



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**Processo integrado de produção de enzimas fibrolíticas, açúcares
fermentescíveis e cogumelos comestíveis utilizando resíduos
agroindustriais**

Douglas Fernandes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Junho – 2016
Rio Claro – SP

Processo integrado de produção de enzimas fibrolíticas, açúcares fermentescíveis e cogumelos comestíveis utilizando resíduos agroindustriais

Capítulo 1: *Produção de enzimas fibrolíticas fúngicas por Fermentação submersa utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos in natura ou pré-tratados*

Capítulo 2: *Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar in natura ou pré-tratado para obtenção de açúcares fermentescíveis*

Capítulo 3: *Produção integrada do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, enzimas fibrolíticas e composto proteico por Fermentação em Estado Sólido com diferentes resíduos lignocelulósicos*

Douglas Fernandes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

**Junho – 2016
Rio Claro – SP**

620.8 Silva, Douglas Fernandes da
S586p Processo integrado de produção de enzimas fibrolíticas,
açúcares fermentescíveis e cogumelos comestíveis utilizando
resíduos agroindustriais / Douglas Fernandes da Silva. - Rio
Claro, 2016
239 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Biotecnologia. 2. Resíduos lignocelulósicos. 3. Enzimas
do complexo fibrolítico. 4. *Trichoderma reesei*. 5.
Sacarificação. 6. *Pleurotus ostreatus*. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DOUGLAS FERNANDES DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS.

Aos 30 dias do mês de junho do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Sala 15 - Bloco Didático I - IB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO - Orientador(a) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis - SP, Prof. Dr. MICHEL BRIENZO do(a) Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa Em Bioenergia-Ipben, Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA do(a) Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro, Prof. Dr. JOÃO CLAUDIO THOMEIO do(a) Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos / UNESP-Câmpus de São José do Rio Preto, Profa. Dra. ELENÍ GOMES do(a) Departamento de Biologia / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto, SP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de DOUGLAS FERNANDES DA SILVA, intitulada **Processo integrado de produção de enzimas fibrolíticas, açúcares fermentescíveis e cogumelos comestíveis utilizando resíduos agroindustriais**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO



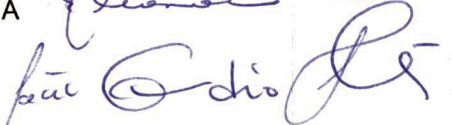
Prof. Dr. MICHEL BRIENZO



Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA



Prof. Dr. JOÃO CLAUDIO THOMEIO



Profa. Dra. ELENÍ GOMES



Dedico este trabalho aos meus pais, José Dimas da Silva e Tania Maria Fernandes da Silva, e a toda a minha família pelo grande apoio e incentivo aos estudos que sempre me concederam. O amor que recebo de vocês é a fonte das minhas energias.

"Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana"

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me acompanhado nesta jornada, me dado força e sabedoria na hora necessária.

Aos meus pais e irmã, por tudo o que já fizeram por mim, por estarem sempre ao meu lado e pela certeza de que sempre estarão. A minha companheira Isabella Leone e toda a sua família por estarem do meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, por sua paciência comigo durante todo esse tempo desde a graduação, por toda a experiência adquirida com ele e por todas as discussões construtivas que tivemos.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho no laboratório, principalmente a Ludmila Hergesel, sem os quais esse trabalho não existiria.

A Dra. Ana Flávia Carvalho que me auxiliou em diversos pontos do meu trabalho, tanto teórico como prático.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, por ter me acolhido e fornecido todo o suporte necessário para a fase experimental da minha pesquisa científica.

A Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e a FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro.

A todos que, de uma forma ou de outra participaram da elaboração desse trabalho e que porventura eu tenha me esquecido de citar, minhas desculpas e meus mais sinceros agradecimentos.

Sumário

Lista de Tabelas.....	13
Lista de Figuras.....	16
Resumo	xx
Abstract.....	21
1. Introdução	22
2. Revisão Bibliográfica	24
2.1. Resíduos agroindustriais lignocelulósicos	24
2.2. Biomassa lignocelulósica	26
2.3. Principais constituintes dos resíduos agroindustriais	28
2.4. Celulose	28
2.5. Hemicelulose	30
2.6. Lignina	32
2.7. Outros constituintes da biomassa lignocelulósica (orgânicos e inorgânicos).....	34
2.8. Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L)	34
2.9. Bagaço de laranja.....	36
2.10. Outras biomassas como fonte lignocelulolítica	36
2.11. Biomassa: Fonte de bioenergia (energias renováveis).....	37
2.12. Pré-tratamentos	40
2.13. Pré-tratamento alcalino	41
2.14. Hidrólise.....	42
2.15. Enzimas: Catalisadores biológicos.....	43
2.16. Enzimas celulolíticas	43
2.16.1. Sinergismo entre as enzimas do complexo celulítico	45
2.17. Enzimas xilanolíticas	46
2.18. Enzimas lignolíticas	46
2.18.1. Lacases	47
2.18.2. Manganês Peroxidase	47
2.19. Micro-organismos produtores de enzimas fibrolíticas	48
2.20. Fungos degradadores de biomassa lignocelulolítica.....	50
2.21. Fungos <i>Basidiomycota</i>	52
2.22. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Shimeji)	55
2.23. Cultivo Axênico de cogumelos	56

2.23.1.	Influência da relação C/N no cultivo dos fungos basidiomicetos	60
2.24.	Açúcares fermentescíveis e Bioetanol de segunda geração	62
3.	Objetivo Geral	63
3.1.	Objetivos Específicos	63
4.	Fluxograma	64
Capítulo 1: <i>Produção de enzimas fibrolíticas fúngicas por Fermentação submersa utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos in natura ou pré-tratados</i>		lxv
Resumo		lxvi
1.	Introdução	67
2.	Materiais e Métodos	68
2.1.	Materiais	68
2.1.1.	Micro-organismo	68
2.1.2.	Preservação dos micro-organismos	68
2.1.3.	Reagentes e Substratos	69
2.1.4.	Celulase comercial (E.C.3.2.1.4)	69
2.1.5.	Equipamentos	71
2.2.	Metodologia	71
2.2.1.	Ensaio para pré-seleção do melhor fungo fibrolítico e da melhor caldo nutriente	71
2.2.1.1.	Ensaio de comparação entre os diferentes fungos fibrolíticos	72
2.2.1.2.	Ensaio para definir a melhor concentração do caldo nutriente para o cultivo e produção do complexo enzimático	73
2.2.2.	Produção do extrato enzimático e substrato residual do <i>T. reesei</i> QM 9414	73
2.2.2.1.	Meio e Condições de Cultivo	73
2.2.2.2.	Pré-tratamento biológico	74
2.2.2.2.1.	Pré-tratamento biológico do Farelo de Trigo	74
2.2.2.2.2.	Pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar	75
2.2.2.2.3.	Preparação das biomassas residuais	75
2.2.2.3.	Pré-tratamento físico-químico	75
2.2.2.3.1.	Pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar	76
2.2.2.3.2.	Pré-tratamento físico do Capim Napier	76
2.2.2.4.	Cultivo do <i>T. reesei</i> QM 9414 em incubadora orbital (80 mL) – protocolos em pequena escala	77
2.2.2.5.	Planejamento Experimental (DCCR ²) na produção do complexo fibrolítico para duas variáveis independentes (pH e Temperatura)	77

2.2.2.6. Culturas em fermentador com agitação (2 Litros - Escala de laboratório em fermentador).....	78
2.2.2.7. Caracterização do complexo enzimático: influência da temperatura, pH e termoestabilidade.....	79
2.2.2.8. Concentração do extrato enzimático	80
2.2.2.8.1. Ensaio de estabilidade da temperatura	80
2.2.2.8.2. Concentração do extrato fibrolítico em fermentador em temperatura constante e a vácuo	80
2.2.3. Procedimentos analíticos	81
2.2.3.1. Determinação das Celulases Totais (Atividade de Papel de Filtro - FPase).....	81
2.2.3.2. Determinação da Endoglucanase (CMCase).....	82
2.2.3.3. Determinação da Exoglucanase (Avicelase).....	83
2.2.3.4. Determinação das Xilanases.....	83
2.2.3.5. Determinação do Açúcar Redutor	84
2.2.3.6. Determinação da atividade por grama de substrato	84
2.2.3.7. Determinação da atividade proteolítica.....	85
2.3. Tratamento Estatístico	85
3. Resultados e Discussão	86
3.1.1.1. Ensaio para pré-seleção do melhor fungo fibrolítico e da complementação nutricional dos meios de cultura.....	86
3.1.1.2. Ensaio de pré-seleção do fungo	86
3.1.1.3. Ensaio para determinar o melhor caldo nutriente	87
3.2. Influência da fonte de carbono na produção do complexo enzimático por <i>T. reesei</i> QM 9414 em “incubadora orbital”	91
3.2.1. Produção do complexo celulolíticos pelos diferentes substratos	93
3.2.1.1. Celulases Totais.....	93
3.2.1.2. Endoglucanase.....	95
3.2.1.3. Exoglucanase	98
3.2.1.4. Produção do complexo xilanolítico pelos diferentes substratos	100
3.3. Avaliação das melhores condições físico-químicas para a produção enzimática por Delineamento composto central rotacional (DCCR)	107
3.3.1. DCCR para o bagaço de laranja (<i>BLara</i> + <i>Sac</i>).....	107
3.3.2. DCCR para o cultivo a partir do substrato <i>T1</i> + <i>Sac</i>	114
3.4. Experimentos com Fermentador de 2 litros.....	122
3.4.1. <i>BLara</i> + <i>Sac</i> em fermentador agitado (2 litros).....	122

3.4.2.	T1+Sac em fermentador agitado (2 litros)	127
3.5.	Testes de estabilidade do complexo fibrolítico produzido	133
3.5.1.	Efeito da temperatura e pH de reação no complexo enzimático fibrolítico	133
3.5.2.	Estabilidade térmica do extrato fibrolítico	135
3.6.	Concentração do extrato enzimático	143
4.	Conclusão	144
Capítulo 2: <i>Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar in natura ou pré-tratado para obtenção de açúcares fermentescíveis</i>cxlvi		
Resumo		cxlvii
1.	Introdução	148
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	149
2.1.	Materiais	149
2.1.1.	Celulase comercial (E.C.3.2.1.4)	149
2.1.2.	Resíduos agroindustriais utilizados	149
2.1.3.	Reagentes e Substratos	150
2.1.4.	Equipamentos	151
2.2.	Metodologia	151
2.2.1.	Preparo do bagaço de cana-de-açúcar	151
2.2.2.	Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio	151
2.2.2.1.	Pré-tratamento por Planejamento Experimental (DCCR 2³) e produção do CPD	152
2.2.2.2.	Pré-tratamento do bagaço de cana em condições pré-definidas de temperatura e NaOH	153
2.2.3.	Ensaio de FSm em incubadora orbital (80 mL)	154
2.2.4.	Testes de sacarificação	154
2.2.5.	Procedimentos analíticos	156
2.2.5.1.	Ensaio de liberação de AR para bagaços pré-tratados	156
2.2.5.2.	Determinação das Celulases Totais (Atividade de Papel de Filtro - FPase)	156
2.2.5.3.	Determinação do Açúcar Redutor	156
2.2.5.4.	Determinação do Teor de Lignina pelo Método Klason	156
2.3.	Tratamento Estatístico	158
3.	Resultados e Discussão	159
3.1.	Pré-tratamento álcali avaliado por delineamento composto central rotacional (DCCR 2³)	159

3.1.1. Tratamento físico/químico sob o bagaço de cana-de-açúcar e liberação de AR por ação da celulase comercial (DCCR 2 ³).....	159
3.1.2. Cultivo de <i>T. reesei</i> QM 9414 a partir de meio formulado com bagaço submetidos a tratamento com NaOH (DCCR) para produção enzimática	163
3.2. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana a partir de condições previamente estabelecidas no DCCR	166
3.3. Cultivo de <i>T. reesei</i> QM 9414 para produção de enzimas fibrolíticas com meios formulados com bagaço de cana pré-tratado	172
3.4. Sacarificação e hidrólise enzimática	174
4. Conclusão	clxxx
Capítulo 3: Produção integrada do cogumelo <i>Pleurotus ostreatus</i> , enzimas fibrolíticas e composto proteico por Fermentação em Estado Sólido com diferentes resíduos lignocelulósicos	
Resumo	clxxxii
1. Introdução	183
2. MATERIAIS E MÉTODOS	185
2.1. Materiais	185
2.1.1. Micro-organismos	185
2.1.2. Resíduos agroindustriais	185
2.1.3. Reagentes e Substratos	186
2.1.4. Equipamentos	187
2.2. Métodos	187
2.2.1. Preservação, cultivo e inóculo primário (matriz primária) do <i>Pleurotus ostreatus</i>	187
2.2.2. Inóculo secundário.....	187
2.2.3. Inóculo terciário	188
2.2.4. Preparo dos Substratos	189
2.2.5. Teste em placa	189
2.2.6. Cultivo Axênico de <i>Pleurotus ostreatus</i> para produção de enzimas fibrolíticas e cogumelos	191
2.2.7. Colheita e Avaliação dos cogumelos	193
2.2.8. Coleta das Amostras	194
2.2.9. Procedimentos analíticos	194
2.2.9.1. Determinação de Celulases Totais (FPase – FPU/g).....	194
2.2.9.2. Determinação da Atividade da Endoglucanase (CMCase – U/g)	194
2.2.9.3. Determinação das Xilanases (U/g).....	195

2.2.9.4.	Determinação do Açúcar Redutor	195
2.2.9.5.	Atividade das enzimas ligninolíticas	195
2.2.9.5.1.	Atividade da Lacase (Lac) (U/g)	195
2.2.9.5.2.	Atividade da Manganês Peroxidase (MnP) (U/g)	195
2.2.9.5.3.	Cálculo das atividades lignolíticas	196
2.2.9.6.	Determinação da proteína bruta nas amostras secas pela técnica Kjeldahl.....	196
2.3.	Tratamento Estatístico	197
3.	Resultado e Discussão	198
3.1.	Teste em placa	198
3.2.	Cultivo Axênico e coleta dos cogumelos	205
3.3.	Produção enzimática	215
4.	Conclusão	218
	Conclusão geral	219
	Referências Bibliográficas	220

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos.....	27
Tabela 1.1. Diferentes substratos utilizados na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.....	72
Tabela 1.2. Diferentes substratos utilizados na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.....	74
Tabela 1.3: DCCR (2^2) para a produção dos complexos enzimáticos pelo <i>T. reesei</i> QM 9414.	79
Tabela 1.4: Comparação entre os diferentes fungos na produção de Celulases Totais (FPase – FPU/mL) e Endoglucanase (CMCase – U/mL).	86
Tabela 1.5: Atividade Enzimática para celulase total (FPase), endoglucanase (CMCase) e protease nas fermentações com o <i>T. reesei</i> QM 9414.....	88
Tabela 1.6: Diferentes fontes de carbono para a produção de Celulases Totais (FPase), Endoglucanase (CMCase), Exoglucanase (Avicelase) e Xilanase pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em cultivo submerso em “incubadora orbital”.....	92
Tabela 1.7: Produção e atividades do complexo fibrolítico e atividades previstas para <i>T. reesei</i> QM 9414 nos ensaios experimentais e respostas em 10 dias de cultivo com o substrato <i>BLara</i> + <i>Sac</i>	108
Tabela 1.8: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Celulases Totais e para o substrato <i>BLara</i> + <i>Sac</i>	108
Tabela 1.9: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Endoglucanase e para o substrato <i>BLara</i> + <i>Sac</i>	110
Tabela 1.10: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Exoglucanase e para o substrato <i>BLara</i> + <i>Sac</i>	111
Tabela 1.11: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade xilanase para o substrato <i>BLara</i> + <i>Sac</i>	113
Tabela 1.12: Valores previstos para o delineamento experimental (DCCR 2^2).....	114
Tabela 1.13: Produção e atividades do complexo fibrolítico e atividades previstas para <i>T. reesei</i> QM 9414 nos ensaios experimentais e respostas em 15 dias de cultivo com o substrato <i>T1</i> + <i>Sac</i>	115
Tabela 1.14: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Celulases Totais e para o substrato <i>T1</i> + <i>Sac</i> em 7 dias de cultivo.	115
Tabela 1.15: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Endoglucanase e para o substrato <i>T1</i> + <i>Sac</i> em 10 dias de cultivo.	117
Tabela 1.16: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Exoglucanase e para o substrato <i>T1</i> + <i>Sac</i> em 10 dias de cultivo.....	118
Tabela 1.17: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Exoglucanase e para o substrato <i>T1</i> + <i>Sac</i> em 10 dias de cultivo.....	119
Tabela 1.18: Valores previstos para o delineamento experimental (DCCR 2^2).....	120

Tabela 1.19: Produção enzimática com Bagaço de laranja (<i>BLara+Sac</i>) cultivado em fermentador de 2 litros em condições controladas e diferentes dias de cultivo.	123
Figura 1.18: Produção de enzimas fibrolíticas – Endoglucanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v ⁻¹) sacarose, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.	125
Tabela 1.20: Produção enzimática com Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente – <i>T1+Sac</i> (Capítulo 3) cultivado em fermentador de 2 litros em condições controladas e diferentes dias de fermentação.....	127
Tabela 1.21: Teste de temperatura para os complexos fibrolíticos produzidos em fermentador de 2 litros em condições controladas – 15 dias.	133
Tabela 1.22: Atividade enzimática em diferentes pHs para os complexos fibrolíticos produzidos em fermentador de 2 litros.	135
Tabela 1.23: Estabilidade térmica a 50 °C até 60 minutos dos complexos fibrolíticos produzidos em fermentador de 2 litros em condições controladas.	136
Tabela 1.24: Estabilidade térmica do extrato enzimático produzido a partir do substrato <i>T1+Sac</i> em fermentador de 2 Litros, para as diferentes atividades fibrolíticas.	139
Tabela 1.25: Extratos enzimáticos sem concentrar e concentrados.	143
Tabela 2.1: Pré-tratamento com hidróxido de sódio e obtenção dos CPDs nos diferentes parâmetros estudados.	153
Tabela 2.2: Diferentes condições de tratamento físico/químico sobre o bagaço de cana-de-açúcar.	154
Tabela 2.3: Liberação de AR (mg) para os diferentes parâmetros do pré-tratamento alcalino no bagaço de cana-de-açúcar..	160
Tabela 2.4: Coeficientes de regressão para a liberação de açúcar redutor para os pré-tratamentos utilizando NaOH.	161
Tabela 2.5: Valores preditos para o delineamento experimental (DCCR2 ³).	163
Tabela 2.6: Produção e atividade do complexo fibrolítico nos diferentes parâmetros estudados no cultivo do <i>T. reesei</i> QM 9414.	164
Tabela 2.7: Coeficientes de regressão para a produção de enzimas fibrolíticas – quantificadas por Celulases Totais – pela FSm e <i>T. reesei</i> QM 9414.	164
Tabela 2.8: Valores preditos para o delineamento experimental (DCCR2 ³).	166
Tabela 2.9: Liberação de AR de acordo com os diferentes tipos de pré-tratamento alcalino.	167
Tabela 2.10: Avaliação da deslignificação e remoção de hemicelulose do bagaço tratado por diferentes hidrólises alcalina.	168
Tabela 2.11: Produção do complexo fibrolítico pela atividade de Celulases Totais (FPU/mL) com substratos CPD e <i>in natura</i>	172
Tabela 2.12: Liberação de açúcares redutores obtidos pela hidrólise enzimática de diferentes substratos e complexos enzimáticos a 50 °C e pH 5,6.	175

Tabela 2.13: Balanço geral da conversão de biomassa em AR por hidrólise enzimática.	178
Tabela 3.1: Diferentes tratamentos com diferentes concentrações dos resíduos agroindustriais ($\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$).	190
Tabela 3.2: Crescimento micelial (cm) do <i>P. ostreatus</i> após 5, 10 e 15 dias de cultivo, em 50, 60 e 80% de umidade, e 20 25 e 30 °C.	199
Tabela 3.3: Cultivo de <i>P. ostreatus</i> – eficiência biológica e rendimento	213
Tabela 3.4: Balanço geral da conversão de biomassa em AR por hidrólise enzimática.	215
Tabela 3.5: Dados de atividades enzimáticas obtidas após a colheita dos cogumelos.	217

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo da estrutura molecular dos constituintes do material lignocelulósico (BIDLACK et al., 1992).	27
Figura 2: Cadeia linear polimérica da celulose.	28
Figura 3: D-Glicose, monossacarídeo resultante após a ação das enzimas celulolíticas sobre a celulose.	29
Figura 4: Representação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal: a) aldeído; b) grupo terminal redutor.	29
Figura 5: Monossacarídeos encontrados na hemicelulose (FENGEL & WEGNER, 1989).	31
Figura 6: Estrutura teórica da lignina (FENGEL & WEGENER, 1989).	33
Figura 7: Ligação α - e β -aril éter da macromolécula de lignina.	33
Figura 8: Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).	33
Figura 9: Composição média do bagaço de cana-de-açúcar.....	35
Figura 10: Oferta interna de Energia para o Brasil. (Fonte: BEN, 2015).	39
Figura 11: Cadeia linear polimérica da celulose até o monossacarídeo.	44
Figura 12: Mecanismo de degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático.	45
Figura 13: Fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> . Fonte: mushroom-collecting.com/mushroomoyster.html	56
Figura 14: Fluxograma do bioprocesso integrado visando à obtenção de enzimas do complexo fibrolítico, açúcares fermentescíveis, biomassa residual proteica e cogumelos comestíveis.	64
Figura 1.1: Fluxograma do bioprocesso para a obtenção das enzimas fibrolíticas.	70
Figura 1.2: Atividades de Celulases Totais (FPase – FPU/mL) para o 7 e 10 ^o de cultivo. Ver Tabela 1.1 com composição dos meios.	89
Figura 1.3: Atividades de Endoglucanase (CMCase – U/mL) para o 7 e 10 ^o de cultivo.	90
Figura 1.4: Diferentes enzimas produzidas (Celulases Totais, Endoglucanase e Proteases) para os meios estudados, em 10 dias de cultivo.	90
Figura 1.5: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Celulases Totais (FPU/mL).	94
Figura 1.6: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Endoglucanase (U/mL).	97
Figura 1.7: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Exoglucanase (U/mL).....	99

Figura 1.8: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Xilanases (U/mL).	101
Figura 1.9: Superfície de resposta para atividade de Celulases Totais (FPU/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	110
Figura 1.10: Superfície de resposta para atividade de Endoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	111
Figura 1.11: Superfície de resposta para atividade de Exoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	113
Figura 1.12: Superfície de resposta para atividade de Xilanases (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	114
Figura 1.13: Superfície de resposta para atividade de Celulases Totais (FPU/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	116
Figura 1.14: Superfície de resposta para atividade de Endoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	118
Figura 1.15: Superfície de resposta para atividade de Exoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	119
Figura 1.16: Superfície de resposta para atividade de Xilanases (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.	120
Figura 1.17: Produção de enzimas fibrolíticas – Celulases Totais (FPU/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v ⁻¹) sacarose, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.	125
Figura 1.18: Produção de enzimas fibrolíticas – Endoglucanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v ⁻¹) sacarose, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.	125
Figura 1.19: Produção de enzimas fibrolíticas – Exoglucanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v ⁻¹) sacarose, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5	126
Figura 1.20: Produção de enzimas fibrolíticas – Xilanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v ⁻¹) sacarose, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5	126
Figura 1.21: Produção de enzimas fibrolíticas – Celulases Totais (FPU/mL) – para o substrato T1+Sac, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5	129
Figura 1.22: Produção de enzimas fibrolíticas – Endoglucanase (U/mL) – para o substrato T1+Sac, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5	129
Figura 1.23: Produção de enzimas fibrolíticas – Exoglucanase (U/mL) – para o substrato T1+Sac, cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5	130

Figura 1.24: Produção de enzimas fibrolíticas – Xilanase (U/mL) – para o substrato <i>T1+Sac</i> , cultivado com <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.	130
Figura 1.25: Efeito da temperatura na atividade enzimática para o complexo fibrolítico produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L e substratos: <i>BLara+Sac</i> e <i>T1+Sac</i>	134
Figura 1.26: Atividade enzimática em função do pH de reação medido por Celulases Totais (FPU/mL) no complexo fibrolítico produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L e substratos: <i>BLara+Sac</i> e <i>T1+Sac</i>	135
Figura 1.27: Estabilidade enzimática a 50 °C e pH 5,6 medida pela técnica de Celulases Totais (FPU/mL) a partir do complexo enzimático fibrolítico produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L e substratos: <i>BLara+Sac</i> e <i>T1+Sac</i>	137
Figura 1.28: Estabilidade enzimática avaliado em diferentes tempos e temperaturas – Celulases Totais (FPU/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato <i>T1+Sac</i>	140
Figura 1.29: Estabilidade enzimática avaliado em diferentes tempos e temperaturas – Endoglucanase (U/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato <i>T1+Sac</i>	140
Figura 1.30: Estabilidade enzimática avaliado em diferentes tempos e temperaturas – Exoglucanase (U/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato <i>T1+Sac</i>	141
Figura 1.31: Estabilidade enzimática avaliado em diferentes tempos e temperaturas – Xilanasas (U/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo <i>T. reesei</i> QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato <i>T1+Sac</i>	141
Figura 2.2: Análise de superfície de resposta da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado por álcali: Liberação açúcares redutores (AR) em função: a) do tempo e NaOH; b) temperatura e NaOH; c) temperatura e tempo.	162
Figura 2.3: Análise do cultivo de <i>T. reesei</i> QM 9414 para produção enzimática usando-se bagaço pré-tratado por hidrólise alcalina, em função: a) tempo e NaOH; b) temperatura e NaOH; c) temperatura e tempo.	165
Figura 2.4: Liberação de AR por ação enzimática para cada amostra de CPD obtidas e o bagaço de cana <i>in natura</i>	168
Figura 2.5: Relação da hidrólise enzimática por liberação de açúcares redutores (AR) em 1 h de reação em função dos substratos pré-tratados com suas diferentes constituições químicas (celulose, hemicelulose e lignina) e bagaço de cana <i>in natura</i>	169
Figura 2.6: Produção de enzimas fibrolíticas pelos diferentes CPDs e bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	173
Figura 2.7: Porcentagem de mg de AR liberado (até 72 h) para os diferentes tipos de complexos fibrolíticos avaliados e bagaço <i>in natura</i>	176
Figura 2.8: Porcentagem de mg de AR liberado (até 72 h) para os diferentes tipos de complexos fibrolíticos avaliados e bagaço pré-tratado.	177

Figura 3.1: Fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> . Fonte: mushroomobserver.org	184
Figura 3.2: Fluxograma do processo biotecnológico.....	186
Figura 3.3: Inóculo terciário (matriz terciário) pronto, composta por grão de trigo, carbonato de cálcio e sulfato de cálcio.	189
Figura 3.4: Exemplo de uma placa dividida em quadrantes para a quantificação do crescimento micelial.....	191
Figura 3.5: Preparo do cultivo axênico: a) Bloco de biomassa para o crescimento do fungo <i>P. ostreatus</i> e o respirador feito por algodão e gases; b) Orifício formado pelo tubo cilíndrico, no qual foi utilizado posteriormente para a inoculação das sementes – matriz terciária (item 2.2.3).	192
Figura 3.6: Crescimento micelial do fungo <i>P. ostreatus</i> para o tratamento T1: a) 20 °C, 5 dias e umidade de 40% (v.m ⁻¹); b) 20 °C, 5 dias e umidade de 80% (v.m ⁻¹).	200
Figura 3.7: Crescimento micelial do fungo <i>P. ostreatus</i> para o tratamento T1, 5 dias de cultivo e 20 °C nas diferentes umidades.	200
Figura 3.8: Densidade micelial do <i>P. ostreatus</i> entre os 15 dias de cultivo para o tratamento T1 e 80%: a) 5 dias; b) 15 dias.....	201
Figura 3.9: Crescimento micelial (cm) em relação à temperatura, para os teores de umidade de 40 e 80% (v.m ⁻¹) de umidade e em 5 dias.....	201
Figura 3.10: Bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado (Capítulo 2) no crescimento micelial em teste em placas do <i>P. ostreatus</i> : a) Tratamentos sem suplementação de sacarose – T1 e T10; b) Tratamentos com suplementação de sacarose – T2 e T11; dados para os 15 dias de cultivo e 80% (v.m ⁻¹) de umidade.....	203
Figura 3.11: Cultivo axênico do T1 em 80% (v.m ⁻¹) de umidade inicial e 20 °C: a) Bloco de biomassa após a inoculação com 10% (m.m ⁻¹) com a matriz terciária – dia 1; b) Bloco de biomassa após a total colonização do micélio – 30 dias de cultivo e fim do cultivo axênico e início do processo de frutificação.....	207
Figura 3.12: Blocos com crescimento micelial após 15 dias de cultivo axênico.....	207
Figura 3.13: Blocos com crescimento micelial após 20 dias de cultivo axênico.....	208
Figura 3.14: Blocos com crescimento micelial após 30 dias de cultivo axênico.....	208
Figura 3.15: Processo de frutificação e formação dos cogumelos: a, b, c) Primeiro dia de frutificação; d, e, f) Segundo dia de frutificação; g, h, i) Terceiro dia de frutificação.	210
Figura 3.16: Processo de frutificação e formação dos cogumelos: a, b, c) Quarto dia de frutificação; d, e, f, g) Quinto dia de frutificação e momento de coleta dos cogumelos.	211
Figura 3.17: Cogumelos de <i>P. ostreatus</i> produzidos e coletados.	212

Resumo

Atualmente os resíduos lignocelulósicos, principalmente os agroindustriais estão sendo visados para a utilização em processos biotecnológicos. Os resíduos, se convenientemente hidrolisados, transformam-se em carboidratos que podem ser usados para diversos fins, tais como: produção de biomassa microbiana, açúcares fermentescíveis, bioenergia e compostos de alto valor agregado tais como enzimas. As enzimas do complexo fibrolítico estão entre as enzimas mais promissoras para a bioconversão e aproveitamento destes resíduos. O objetivo do presente trabalho foi utilizar um bioprocesso integrado utilizando-se diferentes resíduos, bioprocessos e micro-organismos, que combinados pudessem viabilizar a produção dos compostos mencionados. Dentre os resíduos foram estudados o bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja (polpa cítrica), torta de algodão, farelo de soja e outros com e sem pré-tratamento. Dentre os pré-tratamentos utilizados estão pré-tratamentos térmicos com ácido ou base. Também foram avaliados pré-tratamentos biológicos dos resíduos pelo cultivo de fungos filamentosos e unicelulares para produção enzimática. Tais substratos foram cultivados por fungos filamentosos com destaque para o *Trichoderma reesei* para a produção de enzimas fibrolíticas. Desta forma procurou-se integrar estes processos visando à produção de açúcares fermentescíveis. Como produtos secundários foram obtidos biomassa proteica (cogumelos comestíveis) e resíduo proteico que podem ser estudados para a alimentação animal. Para tanto, o trabalho foi dividido em 3 capítulos que foram executados simultaneamente.

Palavras chave: Resíduos lignocelulósicos; enzimas do complexo fibrolítico; *Trichoderma reesei*; pré-tratamento; sacarificação; *Pleurotus ostreatus*.

Abstract

Currently the lignocellulosic residues, particularly the agroindustrial wastes are being targeted for use in biotechnological processes. If the waste is conveniently hydrolysed their carbohydrates can be used for various purposes such as production of microbial biomass, fermentable sugars, bioenergy and high-value compounds such as enzymes. The enzymes of fibrolytic complex are among the most promising enzymes for bioconversion of these wastes. The aim of this study was to use an integrated bioprocess using different waste, bioprocesses and micro-organisms that they combined could be enable the production of these compounds. Among the wastes were studied the sugarcane bagasse, orange peel (citrus pulp), cottonseed meal, soybean meal and others with and without pre-treatment. Among the used pre-treatments are thermal pretreatments with acid or base. Biological pre-treatments of these wastes also were evaluated by the cultivation of unicellular and filamentous fungi for obtaining pretreated residues. Such substrates were cultured by other fungus such as *Trichoderma reesei* for fibrolytic enzyme production. In this way the integration of these processes was performed for the production of fermentable sugars. As by-products were obtained protein biomass (edible mushrooms) and protein residue that can be studied for animal feed. Therefore, the work was divided into three chapters, which were done simultaneously.

Keywords: Lignocellulosic residues; enzymes of the fibrolytic complex; *Trichoderma reesei*; pretreatment; saccharification; *Pleurotus ostreatus*.

