm 0,02$ mg/mL muito próximo ao valor previsto (Figura 35). Sob estas condições, o rendimento obtido foi 62 mg de glicose/g de bagaço de cana. O hidrolisado obtido sob estas condições apresentou também concentração de xilose de $9,89 \pm 0,20$ mg/mL e rendimento de 164,66 mg/g de BC.

Figura 35 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima endoglucanase na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo endófito *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A obtenção de um hidrolisado com elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis é uma premissa para a utilização do resíduo lignocelulósico como matéria-prima nos processos de produção de etanol 2G. Altas cargas enzimáticas aumentam a concentração de glicose durante a sacarificação. No entanto, o custo das enzimas é o que mais onera a produção de biocombustíveis de segunda geração. Assim, são necessários estudos envolvendo novas enzimas microbianas que apresentem características adequadas para sacarificação do resíduo lignocelulósico (eficiência de sacarificação elevada com baixa carga de enzima, baixa inibição pelo produto e estabilidade durante a sacarificação) (PEREIRA et al., 2016). Isto pode ser observado no presente estudo, onde elevadas cargas de enzimas resultaram em maiores concentrações de glicose.

Nesta etapa não foi possível definir a condição ótima para a variável carga de enzima dentro da faixa estudada, visto que pela análise da superfície de resposta nota-se que com o aumento dos níveis da variável ocorre a tendência ao aumento da concentração de glicose. A principal dificuldade em técnicas baseadas em modelos para a definição de estratégias operacionais e otimização de processos

biotecnológicos, incluindo a sacarificação enzimática do resíduo lignocelulósico, é obter um modelo preciso. Embora o uso de planejamento experimental forneça compreensão sobre o processo em estudo, bem como uma determinação confiável de seus parâmetros ótimos, experiências práticas mostram que o comportamento de reações enzimáticas é complexo e, portanto, o trabalho estatístico envolvendo tais reações requer atenção (RIVERA et al., 2010).

A concentração de substrato é um dos principais fatores que afetam o rendimento e a taxa inicial de hidrólise enzimática da celulose. O aumento da concentração de substrato normalmente resulta em um aumento na taxa de rendimento da hidrólise (SUN; CHENG, 2002). No entanto, concentrações elevadas de substrato podem diminuir substancialmente a taxa de hidrólise, provavelmente por problemas em relação a agitação e homogeneização do substrato, inibição enzimática por produtos de sacarificação, diminuição da ação sinérgica entre as enzimas e tempo insuficiente de hidrólise (ALRUMMAN, 2015; KRISHNA; CHOWDARY, 2000; WEN; LIAO; CHEN, 2004). A literatura indica que para se obter um rendimento satisfatório de açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol a partir de um biorreator, a carga inicial de substrato deve estar acima de 20% (p/v), dependendo do substrato (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009; VAN DYK; PLETSCHE, 2012). A concentração ótima de substrato de 18,82% observada no presente trabalho encontra-se muito próxima da faixa citada na literatura.

Vários estudos sobre influência das variáveis carga de bagaço e carga de enzima na sacarificação enzimática são relatados na literatura. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos trabalhos utiliza a atividade de celulase total (FPase) como referência para cálculos da carga de enzima. No presente trabalho, a carga de enzima foi calculada com base na atividade de endoglucanase. Para fins de comparação com a literatura, foi determinada a atividade de FPase total no volume de extrato enzimático utilizado nesta otimização, e constatou-se que o extrato possui atividade de 5,86 FPU.

A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos foi avaliada por Liu et al. (2016). Os experimentos foram realizados com carga de substrato a 2% (p/v) em pH 5,0, a 50 °C, sob agitação de 150 rpm, durante 72h. A carga de enzima (uma mistura de celulase comercial, CTec2, Novozymes) foi de 9,6 FPU/g de biomassa. As concentrações de glicose e xilose nos hidrolisados obtidos utilizando-se bagaço de cana submetido a pré-tratamento

hidrotérmico com NaOH foram 11,33 e 4,59 mg/mL respectivamente. Levando-se em consideração que Liu et al. utilizaram enzima comercial em seus experimentos, as enzimas presentes no extrato enzimático produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01 foram capazes de hidrolisar o bagaço de cana de forma eficiente, obtendo concentrações semelhantes em relação à glicose e superiores em relação à xilose.

Maeda et al. (2011) avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando misturas enzimáticas obtidas a partir de extratos brutos produzidos por *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma harzianum*, bem como dos extratos em combinação com um *cocktail* com enzimas comerciais. O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a um pré-tratamento ácido e a fração sólida obtida, rica em celulose, foi submetida a uma etapa adicional de deslignificação parcial por tratamento alcalino com várias concentrações de NaOH. A concentração máxima de glicose obtida foi de aproximadamente 12 g/L com a carga enzimática de 18 FPU/g de celullignina (mistura dos extratos Multifect®, *T. harzianum* e *P. funiculosum* (MTP) em proporções iguais) em 18h. Os resultados obtidos pela sacarificação com o extrato enzimático produzido por *Botryosphaeria* sp. AM01 são semelhantes e não foram suplementados com coquetéis de enzimas comerciais.

Após avaliação e determinação das condições ótimas dos parâmetros químicos (carga de bagaço e carga de enzima), um novo planejamento foi realizado avaliando-se a influência dos parâmetros físicos (tempo, temperatura e agitação) na sacarificação do bagaço de cana.

5.10.2 Delineamento do tipo face centrada para otimização dos parâmetros temperatura, agitação e tempo de sacarificação

Um delineamento do tipo face centrada 2^3 , incluindo 6 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios foi realizado para avaliar a influência das variáveis temperatura (°C), agitação (rpm) e tempo (h) nos experimentos de sacarificação. Os níveis codificados e reais das variáveis, os ensaios experimentais e a resposta quanto à concentração de glicose obtida são apresentados na Tabela 33. As variáveis carga de bagaço e carga de enzima foram mantidas em 18,82% e 410,71 U de endoglucanase respectivamente.

Tabela 33 - Planejamento fatorial do tipo face centrada 2^3 com valores codificados e reais das variáveis temperatura, agitação e tempo empregado na otimização da sacarificação utilizando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições ótimas de cultivo.