1. Introdução

O desenvolvimento econômico brasileiro está associado ao processo de independência entre os ramos industriais e os diferentes setores produtivos, como a agricultura e o agronegócio. Sendo que esta mesma abordagem econômica desempenha papel importante no país (CARDOSO et al., 2015). Entretanto, a obtenção desses produtos agrícolas gera grande quantidade de resíduos agroindustriais lignocelulósicos (FILHO & FRANCO, 2015), que apesar de serem considerados sérios problemas ambientais, podem servir como ricas fontes de carboidratos fermentescíveis (CASTRO & PEREIRA, 2010). O conveniente aproveitamento desses resíduos resultaria em maiores ganhos econômicos, uma grande diminuição do impacto ambiental e a possibilidade da produção de novos produtos de interesse para a sociedade. Tendo como base esse conceito, somente com novas inovações tecnológicas envolvendo questões da produtividade e somando as relações do homem com a terra, será possível o desenvolvimento de um agronegócio sustentável (CARDOSO et al., 2015).

Os resíduos agroindustriais são amplamente produzidos e destacam-se em quantidades significativas: casca de cereais, palha e farelo de arroz, palha e farelo de trigo, de soja, bagaço de cana-de-açúcar, folha de mandioca, bagaço de laranja, resíduos de algodão, palha de bananeira, dentre outros (FILHO & FRANCO, 2015). Estes resíduos podem servir como substratos para o cultivo de fungos lignocelulolíticos e produção de suas enzimas (CASTRO & PEREIRA, 2010; SHARMAA & ARORAB, 2015).

Os resíduos agroindustriais lignocelulósicos são estruturas duras e fibrosas, constituindo-se de três frações fundamentais: celulose, hemicelulose, lignina (SUN & CHENG, 2002). A maioria destes materiais é parcialmente ou não aproveitada, podendo ser transformadas em poluentes do meio ambiente (SCHUCHARDT, et al, 2001; FILHO & FRANCO, 2015). Dentre as várias possibilidades de aplicação desses resíduos estão: a produção de biomassa microbiana para alimentação humana e animal, açúcares fermentescíveis e especiais, bioenergia e enzimas (AGBHEVOR, 2004; SHARMAA & ARORAB, 2015).

Para uma utilização eficiente destas biomassas são necessários tratamentos prévios, ou pré-tratamentos, os quais vêm sendo estudados para separação dos componentes destas biomassas (GUERRIERO, et al., 2016; SAINI, et al., 2015). O pré-tratamento pode ser feito por métodos físico-químicos utilizando-se ácidos (hidrólise ácida) ou álcali (hidrólise alcalina), com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose. Em uma etapa posterior ao pré-tratamento para a utilização dessas biomassas é o uso de enzimas (hidrólise enzimática) (LEE, et al., 2015), produzidas por micro-organismos que se alimentam desta matéria orgânica, sendo o fungo *Trichoderma reesei* um dos mais utilizados entre os micro-organismos pelas indústrias na produção das enzimas (BISCHOF et al., 2016). Pois esses fungos são conhecidos pela liberação do complexo enzimático fibrolítico podendo degradar as biomassas em condições suaves sem gerar subprodutos tóxicos e, conseqüentemente, facilita e possibilita a sua utilização pela indústria biotecnológica (GUPTA, et al., 2016).

Outro grupo de fungo importante na hidrólise da biomassa lignocelulósica são os basidiomicetos que podem utilizar diversos resíduos agroindústrias e além da produção de enzimas podem ser empregados como suplementação de fontes de C/N (Carbono/Nitrogênio). Os fungos do grupo dos basidiomicetos vêm crescendo de importância há muito tempo devido à possibilidade de reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agroindustriais (DAOU et al., 2016).

No atual contexto mundial há uma necessidade da aquisição de recursos práticos e viáveis, economicamente, para a obtenção de fontes de energias renováveis e alimentos, e para o reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos. Desta forma, este trabalho tem como finalidade o desenvolvimento de um bioprocesso integrado visando à obtenção de açúcares fermentescíveis, produção de enzimas do complexo fibrolítico, assim como cogumelos comestíveis, e uma possível aplicação de biomassa residual proteica para ração animal, utilizando-se como substratos, diferentes resíduos agroindustriais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Resíduos agroindustriais lignocelulósicos

As indústrias brasileiras são responsáveis por gerar toneladas de resíduos compostos de cascas, sementes, caroços e polpa dependendo do tipo de fruta a ser processada. Entretanto, a obtenção desses produtos agrícolas gera grande quantidade de resíduos agroindustriais lignocelulósicos (CARDOSO et al., 2015; FILHO & FRANCO, 2015), este termo é utilizado para representar materiais resultantes de um processamento industrial, no qual o principal produto é outro. Assim sendo, no contexto social e econômico encontra-se a necessidade de uma bioconversão destes resíduos em produtos com alto valor agregados, como os açúcares fermentescíveis e biomassa proteica para ração animal, através de processos biotecnológicos que irão permitir sua utilização pela sociedade de uma forma mais direta, assim como a diminuição de perdas econômicas e do impacto da atividade industrial ao meio ambiente.

Diversos países, tal como o Brasil, que têm sua economia baseada nas atividades agrícolas, desperdiçam grande parte de sua produção sob a forma de resíduos com alto índice de matéria orgânica. O uso destes resíduos representa a otimização da produção agrícola, reduzindo o desperdício, canalizando-os de volta para o processo produtivo e aumentando seu valor agregado. Assim, além de propiciar a redução do seu volume, elimina um possível impacto ambiental por seu acúmulo (FILHO & FRANCO, 2015).

O agronegócio brasileiro possui expressiva participação na economia do País. Somado a isso o PIB do agronegócio brasileiro já acumulou no primeiro bimestre de 2016 uma alta 1,09%. Entre os ramos, o destaque ficou com o setor agrícola, que cresceu 1,62% (CEPEA, 2016). No ramo agrícola, o movimento foi de alta para todos os segmentos, tanto no mês quanto no acumulado do ano. No bimestre, o segmento primário destacou-se com alta de 2,1%. Para os demais segmentos, as elevações acumuladas foram de 1,09% para insumos, 1,45% para indústria e de 1,63% para serviços. O segmento primário do agronegócio iniciou o ano em alta, acumulando elevação de 1,13% no primeiro bimestre do ano de 2016. Entre os ramos, o destaque ficou com a agricultura que, com preços e produção em alta, cresceu 2,1% na comparação

entre janeiro e fevereiro de 2016 com o mesmo período de 2015. Em adição, espera-se crescimento no faturamento anual de inúmeros insumos agrícolas: algodão (26,26%), banana (12,48%), cacau (21,5%), café (10,86%), cana (7,12%), feijão (7,29%), laranja (13,03%), mandioca (11,59%), milho (36,63%), soja (16,88%), tomate (25,92%) e trigo (17,01%) (CEPEA, 2016). Desta forma, e com a elevação na produção desses produtos agrícolas, existirá já no ano de 2016 um elevado processamento dessas matérias primas e, por consequência, serão geradas toneladas de resíduos agroindustriais. Estes resíduos lignocelulósicos possuem um valor comercial insignificante e pouco valor nutricional em sua forma original. E quando são dispostos imprudentemente no meio ambiente, perto de depósitos, podem causar incêndios, poluição ambiental e problemas de saúde (CARDOSO et al., 2015; SCHUCHARDT, et al, 2001).

Os componentes principais dos materiais lignocelulósicos são a celulose, hemicelulose e lignina. As paredes das células vegetais são compostas por diferentes camadas, que diferem uma da outra em respeito à estrutura e a composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto que é formado por substâncias estruturais (hemicelulose) e envoltórias (lignina). Essas substâncias estão fortemente associadas e ligadas covalentemente. Em que as moléculas de hemicelulose estão quase paralelas às fibrilas de celulose, enquanto a lignina apresenta-se em uma forma aleatória, conferindo maior estabilidade à parede celular (CASTRO & PEREIRA, 2010; FENGEL & WEGENER, 1989; SUN, 2002).

A bioconversão de materiais lignocelulósicos vem recebendo considerável interesse, pois esses materiais representam vasta fonte de material bruto, que podem ser empregados na biotecnologia e no desenvolvimento de bioprocessos que resultam em produtos de alto valor agregado, entre os quais açúcares fermentescíveis, bioetanol de segunda geração, alimentos, fármacos, enzimas e substâncias de interesse industrial (CARDOSO et al., 2015; FILHO & FRANCO, 2015).

A biodegradação dos materiais lignocelulósicos por micro-organismos é atribuída à ação de uma série de enzimas extracelulares, muitas das quais, através do desenvolvimento dos processos biotecnológicos, têm sido

produzidas comercialmente e assumindo importante papel na indústria, seja no bioprocessamento de material vegetal, convertendo a biomassa em produtos de alto valor comercial, ou ainda em aplicação na indústria de alimentos, de bioenergia, papelaria ou farmacêutica (FILHO & FRANCO, 2015; GUERRIERO et al., 2016).

2.2. Biomassa lignocelulósica

A biomassa é um material constituído por substâncias de origem orgânica e tem procedência de maneira indireta do sol, podendo ser considerada uma fonte de energia renovável. A formação da biomassa a partir da fotossíntese tem como fonte energética a energia solar. Assim, ocorre a transformação do dióxido de carbono e produtos orgânicos e com alto conteúdo energético (GUERRIERO et al., 2016). Esses compostos orgânicos constituem o material mais abundante em nosso planeta, o que torna a sua utilização para obtenção de produtos de alto valor agregado; como por exemplo, o bioetanol de segunda geração ou produtos alimentícios; altamente atrativa para a sociedade de forma geral.

A composição química da biomassa lignocelulósica em geral apresenta em média 40-50% de celulose, 18-27% de hemicelulose e 18-27% de lignina, além de outros componentes. Estes constituintes possuem características químicas e percentuais dependendo da espécie e condições de crescimento (FENGEL & WEGENER, 1989). Assim, a composição média e variação em função do tipo de material podem variar para cada biomassa, conforme se observa na Tabela 1. Sendo que a Figura 1 apresenta um modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico.

Com base na figura esquemática do modelo da estrutura molecular observa-se que os componentes são organizados para que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da fibra, enquanto que a lignina circundante os componentes e age como uma barreira física para o ataque de micro-organismos e água. A hemicelulose, por sua vez, proporciona a ligação entre a

celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa (BIDLACK et al., 1992). Ou seja, as moléculas de hemicelulose estão quase paralelas às fibrilas de celulose, enquanto a lignina apresenta-se em uma forma aleatória, conferindo maior estabilidade à parede celular (CASTRO & PEREIRA, 2010; GUTPA et al., 2016; SINGHA et al., 2015).

Tabela 1: Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	46,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9

Fonte: TAMANINI & HAULY (2004); MUSSATO & ROBERTO (2002); GUERRIERO

et al., (2016).

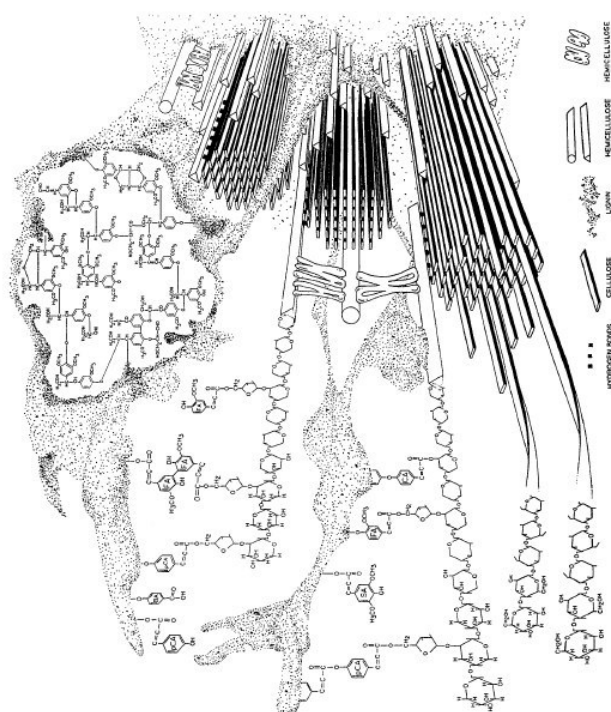


Figura 1: Modelo da estrutura molecular dos constituintes do material lignocelulósico (BIDLACK et al., 1992).

Desta forma, essa biomassa está fortemente associada e ligada covalentemente. Sendo essa ligação e interação entre das microfibras o maior obstáculo para a hidrólise da celulose e essa grande compactação atua como uma barreira física contra o ataque enzimático (FENGEL & WEGENER, 1989; SUN, 2002; SINGHA et al., 2015).

2.3. Principais constituintes dos resíduos agroindustriais

2.4. Celulose

A celulose corresponde por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, é a fonte mais abundante deste elemento base dos componentes orgânicos (ZHANG, 2006). Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99% (O'SULLIVAN, 1997). Sendo, por esse motivo, uma matéria-prima altamente renovável.

Este polímero natural é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose (Figura 2) que é formada por anéis de β -D-glicopirranose unidas por ligações do tipo β -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, proporcionando assim um crescimento linear da cadeia macromolecular levando a uma elevada massa molecular, considerável grau de cristalinidade, insolubilidade em água e estrutura rígida (SAINI et al., 2016).

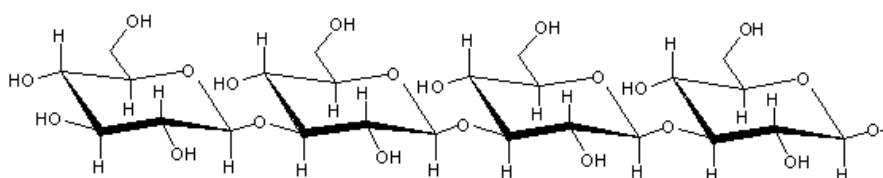


Figura 2: Cadeia linear polimérica da celulose.

O comprimento da cadeia varia entre 100 a 14000 resíduos conforme a origem da celulose. Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose (Figura 3) (DASHTBAN et al., 2010).

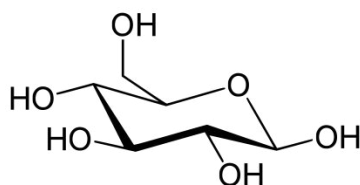


Figura 3: D-Glicose, monossacarídeo resultante após a ação das enzimas celulolíticas sobre a celulose.

A cada quebra da ligação β -D (1,4) glicosídica há a formação de uma cadeia redutora e outra não redutora. Apesar das duas extremidades da cadeia serem grupos hidroxílicos, o grupo C_1 -OH terminal da cadeia redutora é um grupo aldeído hidratado, derivado da formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal (Figura 4). Este grupo tem poder redutor, ao contrário do grupo alcoólico C_4 -OH terminal (grupo não redutor).

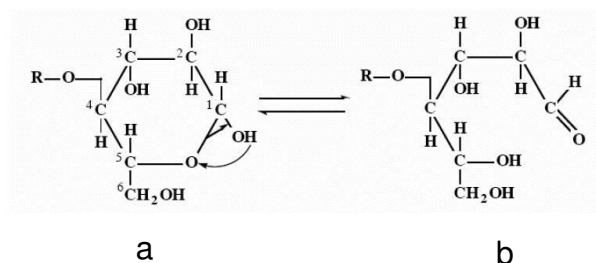


Figura 4: Representação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal: a) aldeído; b) grupo terminal redutor.

Entretanto, apesar da celulose ser formada apenas por um único tipo de carboidrato com uma simples ligação covalente, a biomassa celulósica possui uma complexa gama de formas físicas. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (BEGUIN & AUBERT, 1994). Sendo assim, as estruturas da forma da celulose podem ser definidas pela sequência de ligações covalentes – homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1,4); pela conformação molecular e organização espacial das unidades repetitivas – sendo caracterizado pelas distâncias das ligações, pelos seus ângulos e ligações de hidrogênio intramoleculares; e a associação das moléculas para

formarem estruturas cristalinas (ATALLA et al., 1993). As moléculas de celulose tendem a formar ligações hidrogênio intramoleculares – entre unidades de glicose da mesma molécula, e intermoleculares – entre unidades de glicose de moléculas adjacentes. Sendo que o primeiro tipo de interação é responsável por certa rigidez das cadeias unitárias e o segundo pela formação da fibra vegetal (FENGEL & WEGENER, 1989). Devido às suas fortes ligações de hidrogênio e o tamanho que esses polissacarídeos podem atingir, a celulose é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (HON, 1995).

2.5. Hemicelulose

A hemicelulose representa um grande recurso que pode ser utilizado para produzir açúcares fermentáveis e combustíveis (CARVALHO et al., 2013). Sendo que ela corresponde aproximadamente 20-35% do peso seco total de folhosas e plantas herbáceas e representam um grande recurso que pode ser utilizado para a produção de açúcares fermentáveis e combustíveis (TECHAPUN et al., 2003; CARVALHO et al., 2013).

A hemicelulose é associada à celulose na parede da célula vegetal e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas (FENGEL & WEGENER, 1989). As estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses são mostradas na Figura 5. Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de vegetais (CARVALHO et al., 2013).

Entretanto, as Hemiceluloses são geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucana. A xilana é o principal polissacarídeo encontrado nessa fibra, sendo formado principalmente pela xilose – monossacarídeo, e por heteropolímeros como, por exemplo, a glico-manana formada por glicose e manose (CARVALHO et al., 2013).

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina, e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando a estabilidade e flexibilidade ao agregado (YAOA et al., 2015). Elas estabilizam a parede celular através de interações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina (FENGEL & WEGENER, 1989). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam baixo grau de polimerização (50 a 300), não formam arranjo fibroso e apresentam somente regiões amorfas possibilitando maior acesso e suscetibilidade à hidrólise ácida (YAOA et al., 2015). Sendo que a maior parte das hemiceluloses pode ser extraída por tratamento com soluções aquosas e alcalinas, nos quais são empregados, principalmente, o hidróxido de sódio ou potássio (FENGEL & WEGENER, 1989; YAOA et al., 2015).

As hemiceluloses se encontram no bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 25-27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (CARVALHO et al., 2013; YAOA et al., 2015).

A elongação e modificação da parede das células vegetais são por consequência da presença das hemiceluloses, devido às interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose (FENGEL & WEGENER, 1989). Geralmente as hemiceluloses estão quimicamente associadas ou reticuladas a outros polímeros, como as proteínas ou ligninas (KÄRCHERA et al., 2016).

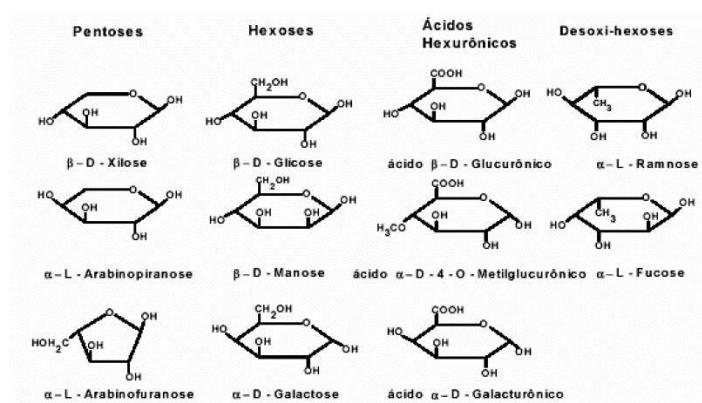


Figura 5: Monossacarídeos encontrados na hemicelulose (FENGEL & WEGNER, 1989).

2.6. Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos (FENGEL & WEGENER, 1989; KÄRCHERA et al., 2016). É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa, como esquematizado na Figura 6. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico.

A estrutura da lignina é heterogênea e pouco conhecida, consistindo numa rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aril-éter (ligação β -O-4) (Figura 7) formando uma estrutura amorfa e pouco flexível (KÄRCHERA et al., 2016).

O mecanismo de biossíntese da lignina se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, sendo esses álcoois esquematizados na Figura 8, estes geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (FENGEL & WEGENER, 1989). Assim, o acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo da biossíntese da lignina.

A lignina sendo um material hidrofóbico e amorfo atua como um cimento entre as fibrilas e como um agente que torna as ligações internas mais rígidas (KÄRCHERA et al., 2016). A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose. (SAINI, et al., 2016). Esta fibra é bastante resistente à hidrólise ácida, porém quando tratada com soluções alcalinas a temperaturas elevadas podem ocorrer rupturas nas ligações éter entre as unidades de fenil propano, formando grupos fenólicos responsáveis por sua solubilização (MOSIER et al, 2003b; SAINI, et al., 2016).

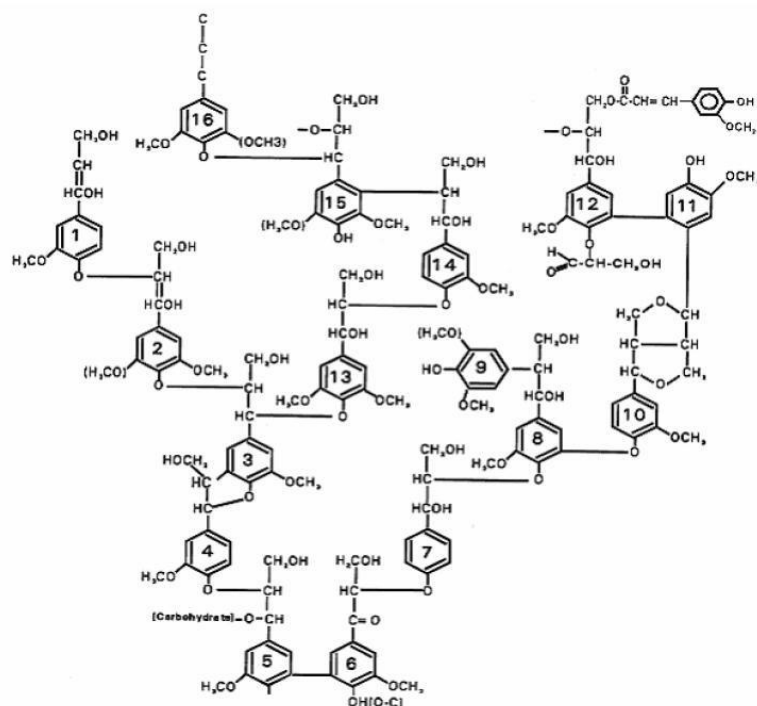


Figura 6: Estrutura química da lignina (FENGEL & WEGENER, 1989).

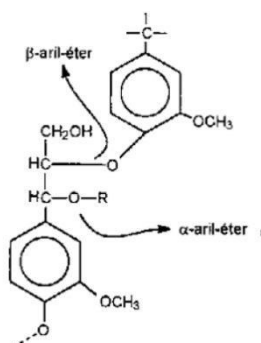


Figura 7: Ligação α - e β -aril éter da macromolécula de lignina.

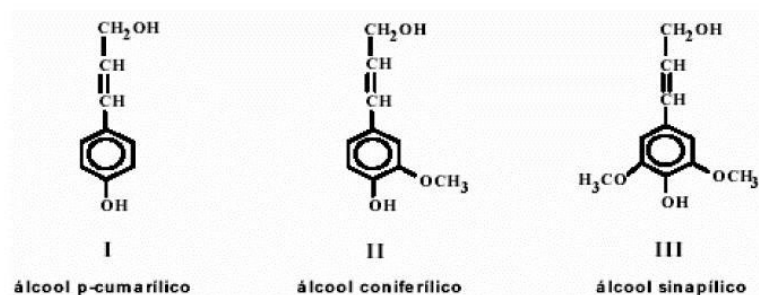


Figura 8: Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).

2.7. Outros constituintes da biomassa lignocelulósica (orgânicos e inorgânicos)

Os constituintes menores dos materiais lignocelulósicos incluem compostos orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos pertencem a diferentes classes de compostos como ácidos graxos, ésteres, alcoóis, esteróides, hidrocarbonetos de elevada massa molecular e outros (GUERRIERO et al., 2016).

Os compostos inorgânicos, chamados de cinzas, estão presentes em quantidades que variam de 1% a 10%. Estes são constituídos principalmente de sulfatos, oxalatos, carbonatos, e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, além de outros sais em quantidades menores. Possuem funções associadas com o sistema fisiológico, exercendo importante papel no metabolismo da planta. A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (FENGEL & WEGENER, 1989).

2.8. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L)

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, sendo proveniente da Nova-Guiné e foi levada para o sul da Ásia, onde foi amplamente usada na forma de xarope, sendo que a primeira evidência da utilização do açúcar sólido foi no ano 500, na Pérsia (ÚNICA, 2012). A planta, geralmente, é tolerante a altas temperaturas, produzindo em regiões com temperatura média de verão de 37 °C, desde que empregada à irrigação. Atualmente, esta matéria-prima é a principal para a fabricação do açúcar e bioetanol, através do seu processamento (CHUM et al., 2013). A composição química do bagaço integral é em média de 46,2% de celulose, 26,4% de hemicelulose, 25,2% lignina e 2,2 outros (Tabela 1 e Figura 9) (TAMANINI & HAULY, 2004).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, chegando em 2016 a 37.086.496 de toneladas (MAPA, 2016). As usinas sucroalcooleiras são as principais consumidoras, utilizando a cana na produção de bioetanol, que tem como resíduo lignocelulósico o bagaço. Uma grande parte desse bagaço,

aproximadamente 60 a 90%, é utilizado pelas próprias usinas, em substituição a lenha e o óleo combustível, no processo de aquecimento das caldeiras e geração de energia elétrica (BEM, 2015), com uma produção média em torno de 30 kW/h/tonelada de cana moída (BEM, 2015). A cogeração de energia através do bagaço nas indústrias sucroalcooleiras traz uma economia na produção do bioetanol, que por sua vez, aumenta a competitividade do álcool carburante nacionalmente e internacionalmente. Entretanto, o excedente, que pode gerar problemas ambientais e de estocagem (CARDOSO et al., 2015). Neste contexto, a possível utilização desta biomassa se tornou vital para a economia do Brasil. Há um excedente em bagaço de cana-de-açúcar que pode ser utilizado para produção de produtos de interesse como açúcares fermentescíveis e biocombustíveis (bioetanol de segunda geração), e assim ajudar de forma limpa e economicamente favorável, a substituir a demanda energética da sociedade que atualmente é suprida pelos combustíveis fósseis.

Esse material lignocelulósico também pode ser empregado na sua bioconversão em biomassa microbiana, tanto para alimentação animal como humana, através do cultivo de micro-organismos capazes de biodegradá-lo e convertê-lo em nutrientes e proteínas.

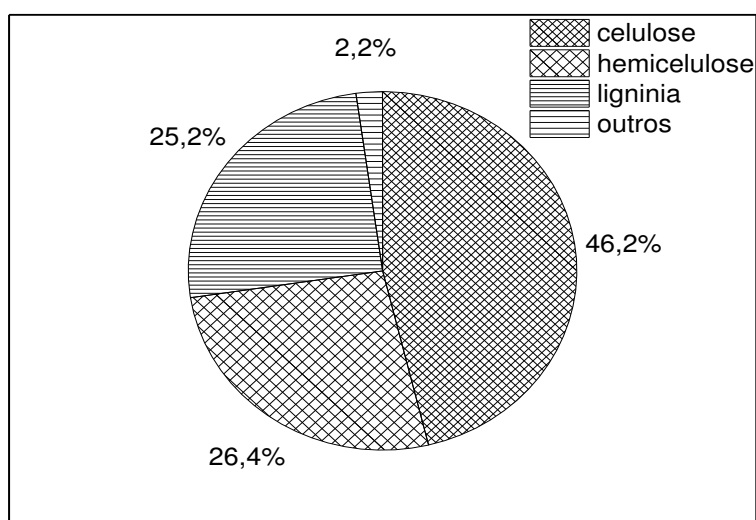


Figura 9: Composição média do bagaço de cana-de-açúcar.

2.9. Bagaço de laranja

A indústria de suco de laranja produz como subproduto o bagaço da laranja, que corresponde a 42% do total da fruta. A polpa cítrica é um subproduto da fabricação de suco concentrado pela indústria citrícola, sendo constituída por cascas, sementes, bagaço e frutas descartadas (MENEGETTI & DOMINGUES, 2008). A sua obtenção é feita após duas prensagens, que reduzem a umidade a 65-75%, com posterior secagem a cerca de 100-116°C, até que se obtenha 88-90% de massa seca. Esta biomassa lignocelulósica é essencialmente energética, tendo 23% de proteína bruta e somente 3% de lignina (ÍTALO, et al., 2000). Sendo que essa biomassa também é rica em pectina, celulose e hemicelulose, tendo aproximadamente 26% de pectina, 22% de celulose e 29% de hemicelulose (ISMAIL, 1996).

O bagaço de laranja é uma das biomassas lignocelulósicas de baixo custo e elevados níveis de carboidratos que viabiliza a sua utilização em processos biotecnológicos, como a produção do bioetanol de segunda geração (TAJ AWAN, 2013). O processamento do fruto através da extração e concentração é largamente exportado pelo Brasil principalmente para EUA, Europa e Ásia, gerando o resíduo denominado polpa cítrica (TAJ AWAN, 2013).

Desta maneira, esse resíduo agroindustrial mostra-se propício para sua bioconversão em outros produtos, podendo ser utilizado para produção de açúcares fermentescíveis, enzimas, e proteína de microorganismos.

Outras biomassas como fonte lignocelulolítica

A torta de algodão, obtida após a extração do óleo, pode ser usada como fertilizante na indústria de corantes, na alimentação animal e na elaboração de rações animais, devido ao seu alto valor proteico e como fonte de biomassa lignocelulósica. Esse resíduo é remanescente em forma sólida da extração do óleo do caroço do algodão. Ela é composta de 7-8% no máximo de teor de óleo, de 36-39% de teor de proteína e menos de 3% de sílica (ARAÚJO et. al, 2003).

O capim napier (*Pennisetum purpureum*) foi selecionado neste trabalho devido à sua rusticidade, por ele ser considerado uma importante forrageira tropical, e especialmente devido ao seu elevado potencial de produção de biomassa lignocelulósica e de fácil adaptação ao diversos ecossistemas (VILELA, 1990). O capim napier é composto de 41,2% de carbono, 5,6% de hidrogênio, 1,8% de nitrogênio, 51,4% de oxigênio, 10,8% de umidade, 8,4% de carbono fixo, 82,6% de matéria volátil e 10,9% de cinzas (VILELA, 2009).

O farelo de trigo é um subproduto do processamento dos grãos de trigo objetivando a produção de farinha e consumo humano. Sua biomassa contém diferentes proporções de endosperma, fibra e germe de trigo, em combinação com amido e frações proteicas solúveis, e concentrações de fibras lignocelulósicas (JACQUEMIN et al., 2015). Essa biomassa apresenta aproximadamente 17% de proteína bruta, 4,2-4,3% de lignina, 6,5% de açúcares e 31,3% de amido e 89,3% de matéria seca (HINDERS, 2000).

2.10. Biomassa: Fonte de bioenergia (energias renováveis)

A possibilidade de utilização dos combustíveis renováveis tem despertado um interesse cada vez maior em todo o mundo (GUERRIERO et al., 2016). Este fato acontece, devido a impactos positivos do uso destas energias renováveis, em substituição aos fósseis, que não se limitam apenas nas questões econômicas, mas também nas ambientais, sendo assim uma alternativa limpa sem prejuízos econômicos (GUERRIERO, et al., 2016). Em 2014, o total de emissões associadas à matriz energética brasileira atingiu 485,2 milhões de toneladas de dióxido de carbono equivalente, principalmente pelo setor de transportes (BEM, 2015).

O apelo ambiental constitui um dos principais agentes para a substituição dos derivados de petróleo pelos chamados: biocombustíveis. Em princípio, os combustíveis fósseis, como o gás natural e o carvão mineral, podem e são utilizados como uma fonte energética alternativa (MME, 2015). Em 2014, a oferta interna de energia (total de energia demandada no país) atingiu 305,6 Mtep, registrando uma taxa de crescimento de 3,1% ante à evolução do PIB nacional de 0,1%, segundo o último dado divulgado pelo IBGE. Sendo que o gás natural, petróleo e derivados responderam por 80%

deste incremento (BEM, 2015). Entretanto, a utilização dessas fontes alternativas não resolve o principal problema relacionado ao uso do petróleo, que é o impacto ambiental pela eliminação de dióxido de carbono (CO₂) e gases sulfurados durante sua queima. Desta forma, com a elevação do consumo e improváveis substitutos do petróleo, as bioenergias, tais como bioetanol e o biodiesel, tornam-se alternativas economicamente e ecologicamente atraentes e viáveis para o setor energético, como formas de energias mais limpas, apresentando um menor impacto ambiental (GUPTA et al., 2015; GUERRIERO et al., 2016).

Denomina-se biomassa qualquer matéria de origem vegetal que dispõe de bioenergia e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. As principais fontes de biomassa provêm dos resíduos agrícolas, como restos de madeira, resíduos de serralherias e plantas, como a cana-de-açúcar e palha de cereais (FILHO & FRANCO, 2015). Para tanto, existe a necessidade de novas pesquisas e tecnologia para a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da indústria de celulose, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais (FILHO & FRANCO, 2015) para a produção de bioetanol de segunda geração (SAINI et al., 2015). Portanto, materiais lignocelulósicos se tornam interessantes para a produção de energias renováveis, reduzindo assim a poluição (FILHO & FRANCO, 2015).

Em 2014, a participação de renováveis na Matriz Energética Brasileira manteve-se entre as mais elevadas do mundo (BEN, 2015). O consumo final de energia no Brasil em 2014 foi de 10% do bagaço de cana, 5% do etanol, 6% da lenha, 7% de gás natural e 17% de eletricidade de fonte hídrica. Segundo dados do Balanço Energético Nacional (edição 2015), a participação da energia renovável na matriz energética brasileira foi de 54% (Figura 10).

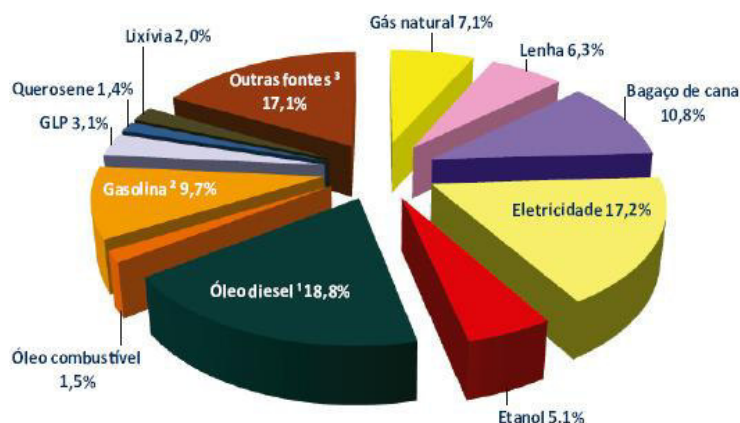


Figura 10: Oferta interna de Energia para o Brasil. (Fonte: BEN, 2015).

Os componentes da biomassa precisam ser separados antes da sua transformação em substâncias químicas para geração de produtos de altos valores agregados. Neste contexto, o conceito de “biorrefinaria” tem por base a separação seletiva de frações constituintes de uma dada matéria prima, a biomassa, de acordo com suas características químicas e dos produtos a serem obtidos (LASER et al., 2002; GARROTE et al., 2002), em que as frações devem ser separadas seletivamente de acordo com suas características e as do produto desejado. De acordo com GIORDANO (2004) o esquema geral de uma biorrefinaria ilustrada novas rotas e transformações, aplicações de novas tecnologias, o conceito 3R, que significa: *Reduzir* (R1), o impacto ambiental através de novos processos, novos catalisadores e projetos de novos equipamentos com o intuito de aperfeiçoar e aumentar a eficiência de processos “clássicos”, pois maiores conversões implicam menores volumes de rejeito; *Reutilizar* (R2), toda a forma de matéria-prima, desde as nobres até os rejeitos industriais para geração de novos produtos e energia, fazendo com que, gradativamente, a matriz energética seja acrescida de mais fontes renováveis; *Reciclar* (R3), não apenas o produto, mas também a própria biosfera, utilizando a bioremediação frente aos impactos ambientais (GIORDANO, 2004).

A demanda futura por bioenergia com alta eficiência e sustentabilidade projeta a necessidade de aumentar significativamente sua produção nos

próximos anos. Esse aumento poderá ser alcançado pela introdução de novas tecnologias no aproveitamento integral das biomassas lignocelulósicas para produção do bioetanol e outros combustíveis renováveis, ou mesmo por meio das biorrefinarias. O aproveitamento da palha de cana-de-açúcar e de outras cultivares podem contribuir significativamente para este aumento.

2.11. Pré-tratamentos

A biomassa lignocelulósica, no geral, é relativamente resistente à bioconversão e o bagaço de cana-de-açúcar não é uma exceção. A utilização da biomassa como uma fonte de carboidrato para produtos químicos e combustíveis tem sido severamente dificultada pela baixa eficiência da população microbiana celulolítica. Em adição a isso, a hidrólise enzimática da biomassa *in natura* é baixa (< 20% de rendimento), devido à característica estrutural do material lignocelulósico. Em vista disso, resíduos agrícolas requerem um pré-tratamento para aumentar a quebra da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG et al., 2016).

A cristalinidade da celulose, área de superfície acessível, proteção da celulose pela lignina, o caráter heterogêneo das partículas da biomassa, e o fato da celulose estar revestida pela hemicelulose contribuem para a resistência da biomassa lignocelulósica à hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2016). Os fatores estruturais e composicionais refletem a complexidade dos materiais lignocelulósicos. No princípio, um pré-tratamento eficaz pode causar o rompimento destas barreiras, o que permitirá que as enzimas possam causar a hidrólise e minimizar a degradação e perda do açúcar (ALVIRA et al., 2016; MOSIER et al., 1999).

O objetivo do pré-tratamento é quebrar a ligação da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose. Um pré-tratamento eficaz é caracterizado por diversos critérios: evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, assim como, limitar a formação dos produtos tóxicos liberados durante a degradação (LEE et al., 2015). Estas propriedades, junto com outras, incluindo o baixo custo do reagente de pré-tratamento, a possibilidade de ser reciclável e a geração de co-produtos da lignina de alto valor agregado são

uma base de comparação para as várias opções de pré-tratamento (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000a, b; SAINI et al., 2016). O pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, devido à solubilização e degradação parcial da hemicelulose e da lignina (SAINI et al., 2016). Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose (KÄRCHER et al., 2016).

O pré-tratamento foi visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Por isso, esta etapa apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento (MOSIER et al., 2003a, b; ALVIRA et al., 2016).

2.12. Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento álcali é visto como um agente de inchamento, sendo que a base age indiretamente e a água o agente que proporciona a quebra (KIM et al., 2016). Pelo inchaço da biomassa lignocelulósica, a superfície é aumentada proporcionando maior abertura da estrutura e facilitando a migração da água para dentro do material. Uma vez dentro da biomassa, a água rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina-carboidrato (SINGHA et al., 2015). O efeito é a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina através da quebra das ligações aril-éter.

As vantagens do uso do álcali sobre os métodos ácidos são as condições mais amenas e a remoção da fração de lignina, sem a degradação dos outros componentes importantes. (KIM et al., 2016). Os principais reagentes utilizados para pré-tratamento alcalino são hidróxido de sódio, amônia, etileno diamina (DETROY et al., 1981) e hidróxido de cálcio. A eficiência dessas bases depende da quantidade de lignina presente nos materiais (MCMILLIAN, 1994). O tratamento alcalino requer temperaturas e pressões mais baixas que outros tipos de tecnologias de pré-tratamentos. (MOSIER et al., 2005). Assim, ao comparar o pré-tratamento ácido ao processo alcalino, este último causa uma menor degradação de açúcares (LEE et al., 2015).

2.13. Hidrólise

A hidrólise é um método que permite o aproveitamento dos potenciais individuais dos três polímeros principais da biomassa, ao invés de provocar a conversão simultânea de todos eles. Assim, em condições apropriadas, a hidrólise de maneira seletiva oferece a possibilidade de conversão das hemiceluloses em monossacarídeos (principalmente xilose e manose) e da celulose em D-glicose. A lignina pode ser removida antes da hidrólise ou permanecer como resíduo da reação em função do método utilizado (KÄRCHERA et al., 2016). Sendo que a separação da lignina da biomassa aumenta a efetividade da enzima eliminando sítios de adsorção que não são produtivos e aumentando o acesso para celulose e hemicelulose (SAINI et al., 2016).

Dentro da fibra de celulose, a porção amorfa é mais fácil de hidrolisar, enquanto a cristalina é mais resistente. A água tem um profundo efeito sobre a estrutura da celulose, sendo a porção amorfa a mais afetada. A superfície específica da celulose aumenta drasticamente após umedecê-la e quando é submetida à secagem com ar, a sua estrutura é modificada notavelmente (KIM et al., 2016).

A sacarificação dos resíduos lignocelulósicos pré-tratados pode realizar-se por ação de ácidos minerais ou enzimas celulolíticas. No caso da hidrólise ácida, existem basicamente dois processos. Um utiliza ácidos concentrados para catalisar a sacarificação e o outro utiliza ácidos diluídos. A hidrólise ácida permite atuação seletiva inicial sobre a hemicelulose, heteropolissacarídeo ramificado de cadeia reduzida e amorfo, devido às diferenças estruturais com a celulose, homopolissacarídeo linear de cadeia muito longa e regiões cristalinas (MOSIER et al, 2003a, b). Os processos de hidrólise com ácido diluído são operados em temperaturas elevadas, produzindo soluções de açúcar em concentração de 10 a 12% e rendimentos limitados a 50-60% (MOSIER et al, 2005).

A hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalisada por uma enzima na presença de água para quebrar uma molécula em duas outras moléculas. Essa quebra pode ser realizada em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (SAINI et al., 2015). O mecanismo mais aceito para a hidrólise enzimática do bagaço ou biomassas lignocelulósicas descreve sinergismo de, pelo menos, três enzimas, que são as endoglucanases (β -1,4-D-glucanglucanohidrolase), hidrolisando a molécula de celulose nos centros não cristalinos; exoglucanases (β -1,4-D-glucan-celobiohidrolase) formando celobiose partindo do fim da molécula de celulose; e β -glucosidase ou celobiase (β -D-glicoside-glucohidrolase), hidrolisando a celobiose e formando duas moléculas de glicose (TANNER, 2002; ZHANG, 2006; DASHTBAN et al., 2010).

O rendimento da hidrólise é determinado não somente pelo tipo de pré-tratamento do substrato, mas como os produtos liberados dessa etapa. Como possíveis inibidores da atividade enzimática e concentração de cada tipo de substrato resultante (KIM et al., 2016). Consequentemente é necessário aperfeiçoar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação.

2.14. Enzimas: Catalisadores biológicos

2.15. Enzimas celulolíticas

O complexo celulolítico é composto por um conjunto de enzimas que apresentam a capacidade de agir de forma conjunta e sinérgica para hidrolisar a celulose. A Figura 11 apresenta os diferentes componentes da celulose.

Estas enzimas são classificadas como hidrolases e, segundo a nomenclatura enzimática (E.C. 3.2.1), hidrolases O-glicosídicas são baseadas em sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. De acordo com a nomenclatura, o número 3 refere-se à hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1 glicosidases, isto é, uma enzima que hidrolisa compostos O-glicosil ou S-glicosil. Atualmente as hidrolases glicosídicas são agrupadas em 87 famílias (DASHTBAN et al., 2010). A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, devido à natureza física do

substrato, que é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, chamadas de microfibrilas, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Essas fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina (GUERRIERO et al., 2016; SINGHA et al., 2015), a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas (BÉLGUIN, 1990). As celulasas produzidas por fungos possuem três componentes principais: As **endoglucanases** que hidrolisam aleatoriamente as ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ D-glicosídicas internas; As **celobiohidrolases** (exocelulasas) que produzirão celobiose das extremidades não redutoras a partir de celulose e; As **β -glicosidases** (celobiasas) que converterão celobiose em glicose. Para uma efetiva hidrólise da celulose é necessário um consórcio destas enzimas, que são descritas na literatura como tendo uma ação sinérgica entre elas (TANNER, 2002; ZHANG et al., 2006; DASHTBAN et al., 2010).

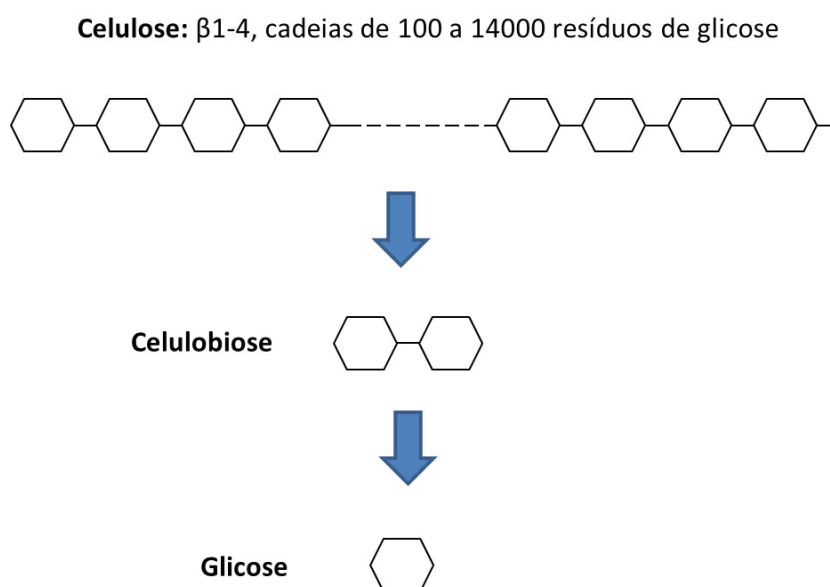


Figura 11: Cadeia linear polimérica da celulose até o monossacarídeo.

As endoglucanases e as celobiohidrolases degradam celodextrinas solúveis e celulose amorfa, enquanto somente as celobiohidrolases, com notáveis exceções, degradam a celulose cristalina eficientemente (DASHTBAN et al., 2010). Na Figura 12 é apresentado o mecanismo de degradação da celulose e se pode verificar o sinergismo das enzimas. A endocelulase quebra aleatoriamente a cadeia polimérica, posteriormente a exocelulase quebra o

final dessa cadeia em um dímero de glicose, chamado de celobiose. Por último, as celobiasas convertem a celobiose em glicose (DASHTBAN et al., 2010).

2.15.1. Sinergismo entre as enzimas do complexo celulítico

A hidrólise da celulose por parte dos fungos demanda uma ação sinérgica das endoglucanases e celobiohidrolases ou exocelulase. Sendo que cada enzima tem seu papel na hidrólise deste substrato. Dois tipos de sinergismo têm sido esclarecidos (NIDETZKY et al., 1994). O sinergismo exo-endo é interpretado como um mecanismo sequencial da ação enzimática. As endoglucanases atacam inicialmente as regiões amorfas da celulose liberando-as para a ação das exoglucanases. Outro modelo assume a competição entre as celulasas individuais em regiões para adsorção de celulose (NIDETZKY et al., 1994), mas esse sinergismo se mantém não esclarecido. Na Figura 12 é apresentado o mecanismo de degradação da celulose e se pode verificar o sinergismo das enzimas.

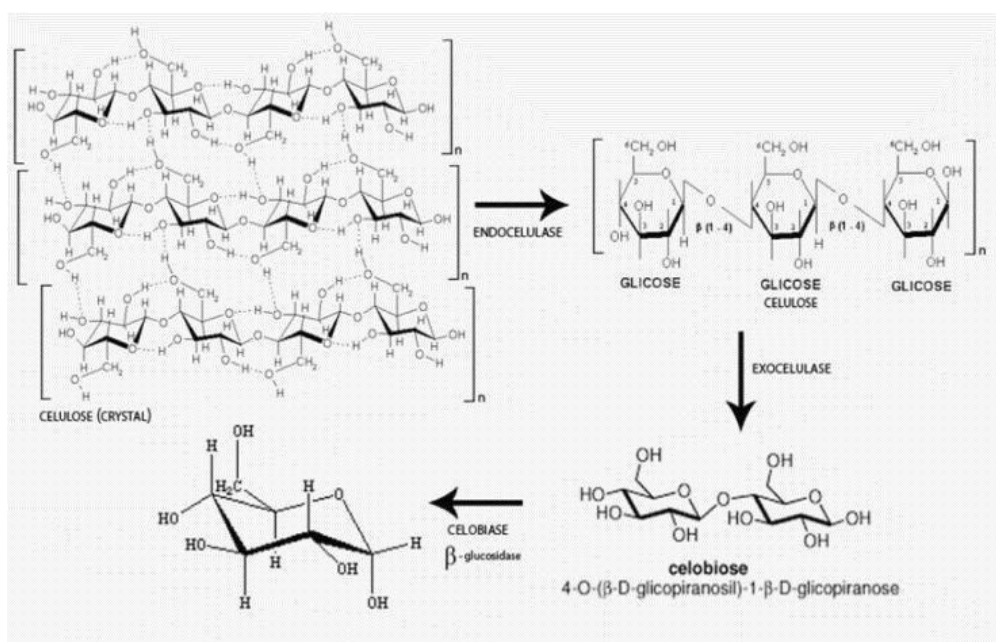


Figura 12: Mecanismo de degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático.

As endocelulasas quebram aleatoriamente a cadeia polimérica da celulose, posteriormente as enzimas exocelulasas quebram o final dessas cadeias em dímeros de glicose, chamado de celobiose. Por último, as celobiasas convertem as celobioses em glicose (NIDETZKY et al., 1994).

2.16. Enzimas xilanolíticas

A xilana é o principal polissacarídeo da hemicelulose e representa um grande recurso que pode ser utilizado para produzir açúcares fermentáveis e combustíveis (CARVALHO et al., 2013). Sendo que ela corresponde aproximadamente 20-35% do peso seco total de folhosas e plantas herbáceas e representam um grande recurso que pode ser utilizado para a produção de açúcares fermentáveis e combustíveis (TECHAPUN et al., 2003; CARVALHO et al., 2013). As xilanases são as enzimas que degradam a xilana, sendo que a endo β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação desse polissacarídeo. Trata-se de uma endo-enzima que hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia de hemicelulose (na cadeia principal de xilana) liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999). A clivagem completa da xilana é pela ação sinérgica de β -xilanase e pela ação sinérgica de endo e exo-xilanases (β - xilosidases ou β -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultante, assim como, outras enzimas acessórias como a β -xylosidase, α -arabinofuranosidase, α -glucuronidase (SMITH et al., 1991; CARVALHO et al., 2013).

Apesar das xilanases fúngicas já serem produzidas industrialmente por alguns micro-organismos, há grandes variações de preço, e o seu alto valor é um fator limitante para o seu uso industrial (100 g de endo β -1,4 xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* custa R\$ 620,00- Sigma); 50 g de endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-xylanase de *Thermomyces lanuginosus* purificada e produzida por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado (Marca: Novozyme) custa R\$ 998,00. Dados colhidos no site comercial da Sigma Aldrich 01/03/2016.

As xilanases, assim como as celulasas, fazem parte do complexo enzimático fibrolítico que tem como principal ação a hidrólise de biomassas lignocelulósicas. Essas enzimas possuem uma alta aplicabilidade na produção de produtos de alto valor agregado, como novas fontes de alimento ou mesmo na produção de bioenergias renováveis (CARVALHO et al., 2013).

2.17. Enzimas lignolíticas

A degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas que desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (CASTRO & PEREIRA, 2010; DURÁN & ESPOSITO, 2008; LEE & MOON, 2003). As enzimas do complexo lignocelulolítico possui um potencial econômico elevadíssimo, encontrando aplicações na área farmacêutica, industrial, alimentar, em bioenergia e outras. Tudo devido a sua capacidade de transformar via ação enzimática, os resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis, sendo este o ponto de partida para inúmeras outras aplicações.

2.17.1. Lacases

As lacases (E.C. 1.10.3.2) são glicoproteína polifenóis oxidases (fenoloxidas) que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos, produzidas por fungos como também por plantas. Entre os substratos doadores de elétrons para lacases encontram-se polifenóis, fenóis metoxi-substituídos (mono e di), diaminas e uma série de outros substratos. São produzidas pela maioria dos basidiomicetos e suas massas molares estão entre 60 e 100 kDa. As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas (DURÁN & ESPOSITO, 2008). Esses radicais formados atuam nas reações não catalíticas como o acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Essas reações levam a polimerização, quebras alqui-arílicas, oxidações no C α e desmetilações. Uma lacase artificial, ABTS (2,2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)), foi estudada e demonstraram que agia como um mediador, promovendo a oxidação de modelos de compostos de lignina não-fenólicos. A atividade da lacase em cultivos de fungos pode ser aumentada com a adição de diferentes compostos no meio.

2.17.2. Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (MnP; E.C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular, glicosilada, de massa molecular de 45-47 kDa e possui um grupo prostético heme. É dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn⁺² e α -

cetoácidos como lactato são responsáveis por estabilizar sua atividade (DURÁN & ESPOSITO, 2008; LANGH et al.; 1997). A manganês peroxidase pode ser encontrada em diferentes formas e estão presentes em diversos fungos (LANGH et al., 1997). Normalmente a mineralização efetiva de ligninas sintéticas está relacionado com um baixo teor de Mn e baixos MnP, mostrando que a possibilidade de que MnP participe na degradação da lignina é mínima (DURÁN & ESPOSITO, 2008), porém outros relatos correlacionam a MnP na degradação de lignina em processos de desmetilação e deslignificação em polpas Kraft (GRGIC & PERDIH, 2003). A MnP catalisa a oxidação da lignina na presença de H_2O_2 (KUWAHARA, 1984). A oxidação de lignina é dependente dos íons livres de Mn^{2+} . Em vários fungos, MnP realiza uma tarefa importante no ataque a lignina, porque gera Mn^{3+} , um poderoso e difundido oxidante. Ácidos orgânicos como oxalato e malonato, secretados por fungos de degradação branca, estimulam a reação de MnP estabilizando Mn^{3+} , para ser capaz de se difundir da superfície da enzima e oxidar o substrato insolúvel, lignina (LANGH et al., 1997). Embora a manganês-peroxidase não oxide compostos não-fenólicos da estrutura da lignina, essas estruturas são vagarosamente cooxidadas quando as MnP peroxidam ácidos graxos. A peroxidação de lipídios também tem sido sugerida na participação no processo de degradação de lignina por MnP (NOVIKOVA et al., 2002).

A produção de enzimas está especificamente relacionada e dependente da composição do substrato e fatores ambientais, como temperatura e umidade. A utilização dos diversos tipos de substratos pelo fungo depende da sua capacidade de secretar celulasas, hemicelulasas e ligninases, liberando nutrientes para seu crescimento (BUSWELL et al., 1998).

2.18. Micro-organismos produtores de enzimas fibrolíticas

Na literatura vários micro-organismos são reportados como produtores de celulasas, e um dos trabalhos de seleção mais conveniente para a produção de celulasas extracelulares foi desenvolvido pelo grupo de Natick da U.S. Army Research and Development Comand em Natick, laboratório norte americano que se interessou nos estudos desse complexo enzimático e dos micro-organismos produtores (DASHTBAN et al., 2010). Esse grupo destacou como o

principal e promissor para produção de celulase o fungo filamentoso *Trichoderma viride* (AGBHEVOR, 2004). Os estudos se basearam em comparações com diversas espécies produtoras na qual esse grupo possuía um acervo de mais de 14.000 cepas de micro-organismos isolados de materiais celulolíticos em decomposição e relataram ao final do estudo que a celulase não era uma entidade simples, mais um complexo de enzimas.

O *Trichoderma reesei* se destaca entre os fungos celulolíticos (BISCHOF et al., 2016). RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO (2004) obtiveram o melhor resultado de CMCase de 1,64 U/mL com *T. harziannum* cultivado em meio de farelo de trigo, sendo que para FPase o melhor resultado 0,021 FPU/mL para o *Penicillium simplicissimum*. WEN et al., (2005) utilizaram *Trichoderma reesei* para produção de celulases. O estudo teve interesse na degradação de forrageira usada pela indústria leiteira através da digestão anaeróbica para conversão de produtos bioenergéticos. Alguns trabalhos apresentam como produtores de celulases o *Aspergillus niger*, KIM, (2004) trabalhando com esse micro-organismo, pesquisaram a produção de celulases e hemicelulases em fermentações em estado sólido como substratos de palha de arroz e farelo de trigo. LOBELLO (2009), isolou 164 fungos da Mata Atlântica e de bagaço de cana e encontrou cerca de 10 linhagens fúngicas que apresentaram excelentes atividades celulolíticas. SUN et al.(2010) trabalhando com uma linhagem mutante do *Trichoderma reesei* RUT C-30 e usando como fonte de carbono o pó de palha de arroz sem pré-tratamento, obtiveram uma atividade enzimática de 0,71 FPU/mL. BASSO et al., (2010) obtiveram como melhor resultado com *Trichoderma reesei* QM 9414 cultivado em bagaço de cana a 28 °C, em 15 dias de cultivo, 0,5 U/mL para CMCase, e 0,2 FPU/mL. DELABONA et al., (2012) conseguiram uma atividade de FPase de 0,85 FPU/mL em 72 horas de fermentação submersa (FSm), utilizando *T. harzianum* P49P11 e como substrato, o bagaço de cana-de-açúcar mais sacarose, e quando estes autores trabalharam em biorreator (1,5L) e bagaço tratado com NaOH, em pH 6,0, a FPase subiu para 0,95 FPU/mL, para o mesmo micro-organismo.

Há várias aplicações das celulases em processos biotecnológicos na qual em sua grande maioria são utilizados fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* para degradação de materiais lignocelulósicos e produção de

enzima livre para comercialização (BISCHOF et al., 2016). As indústrias de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, medicina, química fina, agroindústria e de alimentação animal e silagem vem aplicando essa tecnologia enzimática para redução de custos operacionais, aumento da qualidade e buscando processos mais limpos diminuindo assim os impactos ambientais.

2.19. Fungos degradadores de biomassa lignocelulolítica

Os fungos degradadores de biomassa lignocelulósica desempenham importantes papéis na ecologia da natureza, sendo os agentes principais na decomposição e reciclagem dos nutrientes. A distribuição desses fungos e sua diversidade, em um modo geral, são altamente dependentes de vários fatores bióticos e abióticos (UNTERSEHER & TAL, 2006). De uma forma geral, estes fungos ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos. Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem enzimas do complexo lignocelulolíticos, em condições laboratoriais, diversos substratos são utilizados para induzir e/ou medir a atividade deste complexo enzimático tais como: algodão, papel de filtro, carboximetil celulose (CMC) e resíduos agrícolas (FILHO & FRANCO, 2015). Os resíduos agroindustriais podem ser devidamente processados, para servir como fonte de nutrientes ou ainda enriquecidos como fontes extras de nitrogênio, minerais e vitaminas, tornando-se fonte de produção deste complexo lignocelulolítico (ELISASHVILI, 1993). Os indutores da síntese lignocelulolítica dos fungos variam dependendo da concentração em que se encontram, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento, que no caso, ou são fontes de carbono para o crescimento celular ou de síntese enzimática (GONG & TSAO, 1975).

Os fungos degradadores de madeira (biomassa lignocelulolítica) se dividem em três grupos, de acordo com a morfologia da degradação que produzem: fungos de degradação branca, marrom e branca ou macia. Esses fungos são taxonomicamente variados e pertence principalmente a divisão *Basidiomycotina* (DURÁN & ESPOSITO, 2008).

Os basidiomicetos responsáveis pela degradação branca da madeira selecionam a lignina presente na parede celular, deixando a celulose

praticamente intacta, mas variam consideravelmente com o tipo de ataque à lignina, com os polissacarídeos da madeira e a velocidade com a qual atuam na remoção da lignina (KIRK, 1998). Esses fungos são classificados de acordo com as características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria tem hifas dicarióticas com conexão específicas entre os septos do micélio (DURÁN & ESPOSITO, 2008). Esses basidiomicetos oxidam compostos fenólicos, relacionados à lignina através de enzimas extracelulares lignocelulolíticas (KIRK, 1986; JORGENSEN, 2005). Basidiomicetos de degradação branca como *Pleurotus spp.* são caracterizados pela habilidade de degradar os polímeros da lignina em tecidos vegetais. A lignina são álcoois aromáticos polimerizados (SUN & CHENG, 2002), sendo assim possuem uma biodegradação restrita. Com isso o ataque inicial do fungo necessita ser extracelular, não-específico e oxidativo (KIRK, 1986; KLYOSOV, 1990). E essa hidrólise lignolítica envolve a ação de um complexo enzimático formado por lignina peroxidase, manganês peroxidase, peroxidases e lacases (ERIKSSON, 1990; KIRK, 1986; HATAKKA, 1994; LEE & MOON, 2003; FERRAZ, 2004; JORGENSEN, 2005). Os fungos do gênero *Pleurotus* produzem MnP, peroxidases, lacases, mas não produzem ligninas peroxidases (COHEN et al., 2002). Os fungos desse gênero são também são biologicamente versáteis quando a biodegradação de materiais contaminantes. Foi descoberto que o fungo *P. ostreatus* é capaz de degradar e mineralizar compostos xenobióticos, como PAHs, corantes industriais e outros poluentes de solo, como a atrazina (MENEZES, 1997).

Os fungos de degradação marrom produzem tipicamente uma quebra extensiva dos polissacarídeos de celulose e hemicelulose e deixam a lignina intacta (DURÁN & ESPOSITO, 2008). Desta forma, o material restante desse processo tem uma coloração amarronzada e de aparência frágil (LEE & MOON, 2003). Esses fungos representam somente 6% da classe *Basidiomycotina* degradadores de madeira (DURÁN & ESPOSITO, 2008). O mecanismo no qual esses fungos modificam a lignina ainda é desconhecido, já que enzimas lignolíticas geralmente não são produzidas (LEE & MOON, 2003). Esses fungos são capazes de realizar modificações na lignina, resultando em decréscimo dos grupos metoxilas, fazendo com que os grupos fenólicos

umentem significativamente (DURÁN & ESPOSITO, 2008). Esse processo altera a lignina para uma biodegradação subsequente. Acredita-se que a ação de glicoproteínas contendo ferro participe na transformação da lignina por via da produção de radicais hidroxila (DURÁN & ESPOSITO, 2008).). As células da parede da das biomassas lignocelulósica são atacadas por esses fungos formando poros e erosões, devido à quebra das microfibrilas da celulose. Devido a esse mecanismo, suas hifas podem se dividir em duas categorias: as que degradam os componentes da parede celular, incluindo a lignina e as que somente modificam a lignina enquanto degradam a celulose e/ou hemicelulose (LEE & MOON, 2003; DURÁN & ESPOSITO, 2008).

Os fungos de degradação branda ou macia geralmente são pertencentes às classes *Ascomycotina* e *Deuteromycotina* (DURÁN & ESPOSITO, 2008), esses fungos podem causar degradação da biomassa lignocelulósica em uma forma suave e de aparência úmida (JORGENSEN, 2005). Essa degradação ocorre pela penetração fina das hifas fúngicas nas camadas da parede celular. Os fungos de degradação branda colonizam e degradam madeiras duras, de alta umidade, mas também degradam madeiras moles porem com uma taxa de hidrólise mais lenta quando comparada com fungos de degradação branca e marrom. Esses fungos são mais eficientes na despolimerização de compostos sintéticos de lignina (DURÁN & ESPOSITO, 2008).

A aplicação de enzimas produzidas pelos fungos decompositores de materiais lignocelulósicos tem ganhado muito interesse na atualidade. O uso de xilanases (POLIZELI, et al.; 2005) e lacases (CALL et al., 1997; WIDSTEN & KANDELBAUER, 2008) em processos de branqueamento de polpas celulósicas e a aplicação de celulasas na hidrólise enzimática de celulose nos processos de produção de bioetanol de segunda geração (CASTRO & PEREIRA, 2010) são exemplos de como o avanço no entendimento da biodegradação dos lignocelulósicos tem permitido explorar aplicações tecnológicas de grande relevância para o mundo moderno.

2.20. Fungos *Basidiomycota*

Fungos do grupo *Basidiomycota* são variáveis e extremamente abundantes na natureza, existe mais de 25.000 espécies para estes fungos, que possuem como estrutura reprodutiva característica o basídio (do grego = pequeno pedestal ou base pequena), sendo esta uma microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia (fusão de núcleos gaméticos) e a meiose. Cada basídio produz quatro basidiósporos haplóides, resultado de uma meiose. Os cogumelos são um basidiocarpo, e as lamelas superficiais sob o chapéu são carregadas de basídios, com os basidiósporos. No solo, um amplo sistema subterrâneo de micélios sustenta o basidiocarpo, fornecendo-lhe nutrientes (TORTORA et al., 2008).

Estes organismos são constituídos por filamentos microscópicos denominados hifas, que, em conjunto, formam um emaranhado de filamentos denominado micélio. As paredes das hifas são, em geral, formadas por celulose e quitina. O cogumelo ou basidioma é constituído pelo estípete e píleo. No píleo, situam-se as lamelas em cuja superfície estão localizados os basídios que produzem e ejetam os basidiósporos, que são esporos sexuais (EIRA et al., 2007).

Os cogumelos constituem no mínimo 14.000, e talvez mais de 22.000 espécies conhecidas. O número de espécies de cogumelos é estimado em 140.000, sugerindo que apenas 10% são conhecidas (LINDEQUIST et al., 2005; LULL, et al., 2005).

Dentre essa enorme quantidade de espécies de cogumelos, cerca de 2.000 espécies de cogumelos, pertencentes a pelo menos 30 gêneros, foram consideradas comestíveis (LULL, et al., 2005). Porém apenas 20 espécies eram cultivadas comercialmente até 1998, e somente sete espécies eram produzidas em nível industrial, destacando-se: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea*, *Pholiota nameko*, *Flammulina velutipes* e *Agaricus blazei* (PASCHOLATI, 1998).