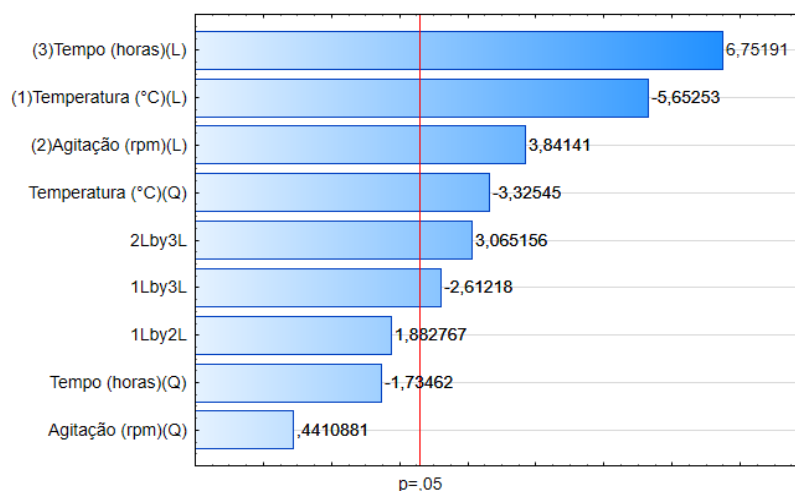
Ensaio	x_1	x_2	x_3	Y_1
1	-1 (45,0)	-1 (200,0)	-1 (8,0)	4,19
2	+1 (55,0)	-1 (200,0)	-1 (8,0)	3,59
3	-1 (45,0)	+1 (280,0)	-1 (8,0)	4,33
4	+1 (55,0)	+1 (280,0)	-1 (8,0)	3,55
5	-1 (45,0)	-1 (200,0)	+1 (24,0)	6,69
6	+1 (55,0)	-1 (200,0)	+1 (24,0)	3,28
7	-1 (45,0)	+1 (280,0)	+1 (24,0)	7,34
8	+1 (55,0)	+1 (280,0)	+1 (24,0)	6,31
9	-1 (45,0)	0 (240,0)	0 (16,0)	6,02
10	+1 (55,0)	0 (240,0)	0 (16,0)	4,45
11	0 (50,0)	-1 (200,0)	0 (16,0)	5,56
12	0 (50,0)	+1 (280,0)	0 (16,0)	6,87
13	0 (50,0)	0 (240,0)	-1 (8,0)	5,20
14	0 (50,0)	0 (240,0)	+1 (24,0)	6,06
15	0 (50,0)	0 (240,0)	0 (16,0)	6,07
16	0 (50,0)	0 (240,0)	0 (16,0)	6,08
17	0 (50,0)	0 (240,0)	0 (16,0)	6,06
18	0 (50,0)	0 (240,0)	0 (16,0)	6,05

x_1 – Temperatura (°C) ; x_2 – Agitação (rpm); x_3 – Tempo (h); Y_1 – Glicose (mg/mL)

Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações de glicose obtidas variaram de 3,28 a 7,34 mg/mL, sendo a maior concentração observada nas condições de sacarificação de 50 °C, 280 rpm e 24 horas (Ensaio 12). O efeito quantitativo estimado que cada variável analisada exerceu e suas interações são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 36) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 34).

Figura 36 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo cultivo do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01, sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O coeficiente de determinação do modelo (R^2) foi 0,94, concluindo-se que há um bom ajuste aos dados experimentais. Pelo diagrama de Pareto pode-se observar que as variáveis tempo, temperatura, agitação e a interação entre agitação e tempo foram significativas ao nível de 95% de confiança. O efeito significativo observado no nível (-1) da variável temperatura indicando que temperaturas menores foram melhores para a sacarificação e este efeito pode estar relacionado com a desnaturação das enzimas em temperaturas elevadas. Já as variáveis agitação e tempo apresentaram efeito positivo, o que indica que com o aumento de seus níveis ocorre um aumento na concentração de glicose. A carga de substrato influencia a eficácia da agitação, uma vez que elevadas cargas dificultam a transferência de massa e a acessibilidade das enzimas à biomassa, sendo necessário maior agitação para que sejam alcançados elevadas concentrações de glicose na sacarificação enzimática (MODENBACH; NOKES, 2013; PEREIRA et al., 2016). Em relação à influência da variável tempo, quanto maior o seu nível, maior a liberação de glicose, até um ponto ótimo, a partir do qual a concentração de glicose diminui. Este comportamento pode ser devido à inibição da ação da enzima pelos produtos de hidrólise acumulados ao longo do tempo (LEE; FAN, 1982; XU et al., 2007).

Pela análise de ANOVA (Tabela 34) confirma-se que o efeito linear e quadrático da variável temperatura, os efeitos lineares de agitação e tempo e a

interação entre as variáveis temperatura e tempo e agitação e tempo foram significativos.

Tabela 34 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose obtida na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições ótimas.

Glicose (mg/mL)					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1) Temperatura (°C) (L)	5,462	1	5,46	31,951	0,000
Temperatura (°C) (Q)	1,891	1	1,89	11,059	0,010
(2) Agitação (rpm) (L)	2,523	1	2,52	14,756	0,005
Agitação (rpm) (Q)	0,033	1	0,03	0,195	0,671
(3) Tempo (horas) (L)	7,793	1	7,79	45,588	0,000
Tempo (horas) (Q)	0,514	1	0,51	3,009	0,121
1L by 2L	0,606	1	0,61	3,545	0,096
1L by 3L	1,166	1	1,17	6,823	0,031
2L by 3L	1,606	1	1,61	9,395	0,015
Erro	1,368	8	0,17		
Total SQ	25,614	17			

*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 ($p < 0,1$)