Os cogumelos, que são organismos degradadores de materiais lignocelulósicos, através do seu complexo enzimático formado por celulasas, ligninases, peroxidases, lacases, proteases, manganases e fenol oxidases dentre outras enzimas, possuem a capacidade de degradar a lignina, retirando

seus grupos metoxílicos e fazendo a ruptura das ligações éster, liberando substâncias mais solúveis e expondo cadeias restantes à ação das demais enzimas (SUN & CHENG, 2002). Sendo assim, a maioria dos *Basidiomycota* podem utilizar os componentes da madeira para seu crescimento, pelo fato de possuírem este sistema enzimático, tornando-os capazes de degradar fontes complexas de carbono, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (BUSWELL, 1998).

Desta maneira, segundo TONINI (2007), os fungos produtores de corpos frutíferos comestíveis e medicinais são aptos para crescer em uma grande variedade de resíduos agroindustriais. Pelo fato, de sua capacidade de secretar enzimas lignocelulolíticas, que, ao degradarem estes compostos complexos, liberam nutrientes para o crescimento fúngico. Sendo que essas biomassas lignocelulósicas, são constituídas pela celulose, hemicelulose, lignina (SUN & CHENG, 2002). Essa interação entre essas fibras torna a biomassa um composto altamente resistente.

Até o presente momento, apenas os fungos são conhecidos como degradadores de lignina em CO₂, apesar de algumas bactérias conseguirem até 20% de degradação. A degradação da lignina é realizada para facilitar o acesso do fungo aos demais polissacarídeos existentes na madeira. Os fungos lignolíticos não conseguem crescer em meio contendo somente lignina como fonte de carbono. As exoenzimas envolvidas no processo de degradação da lignina são a ligninaperoxidase, ligninase (peroxidase manganês-dependente) e lacase (PUTZKE & PUTZKE, 2002).

Contudo, quando se fala de crescimento e cultivo de fungos do grupo *Basidiomycota*, baixos níveis de nitrogênio estimulam a degradação da lignina em diversos fungos de podridão branca; ao mesmo tempo, altas concentrações de nitrogênio promovem a degradação de polissacarídeos. A produção de endoglucanase é associada à formação de primórdios e corpos de frutificação, estágios em que ocorre um significativo incremento na atividade enzimática. Nos primeiros estágios do crescimento do shiitake (*Lentinula edodes*), a celulose e a xilana são os componentes mais abundantes no substrato, ao

mesmo tempo em que a lignina é altamente decomposta (GAITÁN-HERNÁNDEZ et al., 2006).

A importância dos cogumelos comestíveis está crescendo pelos avanços tecnológicos que melhoram sua qualidade, produtividade e custo de produção. (EIRA, 2003). Sendo que estes cogumelos são ricas fontes de proteínas, vitaminas e compostos bioativos (LULL et al., 2005; SADLER, 2003; MANZI, 1999; MATTILA et. al., 2000).

2.21. *Pleurotus ostreatus* (Shimeji)

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* têm sido estudados intensivamente em muitas partes do mundo pelo seu valor gastronômico, habilidade em colonizar e degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos (VELÁZQUEZ- CEDEÑO et al., 2002; TISDALE et al., 2006). Além das propriedades gastronômicas, os cogumelos do gênero *Pleurotus* são alimentos ricos em proteínas e vitaminas e contêm fibras, elementos minerais e baixo teor de gorduras (BREENE, 1990). Os fungos do gênero *Pleurotus* são adaptados a temperaturas entre 20 e 25 °C, consideradas ideais para cultivo no sul do país, e dispensam a compostagem (PATRABANSH & MADAN, 1997).

O fungo *Pleurotus ostreatus* (Figura 13) é uma rica fonte proteica, e um organismo com habilidade efetiva de bioconverter diversos materiais lignocelulósicos, sendo que, várias espécies de *Pleurotus* são cultivadas comercialmente em diferentes partes do mundo (WANG et al., 2001; SUGUIMOTO et al., 2001). Além disso, o substrato utilizado após a colheita dos cogumelos pode ser empregado como fertilizante e como parte da alimentação animal (YILDIZ et al., 1997). O cultivo de *Pleurotus*, requer temperaturas entre 5 e 22 °C, dependendo da espécie, bem como condições adequadas de ventilação e umidade relativa elevada.

O crescimento destes fungos bem como o rendimento qualitativo e quantitativo de seus produtos e biomassa, depende da utilização de nutrientes e condições físico-químicas e ambientais adequadas, como a proporção de utilização de açúcar, diferentes fontes de nitrogênio e fósforo (MUKHOPADHYAY et al., 2002). O processo de formação dos corpos de

frutificação do *Pleurotus ostreatus* é influenciado pela luz, composição do ar, temperatura, composição do substrato e técnicas de cultivo (KAMRA & ZADRAZIL, 1986).



Figura 13: Fungo *Pleurotus ostreatus*. Fonte: mushroom-collecting.com/mushroomoyster.html

2.22. Cultivo Axênico de cogumelos

O cultivo Axênico em substratos sintéticos à base de diversos resíduos agroindustriais vem ganhando espaço na produção comercial dos cogumelos, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é mais elevada (CHANG & HAYES, 1980). A utilização de resíduos lignocelulolíticos representa uma otimização da produção agrícola destes fungos, reduzindo as perdas, agregando valores e, ainda, propiciando a redução do seu volume, diminuindo um possível impacto ambiental provocado pelo seu acúmulo. O cultivo em sacos plásticos é um método recente, se comparado ao cultivo em toros de madeira; cultivo tradicional (BONONI, 1995). Este método reduz o tempo de cultivo, aumenta o rendimento e produz corpos de frutificação de qualidade similar aos obtidos em troncos (BONONI, 1995).

O cultivo em resíduos lignocelulósicos tem relatado altas e consistentes produtividades, sendo demonstrada uma maior eficiência e se estendendo a novas latitudes. Diversas formulações para a preparação dos substratos podem ser utilizadas, em que são baseadas em resíduos orgânicos lignocelulósicos, localmente disponíveis. O uso de resíduos agroindustriais para o cultivo dos cogumelos é uma alternativa atrativa, econômica e de um potencial extremo para muitos produtores. A melhor formulação de substrato é aquela que gera alto rendimento, alta qualidade dos cogumelos, com baixa taxa de contaminação. Várias estratégias têm sido desenvolvidas, em muitas regiões da Ásia, para utilizar parte da vasta quantidade de resíduos lignocelulósicos gerados através dos processos das indústrias agrícola, florestal e alimentícia (PEREIRA Jr., et al., 2003).

Os cogumelos podem ser produzidos em cultivo axênico, em diversos tipos de substratos ricos em lignina e celulose, pois estes organismos possuem a capacidade de utilizá-los como fonte de nutrientes. E para isto, os fungos precisam ter a capacidade de secretar enzimas do complexo lignocelulolítico para obter nutrientes para o seu crescimento (TONINI, 2007). Estes fungos produzem grandes quantidades de hidrolases e oxidases para a bioconversão dos resíduos lignocelulósicos. As diferenças das atividades enzimáticas entre as diversas linhagens promovem informações úteis sobre a participação das enzimas no desenvolvimento dos corpos de frutificação. As atividades de duas destas enzimas, a lacase e a celulase (endoglucanase) são fortemente reguladas durante o desenvolvimento dos corpos de frutificação (SILVA et al., 2005). A produção de enzimas é parte crucial do processo de colonização do substrato e é importante na determinação do rendimento da produção de cogumelos (EIRA, 2003).

Quando as hifas de cogumelos crescem em grandes quantidades de substratos (grãos, serragem, materiais celulósicos ou minerais enriquecidos), em condições axênicas, tem-se o inóculo (termo diretamente ligado aos propágulos viáveis do fungo, as hifas), inoculante (que, além do inóculo, inclui o veículo sólido ou substrato, como serragem, grãos e outros – traduz melhor esse material sólido com o crescimento do fungo) (EIRA, 1997; EIRA, 2003). O termo spawn é derivado do vocábulo francês *espandre*, que significa expandir e

propagar (BONONI, 1995). O inóculo é o veículo de dispersão do micélio no substrato e sua preparação é a fase mais crítica do cultivo, devendo ser realizada sob condições de absoluta assepsia (EIRA, 2003).

O inóculo consiste em um meio de crescimento que tenha sido permeado pelo micélio. É muito importante que os produtores de cogumelos comestíveis utilizem inóculos de alta qualidade. O inóculo é produzido a partir de uma linhagem pura do micélio de um tubo de cultura, que é multiplicado. Os grãos inoculados (spawn) são incubados por 2 ou 3 semanas. Meios de cultura bastante ricos e de composição muito diferente do substrato de produção do basidioma podem levar à adaptação fisiológica do cogumelo, que pode não estar adaptado ao substrato de cultivo. Culturas de *Lentinula edodes* cujo desenvolvimento ocorreu em meio de extrato de madeira, conseguiram adaptar-se melhor aos efeitos inibitórios dos compostos presentes na madeira (MINHONI et al., 2007). O inoculante não deve ser usado após longo período de armazenamento, pois, mesmo linhagens muito produtivas, podem apresentar diminuição no crescimento ou produção, sendo um fenômeno comum, que pode ser atribuído à variação genética induzida por ambiente muito favorável ou desfavorável (MINHONI et al., 2007).

A biomassa microbiana cresce em um período de tempo que resulta em uma típica curva sigmoideal, que podem ser divididas em diferentes fases com características fisiológicas próprias. A primeira fase é chamada fase lag, e é caracterizada pela pequena taxa de crescimento; a segunda fase é a exponencial, ou log, caracterizada pela taxa de crescimento máxima e constante; a terceira fase descreve um declínio na taxa de crescimento e, às vezes, é observada uma fase estacionária de curta duração, e por fim a quarta e última fase, a morte do fungo (MONTINI et al., 2006).

Ao usar um inóculo mais vigoroso e adaptado ao meio de substrato, evita-se uma extensa fase lag, com possível contaminação, que pode ocorrer quando o micélio demora a se desenvolver (ROSSI, 2001). Um dos principais objetivos da manutenção das coleções de linhagens de diversos cogumelos por um período longo é a preservação de características desejáveis. A contínua re-semeação nos meios de cultura fornece uma efetiva opção a curto-prazo para

a preservação. O nitrogênio líquido é o meio preferido para estocar linhagens que não chegaram ao estágio de esporulação do micélio, no entanto, este processo precisa ser mais estudado, mesmo que o micélio seja congelado e adequadamente recuperado com êxito. Em estudos, obteve-se uma taxa entre 96,8 a 99,2% de espécimes recuperadas com êxito após a criopreservação, mostrando que este método pode ser usado em larga escala com linhagens de cogumelos comerciais, reduzindo os custos de mão-de-obra na produção (MATA & PÉREZ-MERLO, 2003).

No cultivo axênico, depois da mistura do substrato ser preparada, é necessário um tratamento em alta temperatura, para eliminar ou reduzir populações de organismos competidores neste substrato. O tempo e a temperatura a ser utilizada dependem do volume de substrato nos sacos de polipropileno. O tempo requerido para esterilizar é função da temperatura: se utilizar alta temperatura diminui o tempo necessário para a esterilização. A temperatura mais utilizada é 121°C. A pasteurização também é utilizada, mas não afeta os organismos termo tolerantes, pois ela ocorre com temperaturas entre 60°C a 80°C. A inoculação é o processo de introdução de um micélio ativo dentro de um saco contendo o meio para o crescimento dos cogumelos comestíveis. Após a inoculação, o cultivo axênico deve ser mantido em ambiente favorável para incubação e o rápido crescimento micelial. Durante o estágio vegetativo, a maioria das linhagens possui um melhor crescimento próximo aos 25°C. Contudo na frutificação, as temperaturas podem variar entre 10 - 25°C, de acordo com a linhagem (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

O micélio usualmente requer de 30 a 120 dias para a frutificação. Este período é influenciado pela linhagem utilizada, a formulação e a eficácia do substrato, a velocidade de miceliação, a distribuição do inóculo e a temperatura durante a incubação. Logo após a colonização, o substrato aparece totalmente branco, e as partículas do substrato não são mais visíveis. Algumas áreas na superfície do substrato podem se tornar marrons, especialmente onde incide luz. Esse fenômeno é causado pela oxidação das polifenol-oxidases, reagindo com a luz e o oxigênio. Esse micélio marrom forma uma camada protetora por

fora do substrato, atuando como barreira e defesa contra a invasão de organismos (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990).

Durante a incubação, os micélios desses fungos estão ligados ao substrato, juntos dentro do saco plástico de polipropileno. Essa massa de substrato e micélio é chamada de bloco. A partir do momento que este bloco está formado pode ser retirado o saco de polipropileno. A indução para a frutificação começa com a mudança de temperatura de 25 °C para algo em torno de 16 °C. A frutificação requer condições ambientais específicas: temperaturas entre 13-20°C, umidade relativa entre 75 a 95%, luz, ar fresco, nutrientes e água suficiente no bloco. É comum que no primeiro fluxo de cogumelos, tenha-se alta porcentagem de abortos e cogumelos deformados. No entanto, cogumelos normais são produzidos durante os fluxos subsequentes. Geralmente, cada fluxo termina com a colheita em 2 a 3 semanas. O tempo de colheita total dos blocos de substrato termina em 3 a 6 meses ou mais, dependendo das condições do ambiente durante a frutificação, da fórmula do substrato e tamanho do bloco (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). O crescimento micelial pode afetar enormemente a produtividade de cogumelos, dados demonstram que a formação de corpos de frutificação está diretamente relacionada à biomassa micelial do substrato (SILVA et al., 2005).

2.22.1. Influência da relação C/N no cultivo dos fungos basidiomicetos

No cultivo de fungos basidiomicetos, diversos resíduos agroindústrias podem ser empregados como suplementação de fontes de C/N (Carbono/Nitrogênio), que são os farelos de cereais, que podem ser de trigo, soja e arroz, dentre outros. Estes têm por função aumentar a quantidade de substâncias nutritivas, bem como a relação C/N (Carbono/Nitrogênio) do substrato, visto que os fungos são dependentes desta relação para que ocorra um adequado desenvolvimento micelial e consequente produção de cogumelos (MONTINI, 2006; DONINI, 2006). Os farelos de cereais são facilmente encontrados e, conforme o teor de nitrogênio pode ser utilizado em proporções estabelecidas (DONINI, 2006).

Segundo EIRA (2003), se for utilizado o substrato enriquecido e a relação C/N estiver entre 15 a 25/1, pode ser realizado o cultivo axênico. A principal razão da utilização de substratos com relação C/N estreita, no cultivo axênico, é obter elevadas produtividades visando cobrir os custos dos processos de esterilização e assepsia e, principalmente, para obter produções no tempo e quantidades requeridas pelo mercado consumidor. Fontes de carbono como lignina, glicose, frutose, entre outras, são importantes fornecedoras de energia para a atividade metabólica dos cogumelos e constituem a base para síntese de diversas moléculas que resultam em aproximadamente 50% do peso da matéria seca dos corpos de frutificação, em carbono (ROSSI et al., 2001).

Os farelos estimulam o crescimento micelial de diversas espécies de fungos, promovendo, assim, a rápida colonização do substrato (TEIXEIRA et al, 1997). São utilizados como fonte de nitrogênio orgânico (N), sendo necessário para o crescimento da massa micelial, o qual pode interferir na produtividade e na eficiência biológica (MARINO & ABREU, 2009). A quantidade e o tipo de farelo podem variar muito de acordo com as espécies e o isolado durante os estágios de desenvolvimento vegetativo (MARINO & ABREU, 2009). Segundo Eira (2003), se o substrato utilizado for suplementado e a relação C/N (Carbono/Nitrogênio) estiver entre 15 a 25/1, pode ser realizado o cultivo axênico. A relação C/N ideal depende da disponibilidade e concentração das fontes de carbono e nitrogênio no substrato, da linhagem e das condições de cultivo (MINHONI et al., 2007). Nitrogênio suplementar pode ser adicionado aos substratos lignocelulósicos, servindo de nutriente que promove um ótimo crescimento médio. Sendo que esta fonte de nitrogênio é importante, pois, atua na síntese de aminoácidos, de proteínas, de ácidos nucléicos e de algumas vitaminas pelo fungo (TONINI, 2004). E, quando se aumenta a suplementação com farelo de soja no meio de cultura de fungos basidiomicetos, diminuiu a velocidade de crescimento micelial e aumentou o vigor micelial acompanhada da formação de micélio aéreo (TONINI, 2007).

A baixa quantidade de nitrogênio nos substratos lignocelulósicos, é um fator limitante para a sua utilização. Sendo assim, a suplementação de nitrogênio pode estimular a mineralização do carbono tornando acessíveis os

constituintes dos resíduos, semelhante à celulose não-lignificada, sendo a decomposição da lignina e materiais lignificados reduzida (SILVA, et al, 2005).

2.23. Açúcares fermentescíveis e Bioetanol de segunda geração

A iminente escassez das reservas de petróleo, principal fonte energética mundial, juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental, são os principais motivos que levaram os governos a buscarem estratégias para uma maior produção e maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis (HIMMEL, et al., 2007).

A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção do bioetanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para atender à demanda mundial por combustíveis e fontes energéticas. Apesar de já existirem tecnologias disponíveis para o processamento da celulose, através de tratamentos químicos e biológicos, a maioria esbarra em dificuldades técnicas ou econômicas (SUN & CHENG, 2002; GUERRIERO et al., 2016; KÄRCHERA et al., 2016; SINGHA et al., 2015).

O rendimento líquido da produção do etanol apartir de celulose atualmente ainda é desfavorável. Neste contexto, a obtenção de novas tecnologias mostra-se de extrema importância para o reaproveitamento dessas matérias-primas bruta, e sua utilização como fonte de energia para a sociedade.

3. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi a utilização de um bioprocesso integrado utilizando-se substratos ligno-celulósicos para a produção de enzimas fibrolíticas, cogumelos e resíduos proteicos, através de métodos de cultivo com fungos selecionados, pré-tramentos físico-químicos e biológicos e hidrólise enzimática para obtenção de açúcares redutores.

3.1. Objetivos Específicos

- Selecionar resíduos lignocelulósicos *in natura* ou pré-tratados (métodos físico-químicos e/ou biológicos) e fungos mais promissores para produção de enzimas fibrolíticas
- Através de delineamento experimental, determinar a melhor condição de pH e temperatura do cultivo do fungo e substrato selecionados, para produção das enzimas fibrolíticas.
- A partir das condições otimizadas no cultivo fúngico em incubadora, realizar o cultivo em biorreator de 2 L para produção enzimática.
- Definir as condições de evaporação para a concentração do extrato enzimático em reator de 2 L.
- Estudar o efeito do pré-tratamento com álcali (NaOH) sobre o bagaço de cana-de-açúcar *in natura para a sacarificação enzimática*, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis.
- Avaliar uma mistura de diferentes resíduos lignocelulósicos para o cultivo axênico do *Pleurotus ostreatus* visando a produção das enzimas lignocelulolíticas, cogumelos comestíveis e resíduo proteico
- A partir do resíduo do cultivo de *Pleurotus ostreatus* com maior crescimento, este resíduo foi utilizado para avaliar a produção das enzimas fibrolíticas pelo fungo pré-selecionado.

4. Fluxograma

A seguir é apresentado um fluxograma geral do trabalho (Figura 14).

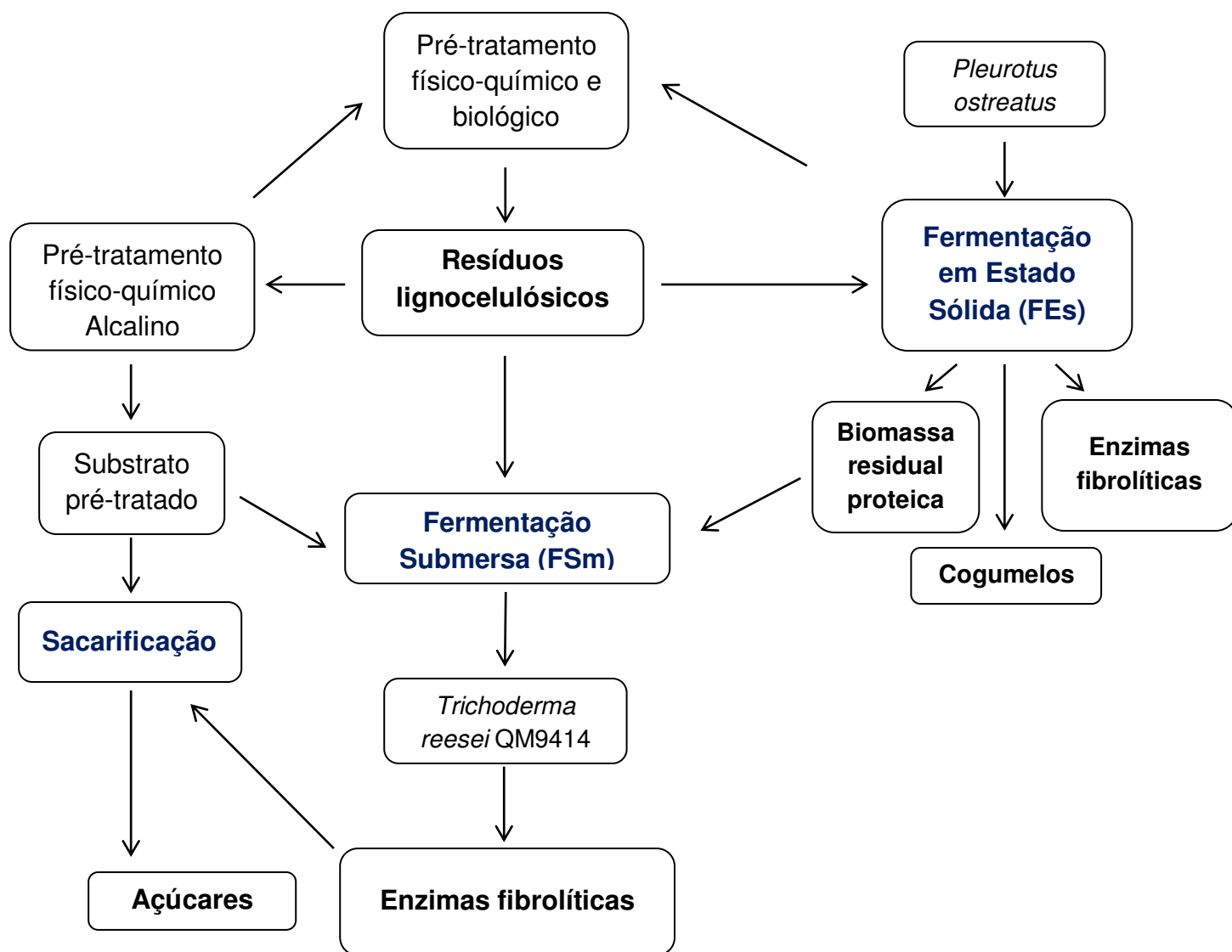


Figura 14: Fluxograma do bioprocesso integrado visando à obtenção de enzimas do complexo fibrolítico, açúcares fermentescíveis, biomassa residual proteica e cogumelos comestíveis.

Capítulo 1: *Produção de enzimas fibrolíticas fúngicas por Fermentação submersa utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos in natura ou pré-tratados*

Resumo

Nesta etapa foi estudado diferentes bioprocessos envolvendo cultivos fúngicos em estado sólido (FES) e submerso (FSm) foram realizados tanto para produção de substratos pré-tratados biologicamente (capítulo 3), quanto para substratos pré-tratados por hidrólise alcalina e ácida (capítulo 2) visando a produção de enzimas fibrolíticas realizada neste capítulo, através de uma pré-seleção de fungos com destaque para o *Trichoderma reesei*. Dentre os substratos estudados, o T1 (bagaço de cana pré-tratado com fungo basidiomiceto – Capítulo 3) e o bagaço de laranja (polpa cítrica), ambos suplementados com 1% (m.v⁻¹) de sacarose, obtiveram os melhores resultados em FSm. No qual, o máximo de atividade para o bagaço de laranja (*BLara+Sac*), após a concentração de duas vezes do extrato foi de 5,14±0,09 FPU/mL (Celulases Totais), 12,65±0,13 U/mL (Endoglucanase), 1,07±0,07 U/mL (Exoglucanase) e 83,93±2,99 U/mL (Xilanase); e para o T1 suplementado com sacarose, após concentração do extrato enzimático de duas vezes, foi de 1,43±0,00 FPU/mL (Celulases Toais), 11,32±0,23 U/mL (Endoglucanase), 1,84±0,00 U/mL (Exoglucanase) e 197,95±7,30 U/mL (Xilanases).

Palavras chave: Resíduos agroindustriais lignocelulósicos; processo biointegrado; enzimas fibrolíticas; *Trichoderma reesei*.

Capítulo 1

1. Introdução

O Brasil é um dos maiores agrícolas do mundo, tendo como consequência uma grande produção de resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana, torta de algodão, farelo de trigo, bagaço de laranja (FILHO & FRANCO, 2015; ISMAIL, 1996; SILVA et al., 2016). Estas biomassas são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina, podendo servir como matéria prima na produção de diferentes produtos a base de carboidratos, como por exemplo, etanol de segunda geração (GUPTA et al., 2015; SAINI et al., 2015). Desta maneira, esses resíduos agroindustriais mostram-se propícios para utilização como fonte de matéria-prima para a produção de novos compostos. Entretanto, para uma melhor utilização dos resíduos lignocelulósicos são necessários tratamentos prévios, ou pré-tratamentos, no qual vários vêm sendo estudados para separação dos componentes do bagaço da cana e/ou hidrólise dos polímeros. O pré-tratamento pode ser físico-químico utilizando-se ácidos (hidrólise ácida), com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose, tendo como o ácido o sulfúrico como o mais utilizado. Outra forma pode ser com o uso de enzimas (hidrólise enzimática) produzidas por micro-organismos, como o fungo *Trichoderma reesei* (BISCHOF et al., 2016). As enzimas celulolíticas são capazes de realizar a hidrólise das biomassas vegetais, sendo este composto por frações de celulose, hemicelulose e lignina (FENGEL & WEGENER, 1989).

No atual contexto mundial mostra-se uma necessidade da aquisição de recursos práticos e viáveis economicamente para a obtenção de fontes de energias renováveis e alimentos, e para o reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos. Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de processos para produção de enzimas do complexo celulolítico em diferentes resíduos agroindustriais.

2. Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Industrial e Microbiologia da Faculdade de Ciências e Letras – Campus de Assis da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. O fluxograma da Figura 1.1 ilustra as etapas principais das metodologias usadas neste trabalho.

Neste trabalho foi cultivado o *T. reesei* QM 9414 (pré-selecionado – item 2.2.1) em diferentes temperaturas e pHs, assim como diferentes substratos como fonte de carbono (pré-tratados ou não), seguida da análise das enzimas celulasas total, endoglucanases, exoglucanases e xilanases. E, com isso, foi determinado o melhor substrato lignocelulósico para produção enzimática. Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicatas.

2.1. Materiais

2.1.1. Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados no pré-tratamento biológico foram: *Rhizopus oligosporus* var. *oligosporus*, Levedura celulolítica (*Rhodotorula mucilaginosa*) e o fungo basidiomycota *Pleurotus ostreatus*, e para a pré-seleção do fungo para a produção das enzimas fibrolíticas foram: *Trichoderma reesei* QM 9414, *Trichoderma reesei* CCT2768 e uma linhagem isolada de *Aspergillus fumigatus* FS09. O cultivo dos fungos foram feitas pelo uso de tubos contendo 5 mL de meio PDA (45 g.L⁻¹ - potato dextrose agar) inclinado (slants) e colocados em ambiente com temperatura controlada (28 °C). Posteriormente seu crescimento, foi feito o repique dos fungos para placas de Petri contendo 30 mL de PDA (45 g.L⁻¹ - potato dextrose agar), as quais, então, foram incubadas por sete dias sob temperatura de 28 °C. Dessas placas foram preparados os pré-inóculos utilizados nesse trabalho.

2.1.2. Preservação dos micro-organismos.

Para preservação duradoura, foram adicionados 20% de glicerol estéril à suspensão de conídios e 1 mL da suspensão de cada linhagem foi transferida para um tubo tipo Eppendorf e congelado a -20°C (MURO & LUCHI, 1989).

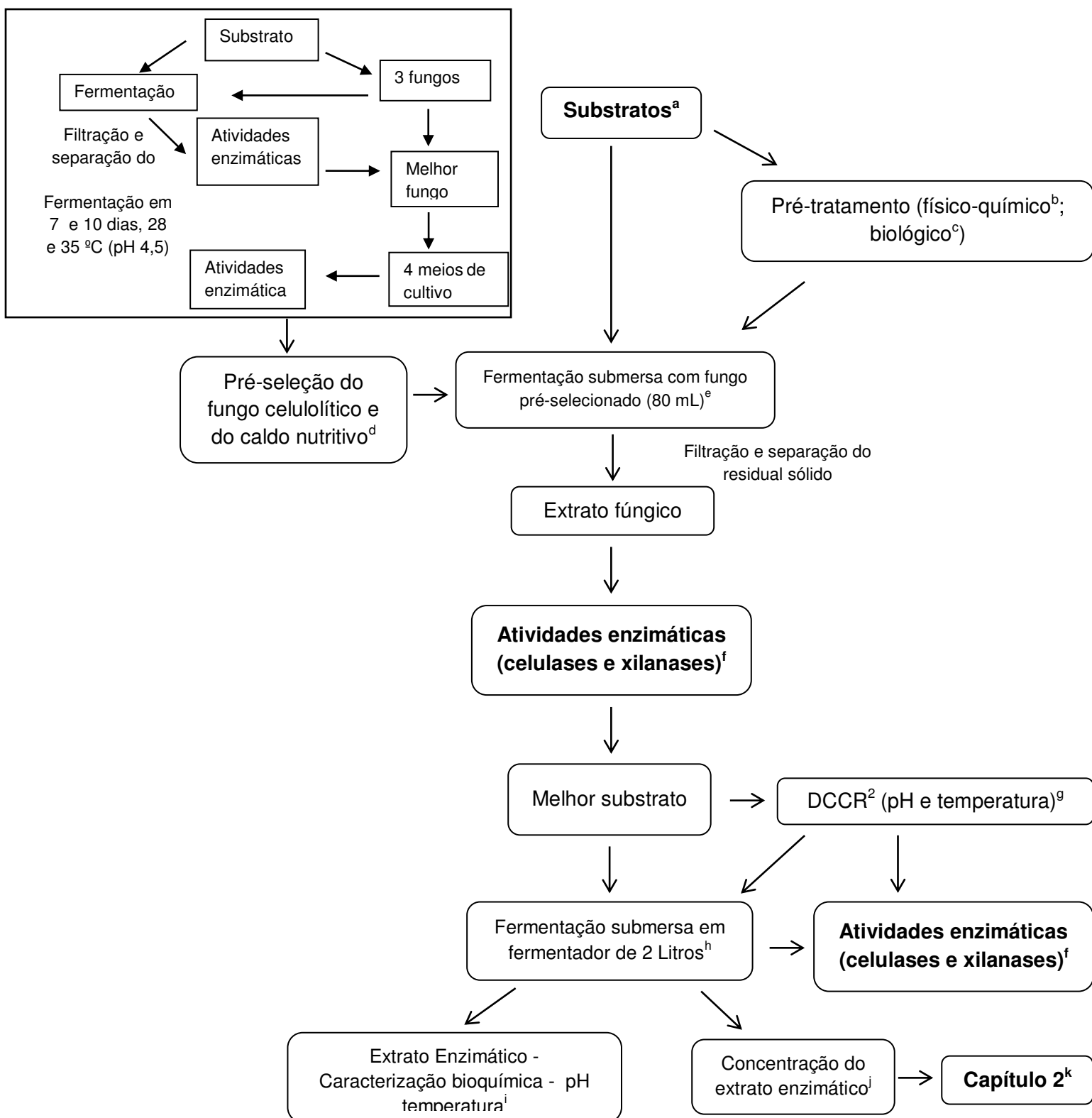
A reativação destes foi dada da mesma forma, sendo repicados periodicamente. Assim, cinco dias após a passagem dos micro-organismos para novos tubos com meio PDA, estes foram repicados para placas de Petri contendo aproximadamente 30 mL de PDA. Estas placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C a fim de se obter um crescimento fúngico desejável. Dessas placas foram preparados os pré-inóculos utilizados nesse trabalho.

2.1.3. Reagentes e Substratos

Os seguintes reagentes foram utilizados, tampões: Acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,6), citrato-fosfato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 3 a 7), fosfato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 7 a 8); Celulases comercial (E.C. 3.2.1.4) (1,4-β-glucanase - AB Enzymes - ROHAMENT® CL); para dosagem das atividades hidrolíticas: papel de filtro Whatman nº1, Carboximetilcelulose (Sigma), Xilana (Sigma), Avicel PH – 101 (Sigma); 5-ácido dinitrosalicílico para a técnica do DNS; Xylose (Sigma); PDA (potato dextrose agar – merck); Hidróxido de Sódio (NaOH); Ácido sulfúrico (H₂SO₄); Azocaseína (Sigma cód. A27656-5G); e demais reagentes em nível laboratorial. Os resíduos agroindustriais foram provenientes de diferentes regiões, o bagaço de cana-de-açúcar (Usina de Açúcar de Alcool São Joaquim – Cândido Mota); Polpa Cítrica (Bagaço de laranja processado - Citrovita – Agroind. Catanduva - SP); torta de algodão (Louis Dreyfus Commodities – Paraguaçu Paulista - SP); farelo de trigo e quirela de arroz (produtores rurais da região de Assis – SP), capim napier (*Pennisetum purpureum*) (produtores rurais da região de Assis – SP) e o substrato T1 (Capítulo 3).

2.1.4. Celulase comercial (E.C.3.2.1.4)

Preparações de celulases (1,4-β-glucanase) de origem microbiana de *Trichoderma reesei* adquirida da empresa AB Enzymes (ROHAMENT® CL) foram utilizadas, com atividade mínima de 15.000 ECU/g, de acordo com a empresa, sendo que esta unidade é definida como a produção de um nmol de açúcar redutor (glicose) em um segundo. Esta enzima foi diluída até as concentrações desejadas em tampão acetato a 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6, para sua utilização na sua forma livre nos ensaios de atividade celulolíticas.



^aTabela 1 – item 2.2.1; ^bItem 2.2.2.3 e Capítulo 3; ^cItem 2.2.2.2 e Capítulo 3; ^dItem 2.2.1; ^eItem 2.2.2;

^fItem 2.2.3; ^gItem 2.2.2.5; ^hItem 2.2.2.6; ⁱItem 2.2.2.7; ^jItem 2.2.2.8; ^kCapítulo 2 –sacarificação e produção de AR.

Figura 1.1: Bioprocesso para obtenção das enzimas fibrolíticas.

2.1.5. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: espectrofotômetro UV/Vis (Ultrospec 1100 Pro - Pharmacia); balança analítica (Gehaka mod. AG 200); incubadora com agitação orbital e controle de temperatura marca Tecnal mod;TE 421 (Piracicaba – SP); Autoclave vertical (Marca Phoenix), estufa (Marca Quimis), fermentador de 2 Litros (BioFlo®/New Brunswick); Moinho de facas (Cienlab); e demais equipamentos em nível analítico.

2.2. Metodologia

2.2.1. Ensaio para pré-seleção do melhor fungo fibrolítico e da melhor caldo nutriente

Nesta etapa do trabalho foi feita uma pré-seleção do melhor fungo para produção de enzimas do complexo fibrolítico, para tanto foi utilizado como fonte de carbono o bagaço de laranja (polpa cítrica) na produção de enzimas celulolíticas, sendo dividido em duas etapas: 1ª) comparados *Trichoderma reesei* QM 9414, *Trichoderma reesei* CCT2768 e o *Aspergillus fumigatus* FS09 (linhagem isolada e identificada em trabalhos anteriores); 2ª) o melhor fungo filamentoso foi cultivado em quatro diferentes meios supridos por diferentes concentrações de nutrientes (SILVA et al., 2013). Para avaliar o potencial celulolítico, tanto dos diferentes fungos quanto dos meios de cultivo estudados, foram realizadas as técnicas de FPase e CMCase, assim como foi feita a avaliação de proteases produzidas.

Os meios de cultura com as diferentes suplementações nutricionais e o substrato lignocelulósico (bagaço de laranja) utilizados nas fermentações e produção dos complexos enzimáticos estão listados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Diferentes substratos utilizados na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

	Meio A ^a	Meio B ^b	Meio C ^b	Meio D ^b
Bagaço de laranja ^c	3,0%	3%	3%	3%
K ₂ HPO ₄	-	0,11%	0,11%	0,11%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4%	0,10%	0,10%	0,10%
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	-	0,0017%	0,0017%	0,0017%
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	-	0,0028%	0,0028%	0,0028%
Extrato de levedura	0,50%	0,25%	0,10%	0,01%
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	0,10%	0,10%
KCl	-	-	0,06%	0,06%
K ₂ SO ₄	0,1%			

^aMeio com poucos nutrientes, utilizado na primeira e segunda etapa; ^bMeios de cultivos utilizados na segunda etapa, ou seja, após a seleção do fungo; ^cPolpa cítrica (m.v⁻¹)

2.2.1.1. Ensaio de comparação entre os diferentes fungos fibrolíticos

Os fungos foram cultivados em placas de petri contendo PDA (45 g.L⁻¹ - potato dextrose agar), após seu crescimento, aproximadamente 7 dias para uma total cobertura da placa, um círculo de 10 mm de diâmetro de PDA contendo os micro-organismos foram transferidos assepticamente para cada Erlenmeyers contendo 80 mL dos meios de cultivos estudados. Assim, nesta primeira etapa foram comparados *Trichoderma reesei* QM 9414, *Trichoderma reesei* CCT2768 e o *Aspergillus fumigatus* FS09 (isolado), cultivados em meio líquido (Meio A – Tabela 1) contendo 3% (m.v⁻¹) bagaço de laranja (polpa cítrica); 0,4% (m.v⁻¹) sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄); 0,5% (m.v⁻¹) de extrato de levedura, em pH 4,5, 28 e 35 °C, a 180 RPM, por 7 dias.

2.2.1.2. Ensaio para definir a melhor concentração do caldo nutriente para o cultivo e produção do complexo enzimático

Na segunda etapa o melhor fungo para produção do complexo enzimático foi cultivado em mais três meios enriquecidos (Tabela 1.1) em pH 4,5 e temperaturas 28 e 35 °C, a 180 RPM, sendo que amostras foram retiradas no 7 e 10º dia de fermentação para obtenção do extrato enzimático e quantificação das atividades celulolíticas e proteolíticas.

2.2.2. Produção do extrato enzimático e substrato residual do *T. reesei* QM 9414

O *Trichoderma reesei* QM 9414 (selecionado no item 3.1.1) foi cultivado para obtenção do extrato enzimático, o caldo nutriente que compôs o meio de cultivo nos demais testes deste trabalho foi o Meio C (item 3.1.1) que por sua vez foi utilizado nas demais etapas deste trabalho.

2.2.2.1. Meio e Condições de Cultivo

Os substratos lignocelulósicos utilizados na fermentação e produção dos complexos enzimáticos estão listados na Tabela 1.2. Os substratos utilizados na produção dos complexos enzimáticos foram utilizados de forma *in natura* (bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja (polpa cítrica), quirera de arroz, torta de algodão) ou pré-tratados (físico-químico – bagaço de cana-de-açúcar (NaOH - Capítulo 2 e ácido – item 2.2.2.3) e Capim napier (*Pennisetum purpureum*) (item 2.2.2.3.2); biologicamente — bagaço de cana-de-açúcar (Capítulo 2), bagaço de cana-de-açúcar (*Rhodotorula mucilaginosa* - item 2.2.2.2.2) e farelo de trigo (*Rhizopus oligosporus* – item 2.2.2.2.1)). Assim, todos os substratos foram cultivados com o *T. reesei* QM 9414 e meio formulado (item 2.1.1), sendo eles suplementados ou não com sacarose ou lactose (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Diferentes substratos utilizados na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

<i>Nomes</i>	<i>Substratos</i>	<i>Complemento^a</i>	<i>Pré-tratamento^b</i>
BC	Bagaço-de-cana	X	X
BC+Lac	Bagaço-de-cana	1% lactose	X
BC_Lev	Bagaço-de-cana	X	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
BC_NaOH	Bagaço-de-cana	X	NaOH-6%/121 °C/45min ^d
BC_NaOH+Sac	Bagaço-de-cana	1% sacarose	NaOH-6%/121 °C/45min ^d
BC_ácido	Bagaço-de-cana	X	Ácido Sulfúrico-0,1%/60 °C/ 12 hrs ^e
BC_ácido+Sac	Bagaço-de-cana	1% sacarose	Ácido Sulfúrico-0,1%/60 °C/ 12 hrs
Ftrigo_olig	Farelo de trigo	X	<i>Rhizopus oligosporus</i>
BLara	Bagaço de laranja	X	X
BLara+Lac	Bagaço de laranja	1% lactose	X
BLara+Sac	Bagaço de laranja	1% sacarose	X
BLara+BC ^c	Bagaço de laranja	X	X
	+ Bagaço-de-cana		
BLara+BC+Lac	Bagaço de laranja	1% lactose	X
	+ Bagaço-de-cana		
QArroz	Quirera de arroz	X	X
QArroz+Sac	Quirera de arroz	1% sacarose	X
TortAlg	Torta de Algodão	X	X
Napier	Capim napier	X	X
Napier+Sac	Capim napier	1% sacarose	X
Napier_Trat	Capim napier	X	121 °C/15min ^f
Napier_Trat+Sac	Capim napier	1% sacarose	121 °C/15min ^f
T1	Bagaço-de-cana + nutrientes	X	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^g
T1+Sac	Bagaço-de-cana + nutrientes	1% sacarose	<i>Pleurotus ostreatus</i> ^g

^a1% de lactose ou sacarose (m.v⁻¹); ^bPré-tratamentos biológicos feitos com fermentações dos respectivos micro-organismos; ^cBagaço de Laranja + Bagaço de cana-de-açúcar (1:1 – m.m⁻¹); ^dCapítulo 2; ^eMétodo adaptado de YANG et al. (2005); ^fItem 2.2.2.3.2; ^gCapítulo 3.

2.2.2.2. Pré-tratamento biológico

Os substratos farelo de trigo e bagaço de cana (Tabela 1.1) foram pré-tratados por diferentes fungos, visando uma abertura das fibras, para posteriormente serem utilizados como substrato e produção dos complexos enzimáticos.

2.2.2.2.1. Pré-tratamento biológico do Farelo de Trigo

O farelo de trigo foi pré-tratado utilizando o fungo *Rhizopus oligosporus*. O cultivo consistiu de inoculação asséptica de 10^8 esporos de *R. oligosporus* x mL⁻¹ em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de farelo de trigo e solução nutriente: 2,5% (m.v⁻¹) - (NH₄)₂SO₄; 1,25% (m.v⁻¹) - KH₂PO₄; 1,25% (m.v⁻¹) – ureia; 60% (m.v⁻¹) de umidade, por 5 dias a 30 °C em cultivo estático de fermentação em estado sólido (FEs) (FREITAS et al., 2014). Após esse período de incubação foi obtida a biomassa lignocelulolítica residual de farelo de trigo pré-tratada.

2.2.2.2.2. Pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana foi pré-tratado com leveduras celulolíticas (*Rhodotorula mucilaginosa*), através da inoculação asséptica no bagaço de cana-de-açúcar de 10^6 células x mL⁻¹ da levedura em 100 mL de meio contendo: 5% (m.v⁻¹) de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e solução nutriente: 0,2% (m.v⁻¹) - extrato de levedura; 0,13% (m.v⁻¹) - (NH₄)₃PO₄; 0,1% (m.v⁻¹) - (NH₄)₂SO₄; 0,031% (m.v⁻¹) - K₂SO₄; 0,0028% (m.v⁻¹) - ZnSO₄; 0,0012% (m.v⁻¹) - MnSO₄; 0,024% (m.v⁻¹) - MgSO₄; em pH 5,5 e fermentação submersa (FSm). A FSm ocorreu em agitador orbital a 180 RPM, 28 °C por 120 h. Assim, posteriormente a esse tempo de fermentação, foi obtida a biomassa lignocelulolítica de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada.

2.2.2.2.3. Preparação das biomassas residuais

As biomassas residuais dos pré-tratamentos biológicos (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar) foram secas em estufa a 50 °C por 48 h e moídas em moinho de facas, originando os substratos *BC_Lev* e *Ftrigo_olig*, (Tabela 1.2), posteriormente esses substratos foram utilizados em meio formulado (*item 2.2.2.4*) para produção de enzimas fibrolíticas pelo *Trichoderma reesei* QM 9414.

2.2.2.3. Pré-tratamento físico-químico

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BC) foi usado como substrato nos pré-tratamentos. Esta biomassa foi sujeita aos tratamentos: ácido (*item 2.2.2.3.1*) e alcalino (Capítulo 2), assim gerando um substrato de celulose parcialmente deslignificado (CPD – *BC_NaOH* ou *BC_acid* – Table 2). Esses

pré-tratamentos foram realizados para aumentar o teor de celulose nos materiais através da remoção da fracção de hemicelulose e eliminação parcial da fracção de lignina, respectivamente.

2.2.2.3.1. Pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado quimicamente utilizando-se de uma pré-hidrólise alcalina a 121 °C (1 atm) com a adição de 100 g de substrato moído (250 a 450 µm) em 200 mL de NaOH (6% - m.v⁻¹) no tempo de 45 minutos em autoclave, técnica modificada de VÁSQUER et al. (2007). Posteriormente, o substrato pré-tratado foi lavado com água deionizada para corrigir o pH (6,0), triturado por 20 minutos a 3000 RPM e seco em estufa 50 °C por 48 h (Capítulo 2).

O pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar, técnica de YANG et al. (2005) modificada, consiste em duas etapas: A primeira foi uma hidrólise ácida em baixa temperatura (60 °C), utilizando 100 g de substrato moído (250 a 450 micrômetros) em 900 mL de ácido sulfúrico a 0,1% (v.v⁻¹). A mistura foi colocada em fermentador de 2 L a 60 °C por 12 horas e 200 RPM. Em seguida o substrato pré-hidrolisado foi filtrado e lavado com água deionizada para corrigir o pH (6,0). Na segunda etapa foi realizada uma pré-hidrólise sobre pressão sem adição de ácido no substrato (bagaço pré-tratado resultante da primeira etapa). Assim, o bagaço de cana-de-açúcar pré-hidrolisado (pH 6,0) foi submetido à autoclave nas condições de 45 min e 121 °C (1 atm). Posteriormente, o substrato foi diluído na proporção 1:12 com água destilada e triturado por 20 minutos a 3000 RPM e secados em estufa 50 °C por 48 h. Os substratos residuais de ambos os pré-tratamentos químicos (alcalino – Capítulo 2 e ácido) originaram os substratos *BC_NaOH* e o *BC_ácido* (Tabela 1.2). Estas biomassas foram utilizadas, em um momento posterior, com meio formulado para produção de enzimas fibrolíticas pelo *T. reesei* QM 9414.

2.2.2.3.2. Pré-tratamento físico do Capim Napier

O Capim Napier foi pré-tratado por ação física da temperatura, para uma maior abertura das suas fibras, visando uma maior produção de enzimas quando cultivado. O protocolo para seu pré-tratamento foi: 2,4 gramas do

substrato foram pesados (3% em relação ao volume da fermentação submersa (FSm) – *item 2.2.2.4*) e autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Após essa etapa, a biomassa residual foi seco em estufa a 50 °C por 48 h, originando o substrato *Napier_Trat* (Tabela 1.2). Esse substrato foi utilizado em meio formulado para produção de enzimas fibrolíticas pelo *Trichoderma reesei* QM 9414.

2.2.2.4. Cultivo do *T. reesei* QM 9414 em incubadora orbital (80 mL) – protocolos em pequena escala

O cultivo de *Trichoderma reesei* QM 9414 para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas com os substratos *in natura* ou pré-tratados (Tabela 1.2) seguiu a seguinte metodologia (SILVA et al., 2016): um círculo de 10 mm de diâmetro de PDA com o fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 foi transferida, assepticamente, para Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de meio formulado: 3% (m.v⁻¹) do substrato e solução nutriente: 0,11% (m.v⁻¹) - K₂HPO₄; 0,1% (m.v⁻¹) - (NH₄)₂SO₄; 0,0017% (m.v⁻¹) - MgSO₄.7H₂O; 0,0028% (m.v⁻¹) - ZnSO₄.7H₂O; 0,1% (m.v⁻¹) - extrato de levedura; 0,1% (m.v⁻¹) - NH₄H₂PO₄; 0,06 % (m.v⁻¹) – KCl (Tabela 1.1). Para alguns substratos foram realizadas uma suplementação: 1% (m.v⁻¹) - sacarose ou 1% (m.v⁻¹) – lactose (Tabela 1.2). Os meios formulados foram autoclavados a 121 °C por 15 min e em seguida colocados em uma incubadora a 180 RPM, 28 °C e pH 4,5. Amostras dos extratos produzidos no cultivo foram retiradas assepticamente nos 3º, 5º, 7º, 10º e 15º dias de cultivo para quantificação dos complexos enzimáticos pelas técnicas de atividades celulolíticas (FPase – *item 2.2.3.1*, CMCase – *item 8.2.3.2* e Exoglucanase – *item 2.2.3.3*) e xilanolíticas (*item 2.2.3.4*).

2.2.2.5. Planejamento Experimental (DCCR²) na produção do complexo fibrolítico para duas variáveis independentes (pH e Temperatura)

O substrato que melhor produziu enzimas do complexo fibrolítico durante a etapa do cultivo em incubadora orbital (80 mL – *item 2.2.2.4*), quantificadas pelas atividades celulolíticas e xilanolíticas (*item 2.2.3*), foi reavaliado usando o delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes e, assim, essa metodologia de superfície-resposta foi feita para

reavaliar a produção das enzimas pelo fungo *T. reesei* QM 9414. O planejamento experimental (DCCR²) utilizou como variáveis independentes o pH e a temperatura.

A produção do extrato enzimático foi feita em 11 experimentos (4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e triplicata no ponto central - DCCR de 2²), com a pH e temperaturas como variáveis independentes, e as atividades celulolíticas e xilanolíticas como a variável dependente (Tabela 1.3). A FSm foi realizada utilizando as condições pré-definidas, em que foram adicionados 3% (m.v⁻¹) dos dois substratos selecionados, Bagaço de laranja e T1, ambos suplementados com 1% de sacarose, e o caldo nutriente. O micro-organismo selecionado foi o *T. reesei* QM 9414, no melhor tempo de produção enzimática, 10 ou 15 dias, dependendo da enzima de interesse.

2.2.2.6. Culturas em fermentador com agitação (2 Litros - Escala de laboratório em fermentador)

O melhor resultado dos substratos testados na produção dos complexos enzimáticos durante o protocolo de cultivo em incubadora orbital (80 mL – *item 2.2.2.4*), assim como as melhores condições determinadas na matriz experimental (temperatura e pH – *item 2.2.2.5*), foram utilizadas para definição das condições do cultivo no fermentador de 2 Litros (BioFlo- New Brunswick Cientific) para posterior quantificação das enzimas fibrolíticas.

Assim, seguiu-se a seguinte metodologia de cultivo submerso: o pré-inóculo foi preparado com transferência de dois círculos de 10 mm de diâmetro de PDA (45 g.L⁻¹ - potato dextrose agar), previamente inoculada com o fungo *Trichoderma reesei* QM 9414, assepticamente para Erlenmeyers de 250 mL contendo 30 mL de meio líquido formulado com 4% (m. v⁻¹) – sacarose; 0,11% (m.v⁻¹) - K₂HPO₄; 0,1% (m.v⁻¹) - (NH₄)₂SO₄; 0,0017% (m.v⁻¹) - MgSO₄.7H₂O; 0,0028% (m.v⁻¹) - ZnSO₄.7H₂O; 0,1% (m.v⁻¹) - extrato de levedura; 0,1% (m.v⁻¹) - NH₄H₂PO₄; 0,06 % (m.v⁻¹) - KCl. O meio formulado foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e colocados em 180 RPM, 28°C e pH 4,5 (SILVA et al., 2016) no período de 4 a 6 dias para o crescimento do fungo no meio líquido. Posteriormente, o pré-inóculo (30 mL) foi inoculado em 1800 mL do meio de cultivo formulado com o substrato selecionado e os nutrientes já descritos

(Meio C – *item 3.1.1*) e as melhores condições de pH e temperatura pré-determinadas. O período total de cultura foi de 15 dias, e as condições físico-químicas foram mantidas pelo sistema automático de controle do fermentador, como a agitação, pH, aeração, temperatura e anti-espuma. A temperatura foi mantida a 28 °C (*item 3.3*) e agitação de 250 RPM. A concentração do oxigênio dissolvido (DO) foi monitorada como uma função do tempo pela aeração, em uma taxa de 1,7 L.min⁻¹. O pH foi mantido em 4.5±0.2 (*item 3.3*) e foi controlado pela adição automática de HCl (0,2 mol.L⁻¹) ou NaOH (0,2 mol.L⁻¹). A espuma foi controlada pela adição automática de agente antiespumante. As amostras de extrato enzimático foram coletadas assepticamente no 3º, 5º, 7º, 10º e 15º dias de cultivo e todas as amostras foram quantificadas para as enzimas do complexo fibrolítico (celulases e xilanases – *item 2.2.3*).

Tabela 1.3: DCCR (2²) para a produção dos complexos enzimáticos pelo *T. reesei* QM 9414.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	26,5	3,8
2	-1	+1	26,5	5,2
3	+1	-1	33,5	3,8
4	+1	+1	33,5	5,2
5	-1,41	0	25,0	4,5
6	+1,41	0	35,0	4,5
7	0	-1,41	30,0	3,5
8	0	+1,41	30,0	5,5
9	0	0	30,0	4,5
10	0	0	30,0	4,5
11	0	0	30,0	4,5

* Melhor substrato determinado na etapa anterior do trabalho.

2.2.2.7. Caracterização do complexo enzimático: influência da temperatura, pH e termoestabilidade.

A estabilidade térmica do complexo celulolítico foi avaliada para a atividade de celulases totais (FPase - FPU/ml – *item 2.2.3.1*) (extrato enzimático correspondente a uma produção ótima em fermentação) foi determinada por ensaios de atividade em diferentes temperaturas de reação (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C) em tampão acetato (pH 5.6 – 0,2 mol.L⁻¹). Subsequentemente, a atividade de FPase (FPU/mL) foi avaliada em

diferentes soluções tampão (citrato-fosfato ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) para pH 3.0 a 7.0; fosfato ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) para pH 7.0 a 8.0; Tris-HCl ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) para pH 8.0 a 9.0; e glicina-NaOH ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) para pH 9.0-10.0, em 50°C e 60 minutos de reação.

A termoestabilidade da atividade residual de celulases total do extrato fibrolítico foi obtida através da incubação em temperatura na maior estabilidade pré-determinada nos testes anteriores, assim como, no pH mais estável, por 1 hora na ausência de substrato. Posteriormente, a atividade residual foi mensurada pela técnica de FPase (FPU/mL) em diferentes tempos de incubação (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutos).

2.2.2.8. Concentração do extrato enzimático

Após o processo de obtenção do melhor substrato como fonte de carbono, seu cultivo nas melhores condições pré-determinadas e em fermentador de 2 litros, foi feita a concentração do extrato enzimático produzido. Esta etapa visou à elevação das atividades celulolíticas e xilanolíticas.

2.2.2.8.1. Ensaio de estabilidade da temperatura

Em um primeiro momento foi feito ensaios de estabilidade da temperatura pelo tempo utilizando o extrato produzido no fermentador. Desta forma, amostras do substrato (*T1+Sac – item 3.4.2*) foram diluídas para 50% e colocados em incubação nas temperaturas: 30, 35, 40 e 45°C no período de 1, 5, 10, 15, 24 e 48 horas. As amostras foram quantificadas perante as diferentes atividades fibrolíticas: Celulases totais, Endoglucanase, Exoglucanase e Xilanase. Assim, foi determinada a temperatura mais estável para a realização do protocolo de concentração enzimática.

2.2.2.8.2. Concentração do extrato fibrolítico em fermentador em temperatura constante e a vácuo

Após determinar os melhores substratos para atividades celulolíticas e xilanolíticas (*T1+Sac* e *BLara+Sac – item 3.2*) e cultivados nas condições pré-definidas em experimentos anteriores, os extratos produzidos pelo *T. reesei*

QM 9414 em fermentador de 2 litros foram concentrados em fermentador com temperatura constante (*item 3.6.1*) e sob a pressão negativa (vácuo).

Desta forma, os experimentos seguiram o seguinte protocolo: 400 mL do extrato produzido foram colocados em um fermentador de 2 litros e mantidos em temperatura pré-definida constante, com rotação de 60 RPM, pressão negativa proporcionada por uma bomba a vácuo, e no tempo necessário para reduzir pela metade o volume inicial. Posteriormente, amostras foram coletadas e quantificadas perante as diferentes atividades fibrolíticas.

2.2.3. Procedimentos analíticos

2.2.3.1. Determinação das Celulases Totais (Atividade de Papel de Filtro - FPase)

A atividade de celulases totais do extrato produzido pelos fungos e da enzima comercial foi medida através da técnica de FPase, no qual uma solução com 0,5 mL de extrato celulolítico ou solução enzimática é adicionada 1 mL de solução tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹ e pH 5,6, e uma tira de 0,5 X 3,0 cm ou 0,016 g de papel Whatman n°1 foi colocada para reagir por 1 h a 50 °C (MANDELS et al., 1976), assim, ocorrendo a hidrólise da celulose do papel, liberando açúcares redutores (glicose), quantificados no início e após 60 minutos de reação. A liberação de açúcar redutor foi quantificada a partir da amostra obtida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959) e a curva de calibração foi preparada com glucose (sigma).

A unidade utilizada para determinação da atividade de celulases totais foi a unidades de FPase (Filter Paper Units) por volume de enzima ou FPU/mL, no qual 1 FPU é a liberação de 1 micromol de açúcar redutor por min por mL de enzima nas condições descritas.

Para o cálculo da atividade enzimática segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente em mols (2,0/0,18016 µmol) do volume de enzima adicionada a cada ensaio (0,5 mL), e no tempo de incubação requerido (60 minutos) para a geração dos equivalentes (enzima diluída), para quando necessário. Este conceito é mostrado na equação 1.

Equação 1

$$\frac{FPU}{mL} = \left(\frac{2,0}{0,1816 \cdot 0,5 \cdot 60} \right) \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

$$\frac{FPU}{mL} = \left(\frac{0,37}{\text{concentração [enzima diluída] da enzima que libera 2 mg de glicose}} \right)$$

2.2.3.2. Determinação da Endoglucanase (CMCase)

A atividade da endoglucanase foi determinada através da determinação de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboximetilcelulose (CMC), seguindo a técnica de GHOSE (1987) modificada.

Em tubos de ensaio 100 µL extrato celulolítico ou solução foi adicionada em 650 µL de suspensão de carboximetilcelulose (CMC) (Sigma) 0,5% (m.v⁻¹) em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹ e pH 5,6. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos seguidos por um resfriamento imediato no gelo por 5 minutos. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959) e a curva de calibração foi preparada com glucose (sigma).

Uma unidade de atividade celulolítica endoglucanase ou CMCase (carboximetilcelulase) foi expressa em U/mL, e é definida como de 1 µmol de açúcar redutor por minuto e por de enzima a partir do substrato CMC (carboximetilcelulose), conforme protocolo descrito neste item.

O cálculo da atividade segundo Ghose (1987) modificado baseia-se no conceito da unidade da atividade de Endoglucanase (CMC), a qual é a liberação de exatamente 0,5 mg de glicose equivalente em mols (0,5/0,18016), convertida por 0,1 mL de extrato enzimático em 10 minutos de reação. Este conceito é mostrado na equação 2.

Equação 2

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{0,5}{0,1816 \cdot 0,1 \cdot 10} \right) \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{2,75}{\text{concentração [enzima diluída] da enzima que libera 0,5 mg de glicose}} \right)$$

2.2.3.3. Determinação da Exoglucanase (Avicelase)

A atividade avicelase foi feita através da determinação de açúcares redutores liberados durante a degradação do avicel, seguindo a técnica descrita por TANAKA et al. (1981) modificada.

Em tubos de ensaio, 100 µL extrato celulolítico foram adicionados em 650 µL de suspensão de Avicel (Sigma) a 0,5% em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹ e pH 5,6. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos seguidos por um resfriamento imediato. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método DNS (MILLER, 1959) e a curva de calibração foi preparada com glucose (sigma).

A unidade de atividade celulolítica foi expressa em U/mL, sendo definida como de 1 µmol de AR liberado por minuto, por mL de enzima a partir do substrato Avisel hidrolisado.

O cálculo da atividade segundo Ghose (1987) modificado baseia-se no conceito da unidade da atividade de Exoglucanase (Avicelase), a qual é a liberação de exatamente 0,5 mg de glicose equivalente em mols (0,5/0,18016), convertida por 0,1 mL de extrato enzimático em 30 minutos de reação. Este conceito é mostrado na equação 3.

Equação 3

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{0,5}{0,1816 \cdot 0,1 \cdot 30} \right) \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{0,917}{\text{concentração [enzima diluída] da enzima que libera 0,5 mg de glicose}} \right)$$

2.2.3.4. Determinação das Xilanases

A atividade xilanase foi feita através da determinação de açúcares redutores liberados durante a degradação da xilana (sigma), seguindo a técnica de GOMES et al (1992) modificada.

Em tubos de ensaio, 100 µL extrato xilanolítico foram adicionados em 650 µL de suspensão de xilana (Sigma) a 0,5% em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹

e pH 5,6. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos seguidos por um resfriamento imediato. O açúcar redutor (xilose) liberado foi quantificado pelo método DNS (MILLER, 1959) e a curva de calibração foi preparada com xilose (sigma).

A unidade de atividade xilanolíticas foi expressa em U/mL, sendo definida como de 1 µmol de xilose liberado por minuto, por mL de enzima a partir do substrato hidrolisado.

O cálculo da atividade segundo Ghose (1987) modificado baseia-se no conceito da unidade da atividade de Xilanase, a qual é a liberação de exatamente 0,5 mg de xilose equivalente em mols (0,5/0,15013), convertida por 0,1 mL de extrato enzimático em 10 minutos de reação. Este conceito é mostrado na equação 4.

Equação 4

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{0,5}{0,15013 \cdot 0,1 \cdot 10} \right) \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{3,33}{\text{concentração [enzima diluída] da enzima que libera 0,5 mg de xilose}} \right)$$

2.2.3.5. Determinação do Açúcar Redutor

A liberação de açúcar redutor foi quantificada a partir da amostra obtida e pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

2.2.3.6. Determinação da atividade por grama de substrato

Os cálculos e resultados obtidos nas análises de atividades enzimáticas foram em atividade volumétrica, entretanto para uma melhor avaliação do real custo da produção das enzimas é necessário converter esses resultados em atividade por grama de substrato gasto. Para tanto, o cálculo para conversão é mostrado na equação 5.

Equação 5

$$\frac{\text{Atividade enzimática (U)}}{\text{g de substrato}} = \frac{\text{Atividade volumétrica} \times \text{Volume produzido (mL)}}{\text{Quantidade de substrato utilizado (g)}}$$

2.2.3.7. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica da enzima foi determinada pela hidrólise de azocaseína sulfanilamida, de acordo com o método de LEIGHTON et al. (1973), no qual foram misturados 250 μL de solução de azocaseína a 1% com 150 μL de solução de enzima para as amostras do extrato produzido. Essas soluções foram incubadas em banho-maria a 40 °C por 30 minutos e a reação interrompida com ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Esse material, então, depois de centrifugado, foi misturado a uma solução de NaOH a 1,0 mol.L⁻¹ para estabelecer a coloração, a qual foi identificada espectrofotometricamente em $\lambda = 440 \text{ nm}$.

A unidade de atividade volumétrica (U/mL) foi definida como a variação de absorbância por 30 minutos, por mL da solução de enzima. A atividade total (U) foi determinada por meio do produto da atividade volumétrica pelo volume total de solução utilizada para realizar o teste da azocaseína (0,150 mL).

2.3. Tratamento Estatístico

Os testes de atividades enzimáticas foram conduzidos em triplicata e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa estatístico GraphPad Instat – versão 3.05 (Rutgers University). As análises de superfície resposta das matrizes experimentais foram feitas no programa Statistica – versão 7.0. Os gráficos foram feitos no programa OriginPro – versão 9.1 64Bit. Os experimentos foram analisados e considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Pré-seleção do fungo fibrolítico e complementação nutricional do meio

3.1.1. Ensaio de pré-seleção do fungo

A partir de um trabalho de screening e seleção de linhagens isoladas ou de coleção de cultura de fungos fibrolíticos (SILVA, 2012) foram escolhidos três fungos relacionados na Tabela 1.4 para o desenvolvimento do presente trabalho. Esta etapa do trabalho visou à identificação do melhor fungo para produção do complexo fibrolítico. Após o cultivo e obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada as técnicas de Celulases Totais (FPase – FPU/mL) e Endoglucanase (CMCase – U/mL), e os resultados estão apresentados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4: Comparação entre os diferentes fungos na produção de Celulases Totais (FPase – FPU/mL) e Endoglucanase (CMCase – U/mL).

Fungos*	FPU/mL (FPase)		U/mL (CMCase)	
	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C
<i>T.reesei</i> CCT2768	0,08±0,03 ^a	0,09±0,02 ^{a'}	0,95± 0,00 ^I	0,94± 0,13 ^{I'}
<i>T.reesei</i> QM 9414	0,15±0,02 ^b	0,11±0,02 ^{c'}	1,17± 0,13 ^{II}	0,79± 0,11 ^{III'}
<i>A. fumigatus</i> FS09	0,07±0,01 ^d	0,07±0,00 ^{d'}	0,70± 0,16 ^{III}	0,36± 0,07 ^{IV'}

*Meio A - 3% (m.v⁻¹) de bagaço de laranja (polpa cítrica); 0,4% (m.v⁻¹) de sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄); 0,5% (m.v⁻¹) de extrato de levedura; 28 e 35°C, pH 4,5, 180 RPM em 7 dias de cultivo. Diferentes letras e números indicam que são estatisticamente diferentes ($p<0.05$).