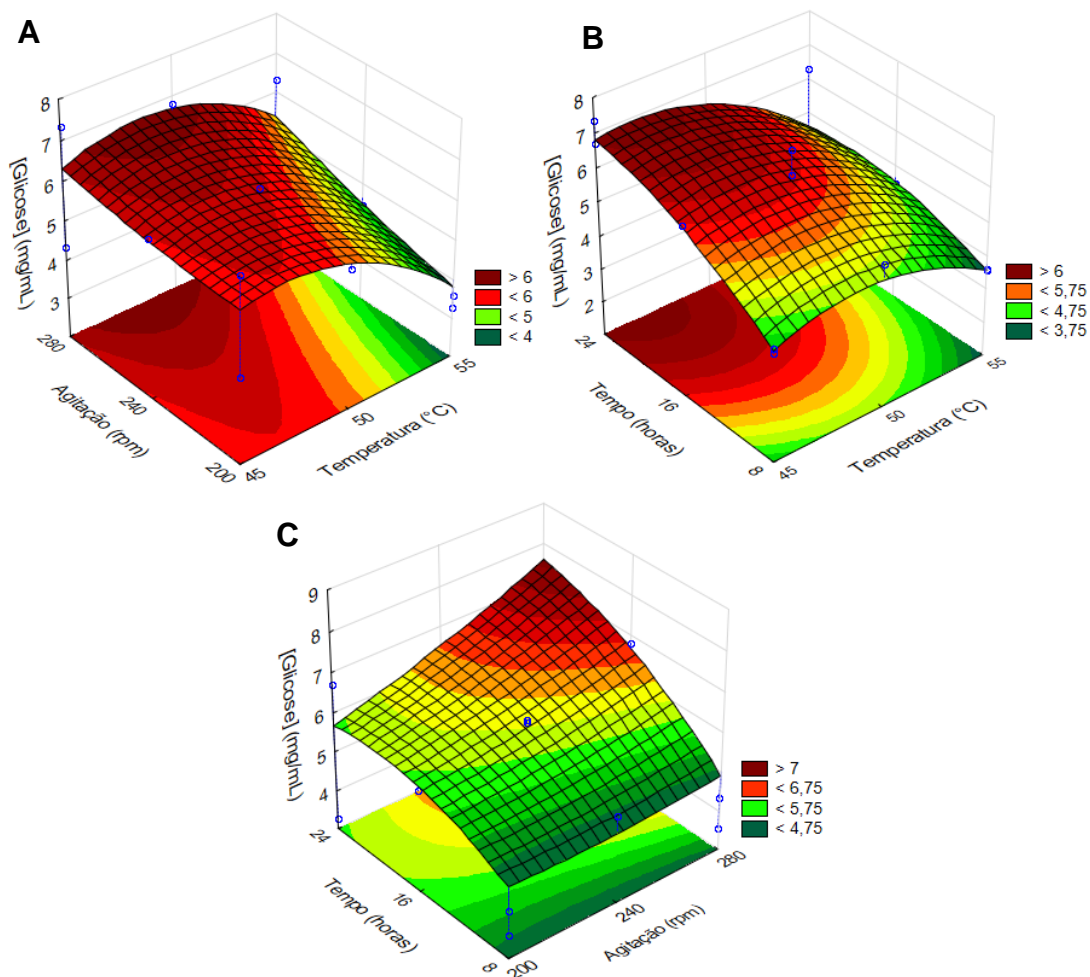
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados experimentais foram analisados por regressão múltipla e uma equação polinomial de segunda ordem foi derivada para representar a concentração de glicose (Eq. 15) em função das variáveis independentes avaliadas. A equação do modelo utilizado para a análise das duas variáveis é apresentada abaixo:

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & - 58,3491 + 3,0158 \cdot x_1 - 0,0334 \cdot x_1^2 - 0,1119 \cdot x_2 + 0,0001 \cdot x_2^2 + 0,4695 \cdot x_3 \\
 & - 0,0068 \cdot x_3^2 + 0,0014 \cdot x_1 \cdot x_2 - 0,0095 \cdot x_1 \cdot x_3 + 0,0014 \cdot x_2 \cdot x_3
 \end{aligned}
 \tag{15}$$

As superfícies de respostas geradas pelo modelo são apresentadas na Figura 37. As regiões ótimas são observadas nas temperaturas entre 45-50 °C (Figura 37A e 37B), tempo (Figura 37B e 37C) e agitação (Figura 37A e 37C) em seus níveis mais altos, 24h e 280 rpm respectivamente.

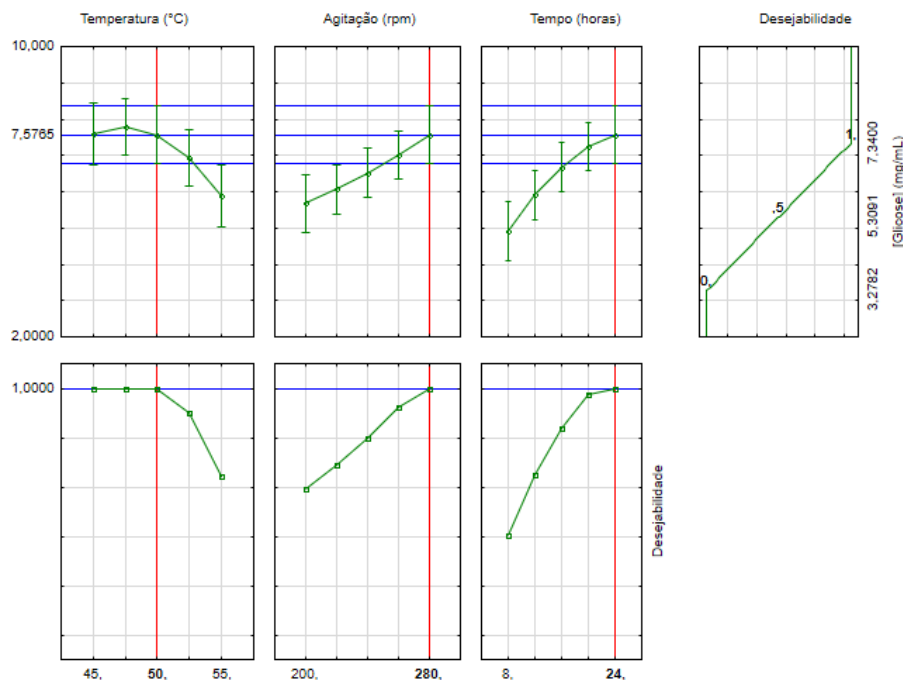
Figura 37 - Superfícies de resposta obtidas para concentração de glicose em função das variáveis agitação e temperatura (A), tempo e temperatura (B), tempo e agitação (C) na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo do fungo endófito *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições ótimas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A função de desejabilidade do *software* STATISTICA 10.0 (Figura 38) foi utilizada para otimização das condições de sacarificação, prevendo os valores ótimos dos parâmetros investigados: de 50 °C, 280 rpm e 24h. A concentração máxima de glicose prevista sob estas condições foi de 7,57 mg/mL.

Figura 38 - Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade para concentração de glicose em função das variáveis temperatura, agitação e tempo na sacarificação enzimática do bagaço de cana pelo extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico *Botryosphaeria* sp. AM01 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O experimento de validação foi realizado em triplicada, nas condições acima mencionadas, conforme desenvolvido pelo modelo. O resultado experimental foi de $8,05 \pm 0,03$ mg/mL, muito próximo ao valor previsto, e o rendimento obtido foi de 64,92 mg/g de bagaço. Além de glicose, o hidrolisado apresentou concentração de xilose de $9,48 \pm 0,07$ mg/mL e rendimento de 158,0 mg/g de bagaço.