O fungo que apresentou maior atividade enzimática nesta etapa do trabalho, considerando a técnica de FPase, foi o *T.reesei* QM 9414 com 0,15±0,02 FPU/mL (28 °C) e 0,11±0,02 FPU/mL (35 °C). Ambos os resultados foram muito superiores ao maior valor apresentado pelo *T. reesei* CCT2768 (0,09±0,02 FPU/mL – 35 °C) e pelo *A. fumigatus* FS09 (0,07±0,01 FPU/mL – 28 °C) ($p<0,05$) (Tabela 1.4). Para a técnica de CMCase o fungo com maior atividade enzimática igualmente foi o *T. reesei* QM 9414 com 1,17±0,13 U/mL (28 °C), seguido pelo *T. reesei* CCT2768 (0,95±0,00 FPU/mL – 28 °C)

($p < 0.05$). Contudo, ambos foram muito superiores ao maior valor apresentado pelo *A. fumigatus* FS09 ($0,7 \pm 0,16$ U/mL em 28 °C e pH 4,5) ($p < 0,05$) (Tabela 1.1). Assim, com os resultados e dados obtidos foi o *T.reesei* QM 9414 em 28 °C.

3.1.2. Ensaio para determinar o melhor caldo nutriente

Com base nos resultados apresentados na etapa anterior (item 3.1.1.1), o *T. reesei* QM 9414 foi fermentado em quatro diferentes meios de cultivos (Tabela 1.1), visando determinar o caldo nutriente que melhor se adequasse na produção das enzimas fibrolíticas e, assim, ser utilizado nas demais etapas desse trabalho. As condições físico-químicas de cultivo já foram apresentadas, tendo pH 4,5 e temperaturas de 28 e 35 °C. Desta forma, após o cultivo e fermentação desse fungo (7 e 10 dias) nos meios propostos, os complexos enzimáticos foram quantificados pelas técnicas de FPase (Celulases Totais) e CMCase (Endoglucanase), assim como, as proteases pela técnica da Azocaseína. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.5.

O Meio C apresentou os maiores valores de atividades com $0,45 \pm 0,06$ FPU/mL e $1,86 \pm 0,09$ U/mL em 7 dias de cultivo e $0,57 \pm 0,09$ FPU/mL e $2,89 \pm 0,20$ U/mL em 10 dias de cultivo. Uma análise estatística de comparação entre os diferentes tempos demonstrou que houve uma diferença significativa entre as médias de atividade celulolítica entre o 7º e o 10º dia, obtendo o pico de produção enzimática ($p < 0,05$), evidenciando que um maior tempo de cultivo favorece o crescimento dos fungos e a produção de complexos enzimáticos (Figura 1.2 e Figura 1.3), contudo cabe ressaltar que em tempos mais longos as reservas nutricionais e o acúmulo de compostos tóxicos iriam induzir a morte dos micro-organismos, para o tipo de fermentação submersa estudada no presente trabalho.

O Meio A, que possui baixos valores nutricionais, apresentou os menores resultados somente $0,09 \pm 0,04$ FPU/mL e $1,02 \pm 0,08$ U/mL, ambos para 28 °C e 10 dias de cultivo (Tabela 1.5 e Figuras 2.2 e 2.3), esse fato demonstra a necessidade de uma suplementação nutricional para o crescimento e produção dos complexos enzimáticos. Assim, o Meio

enriquecido C aumentou 7,5 vezes a atividade Celulase Total e de 7,6 vezes de Endoglucanase, quando comparado ao Meio A. Para o cultivo em 10 dias ocorreu um acréscimo de aproximadamente 27% para ambas as atividades FPase e 55% para atividade endoglucanase entre o 7º e o 10 dia de cultivo.

Tabela 1.5: Atividade Enzimática para celulase total (FPase), endoglucanase (CMCase) e protease nas fermentações com o *T. reesei* QM 9414.

Meios *	Dias	FPU/mL (Celulases Totais)		U/mL (Endoglucanase)		U/mL (Protease)	
		28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C
Meio A	7	0,06±0,02 ^a	0,03±0,02 ^a	0,60±0,05 ^I	0,65±0,02 ^I	0,75±0,12 ^m	0,62±0,10 ^m
Meio B		0,16±0,06 ^b	0,12±0,02 ^b	1,03±0,22 ^{II}	0,95±0,29 ^{II}	0,28±0,06 ⁿ	0,31±0,06 ⁿ
Meio C		0,45±0,06 ^d	0,23±0,04 ^c	1,86±0,09 ^{III}	1,02±0,57 ^{II}	0,11±0,06 ^o	0,12±0,06 ^o
Meio D		0,18±0,02 ^b	0,13±0,04 ^b	1,37±0,03 ^{IV}	1,26±0,09 ^{IV}	0,00±0,00	0,00±0,00
Meio A	10	0,09±0,04 ^b	0,02±0,02 ^a	1,02±0,08 ^{II}	0,55±0,05 ^I	1,16±0,02 ^p	0,80±0,11 ^m
Meio B		0,25±0,10 ^c	0,17±0,03 ^b	2,17±0,07 ^v	2,11±0,10 ^v	0,42±0,09 ^q	0,59±0,09 ^q
Meio C		0,57±0,09 ^e	0,29±0,04 ^c	2,89±0,20 ^{VI}	2,13±0,09 ^v	0,21±0,02 ⁿ	0,23±0,05 ⁿ
Meio D		0,26±0,03 ^c	0,20±0,04 ^b	2,12±0,80 ^v	2,09±0,30 ^v	0,00±0,00	0,00±0,00

*Tabela. 1.1 – composição dos meios. Fermentação submersa (FSm – 7 e 10 dias) em 28 e 35°C, pH 4,5, 180 RPM. Diferentes letras e números indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). FPU – Filter Paper Unit – atividade de hidrólise no papel de filtro, CMC – carboximetilcelulase ou atividade endoglucanase.

Ao comparar o Meio C com o Meio D, fica evidente a necessidade de uma suplementação de proteína, pois ao reduzir a concentração de 0,1% ($m \cdot v^{-1}$) (Meio C) para 0,01% ($m \cdot v^{-1}$) (Meio D) de extrato de levedura, a produção das enzimas celulolíticas foi prejudicada, caindo de 0,57±0,09 FPU/mL e 2,89±0,20 U/mL para 0,26±0,03 FPU/mL e 0,20±0,04 U/mL, (28 °C e 10 dias de cultivo) ($p < 0,05$) (Tabela 1.5 e Figura 1.2). Contudo a presença do $NH_4H_2PO_4$ (0,1% - $m \cdot v^{-1}$) mostrou-se crucial para uma boa produção enzimática, visto que sua adição no meio de cultivo fez a produção de enzimas celulolíticas se elevarem em até 2,3 vezes para as Celulases Totais e de 1,7 vezes para as Endoglucanases (28 °C e 10 dias de cultivo).

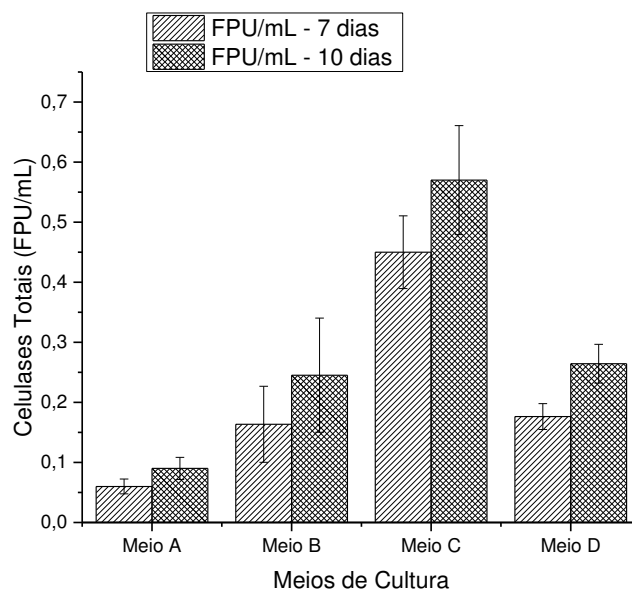


Figura 1.2: Atividades de Celulases Totais (FPase – FPU/mL) para o 7 e 10º de cultivo. Ver Tabela 1.1 com composição dos meios.

O meio A foi o mais efetivo em atividade proteolítica, sendo a maior atividade em 10 dia de cultivo, com $1,16 \pm 0,02$ U/mL. Porém quando as demais atividades enzimáticas analisadas são comparadas (Celulases Totais e Endoglucanase – Tabela 1.5) fica evidente que esses valores são invertidos (Figura 1.4).

O Meio C, que demonstrou maior eficiência na produção das enzimas do complexo fibrolítico, obteve para 10 dias de cultivo $0,57 \pm 0,09$ FPU/mL e $0,29 \pm 0,04$ U/mL (28 °C), tendo uma queda de atividade de aproximadamente 1,3 a 2 vezes com 35 °C. ($p < 0,05$). O mesmo acontecendo para as proteases produzidas, em que no Meio A (28 °C) conseguiu-se $1,16 \pm 0,02$ U/mL contra $0,80 \pm 0,11$ U/mL (35 °C) ($p < 0,05$), ambos em 10 dias de cultivo (Tabela 1.5). Esses resultados demonstra que a elevação da temperatura causa uma perda de rendimento do crescimento dos fungos, o que reflete diretamente na produção dos complexos enzimáticos.

Nessa primeira etapa de pré-seleção ficou evidente que o melhor fungo para a produção do complexo fibrolítico foi o *T. reesei* QM 9414, sendo este um fungo já muito utilizado para a produção de celulases (CHOKHAWALA, et al., 2015; HÄKKINEN et al., 2015; SHARMAA & ARORAB, 2015). O meio C consistiu na melhor composição de nutrientes para produção enzimática devido

a uma concentração intermediária de extrato de levedura. Este último é considerado um fator crucial para a produção deste complexo enzimático (HAQ et al., 2006; SHARMAA & ARORAB, 2015; SILVA et al., 2016).

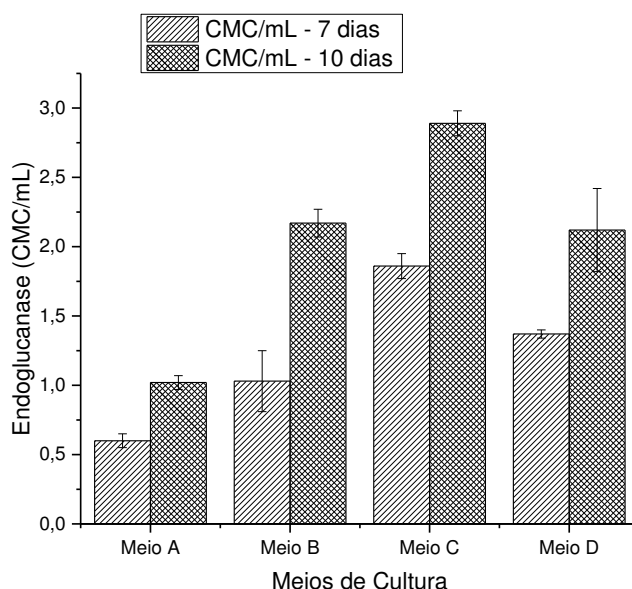


Figura 1.3: Atividades de Endoglucanase (CMCase – U/mL) para o 7 e 10º de cultivo.

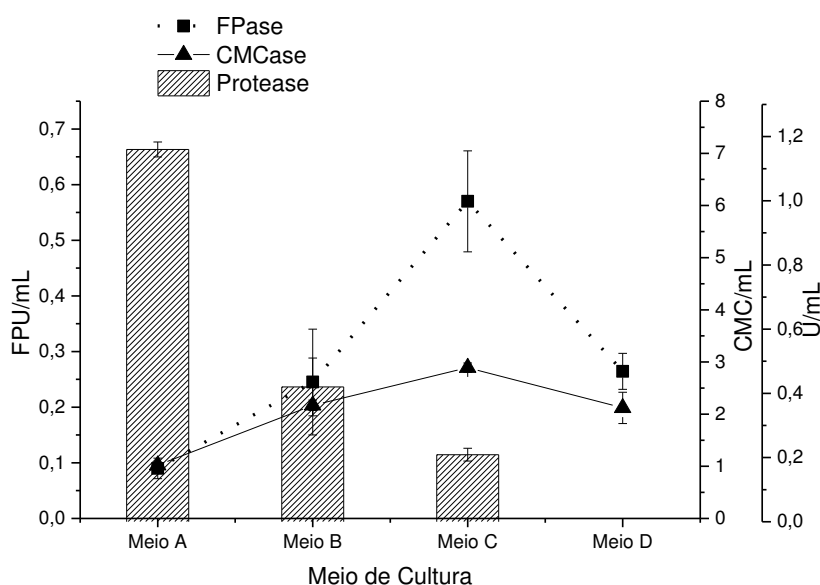


Figura 1.4: Diferentes enzimas produzidas (Celulases Totais, Endoglucanase e Proteases) para os meios estudados, em 10 dias de cultivo.

Porém é importante salientar que uma elevada concentração de extrato de levedura (extrato de levedura – Meio A – 0,50%) estimulou a produção de proteases (Tabela 1.5 e Figura 1.4). Portanto, mesmo que o Meio A tenha sido

inferior na produção de celulases ($0,09 \pm 0,04$ FPU/mL e $1,02 \pm 0,08$ U/mL – 28 °C e 10 dias), apresentou maiores resultados para proteases ($0,75 \pm 0,12$ e $1,16 \pm 0,02$ U/mL, respectivamente 7 dias e 10 dias de cultivo ($p < 0,05$), quando comparados aos demais meios de cultivo (Tabela 1.5). Assim, no presente trabalho verificou-se que ao diminuir a concentração do extrato de levedura de 0,5% para 0,01% (Tabela 1.1) diminuiu a produção da protease. Já a produção de celulases (FPases) foi máxima num valor intermediário (0,1%). Outros trabalhos corroboram esta relação entre a produção de proteases e meios mais ricos em proteínas. HAAD et al. (1990) obtiveram resultados semelhantes a dessa pré-seleção, trabalhando com *T. reesei* QM 9414. A produção de proteases pelos fungos, principalmente em meios ricos em nutrientes a base de proteínas, pode ser um fator negativo na obtenção das enzimas de interesse, visto que as enzimas fibrolíticas poderiam ser degradadas pelas enzimas proteolíticas (HAAB et al., 1990; SILVA et al., 2016).

3.2. Influencia da fonte de carbono na produção do complexo enzimático por *T. reesei* QM 9414 em “incubadora orbital”

Em uma primeira etapa deste estudo, os experimentos foram concebidos para avaliar os efeitos da fonte de carbono na produção de enzimas fibrolíticas pelo fungo *T. reesei* QM 9414 em fermentação submersa (FSm). Assim, foram utilizados diferentes biomassas lignocelulósicas, em grande parte formada por resíduos agroindustriais, como substrato: Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* ou com diferentes pré-tratamentos; farelo de trigo; bagaço de laranja (polpa cítrica); bagaço de laranja (polpa cítrica) e bagaço de cana (1:1); quirera de arroz; torta de algodão, Capim Napier *in natura* ou pré-tratado; e o composto T1 obtido do cultivo de *P. ostreatus* (Capítulo 3), sendo que os resultados para a produção das enzimas fibrolíticas estão na Tabela 1.6.

O estudo cinético da produção enzimática quantificada pelas técnicas de Celulases Totais (FPase), Endoglucanase (CMCase), Exoglucanase (Avicelase), e Xilanases foram apresentados ao longo dos 15 dias de cultivo em FSm, conforme os próximos subitens.

Tabela 1.6: Diferentes fontes de carbono para a produção de Celulases Totais (FPase), Endoglucanase (CMCase), Exoglucanase (Avicelase) e Xilanase pelo *T. reesei* QM 9414 em cultivo submerso em “incubadora orbital”.

Substratos ^a	Celul.Totais (t) (FPU/mL)	Endoglucan. (t) (U/mL)	Exoglucanase (t) (U/mL)	Xilanase (t) (U/mL)
<i>BC</i>	0,110±0,00 – 168 h	1,014±0,18 – 168 h	0,441±0,09 – 240 h	21,11±2,05 – 168 h
<i>BC+Lac</i>	0,064±0,01 – 168 h	1,127±0,11 – 168 h	0,459±0,20 – 240 h	23,74±1,03 – 168 h
<i>BC_Lev</i>	0,093±0,01 – 360 h	1,706±0,01 – 360 h	0,521±0,04 – 240 h	73,60±6,66 – 360 h
<i>BC_NaOH</i>	0,043±0,00 – 360 h	0,403±0,00 – 120 h	0,543±0,09 – 360 h	93,08±3,27 – 360 h
<i>BC_NaOH+Sac</i>	0,024±0,00 – 72 h	0,407±0,00 – 168 h	0,148±0,01 – 360 h	56,45±0,33 – 240 h
<i>BC_ácido</i>	0,150±0,03 – 360 h	1,243±0,01 – 360 h	0,868±0,01 – 240 h	4,76±0,09 – 360 h
<i>BC_ácido+Sac</i>	0,125±0,00 – 168 h	1,538±0,00 – 360 h	0,158±0,01 – 168 h	5,09±0,07 – 240 h
<i>Ftrigo_olig</i>	0,064±0,00 – 168 h	1,178±0,05 – 360 h	0,521±0,01 – 168 h	52,39±7,37 – 240 h
<i>BLara</i>	0,576±0,05 – 240 h	2,899±0,20 – 240 h	1,259±0,14 – 168 h	47,08±2,38 – 240 h
<i>BLara+Lac</i>	0,201±0,03 – 240 h	2,202±0,04 – 168 h	0,529±0,05 – 240 h	34,53±2,77 – 240 h
<i>BLara+Sac</i>	0,853±0,03 – 240 h	3,140±0,10 – 240 h	0,799±0,06 – 240 h	44,06±0,93 – 240 h
<i>BLara+BC</i>	0,159±0,01 – 240 h	1,785±0,09 – 240 h	0,069±0,00 – 240 h	37,08±2,01 – 168 h
<i>BLara+BC+Lac</i>	0,201±0,07 – 240 h	1,922±0,17 – 240 h	0,504±0,03 – 240 h	36,30±3,23 – 168 h
<i>QArroz</i>	0,173±0,01 – 120 h	0,533±0,03 – 120 h	0,136±0,01 – 72 h	0,616±0,02 – 120 h
<i>Qarroz+Sac</i>	0,186±0,00 – 240 h	1,228±0,00 – 72 h	0,264±0,00 – 240 h	1,37±0,00 – 120 h
<i>TortAlg</i>	0,036±0,01 – 168 h	0,421±0,03 – 168 h	0,049±0,04 – 240 h	22,23±2,73 – 168 h
<i>Napier</i>	0,101±0,01 – 360 h	1,689±0,04 – 360 h	0,383±0,01 – 240 h	94,72±3,87 – 360 h
<i>Napier+Sac</i>	0,200±0,01 – 360 h	1,344±0,24 – 360 h	0,238±0,02 – 120 h	191,34±1,14 – 360 h
<i>Napier_Trat</i>	0,092±0,01 – 360 h	1,853±0,03 – 168 h	0,317±0,04 – 360 h	99,34±3,25 – 360 h
<i>Napier_Trat+Sac</i>	0,250±0,01 – 360 h	2,356±0,32 – 360 h	0,866±0,07 – 168 h	206,48±1,94 – 360 h
<i>T1</i>	0,471±0,09 – 360 h	2,298±0,35 – 240 h	1,037±0,02 – 360 h	172,50±1,70 – 240 h
<i>T1+Sac</i>	0,727±0,01 – 168 h	3,630±0,11 – 360 h	1,178±0,01 – 360 h	220,00±3,99 – 240 h

^aSubstratos descritos na Tabela 1.2; BLara - Bagaço de Laranja (polpa cítrica) + BC

Bagaço de cana-de-açúcar (1:1 – m,m⁻¹); T1 – Resíduo da produção de cogumelo -

Capítulo 3; (t) tempo de cultivo com maior produção enzimática.

A eficiência da fonte de carbono na produção do complexo enzimático foi avaliada pelas celulases e xilanases produzidas. Desta forma, a compilação dos dados mostrou que o melhor substrato para produção do complexo celulolítico foi o bagaço de laranja com suplementação de sacarose (*BLara+Sac* - 1% - m,v⁻¹), seguido pelo composto *T1* (*T1+Sac* - 1% - m,v⁻¹ – Capítulo 3). Para a produção de xilanases, o composto T1 (*T1+Sac*), também foi o mais produtivo, seguido pelo Capim Napier tratado e suplementado com sacarose (*Napier_Trat+Sac* - 1% - m,v⁻¹). (Tabela 1.6).

3.2.1. Produção do complexo celulolíticos pelos diferentes substratos

3.2.1.1. Celulases Totais

O perfil da avaliação das celulases totais produzidas nos cultivos de *T. reesei* com os diferentes materiais lignocelulósicos testadas está na Figura 1.5. A fonte de carbono influenciou significativamente a produção do complexo celulolítico.

O melhor substrato para produção de celulases totais medido pela técnica de FPase (Celulase Total) (Tabela 1.6 e Figura 1.5) foi o bagaço de laranja (*BLara+Sac*) com adição de sacarose 1% (m.v^{-1}), com valores de $0,853 \pm 0,03$ FPU/mL ou $25,61 \pm 1,18$ FPU/g de substrato (equação 5), no 10º dia de cultivo, valores significativamente superiores aos demais substratos ($p < 0,05$). Os valores de atividades foram significativos entre as atividades celulolíticas do 7º e do 10º dia (respectivamente, $0,621 \pm 0,04$ e $0,853 \pm 0,03$ FPU/mL), ocorreram os maiores picos de produção enzimática ($p < 0,05$).

Para a mistura de bagaço de laranja com bagaço de cana *in natura* houve maior produção de celulases com a adição de lactose (*BLara+BC+Lac* – 1:1 – m.m^{-1} - com suplementação (1% (m.v^{-1}) de lactose – Tabela 1.6) a qual produziu $0,201 \pm 0,07$ FPU/mL e $6,70 \pm 2,63$ FPU/g. No entanto este resultado é significativamente inferior ($p < 0,001$) ao meio composto com apenas o bagaço de laranja como substrato suplementado com sacarose.

O substrato *T1+Sac*, que é o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente com *P. ostreatus* (Capítulo 3), obteve resultados relativamente altos, quando comparados aos demais, com $0,727 \pm 0,01$ FPU/mL em 7 dias de cultivo. Este resultado demonstra a eficiência alcançada e ganho biotecnológico na obtenção desse substrato após a pré-hidrólise das suas fibras lignocelulósicas por ação de um fungo basidiomiceto. Assim, ao comparar a produção das celulases totais conseguidas com o substrato *in natura* (*BC* – $0,110 \pm 0,00$ FPU/mL) ($p < 0,05$) observa-se uma elevação de quase 7 vezes na eficiência de produção enzimática (Table 2.6 e Figura 1.5).

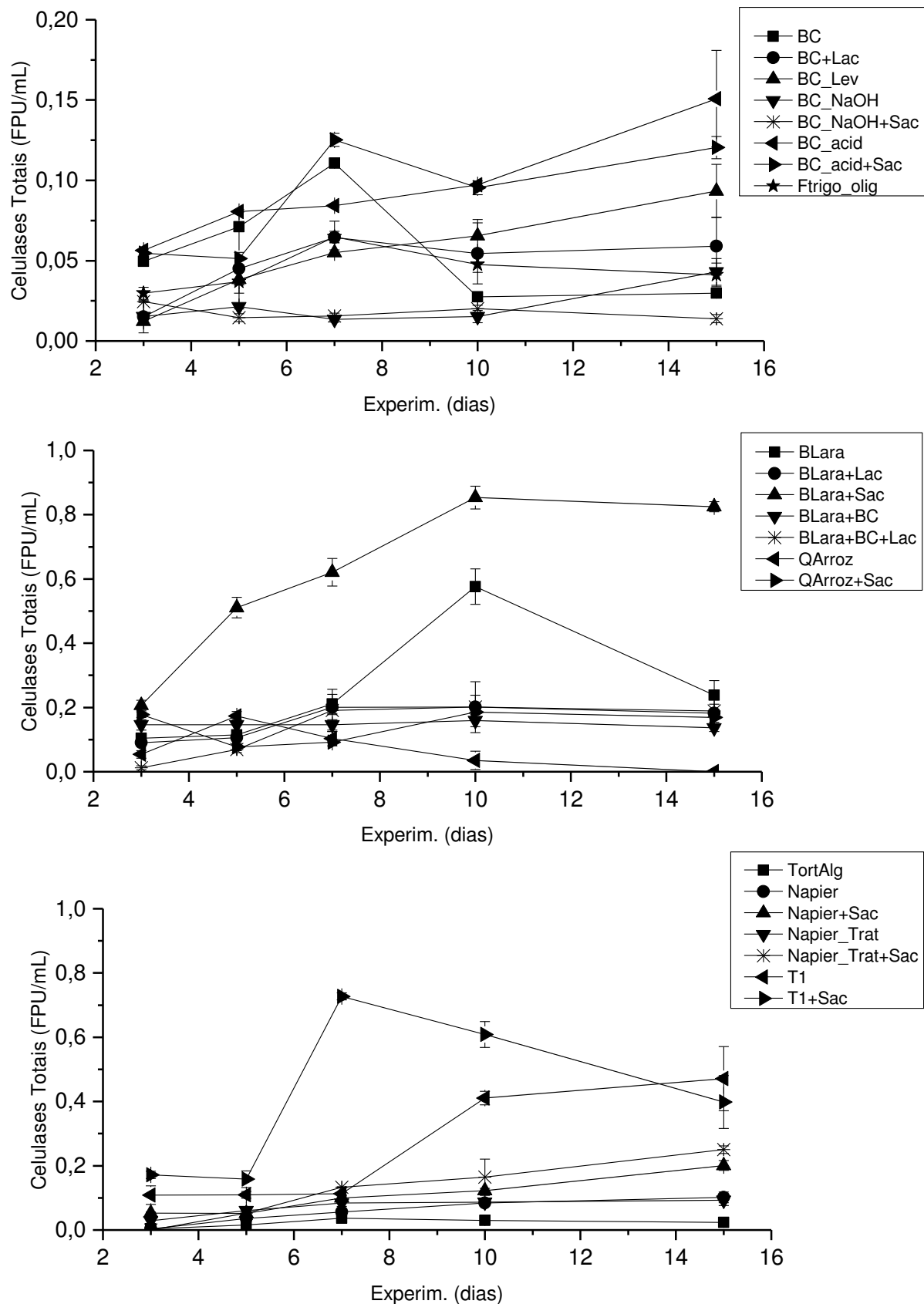


Figura 1.5: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Celulases Totais (FPU/mL).

O substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com a levedura celulolítica *R. mucilaginosa* (*BC_Lev*) obteve resultados muito inferior ($0,093 \pm 0,01$ FPU/mL e $3,1 \pm 0,33$ FPU/g - Equação 5) ao tratado pela basidiomiceto *P. ostreatus* (T1 – Capítulo 3), ou mesmo ao próprio bagaço *in natura* (*BC_Lev* – 15º dia de cultivo). Já o farelo de trigo tratado com o *Rhizopus oligosporus* obteve resultados ainda mais baixo com somente $0,064 \pm 0,00$ FPU/mL e $2,133 \pm 0,1$ FPU/g (Equação 5) (*Ftrigo_olig* – 7º dia de cultivo) (Tabela 1.6 e Figura 1.5), ambos muito inferiores aos valores obtidos para o *BLara+Sac* ($p < 0.05$).

Nos protocolos que envolveram pré-tratamentos (Tabela 1.2), a ação de compostos químicos (Ácido sulfúrico – 0,1% (v.v⁻¹) e NaOH – 6% (m.v⁻¹)), os maiores valores para o tratamento ácido foram $0,150 \pm 0,03$ FPU/mL e $5,02 \pm 1,00$ FPU/g (15º dia de cultivo – adição de 1% sacarose (m.v⁻¹) – *BC_ácido+Sac*) e de $0,125 \pm 0,00$ FPU/mL e $4,17 \pm 0,134$ FPU/g (7º dia de cultivo – *BC_ácido*), ambos com diferenças significativas ($p < 0.05$) (Tabela 1.6 e Figura 1.5), resultados superiores do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (*BC* – $0,110 \pm 0,00$ FPU/mL e $3,69 \pm 0,04$ FPU/g de substrato – 7 dias de cultivo ($p < 0,05$)), demonstrando que deslignificação influencia na produção das enzimas fibrolíticas.

3.2.1.2. Endoglucanase

O perfil da avaliação das endoglucanase (CMCase) para os diferentes substratos agroindustriais e biomassas lignocelulósicas testadas, e nos diferentes dias de cultivo (FSm), estão na Figura 1.6. Ao observar os resultados, a fonte de carbono, para os diferentes meios de cultivos, apresentou influencias significativas na produção do complexo enzimático. No caso, o substrato *T1+Sac* (Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente pelo *P. ostreatus* – Capítulo 3 – e suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose) apresentou melhor resultado com $3,630 \pm 0,11$ U/mL e $121,02 \pm 3,70$ U/g de substrato (15º dia de cultivo), seguido pelo bagaço de laranja (polpa cítrica) suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose (*BLara+Sac*) com $3,14 \pm 0,10$ U/mL e $104,69 \pm 3,34$ U/g de substrato (Equação 5) (10º dia de cultivo), entretanto, ambos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (Tabela 1.6 e

Figura 1.6). Entretanto, a fermentação do substrato *T1+Sac* teve seu pico de fermentação somente após o 10º dia de cultivo, enquanto o *BLara+Sac* já no 10º dia de cultivo foi estatisticamente superior aos demais na produção do extrato enzimática ($p>0.05$) (Figura 1.6).

Os mesmos substratos quando não suplementados com a sacarose apresentaram resultados significativamente menores ($p<0,05$), como no caso do *T1* em que o pico de atividade de endoglucanase foi de $2,29\pm0,35$ U/mL e $76,60\pm11,79$ U/g de substrato (15º dia de cultivo), enquanto o bagaço de laranja (*BLara*) foi de $2,899\pm0,20$ U/mL e $96,63\pm6,80$ U/g de substrato (10º dia de cultivo) (Tabela 1.6 e Figura 1.6). Para o bagaço de laranja suplementado com lactose (*BLara+Lac* – 1% (m.v⁻¹) de lactose) o pico de atividade foi de apenas $2,20\pm0,04$ U/mL (7º dia de cultivo), sendo estatisticamente inferior ($p<0,05$) (Tabela 1.6 e Figura 1.6).

Nos bioprocessos que envolveram um pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (biológico ou químico), a produção de endoglucanase foi inferior ao bagaço de laranja com ou sem suplementação ($p<0.05$) (Tabela 1.6). O tratamento biológico do bagaço de cana com leveduras celulolíticas (*BC_Lev*) obteve $1,70\pm0,01$ U/mL e $56,89\pm0,43$ U/g de substrato (Equação 5) (15º dia de cultivo). Para o farelo de trigo, que foi tratado pelo fungo *Rhizopus oligosporus* (*Ftrigo_olig*), o melhor dia de produção de endoglucanase foi no 15º, com $1,17\pm0,05$ U/mL e $35,36\pm1,67$ U/g.

O maior valor foi para o substrato *BC_NaOH+Sac* com $0,40\pm0,00$ U/mL contra $1,12\pm0,11$ U/mL (*BC+Lac*) e $1,01\pm0,18$ U/mL (*BC*) (todos com 7 dias de cultivo) ($p<0.05$) (Tabela 1.6 e Figura 1.6).

A mistura de ambos os resíduos *in natura* (*BC+BLara* – 1:1– m.m⁻¹) obteve como melhor resultado $1,78\pm0,09$ U/mL sem suplementação (*BLara+BC* – 10º de cultivo) e $1,92\pm0,17$ U/mL com suplementação (*BLara+BC+Lac* – 10º de cultivo) (Tabela 1.6 e Figura 1.6). As biomassas quirera de arroz ($1,228\pm0,00$ U/mL e $40,93\pm0,33$ U/g de substrato – 3º de cultivo) e torta de algodão ($0,421\pm0,03$ U/mL e $14,06\pm0,12$ U/g de substrato – 7º de cultivo) apresentaram resultados baixos de endoglucanase (Tabela 1.6).