Em relação a variável temperatura, esta afeta a taxa de reação e, conseqüentemente, a concentração de glicose obtida na sacarificação. Na maioria dos estudos relatados na literatura, a hidrólise tem sido realizada a temperaturas entre 45 °C e 50 °C, o que proporciona uma alta taxa de reação (CARDONA et al., 2014; MESA et al., 2016; TAN; LEE, 2014). Elevadas temperaturas podem causar uma maior desnaturação da enzima. A temperatura ótima de sacarificação enzimática observada nos experimentos do presente estudo é semelhante aos dados reportados na literatura.

Quanto à influência da agitação na sacarificação, dois fatores devem ser levados em consideração: a relação entre a velocidade de difusão da enzima na fase líquida e a velocidade intrínseca de reação (CARVALHO, 2011). Além de se

transportar para a superfície do substrato a enzima deverá ainda se adsorver fisicamente a ele (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). É importante considerar também que a agitação excessiva pode levar à desnaturação das enzimas devido à força de cisalhamento, reduzindo o rendimento de conversão da biomassa (GANESH; JOSHI; SAWANT, 2000; GHADGE et al., 2005). A influência da velocidade de agitação também depende do substrato estudado e, possivelmente, do esquema experimental utilizado, pois essas características irão alterar a resistência ao transporte de massa no filme externo ao substrato sólido em cada caso (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

Estudos realizados por Tengborg et al. (2001) demonstraram que velocidades de agitação até 340 rpm aumentaram a conversão enzimática de madeira pré-tratada por explosão a vapor, enquanto que, velocidades de agitação na faixa de 340 a 510 rpm apenas aumentaram as velocidades iniciais de hidrólise, e não a conversão final.

O efeito da agitação sobre hidrólise enzimática de espigas de milho pré-tratadas foi avaliado por Guo et al. (2015). Aumentando a agitação de 0 a 150 rpm, houve um aumento nas taxas iniciais de hidrólise e concentração final de açúcar. No entanto, a agitação de 200 rpm teve um efeito negativo significativo sobre a concentração de açúcar nas cargas sólidas de 2% a 15%. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram aumento na concentração de glicose com o aumento da agitação, até o nível máximo de 280 rpm. Apesar da função de desejabilidade sugerir que maiores concentrações seriam obtidas em uma faixa de agitação maior, optou-se por manter em 280 rpm, diminuindo o risco de inativação da enzima por cisalhamento e oferecendo uma condição mais branda de trabalho durante os experimentos.

O tempo de hidrólise é outra variável importante a ser avaliada, uma vez que as taxas de hidrólise tendem a diminuir com o prolongamento do tempo após o ótimo. Este comportamento pode ocorrer devido à inibição da ação das enzimas pelos produtos de hidrólise acumulados (LEE; FAN, 1982; XU et al., 2007). No presente estudo a maior concentração de açúcares foi obtida no nível mais alto dentro da faixa de tempo avaliada (24h), não sendo possível a determinação do ponto ótimo de sacarificação, pois pela análise das superfícies de resposta nota-se uma tendência de aumento de açúcares com o aumento da variável. Porém neste tempo pode-se observar uma concentração de açúcares satisfatória e prolongando-se o tempo de sacarificação pode ocorrer uma oneração do processo.

A concentração de glicose (e também xilose) obtida pelos experimentos de sacarificação onde empregou-se planejamentos experimentais encorajam a utilização do hidrolisado obtido no presente trabalho como fonte de açúcares para fermentações alcoólicas.

5.11 Análise de inibidores de fermentação

A utilização de resíduo lignocelulósico para sacarificação enzimática em biorrefinarias requer pré-tratamentos para desestruturar a associação entre as frações de celulose, hemicelulose e lignina que constituem a parede celular vegetal (YANG; WYMAN, 2008).

Os pré-tratamentos geralmente envolvem reações secundárias que resultam em subprodutos, derivados da lignocelulose, inibitórios às células microbianas nos processos de fermentação (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Sabe-se que dentre os inibidores formados em etapas de pré-tratamento, destacam-se o furfural e 5-hidroximetilfurfural, gerados pela degradação de pentoses e hexoses respectivamente, que danificam as paredes e membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico), inibem a síntese de proteínas e RNA (ácido ribonucleico), e reduzem a produção de etanol. Outro composto inibidor é o ácido acético, um ácido alifático, formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose. A sua presença no meio fermentativo ocasiona um aumento no consumo de ATP pela levedura. Assim, parte do ATP que seria utilizado para o crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno (BARAL; SHAH, 2014).

A geração de subprodutos depende da biomassa e do método de pré-tratamento utilizado. Comparados aos processos ácidos, os pré-tratamentos alcalinos leves (hidróxidos de sódio e de potássio) podem ser realizados a temperaturas mais baixas, levando a menor solubilização de hemicelulose e menor formação de compostos inibitórios (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

O hidrolisado obtido sob a condição otimizada de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático de *Botryosphaeria* sp. AM01 foi analisado quanto à presença de inibidores de fermentação. Observou-se a presença de ácido vanílico e ácido ferúlico nas concentrações de 0,111 e 0,054 g/L respectivamente. Não foi detectada a presença de 5-Hidroximetilfurfural, furfural, ácido siringico e ácido cumárico.

Furlani (2014) em sua tese de doutorado, avaliou a influência de 8 compostos fenólicos de baixa massa molar, oriundos da degradação da lignina, sobre a fermentação de glicose a etanol, utilizando-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e de panificação. Para a cepa PE-2, os ácidos cumárico e ferúlico não apresentaram toxicidade. No caso da *S. cerevisiae*, o ácido vanílico (1,0 g/L) e o

ácido cúmarico (0,6 e 1,0 g/L) dificultaram o consumo de glicose, apresentando alto efeito inibitório.

Em estudo com o objetivo de avaliar a influência de vanilina, ácido acético, ácido vanílico e ácido 4-hidroxibenzoico na fermentação de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1, Colombi et al. (2017) observaram que ácido vanílico (0,1; 0,5 e 1,0 g/L) inibem o crescimento da levedura em uma extensão diretamente proporcional à concentração inicial destes no meio fermentativo.

O hidrolisado obtido no presente trabalho apresenta características favoráveis para ser utilizado em processos de fermentação alcoólica, uma vez que apresentou baixas concentrações de inibidores.

6 CONCLUSÕES

Pelos dados apresentados, destaca-se a importância dos resultados obtidos como pesquisa básica, uma vez que não são relatados na literatura estudos quantitativos da produção de celulasas pelos gêneros estudados. A utilização de fungos endofíticos para produção de celulasas, bem como o emprego de FES e de ferramentas estatísticas representaram uma opção vantajosa para redução de custos em relação às enzimas utilizadas na produção de etanol celulósico.

As atividades enzimáticas aumentaram tanto em co-cultivo quanto em monocultivos, quando comparadas com aquelas obtidas nos cultivos iniciais onde não se avaliou a influência das variáveis estudadas, reforçando a importância do estudo. Com relação às atividades enzimáticas, pode-se destacar a elevada atividade β -glicosidade obtida pelo cultivo isolado de *Saccharicola* sp. EJC04 sob condições ótimas (770,58 U/g de substrato). Altas atividades desta enzima são interessantes para estudos envolvendo purificação ou, ainda, outras aplicações biotecnológicas.

A avaliação da influência dos parâmetros envolvidos na sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado possibilitou a obtenção de glicose em concentração 2,9 vezes superior, quando comparada à sacarificação realizada sob condições não otimizadas.

Os delineamentos experimentais foram muito adequados e possibilitaram a obtenção de modelos estatísticos válidos, tanto para produção das enzimas quanto para a sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado.

De modo geral, os dados obtidos no presente trabalho estimulam a continuidade dos estudos, tanto em relação à utilização dos hidrolisados como fonte de glicose para a obtenção de etanol celulósico quanto para o emprego das enzimas em outros processos biotecnológicos.

APÊNDICE

Tabela 35 - Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica dos extratos enzimáticos dos planejamentos fatoriais fracionados para as condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

Ensaio	Co-Cultivo			<i>Botryosphaeria</i> sp. AM01			<i>Saccharicola</i> sp. EJC04		
	PT	Endoglucanase	β -glicosidase	PT	Endoglucanase	β -glicosidase	PT	Endoglucanase	β -glicosidase
	(mg/mL)	AE (U/mg)	AE (U/mg)	(mg/mL)	AE (U/mg)	AE (U/mg)	(mg/mL)	AE (U/mg)	AE (U/mg)
1	7,48	1,77	1,14	6,68	3,87	1,21	10,83	0,18	1,19
2	10,43	1,25	1,16	7,28	3,88	1,43	16,38	0,05	1,46
3	10,18	1,32	1,44	7,28	3,78	1,49	17,18	0,11	1,58
4	8,78	1,60	1,26	6,93	3,70	1,24	10,03	0,10	1,33
5	9,88	1,49	1,71	8,03	3,70	1,60	20,88	0,09	1,43
6	10,33	1,19	0,67	6,83	4,51	1,12	7,93	0,18	0,96
7	10,53	1,18	0,46	6,33	4,74	1,16	7,48	0,21	1,53
8	10,98	1,53	1,52	6,83	4,72	1,94	12,48	0,08	1,91
9	12,23	0,99	1,41	6,23	2,72	1,74	18,78	0,04	1,07
10	10,48	1,45	1,28	6,28	3,75	1,45	9,43	0,19	1,87
11	9,63	1,44	1,49	6,18	3,26	1,39	8,23	0,19	1,83
12	11,08	1,07	1,22	7,38	3,22	1,43	12,08	0,08	1,18
13	10,88	0,55	0,44	6,93	5,31	0,74	7,48	0,22	1,61
14	10,98	1,24	1,35	6,58	4,87	1,61	11,23	0,17	1,74
15	10,63	1,51	1,36	7,48	3,37	1,51	10,23	0,20	2,21
16	10,63	0,60	0,43	7,28	2,73	0,91	9,88	0,09	1,76
17	11,88	1,12	1,22	7,13	1,87	1,42	12,93	0,07	1,63
18	12,18	1,06	1,13	7,33	1,86	1,35	12,68	0,09	1,68
19	13,23	1,01	1,06	7,23	1,86	1,39	13,13	0,08	1,60
20	12,38	1,05	1,12	7,28	1,89	1,36	13,03	0,07	1,64

*PT- Proteínas Totais; AE- Atividade Específica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 36 - Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica de celulases dos extratos enzimáticos nos delineamentos compostos centrais para as condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

Ensaio	Co-Cultivo			<i>Botryosphaeria</i> sp. AM01			<i>Saccharicola</i> sp. EJC04		
	PT (mg/mL)	Endoglucanase AE (U/mg)	β -glicosidase AE (U/mg)	PT (mg/mL)	Endoglucanase AE (U/mg)	β -glicosidase AE (U/mg)	PT (mg/mL)	Endoglucanase AE (U/mg)	β -glicosidase AE (U/mg)
1	7,58	0,76	3,45	11,03	0,99	1,89	13,43	0,28	4,54
2	11,88	0,70	3,25	10,33	1,25	2,29	12,13	0,28	3,50
3	10,98	0,95	0,76	8,93	1,33	3,31	14,28	0,25	4,20
4	9,98	0,80	1,71	9,68	1,11	3,22	16,83	0,22	4,09
5	9,98	1,16	1,74	9,08	1,67	3,16	8,73	0,35	3,45
6	9,83	1,17	1,79	9,03	1,67	3,19	16,63	0,21	4,15
7	7,98	1,41	2,16	6,68	2,28	4,33	14,43	0,20	4,38
8	8,78	0,94	1,78	9,18	1,50	3,11	15,23	0,19	4,57
9	11,18	1,30	2,69	10,68	1,37	2,91	14,88	0,20	4,92
10	9,08	0,99	2,26	10,03	0,80	1,41	11,33	0,25	6,47
11	9,83	1,18	3,07	10,23	1,09	2,95	13,63	0,21	5,35
12	-	-	-	-	-	-	12,68	0,23	5,32
13	-	-	-	-	-	-	15,38	0,15	5,01
14	-	-	-	-	-	-	12,38	0,24	3,85
15	-	-	-	-	-	-	12,93	0,21	4,47
16	-	-	-	-	-	-	13,08	0,22	2,78
17	-	-	-	-	-	-	13,03	0,22	4,60

*PT- Proteínas Totais; AE- Atividade Específica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 37 - Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica de celulases dos extratos enzimáticos otimizados para as condições de cultivo isolado e co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria* sp. AM01 e *Saccharicola* sp. EJC04.