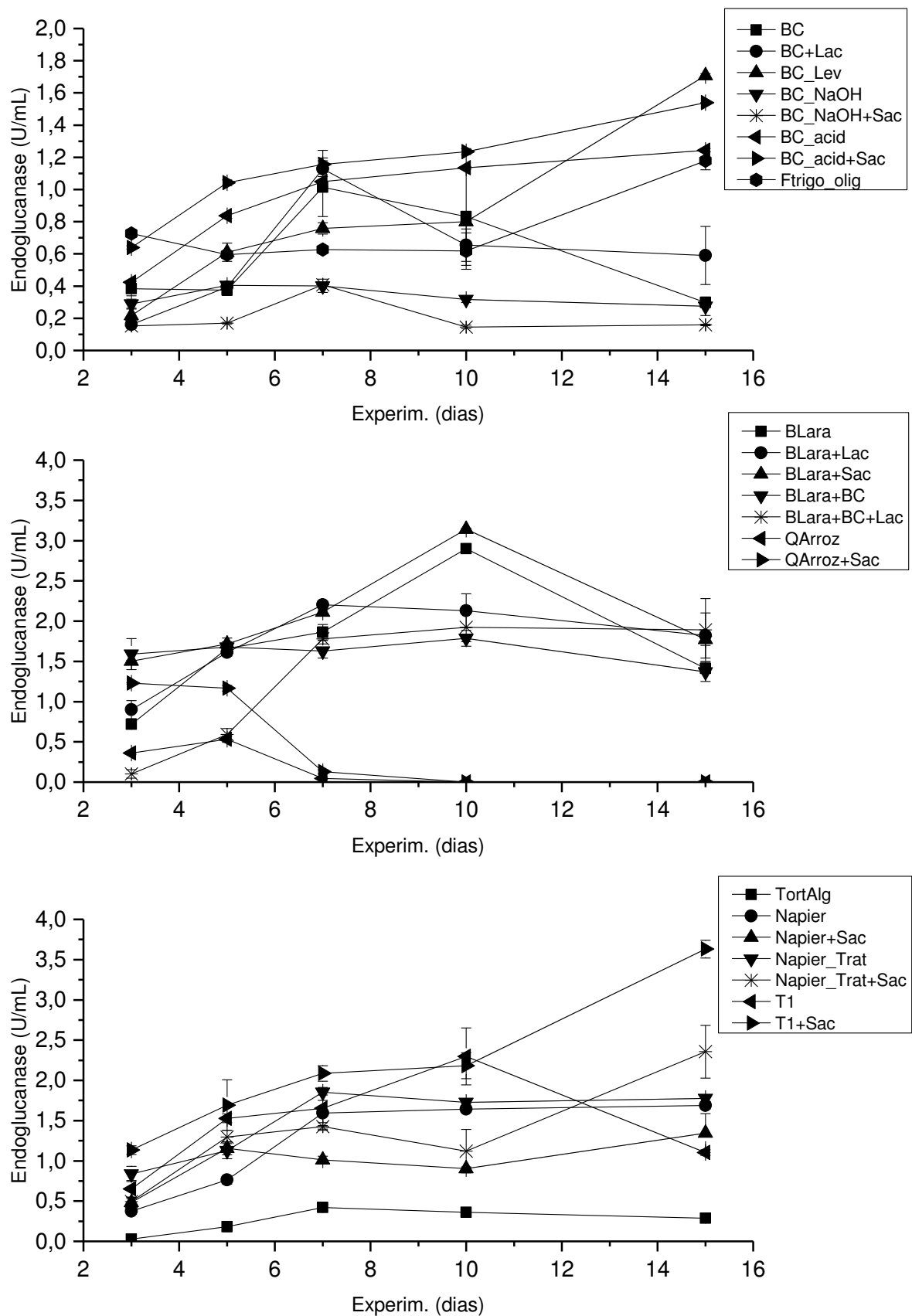


Figura 1.6: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Endoglucanase (U/mL).

3.2.1.3. Exoglucanase

O perfil da avaliação das exoglucanase (Avicelase) para os diferentes substratos agroindustriais e biomassas lignocelulósicas testadas neste trabalho, e nos diferentes dias de fermentação (FSm), estão na Figura 1.7. Sendo que a análise dos dados revelou que o melhor substrato para produção de exoglucanase pela fermentação submersa do fungo *T. reseei* QM 9414 foi o bagaço de laranja sem suplementação (*BLara*) com $1,25 \pm 0,14$ U/mL e $37,79 \pm 4,41$ U/g de substrato (Equação 5) (7º dia de cultivo). Uma análise estatística de comparação entre os diferentes dias de cultivo demonstrou que houve diferenças significativas entre as atividades de exoglucanase entre o 7º e o 10º ($p < 0,001$). Seguindo do substrato *T1+Sac* (1% (m.v⁻¹) de sacarose) com valores de atividade de $1,178 \pm 0,01$ U/mL e *T1* com valores de $1,037 \pm 0,02$ U/mL, que apesar da pouca diferença entre ambos, existe diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (Tabela 1.6 e Figura 1.7).

O bagaço de laranja com adição de 1% (m.v⁻¹) sacarose (*BLara+Sac*), considerado o substrato com melhor e mais efetivo na produção das enzimas fibrolíticas, medidas pelas técnicas de celulasas totais ($0,85 \pm 0,03$ FPU/mL) e endoglucanase ($3,14 \pm 0,10$ U/mL), apresentou resultados inferiores para exoglucanase, mesmo no seu melhor dia de produção, $0,79 \pm 0,06$ U/mL ou mesmo para quando suplementado com 1% (m.v⁻¹) lactose $0,52 \pm 0,05$ U/mL, ambos para 10 dias de cultivo. Os demais substratos revelaram valores inferiores, como $0,14 \pm 0,01$ U/mL e $4,46 \pm 0,26$ U/g para bagaço de cana-de-açúcar tratado com 6% (m.v⁻¹) NaOH e com adição de 1% (m.v⁻¹) sacarose (*BC_NaOH+Sac*) e $0,54 \pm 0,09$ U/mL e $16,30 \pm 0,79$ U/g para bagaço de cana-de-açúcar sob tratamento alcalino sem sacarose (*BC_NaOH*), ambos no 15º dia de cultivo. Já o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente com levedura (*BC_Lev*) com o 10º dia de cultivo como o melhor dia de produção enzimática para exoglucanase obteve valores de $0,52 \pm 0,01$ U/mL e $15,64 \pm 0,59$ U/g. O farelo de trigo (*Ftrigo_olig*), também tratado biologicamente, obteve apenas $0,52 \pm 0,01$ U/mL ou $15,64 \pm 0,59$ U/g (Equação 5) para no 7º dia de cultivo.

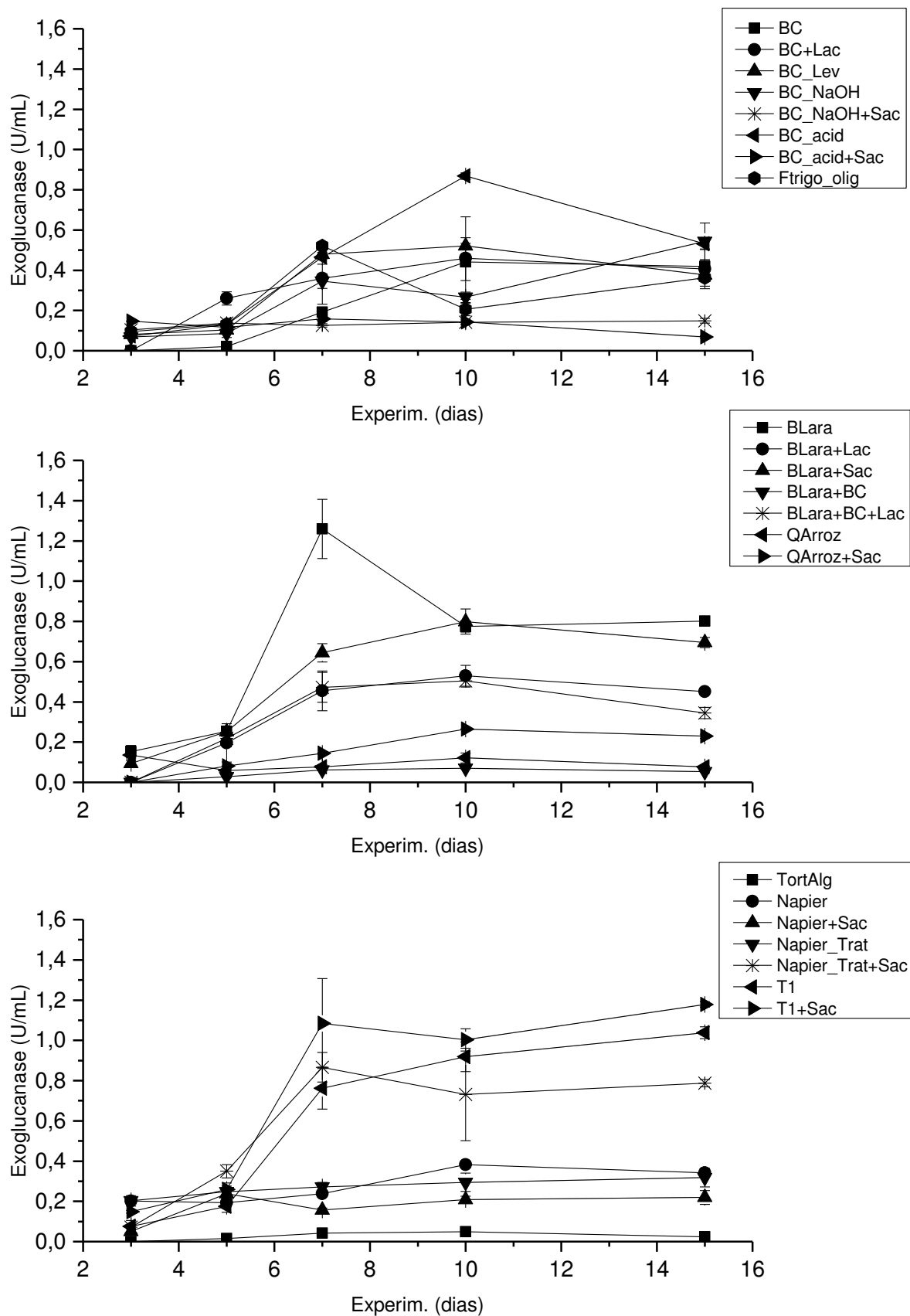


Figura 1.7: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Exoglucanase (U/mL).

3.2.1.4. Produção do complexo xilanolítico pelos diferentes substratos

O perfil da avaliação do complexo xilanolítico para os diferentes substratos agroindustriais e biomassas lignocelulósicas testadas neste trabalho, e nos diferentes dias de fermentação (FSm), estão na Figura 1.8. Assim, na produção das enzimas deste complexo, o melhor resultado obtido foi para o substrato *T1+Sac* (Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente pelo *P. ostreatus* e suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose) com valores de atividade xilanolítica de 220,00±3,99 U/mL e 7332,48±133,15 U/g de substrato (10º dia de cultivo), seguido pelo Capim napier tratado e suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose (*Napier_Trat+Sac*) com 206,48±1,94 U/mL e 6882,74±64,87 U/g de substrato (15º de cultivo), apesar da diferença ser pequena entre esses substratos, foi averiguado uma diferença estatística ($p<0,05$) (Tabela 1.6 e Figura 1.8).

O substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente com levedura (*BC_Lev*) teve como melhor dia de produção de xilanases o 15º dia com 73,60±6,66 U/mL e 2208,18±199,85 U/g ($p<0.05$) (Tabela 1.6 e Figura 1.8). A ação da levedura celulolítica *Rhodotorula mucilaginosa*, apesar de deixar as fibras mais soltas e acessíveis ao *T. reesei* QM 9414 – fato verificado pela diferença significativa de xilanases produzidas entre o bagaço de cana *in natura* (21,11±2,05 U/mL – 7º de cultivo) e o pré-hidrolisado pelas leveduras ($p<0.05$) – não foi o suficiente para se igualar ao tratamento físico-químico alcalino (*BC_NaOH* – 93,08±3,27 U/mL) (Tabela 1.6).

Os cultivos com meios usando bagaço de laranja (polpa cítrica), suplementado ou não com sacarose, apresentaram resultados baixos de xilanases. No 10º dia de cultivo foram produzidos 47,08±2,38 U/mL; 34,53±2,77 U/mL e 44,06±0,93 U/mL, respectivamente para os substratos *BLara*, *BLara+Lac* e *BLara+Sac*, uma diferença de até 4,7 vezes menor quando comparado aos melhores cultivos (Tabela 1.6).

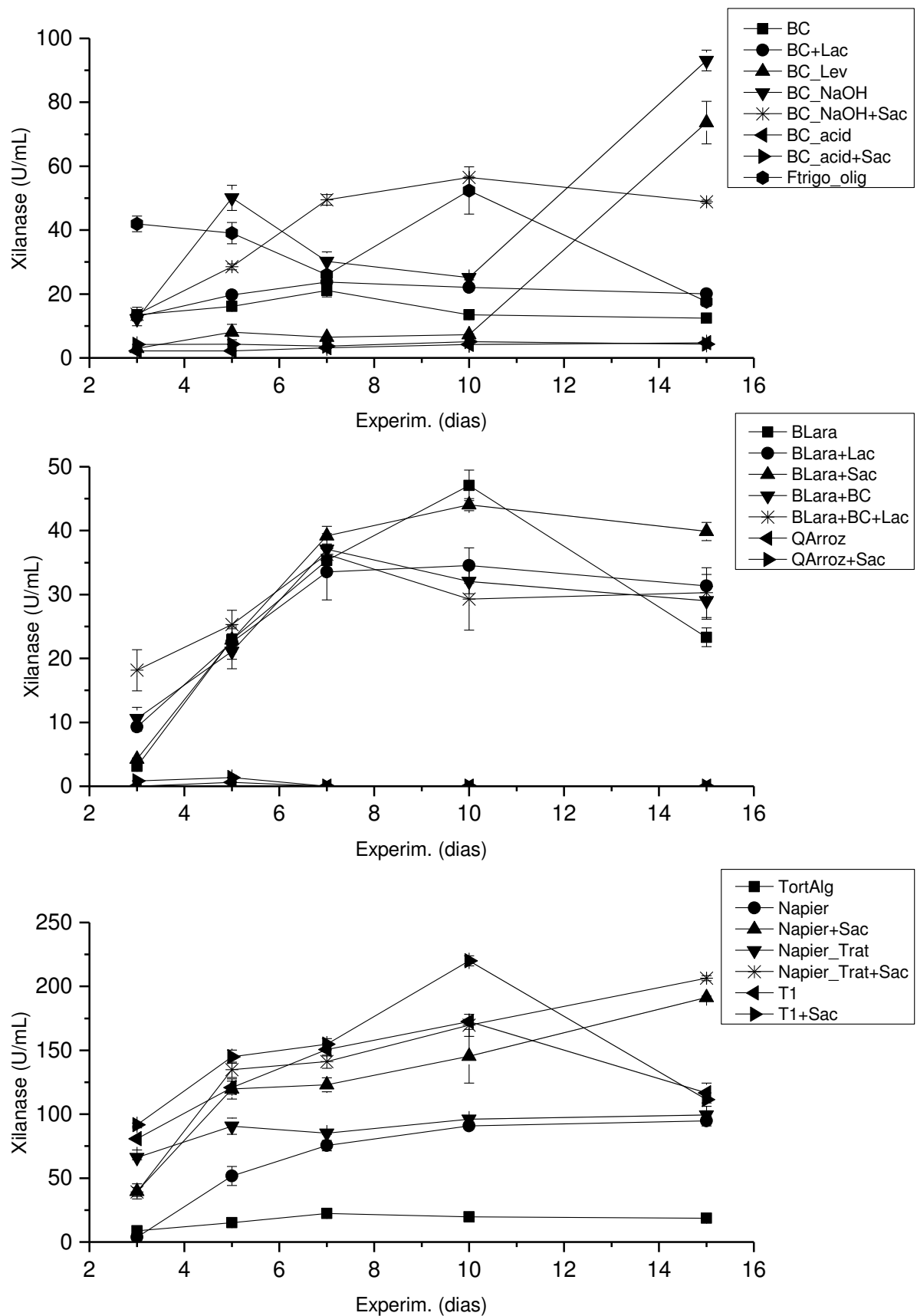


Figura 1.8: Diferentes fontes de carbono na produção de enzimas fibrolíticas quantificadas pela técnica de Xilanas (U/mL).

Estes resultados foram o oposto em relação a produção de enzimas celulolíticas para este substrato. O cultivo com farelo de trigo pré-tratado pelo *Rhizopus oligosporus* (*Ftrigo_olig*), quirera de (*Qarroz*) e torta de algodão (*TortAlg*) apresentaram baixa atividade xilanolítica (Tabela 1.6 e Figura 1.8).

Dentre os resultados apresentados ficou evidente que a fonte de carbono influenciou diretamente na produção das enzimas do complexo celulolítico. O destaque foi para a polpa cítrica (bagaço de laranja) e o substrato *T1*. Este último proveniente do cultivo do *P. ostreatus* tendo o bagaço de cana como substrato, provavelmente sofreu um ataque de enzimas lignolíticas (PUTZKE & PUTZKE, 2002), permitindo uma desestruturação específica da fibra, fato este que pode ter sido favorável para o estímulo da produção das enzimas fibrolíticas pelo *T. reesei*. Essa degradação específica e parcial da fibra lignocelulósica pode ser devido a regiões como porções da lignina que sofreram ação das oxidases do *P. ostreatus* (ZANCAN et al., 2015; DAOU, et al., 2016), diferentemente, por exemplo, do tratamento alcalino que extrai grande parte da lignina. Isso sugere que a fibra contendo a lignina, após ser convertida em compostos fenólicos (GUPTA, et al., 2016), e degradada de forma parcial podera ter algum efeito sinérgico na produção das enzimas fibrolíticas por *T. reesei*.

Vários trabalhos descritos na literatura com a produção de celulase fúngica em cultivo com diferentes resíduos lignocelulósicos, foram inferiores aos obtidos no presente trabalho. SONI et al. (2010) apresentaram resultados otimizados (3,37 FPU/g) com diferentes fontes de carbono, como bagaço de cana, farelo de trigo e palha de arroz, entretanto o maior valor foi de 3,37 FPU/g para Celulases Totais e 60,5 U/g de endoglucanase, em fermentação em Estado Sólido e com o fungo *Aspergillus fumigatus* fresenius (AMA). Ou mesmo nos estudos de DELABONA et. al (2012a) que utilizaram diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, como bagaço de laranja e farelo de trigo, e o fungo *Aspergillus fumigatus* em FEs, chegando no melhor substrato com uma atividade de 5,0 FPU/g de substrato, entretanto valores de atividade abaixo do melhor substrato utilizado nessa etapa do projeto (Tabela 1.6). Neste mesmo estudo, quando os autores usaram somente o bagaço de laranja como substrato, a atividade endoglucanase foi de apenas 18,42 U/g e

quando o bagaço de laranja foi misturado com farelo de trigo (1:1 m.m⁻¹) a atividade subiu para 32,92 U/g. THYGESEN et al. (2003) testou diferentes fontes de carbono, chegando o máximo de produção de 66,6 U/g de substrato de atividade de endoglucanase em fermentação em estado sólido (FEs) usando farelo de trigo como substrato e o fungo *A. niger* ATCC 9029.

Outro dado interessante foi notar que a sacarose como fonte de carbono solúvel demonstrou um ganho biotecnológico na produção das celulasas totais, para quase todos os substratos testados. A combinação da sacarose com o substrato bagaço de laranja (polpa cítrica) elevou o máximo de atividade FPase de 0,576±0,05 FPU/mL para 0,853±0,03 FPU/mL (Tabela 1.6 e Figura 1.7). E para as endoglucanase a diferença para o bagaço de laranja suplementado ou não foi de aproximadamente 1,1 vezes, e para o substrato T1 a diferença foi de 1,6 vezes. Provavelmente devido ao fato desse carboidrato ser mais fácil de metabolização, proporcionou uma aceleração no crescimento inicial do *T. reesei* QM 9414, assim, permitindo uma maior eficiência na produção das enzimas de interesse (DELABONA et al., 2012b). A composição do meio de cultura é um fator importante para sucesso da produção de complexo enzimático nas fermentações utilizando micro-organismos (HAQ, et al., 2006; SILVA et al., 2016). Desta forma, a utilização do suplemento de outras fontes de carbono, tais como sacarose, ou mesmo, lactose, na composição do substrato pode influenciar fortemente a produção do complexo fibrolítico pelos micro-organismos. JOURDIER et al. (2013) estudaram o efeito da mistura de diferentes carboidratos (glucose, xilose, lactose e celobiose) e o fungo mutante *Trichoderma reesei* (strain CL847) na produção de enzimas celulolíticas. Os autores corroboraram com a conclusão desse trabalho, pois concluíram que o substrato suplementado com açúcares influencia fortemente a produção do complexo celulolítico pelo fungo. Resultados semelhantes foram alcançados por DELABONA et al. (2012b), que reportaram uma elevação na produção enzimática quando os meios foram suplementados por carboidratos simples.

Os pré-tratamento do bagaço de cana apresentaram resultados diferenciados. Sendo que o substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com a levedura celulolítica *R. mucilaginosa* (BC_Lev) obteve resultados muito inferior ao tratado pela basidiomiceto *P. ostreatus* para a produção das

enzimas celulolíticas, provavelmente devido a forma e crescimento de ação do fungo basidiomyceto e suas enzimas lignocelulolíticas (PUTZKE & PUTZKE, 2002). Para os tratamentos físico-químicos a base de ácido sulfúrico as atividades de celulasas foram superiores quando comparado ao bagaço *in natura*. Entretanto, ao modificar o pré-tratamento para compostos básicos, como foi o caso do substrato *BC_NaOH*, os valores foram bem inferiores (Tabela 1.6), o que demonstrou que não somente a deslignificação e a retirada de hemicelulose influencia na produção das enzimas fibrolíticas, mas também a forma que esse processo acontece. No tratamento ácido, apesar de proporcionar uma boa deslignificação, acaba tendo a liberação de inúmeros compostos tóxicos, como o furfural (LEE et al., 2015). Já o tratamento álcali a remoção da fração de lignina pode ser feita em condições mais amenas e, por consequência, uma menor degradação de compostos diversos (SINGHA et al., 2015). Este fato provavelmente ocorreu devido à ação do tratamento alcalino sobre as fibras lignocelulolíticas, proporcionando uma abertura das fibras sem uma grande degradação dos carboidratos da celulose, este fato possibilitou uma facilidade de acesso das enzimas produzidas pelo o fungo ao polissacarídeo, como é afirmado em literatura (VERVERIS et al., 2007), tendo como consequência uma menor eficiência na produção dessas enzimas. Resultados de produção enzimática em substratos pré-tratados quimicamente são apresentados na literatura e corroboram com os dados apresentados nesse trabalho, como é o caso do trabalho de DELABONA et al (2012b), esses autores obtiveram resultados diferentes quando utilizaram pré-tratamentos diferentes do bagaço de cana (0,78 e 0,50 FPU/mL, apenas vapor e vapor seguido de deslignificação com NaOH, respectivamente). No trabalho de SILVA et al., (2013), os resultados reportados foram semelhantes, pois ao utilizarem bagaço *in natura* obtiveram $0,11 \pm 0,001$ FPU/mL e ao pré-tratar o bagaço com NaOH o resultado foi muito inferior $0,052 \pm 0,001$ FPU/mL.

A diferença entre esses valores de atividades enzimáticas provavelmente também aconteceu devido às diferenças entre concentrações de fibras de hemicelulose e lignina, já que, como já comprovado por estudos na literatura, o bagaço de cana, quando *in natura*, possui uma maior concentração dessas fibras (VERVERIS et al., 2007). Assim, dependendo da ação de pré-

tratamentos e por consequência a deslignificação (LEE et al., 2015), podem ou não melhorar a produção e atividade das enzimas fibrolíticas. Como por exemplo, a presença de grandes quantidades de lignina no substrato pode adsorver a enzima produzida (SAINI et al., 2016) e, por consequência, diminuir a atividade enzimática durante o cultivo dos fungos (BERLIN et al. 2005; SAINI et al., 2016), entretanto para uma possível sacarificação, pelo motivo apresentado anteriormente, a menor concentração de lignina irá facilitar a hidrólise e liberação dos açúcares da celulose. Outro ponto, é que os pré-tratamentos podem aumentar a porosidade dos materiais lignocelulósicos por removerem a hemicelulose e/ou a lignina, fazendo com que a fração de celulose fique mais acessível ao fungo (SUN & CHENG, 2002; KÄRCHERA et al., 2016), e isso afetar diretamente a necessidade de produção de enzimas. Com os resultados obtidos ficou claro que os pré-tratamentos biológicos e físico-químicos ácido podem ou não proporcionaram uma maior eficiência na produção das enzimas celulolíticas, o que depende diretamente do tipo de pré-tratamento e do substrato. Como já reportado na literatura, o trabalho de DELABONA et al. 2012b produziram enzimas celulolíticas pelo fungo *T. harzianum* isolado da floresta Amazônica e crescido e cultivado em bagaço de cana-de-açúcar *pré-tratado* com vapor e obtiveram melhores resultados. Este comportamento também foi observado nesse trabalho, mas somente quando o bagaço foi pré-tratado com ácido (Tabela 1.6).

Entretanto, para os todos os protocolos pré-tratados físico-quimicamente os valores foram inferiores ao obtido pelo melhor substrato deste trabalho (*BLara+Sac*). Mesmo após a suplementação com a sacarose os resultados dos pré-tratamento ficaram baixos (Tabela 1.6). Esses resultados são semelhantes ao apresentado em literatura, onde nos trabalhos de BENOLIEL et al. (2013) com bagaço de cana-de-açúcar parcialmente deslignificado obtiveram apenas 0,04 FPU/mL com linhagens do *Trichoderma harzianum* (L04), e ROCHA et al. (2013) conseguiram no máximo 0,001 FPU/mL com bagaço de cana pré-tratado e *T. harzianum* IOC 3844. Entretanto, CAMASSOLA & DILLON (2014) obtiveram um pico de produção de celulasas totais de 1,13 FPU/mL em 6 dias de cultivo (FEs), usando bagaço de cana pré-tratado com 16% (m.v⁻¹) NaOH,

porém o fungo utilizado como micro-organismo celulolítico foi *Penicillium echinulatum* 9A02S1.

A produção das enzimas xilanolíticas seguiu os mesmos princípios relacionados na produção das celulases. Pois as diferentes fontes de carbono, pré-tratados ou não, foram diretamente responsáveis pelas diferenças nas atividades das enzimas do complexo xilanolítico produzidos. Como reportado pelo trabalho de DELABONA et al. (2012a), que testou diferentes fontes de carbono, desde bagaço de cana, farelo de soja, de trigo, bagaço de laranja, e obtiveram resultados altos (1055,62 U/g) ao variar essas fontes.

O pré-tratamento álcali do bagaço de cana apresentou valores relativamente altos ($93,08 \pm 3,27$ U/mL) quando comparados aos demais substratos testados, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Neste caso, conseguindo um valor de aproximadamente 4,5 vezes mais elevado. Provavelmente devido a deslignificação proporcionada pela técnica de pré-tratamento alcalino ($\text{NaOH-6\%/121 } ^\circ\text{C/45min}$ – Capítulo 2), favorecendo assim o ataque enzimático à hemicelulose como fonte de carbono para o crescimento do fungo. Esse pré-tratamento privilegiou prioritariamente a biossíntese de xilanases em detrimento à produção de celulases, pois os resultados de produção desta última foram bem inferiores quando comparados aos demais substratos (Tabela 1.6).

Em contrapartida o pré-tratamento ácido demonstrou inferioridade na produção do complexo xilanolítico, tendo ou não suplementação. Esse resultado é compreensivo, visto que o tratamento ácido tem uma forte ação sobre as fibras lignocelulósicas do bagaço de cana, tendo como consequência, uma alta extração da hemicelulose durante o pré-tratamento ácido (CANILHA et al., 2011) e produção de compostos tóxicos (LEE et al., 2015; ALVIRA et al., 2016). Desta forma, o substrato que o micro-organismo poderia utilizar para produzir as enzimas xilanolíticas foi diminuído ou eliminado, o que explicaria a baixa eficiência na produção dessas enzimas. Assim, é razoável supor que biomassas com altas concentrações de hemicelulose devem possuir uma maior eficiência na produção das enzimas do complexo xilanolítico, sendo o inverso também verdadeiro (OLSSON et al., 2003). A literatura corrobora com os dados

obtidos, como no caso dos trabalhos de BENOLIEL et al. (2013), em que o bagaço de cana pré-tratado obteve apenas 6,51 U/mL de atividade xilanases. Ou no trabalho de DELABONA et al. (2012b) que foi reportado baixos valores de apenas 15,02 U/mL (72 h), quando substrato pré-tratado.

A biossíntese das enzimas fibrolíticas como observado neste trabalho é bastante influenciada pela grande heterogeneidade estrutural dos substratos lignocelulósicos utilizados (DELABONA et al., 2012b; CAMASSOLA & DILLON, 2014; SILVA et al., 2016). Desta forma, a fonte de carbono é uma variável importante na produção das xilanases (OLSSON et al., 2003).

3.3. Avaliação das melhores condições físico-químicas para a produção enzimática por Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Como os substratos bagaço de laranja (polpa cítrica) suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose (*BLara+Sac* – Tabela 1) e *T1+Sac* (Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente pelo cultivo com *P. ostreatus* e suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose) apresentaram as maiores eficiências na produção dos complexos fibrolíticos, estes foram selecionados para um DCCR.

3.3.1. DCCR para o bagaço de laranja (*BLara+Sac*)

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais do planejamento que foi realizado para a fermentação do *T. reesei* QM 9414 junto com o substrato *BLara+Sac* nas variáveis dependentes de pH e temperatura estão na Tabela 1.7 e as curvas de superfície de resposta gerada pelo modelo neste estudo estão representadas nas Figuras 2.9, 2.10, 2.11 e 2.12.

Devido a grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e micro-organismos foram considerados significativos os parâmetros com *p* menores que 10% (*p*<0,1). Assim, para Celulases Totais todos os parâmetros analisados foram considerados significativos. Os valores de atividade de celulases totais obtido nos experimentos de DCCR 2² variaram de 0,37 FPU/mL (ensaio 6 – 35 °C e pH 4,5) a 0,89 FPU/mL (ensaio 11 – 30 ° e pH 4,5) nos 11 ensaios realizados (Tabela 1.7).

Tabela 1.7: Produção e atividades do complexo fibrolítico e atividades preditas para *T. reesei* QM 9414 nos ensaios experimentais e respostas em 10 dias de cultivo com o substrato *BLara+Sac*.

Expe	Temp (°C)	pH	Total Cellulase (FPU/mL)		Endoglucanase (U/mL)		Exoglucanase (U/mL)		Xylanase (U/mL)	
			Expe ^a	Pred ^b	Expe ^a	Pred ^b	Expe ^a	Pred ^b	Expe ^a	Pred ^b
1	26,5	3,8	0,68	0,70	2,57	2,79	1,42	1,29	33,29	35,65
2	26,5	5,2	0,66	0,69	1,72	1,84	1,16	1,16	34,10	36,84
3	33,5	3,8	0,68	0,66	2,05	1,93	0,93	0,99	37,09	35,64
4	33,5	5,2	0,49	0,48	2,05	2,16	0,91	0,86	25,84	24,77
5	25,0	4,5	0,61	0,57	1,90	1,70	1,36	1,43	34,95	31,65
6	35,0	4,5	0,37	0,39	1,27	1,31	1,02	1,00	20,98	23,02
7	30,0	3,5	0,84	0,84	2,96	3,07	0,99	1,03	42,44	42,08
8	30,0	5,5	0,72	0,71	2,57	2,55	0,84	0,85	36,07	35,17
9	30,0	4,5	0,86	0,87	3,37	3,24	0,77	0,82	45,15	45,19
10	30,0	4,5	0,86	0,87	3,32	3,24	0,87	0,82	45,02	45,19
11	30,0	4,5	0,89	0,87	3,27	3,24	0,84	0,82	45,44	45,19

^aAtividades enzimáticas obtidas durante os experimentos; ^bAtividades enzimáticas preditas de acordo com os parâmetros considerados significativos.

A Tabela 1.8 descreve os coeficientes do modelo de regressão a partir da matriz codificada para a produção de Celulases Totais (FPase – FPU/mL), os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos com a letra Q.

Tabela 1.8: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Celulases Totais e para o substrato *BLara+Sac*.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	-16,7028	1,311701	-12,7337	0,000053	-19,35	-14,06
X ₁ - (1)Temp(L)	0,9984	0,061383	16,2650	0,000016	0,875	1,12
X ₁ - Temp(Q)	-0,0156	0,000931	-16,7417	0,000014	-0,0175	-0,0137
X ₂ - (2)pH (L)	1,3425	0,269134	4,9883	0,004146	0,800	1,88
X ₂ - pH (Q)	-0,0964	0,023285	-4,1412	0,008987	-0,143	-0,0495
X ₁ X ₂ - 1L by 2L	-0,0180	0,005610	-3,2059	0,023839	-0,0293	-0,0067

A equação da regressão obtida após uma análise de variância (ANOVA) caracteriza o nível de produção das celulases totais e função das variáveis

independentes testadas. A equação final que representa o modelo ajustado para a produção desse complexo enzimático esta na equação 6.