Ensaio	Co-Cultivo			<i>Botryosphaeria</i> sp. AM01			<i>Saccharicola</i> sp. EJC04		
	PT	Endoglucanase	β -glicosidase	PT	Endoglucanase	β -glicosidase	PT	Endoglucanase	β -glicosidase
	(mg/mL)	AE (U/mg)	AE (U/mg)	(mg/mL)	AE (U/mg)	AE (U/mg)	(mg/mL)	AE (U/mg)	AE (U/mg)
1	13,33	1,00	2,32	8,48	2,07	2,19	11,03	0,24	5,47
2	13,43	0,99	2,29	8,58	2,29	2,15	11,18	0,23	5,36
3	13,43	0,96	2,31	8,43	2,31	2,16	11,08	0,25	5,37

*PT- Proteínas Totais; AE- Atividade Específica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

REFERÊNCIAS

- ADELEKE, A. J. et al. Production of cellulase and pectinase from orange peels by fungi. **Nature and Science**, v. 10, n. 5, p. 107-112, 2012.
- AGGER, J.; VIKSØ-NIELSEN, A.; MEYER, A. S. Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6141-6148, 2010.
- ALMEIDA, J. M. et al. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced β -glucosidases production by *Penicillium verrucosum*: potential of the crude extract for biomass hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 216-226, 2015.
- 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.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, 2011.
doi:10.1186/1754-6834-4-3.
- ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: a future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 699-717, 2015.
- ALRUMMAN, S. A. Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 110-119, 2015.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.
- BALI, G. et al. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. **ChemSusChem**, v. 8, n. 2, p. 275-279, 2015.
- BANSAL, N. et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, n. 7, p. 1341-1346, 2012.
- BARAL, N. R.; SHAH, A. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9151-9172, 2014.

BARCELOS, C. A. et al. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, n. 2, p. 341-346, 2013.

BARLEY, E.; FITZPATRICK, K. The structure and function of large biological molecules. In: REECE, J. B. et al. (Ed.). **Campbell biology**. 9th ed. Boston: Benjamin Cummings/Pearson, c2011. Chap. 5. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/kindarspirit/05-the-structure-and-function-of-large-biological-molecules>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1996.

BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91-106, 2014.

BERLIN, A. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198-209, 2006.

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. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C.-G.; GNANSOUNOU, E. (Ed.). **Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes**. Amsterdam: Academic Press, 2011. Chap. 10, p. 229-250.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries**, v. 12, p. 1-11, 2007.

BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 769-781, 2004.

BORGES, W. D. S. et al. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - a review. **Chimia**, v. 69, n. 10, p. 572-581, 2015.

BOYCE, A.; WALSH, G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 18, p. 7515-7525, 2015.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120-128, 2010.

BUGG, T. D. H. et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 394-400, 2011a.

BUGG, T. D. H. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883-1896, 2011b.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 8, p. 237-259, 2008.

CADIRCI, B. H.; YASA, I.; KOCYIGIT, A. *Streptomyces* sp. TEM 33 possesses high lipolytic activity in solid-state fermentation in comparison with submerged fermentation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 23-29, 2016.

CALLOW, N. V et al. Nutrient control for stationary phase cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 82, p. 8-14, 2015.

CARDONA, E. et al. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, v. 118, p. 41-47, 2014.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849-864, 2008.

CARVALHO, M. L. de. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011.102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CAVKA, A. et al. Production of cellulosic ethanol and enzyme from waste fiber sludge using SSF, recycling of hydrolytic enzymes and yeast, and recombinant cellulase-producing *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1191-1200, 2014.

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.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília, DF, 2010.

CHEN, H. Biotechnology principles of solid state fermentation. In: _____. **Modern solid state fermentation: theory and practice**. New York: Springer, 2013. p. 23-74.

CHEN, W.-H.; TU, Y.-J.; SHEEN, H.-K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, n. 8, p. 2726-2734, 2011.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121-145, 2011.

COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8308-8314, 2010.

COLOMBI, B. L. et al. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Engevista**, v. 19, n. 2, p. 339-352, 2017.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

COSTA, A. G. et al. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 363-372, 2014.

DANIEL, R. M. et al. The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. **Extremophiles**, v. 12, n. 1, p. 51-59, 2008.

DAROIT, D. J. et al. Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 904-908, 2007.

DAS, A. et al. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 290-296, 2013.

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

DELABONA, P. da. S. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 236-242, 2013.

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

DEWAN, S. S. **Global markets for enzymes in industrial applications**. [S.l.]: BCC Research, 2014. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

DEWAN, S. S. **Global markets and technologies for biofuel enzymes**. [S.l.]: BCC Research, 2015. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/energy-and-resources/biofuels-enzymes-global-markets-technologies-report-egy099b.html>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

DU, R. et al. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: SEC-MALLS analysis and reaction mechanism. **RSC Advances**, v. 3, n. 6, p. 1871-1877, 2013.

DWIVEDI, P.; ALAVALAPATI, J. R. R.; LAL, P. Cellulosic ethanol production in the United States: conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. **Energy for Sustainable Development**, v. 13, n. 3, p. 174-182, 2009.

EL-BAKRY, M. et al. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

EL-HADI, A. A. et al. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2014.

EL HAGE, R. et al. Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 10, p. 1632-1638, 2009.

ELLIAH, P. et al. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 615-620, 2002.

ELLISTON, A. et al. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 117-126, 2013.

EYLEY, S.; THIELEMANS, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. **Nanoscale**, v. 6, p. 7764-7779, 2014.

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.

FERNANDES, M. C. et al. Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 309-315, 2015.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Biomass residues in brazil: availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65-76, 2010.

FURLANI, J. M. S. **Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. Chap. 2, p. 41-65. (Série: advances in biochemical engineering/biotechnology, v. 108).

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, 2012.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an over view, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1003-1018, 2003.

GANESH, K.; JOSHI, J. B.; SAWANT, S. B. Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, 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.

GAO, Y. et al. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 41-45, 2014.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 85-101, 2003.

GHADGE, R. S. et al. Effect of flow pattern on cellulase deactivation in stirred tank bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 1067-1083, 2005.

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

GHOSH, P. et al. Statistical optimization of α -amylase production from *Penicillium notatum* NCIM 923 and kinetics study of the purified enzyme. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 59, n. 2, p. 179-188, 2015.

GHOSHAL, G.; BASU, S.; SHIVHARE, U. Solid state fermentation in food processing. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 3, 2012.
doi:10.1515/1556-3758.1246

GOYAL, M.; SONI, G. Induction and optimization of cellulases using various agro-wastes by *Trichoderma viridi*: effect of alkali pretreatment. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 33, p. 3426-3432, 2014.

GUILLÉN, D.; SÁNCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1241-1249, 2010.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

GUO, H. et al. Co-optimization of sugar yield and input energy by the stepwise reduction of agitation rate during lignocellulose hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 95, p. 1-6, 2015.

GUPTA, R.; LEE, Y. Y. Pretreatment of corn stover and hybrid poplar by sodium hydroxide and hydrogen peroxide. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 1180-1186, 2010.

HAAPALA, R. et al. Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 6, p. 401-406, 1994.

HALL, M. et al. Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **The FEBS journal**, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.

HAMES, B. et al. **Preparation of samples for compositional analysis**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. Technical report NREL/TP-510-42620. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42620.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

HAMID, S. B. A.; ISLAM, M. M.; DAS, R. Cellulase biocatalysis: key influencing factors and mode of action. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2157-2182, 2015.

HANSEN, C. M.; BJÖRKMAN, A. The ultrastructure of wood from a solubility parameter point of view. **Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**, v. 52, n. 4, p. 335-344, 1998.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, n. 3, p. 781-788, 1993.

HERVÉ, C. et al. Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15293-15298, 2010.

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

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, 2012. doi:10.1186/1754-6834-5-45.

HUANG, Z. et al. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1604-1608, 2008.

HUANG, R. et al. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: process intensification and mechanism research. **BioEnergy Research**, v. 4, n. 4, p. 225-245, 2011.

IBRAHIM, N. A. et al. Biosynthesis, optimization and potential textile application of fungal cellulases/xylanase multifunctional enzyme preparation from *Penicillium* sp. SAF6. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 3, p. 128-136, 2016.

ILMEN, M. et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1298-1306, 1997.

INGESSON, H. et al. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 177-182, 2001.

IOELOVICH, M. Cellulose as a nanostructured polymer: a short review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1403-1418, 2008.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, p. 4497-4559, 2015.

JACKSON, G. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical – chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

JADON, N. et al. Optimization of process parameters for the production of cellulases under solid state fermentation. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, p. 653-660, 2013.

JEYA, M. et al. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5155-5161, 2009.

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

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, 2013. doi:10.1186/1754-6834-6-16.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

JØRGENSEN, H. et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 862-870, 2007.

JUN, H. et al. Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 188-195, 2009.

KACHLISHVILI, E. et al. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 391-397, 2006.

KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KAPOOR, M.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 88-97, 2008.

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.

KAR, S. et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2013.

KARLSSON, J. et al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 63-78, 2002.

KHUONG, L. D. et al. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 62-68, 2014.

KILIKIAN, B. V et al. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 279-286, 2014.

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

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KO, J. K. et al. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. **Bioresource Technology**, v. 209, n. 4, p. 290-296, 2016.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1/2, p. 1-30, 2005.

KRISHNA, S. H.; CHOWDARY, G. V. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1971-1976, 2000.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, n. 1/3, p. 127-132, 2009.

KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Co-cultivation of *Penicillium* sp. AKB-24 and *Aspergillus nidulans* AKB-25 as a cost-effective method to produce cellulases for the hydrolysis of pearl millet stover. **Fermentation**, v. 2, n. 2, 2016. doi:10.3390/fermentation2020012.

KUMAR, L. et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 201-208, 2012.

KUPSKI, L. et al. Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: production, characterization, and thermal stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458-468, 2014.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. doi: 10.1155/2014/1631013.

LEE, Y.; FAN, L. T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 2383-2406, 1982.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

LIMA, M. S. et al. Co-cultivation of *Aspergillus nidulans* recombinant strains produces an enzymatic cocktail as alternative to alkaline sugarcane bagasse pretreatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.00583

LIU, J. et al. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2347-2351, 2006.

LIU, Y. et al. Reinforced alkali-pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Fuel Processing Technology**, v. 143, 2016.
doi:10.1016/j.fuproc.2015.11.004

LOH, Y. R. et al. Sugarcane bagasse - the future composite material: a literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 75, p. 14-22, 2013.

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.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

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

MADADI, M.; TU, Y.; ABBAS, A. Recent status on enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Electronic Journal of Biology**, v. 13, n. 2, p. 135-143, 2017.

MAEDA, R. N. et al. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1/8, p. 411-422, 2010.

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.

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.

MÄKI-ARVELA, P. et al. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- a review. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5638-5666, 2011.

MALLERMAN, J.; PAPINUTTI, L.; LEVIN, L. Characterization of β -glucosidase produced by the white rot *Fungus Flammulina velutipes*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 57-65, 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.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553-560, 2008.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

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 solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, n. 1, p. 5-8, 2012.

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.

MEDIE, F. M. et al. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227-234, 2012.

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. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 87-93, 2010.

MESA, L. et al. Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 86, p. 270-279, 2016.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications - an overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 21-26, 2011.

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

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (Ed.). **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation**. New York: Springer, c2006.

MISHRA, Y. et al. Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: a review. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 8, p. 2, 2014.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MOHAMMED, A. K. Studying the optimum conditions for cellulase production from wheat straw and papyrus straw using *Trichoderma viride*. **International Journal of Bio-Technology**, v. 3, n. 3, p. 61-68, 2013.

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

MORETTI, M. M. 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.

MORETTI, M. M. D. 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. D. 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.

NAKANISHI, S. C. et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, 2017. Ahead of print. doi:10.1002/bit.26357.

NANDA, S.; MOHAMMAD, J.; REDDY, S. N. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 4, n. 2, p. 157-191, 2014.

NARRA, M. et al. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NARRA, M. et al. Production, purification and characterization of a novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 150-161, 2014.

NGUYEN, N. et al. One-step purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 10, p. 2107-2116, 2010.

NIGAM, P. S.-N.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**: utilisation of agro-residues. [Netherlands]: Springer, c2009.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.

OHGREN, K. et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 834-839, 2007.

OLSEN, J. P. et al. Interrelationships between cellulase activity and cellulose particle morphology. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2349-2361, 2016.

PALOMARES-RIUS, J. E. et al. Distribution and evolution of glycoside hydrolase family 45 cellulases in nematodes and fungi. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, 2014. doi:10.1186/1471-2148-14-69.

PAN, X. et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1069-1079, 2005.

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

PANDIYAN, K. et al. Optimization of enzymatic saccharification of alkali pretreated *Parthenium* sp. using response surface methodology. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/764898.

PARDO, A. G. Effect of surfactants on cellulase production by *Nectria catalinensis*. **Current Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 275-278, 1996.

PATIL, M. G. et al. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 1035-1042, 2015.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.

PEDRI, Z. C. et al. Influence of nitrogen sources on the enzymatic activity and growth by *Lentinula edodes* in biomass *Eucalyptus benthamii*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 940-947, 2015.

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.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química**: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: São Carlos: EdUSFCar, 2015.

PHILIPPOUSSIS, A. et al. Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 285-297, 2011.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 390-405, 2013.

PICART, P.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. J. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 108-113, 2007.

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.

RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry**, v. 67, n. 8, p. 850-871, 2002.

RANA, S. S.; JANVEJA, C.; SONI, S. K. Brewer's spent grain as a valuable substrate for low cost production of fungal cellulases by statistical modeling in solid state fermentation and generation of cellulosic ethanol. **International Journal of Food and Fermentation Technology**, v. 3, n. 1, p. 41-55, 2013.

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

REESE, E. T.; MAGUIRE, A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 242-245, 1969.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, 2011. doi:10.1186/1754-6834-4-54.

RIVERA, E. C. et al. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 7, p. 983-992, 2010.

ROBL, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, 2013. doi:10.1186/1472-6750-13-94.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Ed. Cárita, 2014.

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

RODRIGUEZ-GOMEZ, D.; HOBLEY, T. J. Is an organic nitrogen source needed for cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30 ? **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 2157-2165, 2013.

RODRÍGUEZ, M. A. R. et al. An LCA based indicator for evaluation of alternative energy routes. **Applied Energy**, v. 88, p. 630-635, 2011.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROMO-SÁNCHEZ, S. et al. Immobilization of β -glucosidase and its application for enhancement of aroma precursors in muscat wine. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 5, p. 1381-1392, 2014.

RUIZ, H. A. et al. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90-95, 2012.

RYTIOJA, J. et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SAINI, R. et al. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 240-246, 2015.

SAJITH, S. et al. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, n. 1, 2016. doi:10.4172/2155-9600.1000461.

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

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANDHU, S. K. et al. Two-stage statistical medium optimization for augmented cellulase production via solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus niger* HN-1 and application of crude cellulase consortium in hydrolysis of rice straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12653-12661, 2013.

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

SANTOS, M. F. R. F. dos; BORSCHIVER, S.; COUTO, M. A. P. G. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. **Economia & Energia**, n. 82, p. 14-32, 2011.

SATHYA, T. A.; KHAN, M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 11, p. 2149-2156, 2014.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 1, p. 60-70, 2007.

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

SHARMA, A. et al. Cellulases: classification , methods of determination and industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, p. 1346-1380, 2016.

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.

SINGHANIA, R. R. et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2013.

SILVEIRA, M. H. L. et al. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. **ChemSusChem**, v. 8, n. 20, p. 3366-3390, 2015.

SLUITER, A. et al. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. Technical report NREL/TP-510-42623. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

SLUITER, A. et al. **Determination of ash in biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. Technical report NREL/TP-510-42622. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008. Technical report NREL/TP-510-42618. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/7153/8124eba6d60c5c6140128866f3dfeb10a7ed.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

SØRENSEN, A. et al. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 612-631, 2013.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, p. 480-486, 2012.

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

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

SUNITHA, V. H.; DEVI, D. N.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2013.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

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

TAKÓ, M. et al. Identification of acid-and thermotolerant extracellular β -glucosidase activities in *Zygomycetes* fungi. **Acta Biologica Hungarica**, v. 61, n. 1, p. 101-110, 2010.

TAN, I. S.; LEE, K. T. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: an optimization study. **Energy**, v. 78, p. 53-62, 2014.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 1, p. 110-117, 2001.

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

TIMELL, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 45-70, 1967.

TIPTON, K. F.; DIXON, H. B. Effects of pH on enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 63, p. 183-234, 1979.

TIRADO-GONZÁLEZ, D. N. et al. Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 147-156, 2016.

TODD, G. W. Water deficit and enzymatic activity. **Water Deficits and Plant Growth**, v. 3, p. 177-216, 1972.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146-153, 2017.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VÁRNAI, A. et al. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9096-9104, 2011.

VÁSQUEZ, M. P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1, p. 141-153, 2007.

VILLENA, M. A. et al. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 229-234, 2006.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 397-406, 2006.

VINOGRADOVA, S. P.; KUSHNIR, S. N. Biosynthesis of hydrolytic enzymes during cocultivation of macro and micromycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 573-575, 2003.

VISHWAKARMA, R.; BANERJEE, R. Enhancement of sugar content of *Cyperus* sp. through cellulolytic enzymes for bioethanol generation. **Lignocellulose**, v. 5, n. 2, p. 94-105, 2016.

VOLYNETS, B.; DAHMAN, Y. Assessment of pretreatments and enzymatic hydrolysis of wheat straw as a sugar source for bioprocess industry. **International Journal of Energy & Environment**, v. 2, n. 3, p. 427-446, 2011.

VOLYNETS, B.; EIN-MOZAFFARI, F.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Processing and Synthesis**, v. 6, p. 1-22, 2017.

WAHID, M. Z. A. et al. Factors affecting endoglucanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 from solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches using Plackett-Burman design. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9402-9409, 2011.

WANG, H. et al. Digestibility improvement of sorted waste with alkaline hydrothermal pretreatment. **Tsinghua Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 378-382, 2009.

WANG, Q. et al. Recycling cellulase towards industrial application of enzyme treatment on hardwood kraft-based dissolving pulp. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 160-163, 2016.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 31-39, 2004.

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

WYMAN, C. E. et al. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**, v. 1, p. 1023-1062, 2005.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, p. 307-319, 2001.

XU, J. et al. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. **Energy Fuels**, v. 24, n. 9, p. 2113-2119, 2010.

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.

XU, Z. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 2/3, p. 162-167, 2007.

YADAV, P. R.; CHAUHAN, P. B.; GAHLOUT, M. Isolation, screening and optimization of process parameters for enhanced production of cellulase by solid state fermentation. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 21-27, 2016.

YANG, B. et al. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 678-684, 2002.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

YU, Q. et al. Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 592-598, 2013.

YÜCEL, Y.; GÖYCINCIK, S. Optimization and modelling of process conditions using response surface methodology (rsm) for enzymatic saccharification of spent tea waste (STW). **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1077-1084, 2015.

YUE, D.; YOU, F.; SNYDER, S. W. Biomass-to-bioenergy and biofuel supply chain optimization: overview, key issues and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, v. 66, p. 36-56, 2014.

ZABALGOGEAZCOA, I.; OLEAGA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 336-343, 2008.

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

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

ZHANG, H.; SANG, Q. Statistical optimization of cellulases production by *Penicillium chrysogenum* QML-2 under solid-state fermentation and primary application to chitosan hydrolysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1163-1174, 2012.

ZHANG, N. et al. Biological materials by design cellulose-hemicellulose interaction in wood secondary cell-wall. **Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering**, v. 23, n. 8, 2015. doi:10.1088/0965-0393/23/8/08510.

ZHANG, Q.; CAI, W. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1130-1135, 2008.

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, X.; ZHANG, Y. P. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. In: YANG, S.-T.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL, N. (Ed.). **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. Chap. 8, p. 131-146.

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, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, S. et al. High-yield cellulase production in solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* SEMCC-3 . 217 using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10178-10187, 2011.

ZHOU, C. et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 5588-5617, 2011.

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.