Equação 6

$$\text{Celulases Totais (FPU/mL)} = -16,7028 + 0,9984X_1 - 0,0156X_1^2 + 1,3425X_2 - 0,0964X_2^2 - 0,0180X_1X_2; (R) = 0.986.$$

Esta equação descreve a atividade total de celulase previsto pelo modelo como uma função das variáveis codificadas no modelo reparametrizado que contém apenas termos estatisticamente significativos (X_1 e X_2^2 são, respectivamente, temperatura (°C) e pH).

Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos (Tabela 1.7), pode-se considerar que os resultados obtidos nos ensaios de validação foram satisfatórios, tendo como valor experimental (28 °C e pH 4,5) igual a 0,8534 FPU/mL e os valores preditos foram de 0,8289 e 0,8711 FPU/mL (Tabela 1.12).

Na produção de endoglucanase pelo delineamento experimental (Tabela 1.7) os resultados variaram de 1,27 U/mL (35 °C e pH 4,5) a 3,37 U/mL (30 °C e pH 4,5), nota-se que os resultados, mínimos e máximos foram em condições semelhantes às encontradas para a atividade de celulase totais.

A Tabela 1.9 descreve os coeficientes do modelo de regressão a partir da matriz codificada para a produção de Endoglucanase (CMCase – U/mL). Assim, para a atividade de endoglucanase somente o parâmetro X_2 (L) (pH) não foi significativo para a produção das Endoglucanase ($p < 0,1$).

Através dos resultados obtidos foram calculados os coeficientes de regressão (X_1 – Temperatura; X_2 – pH) (equação 7).

Equação 7

$$\text{Endoglucanase (U/mL)} = -59,1959 + 3,8573X_1 - 0,0714X_1^2 - 0,6021X_2^2 + 0,0864X_1X_2; (R) = 0,981.$$

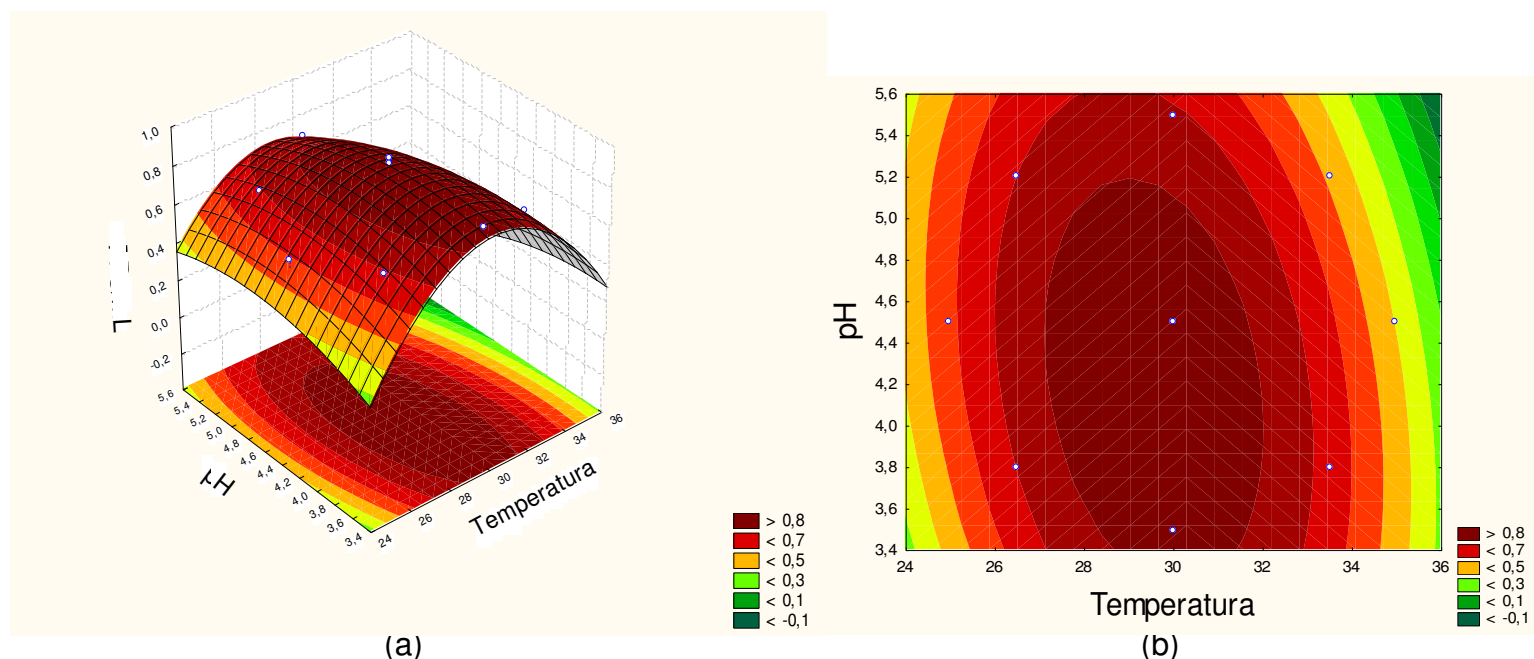


Figura 1.9: Superfície de resposta para atividade de Celulases Totais (FPU/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Os ensaios de validação foram satisfatórios, tendo como valor experimental (28 °C e pH 4,5) igual a 3,10 U/mL e os valores preditos foram de 2,97 e 3,11 U/mL (Tabela 1.12)

Tabela 1.9: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Endoglucanase e para o substrato *BLara*+*Sac*.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	-59,1959	6,600135	-8,9689	0,000287	-72,49	-45,89
X_1 - (1)Temp(L)	3,8573	0,308864	12,4888	0,000058	3,2350	4,4797
X_1 - Temp(Q)	-0,0714	0,004686	-15,2381	0,000022	-0,0809	-0,0620
X_2 - (2)pH (L)	2,5776	1,354212	1,9034	0,115357	-0,1512	5,3064
X_2 - pH (Q)	-0,6021	0,117162	-5,1393	0,003648	-0,8382	-0,3660
$X_1 X_2$ - 1L by 2L	0,0864	0,028229	3,0610	0,028070	0,0295	0,1433

O DCCR da avicelase (atividade exoglucanase) não atingiu a faixa ótima (Tabela 1.7 e Figura 1.11). Na Tabela 1.10 foram plotados os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a produção de

Exoglucanase (U/mL). Desta forma, verificou-se que somente a variável quadrática da temperatura (X_1) x pH (X_2) não foi significativa.

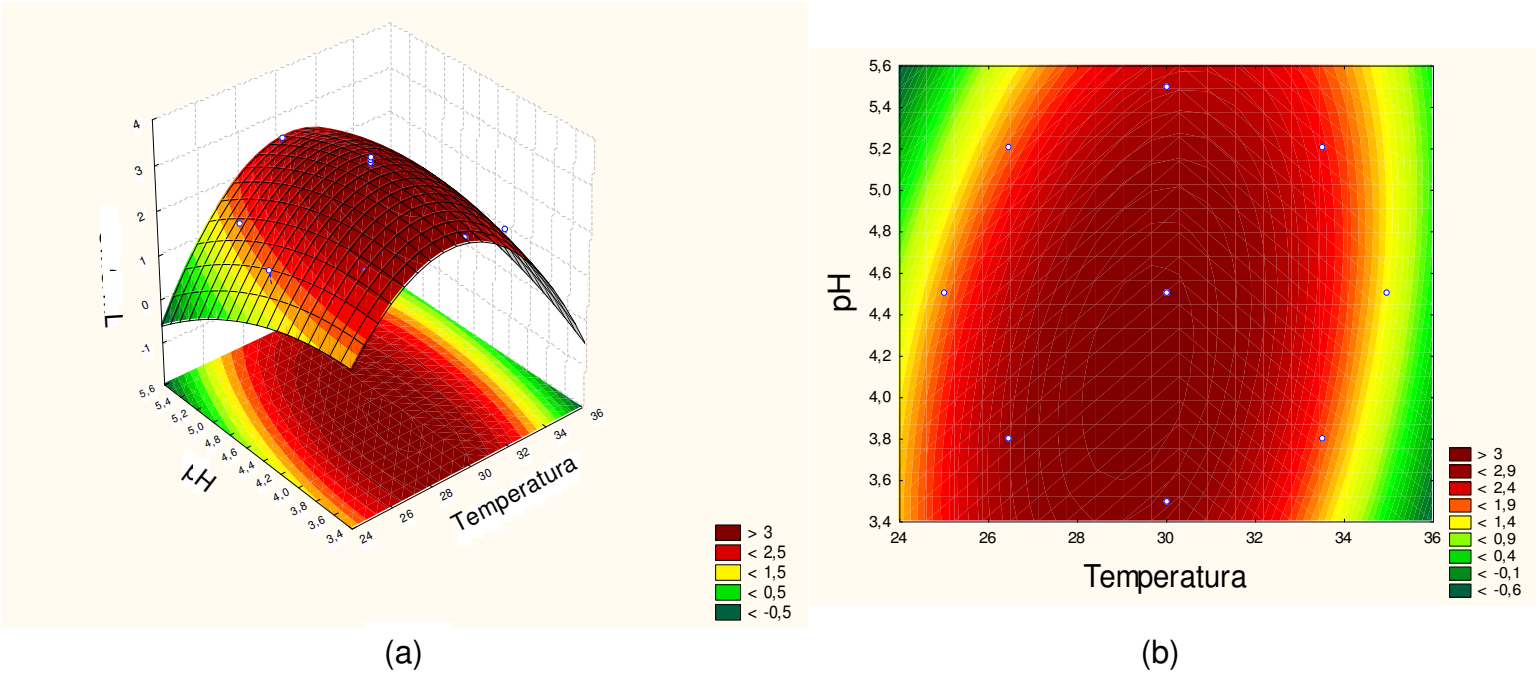


Figura 1.10: Superfície de resposta para atividade de Endoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Tabela 1.10: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Exoglucanase e para o substrato *BLara*+*Sac*.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	22,39286	3,028216	7,39474	0,000711	16,290	28,494
X_1 - (1)Temp(L)	-1,09734	0,141710	-7,74352	0,000574	-1,3828	-0,8117
X_1 - Temp(Q)	0,01572	0,002150	7,31029	0,000750	0,0113	0,0200
X_2 - (2)pH (L)	-1,89109	0,621328	-3,04363	0,028632	-3,1430	-0,6390
X_2 - pH (Q)	0,11815	0,053755	2,19801	0,079293	0,0098	0,2264
$X_1 X_2$ - 1L by 2L	0,02465	0,012952	1,90292	0,115430	-0,0014	0,0507

Com base nos coeficientes de regressão para a atividade de exoglucanase e para valores significativos ($p < 0,1$), o coeficiente de regressão foi calculado (equação 8).

Equação 8

$$\text{Exoglucanase (U/mL)} = 22,39286 - 1,09734X_1 + 0,01572X_1^2 - 1,89109X_2 + 0,11815X_2^2; (R = 0.956).$$

Os valores dos ensaios de validação foram aceitáveis, tendo como valor experimental (28 °C e pH 4,5) igual a 0,905 U/mL e os valores preditos foram de 0,901 e 1,056 U/mL (Tabela 1.12).

As condições da produção de xilanases, de acordo com o delineamento experimental, foram semelhantes às encontradas pela técnica de celulase totais, com o valor mínimo de 20,98 U/mL e máximo de 45,44 U/mL, respectivamente 35 °C e 30 °C, ambas no pH 4,5 (Tabela 1.7). O máximo de xilanases produzidas foi na faixa de 28-31 °C e pH 4,2-4,6 (Figura 1.12).

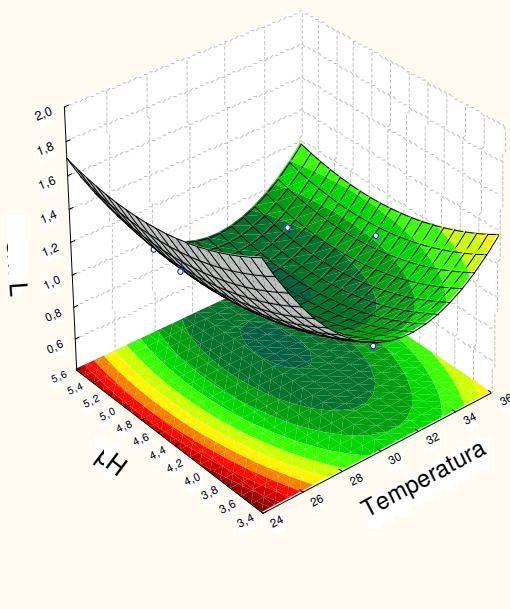
A Tabela 1.11 descreve os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a produção de Xilanases (U/mL). Assim, para a atividade de xilanases todos os parâmetros analisados foram considerados significativos ($p < 0,1$).

Com base na Tabela 1.11 dos coeficientes de regressão foi feita a equação 9, que descreve o modelo de atividade xilanolítica previsto pelo modelo reparametrizado que contém apenas termos estatisticamente significativos (X_1 – Temperatura (°C) e X_2 – pH).

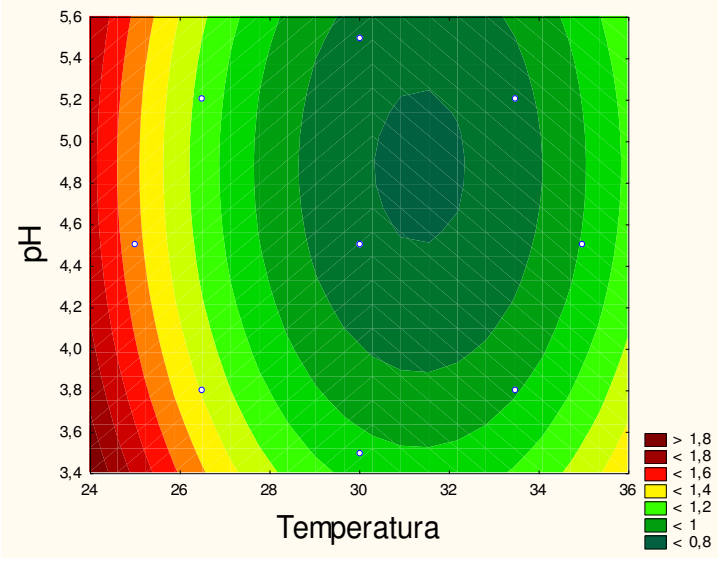
Equação 9

$$\text{Xilanase (U/mL)} = -855,163 + 47,525X_1 - 0,714X_1^2 + 92,529X_2 - 6,562X_2^2 - 1,231X_1X_2; (R = 0.949).$$

Esse ensaio de DCCR para as enzimas xilanolíticas foram satisfatórios, visto que, os ensaios de validação foram aceitáveis, mesmo tendo diferenças nos valores experimentais dos preditos (Tabela 1.7), como valor experimental (28 °C e pH 4,5) igual a 44,09 U/mL e os valores preditos foram de 43,72 e 44,39 U/mL (Tabela 1.12).



(a)

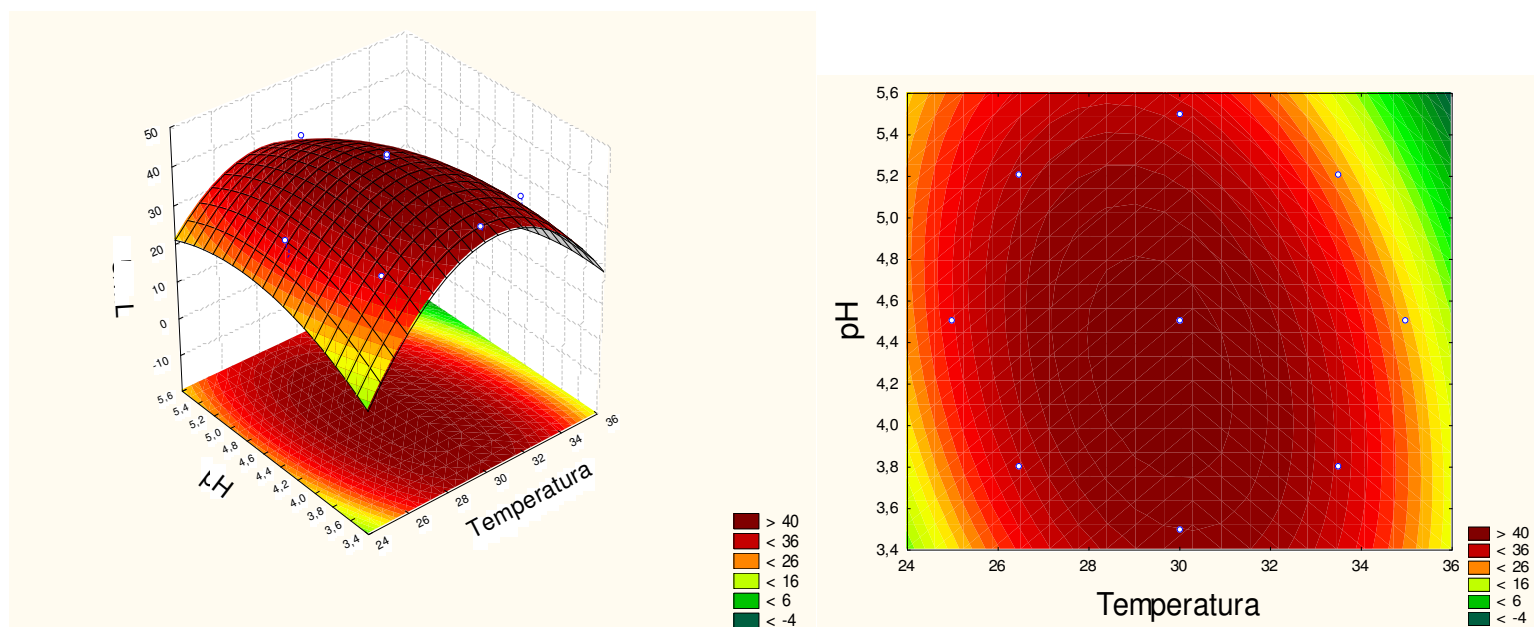


(b)

Figura 1.11: Superfície de resposta para atividade de Exoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Tabela 1.11: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade xilanase para o substrato *BLara*+*Sac*.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	<i>t</i> (5)	<i>p</i>	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	-855,163	121,4299	-7,04244	0,000892	-1099,8	-610,5
$X_1 - (1)Temp(L)$	47,525	5,6825	8,36339	0,000400	36,07	58,976
$X_1 - Temp(Q)$	-0,714	0,0862	-8,28257	0,000419	-0,89	-0,540
$X_2 - (2)pH (L)$	92,529	24,9149	3,71381	0,013800	42,32	142,73
$X_2 - pH (Q)$	-6,562	2,1556	-3,04404	0,028618	-10,91	-2,218
$X_1 X_2 - 1L \text{ by } 2L$	-1,231	0,5194	-2,37014	0,063941	-2,28	-0,184



(a)

(b)

Figura 1.12: Superfície de resposta para atividade de Xilanases (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Tabela 1.12: Valores preditos para o delineamento experimental (DCCR2²)

	Valores Previstos					Valor experimental
	Previsto	-90,% Conf.	+90,% Conf.	-90,% Pred.	+90,% Pred.	
FPU/mL ^a	0,8500	0,8289	0,8711	0,8051	0,8948	0,8534
U/mL ^b	3,0425	2,9729	3,1120	2,8747	3,2103	3,105
U/mL ^c	0,9790	0,9018	1,0562	0,8148	1,1432	0,905
U/mL ^d	44,061	43,729	44,393	43,356	44,766	44,09

^aCelulases Totais, R-sqr=0,98617; Adj:0,97234; ^bEndoglucanase, R-sqr=0,96776; Adj:0,94626; ^cExoglucanases, R-sqr=0,92558; Adj:0,87596; ^dXilanase, Var.:U/mL; R-sqr=0,94909, Adj:0,89817.

3.3.2. DCCR para o cultivo a partir do substrato T1+Sac

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais do planejamento que foi realizado para a fermentação do *T. reesei* QM 9414 junto com o substrato T1+Sac nas variáveis dependentes de pH e temperatura estão na Tabela 1.13 e as curvas de superfície de resposta gerada pelo modelo estão representadas nas Figuras 2.13, 2.14, 2.15 e 2.16.

Para celulasas totais todos os parâmetros analisados foram considerados significativos. Os valores de atividade de celulase totais obtido nos experimentos de DCCR 2² variaram de 0,34 FPU/mL (ensaio 6 – 35 °C e pH 4,5) a 0,74 FPU/mL (ensaio 11 – 30 °C e pH 4,5) nos 11 ensaios realizados (Tabela 1.13). Sendo que na Tabela 1.14 são descrito os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a produção de Celulasas Totais.

Tabela 1.13: Produção e atividades do complexo fibrolítico e atividades preditas para *T. reesei* QM 9414 nos ensaios experimentais e respostas em 15 dias de cultivo com o substrato *T1+Sac*.

Expe	Temp (°C)	pH	Total Cellulase (FPU/mL)		Endoglucanase (U/mL)		Exoglucanase (U/mL)		Xylanase (U/mL)	
			Expe ^a	Pred ^b	Expe ^a	Pred ^b	Expe ^a	Pred ^b	Expe ^a	Pred ^b
1	26,5	3,8	0,6	0,62	1,80	1,77	1,46	1,33	168,51	181,61
2	26,5	5,2	0,56	0,60	1,21	1,20	1,19	1,20	172,62	176,10
3	33,5	3,8	0,59	0,58	1,34	1,44	0,96	1,02	187,75	187,90
4	33,5	5,2	0,42	0,42	1,24	1,17	0,94	0,89	171,30	182,40
5	25,0	4,5	0,54	0,50	1,43	1,28	1,407	1,48	187,02	178,35
6	35,0	4,5	0,34	0,35	0,79	0,80	1,05	1,03	192,28	187,34
7	30,0	3,5	0,73	0,73	2,08	2,06	1,02	1,06	189,53	183,19
8	30,0	5,5	0,63	0,61	1,80	1,68	0,86	0,88	182,60	175,33
9	30,0	4,5	0,75	0,75	2,39	2,36	0,79	0,85	228,55	228,64
10	30,0	4,5	0,75	0,75	2,33	2,36	0,89	0,85	227,91	228,64
11	30,0	4,5	0,74	0,75	2,37	2,36	0,86	0,85	230,01	228,64

^aAtividades enzimáticas obtidas durante os experimentos; ^b Atividades enzimáticas preditas de acordo com os parâmetros considerados significativos.

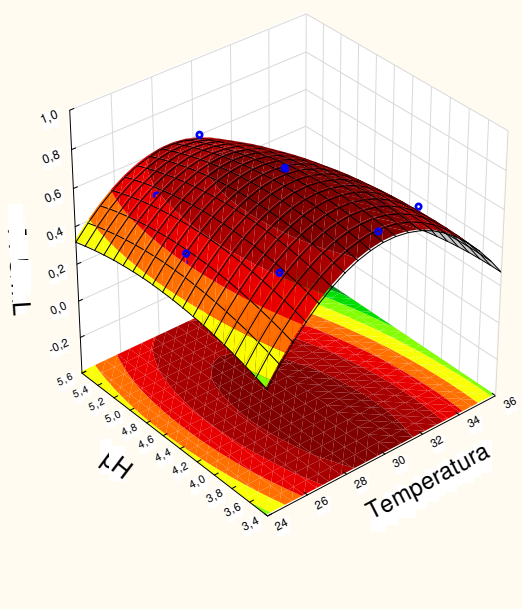
Tabela 1.14: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Celulasas Totais e para o substrato *T1+Sac* em 7 dias de cultivo.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	-13,4110	1,304594	-10,2798	0,000150	-16,039	-10,782
<i>X</i>₁ - (1)Temp(L)	0,8136	0,061051	13,3266	0,000043	0,6906	0,9366
<i>X</i>₁ - Temp(Q)	-0,0128	0,000926	-13,7725	0,000036	-0,0146	-0,0109
<i>X</i>₂ - (2)pH (L)	1,0344	0,267676	3,8643	0,011829	0,4950	1,5737
<i>X</i>₂ - pH (Q)	-0,0750	0,023158	-3,2377	0,023007	-0,1216	-0,0283
<i>X</i>₁ <i>X</i>₂ - 1L by 2L	-0,0141	0,005580	-2,5218	0,053059	-0,0253	-0,0028

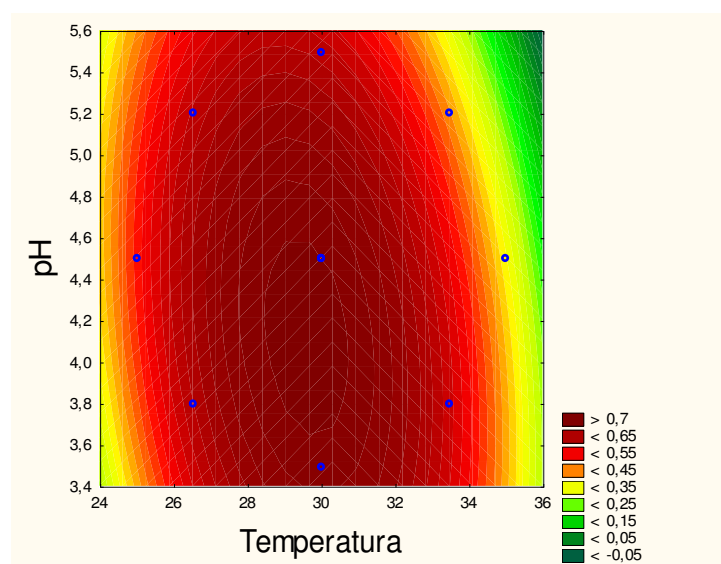
A equação final que representa o modelo ajustado para a produção desse complexo enzimático esta na equação 10.

Equação 10

$$\text{Celulases Totais (FPU/mL)} = -13,4110 + 0,8136X_1 - 0,0128X_1^2 + 1,0344X_2 - 0,0750X_2^2 - 0,0141 X_1X_2; (R) = 0,960.$$



(a)



(b)

Figura 1.13: Superfície de resposta para atividade de Celulases Totais (FPU/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Na produção de endoglucanase em fermentações de 10 dias, o delineamento experimental e os resultados obtidos no ensaio estão na Tabela 1.13 e variam de 0,79 U/mL (temperatura de 35 °C e pH 4,5) a 2,39 U/mL (30 °C e pH 4,5). Nota-se que os resultados, mínimos e máximos, foram em condições semelhantes às encontradas para a atividade de celulases totais.

A partir dos coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a produção de Endoglucanase (CMCase – U/mL), o parâmetro quadrático $X_1 X_2$ não foi significativo (Tabela 1.15) ($p < 0,1$).

A partir dos resultados obtidos na Tabela 1.15 foi calculada a equação 11 que representa o modelo ajustado para a produção desse complexo enzimático. Os resultados obtidos nos ensaios de validação como satisfatórios, tendo como valor experimental (28 °C e pH 4,5) igual a 0,8534 FPU/mL e os valores preditos foi de 0,8289 e 0,8711 FPU/mL (Tabela 1.18).

Equação 11

$$\text{Endoglucanase (U/mL)} = -46,1789 + 2,9036X_1 - 0,0530X_1^2 + 2,7305X_2^2 - 0,4932X_2; (R) = 0,971.$$

Tabela 1.15: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Endoglucanase e para o substrato T1+Sac em 10 dias de cultivo.

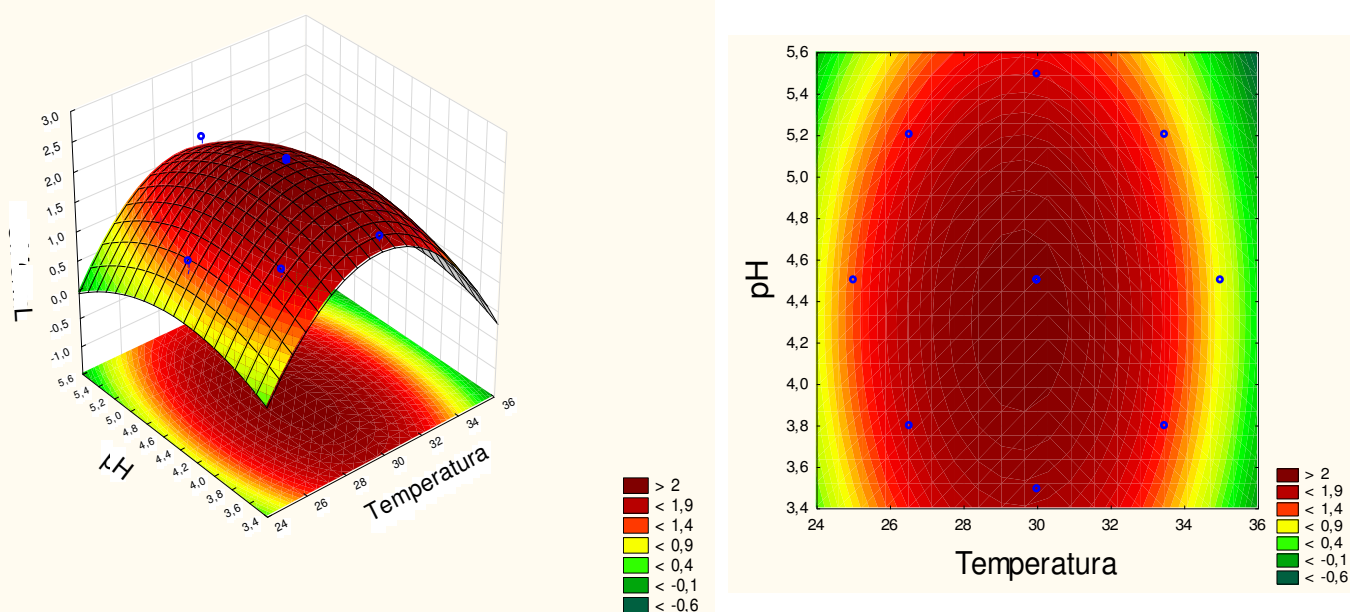
Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	-46,1789	6,186062	-7,4650	0,000681	-58,644	-33,713
X_1 - (1)Temp(L)	2,9036	0,289487	10,0302	0,000168	2,3203	3,4869
X_1 - Temp(Q)	-0,0530	0,004392	-12,0613	0,000069	-0,0618	-0,0441
X_2 - (2)pH (L)	2,7305	1,269253	2,1513	0,084108	0,1729	5,2881
X_2 - pH (Q)	-0,4932	0,109812	-4,4910	0,006453	-0,7144	-0,2719
$X_1 X_2$ - 1L by 2L	0,0505	0,026458	1,9089	0,114548	-0,0028	0,1038

A técnica de avicelase, assim como no substrato BLara+Sac (item 3.3.1), não atingiu a faixa ótima dessa variável independente, sendo que os resultados dos ensaios estão plotados na Tabela 1.13. Na Tabela 1.16 foram plotados os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a produção de Exoglucanase (Avicelase – U/mL) em 10 dias de cultivo, verificando-se novamente, que a variável quadrática da temperatura (X_1) x pH (X_2) não foi significativa.

Com base nos coeficientes de regressão a equação foi calculada (equação 12). E os valores dos ensaios de validação foram aceitáveis e plotados na Tabela 1.18

Equação 12

$$\text{Exoglucanase (U/mL)} = 23,07499 - 1,13076X_1 + 0,01620X_1^2 - 1,94869X_2 + 0,12175X_2^2; (R = 0.96).$$



(a)

(b)

Figura 1.14: Superfície de resposta para atividade de Endoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Tabela 1.16: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Exoglucanase e para o substrato *T1+ Sac* em 10 dias de cultivo.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	<i>t</i> (5)	<i>p</i>	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	23.07499	3.120461	7.39474	0.000711	16.787	29.362
$X_1 - (1)Temp(L)$	-1.13076	0.146027	-7.74352	0.000574	-1.4250	-0.8365
$X_1 - Temp(Q)$	0.01620	0.002216	7.31029	0.000750	0.0117	0.0206
$X_2 - (2)pH (L)$	-1.94869	0.640254	-3.04363	0.028632	-3.2388	-0.6585
$X_2 - pH (Q)$	0.12175	0.055393	2.19801	0.079293	0.0101	0.2333
$X_1 X_2 - 1L \text{ by } 2L$	0.02540	0.013346	1.90292	0.115430	-0.0015	0.0522

Na produção das enzimas com complexo xilanolítico pelo delineamento experimental obteve-se como valor mínimo de 168,51 U/mL e máximo de 230,01 U/mL (Tabela 1.13). Foi possível verificar a integração dos parâmetros analisados e plotados no modelo de superfície de resposta na Figura 1.16. A Tabela 1.17 descreve os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a produção de Xilanases (U/mL), e para essas atividades e nesse ensaio realizado o parâmetro quadrático de $X_1 X_2$ não foi

significativo ($p<0,1$). Com base na tabela dos coeficientes de regressão foi feita a equação 13.

Equação 13

$Xil\text{anase (U/mL)} = - 2712,82 + 120,26X_1 - 1,83X_1^2 + 503,49X_2 - 49,38X_2^2$; (R = 0.927).

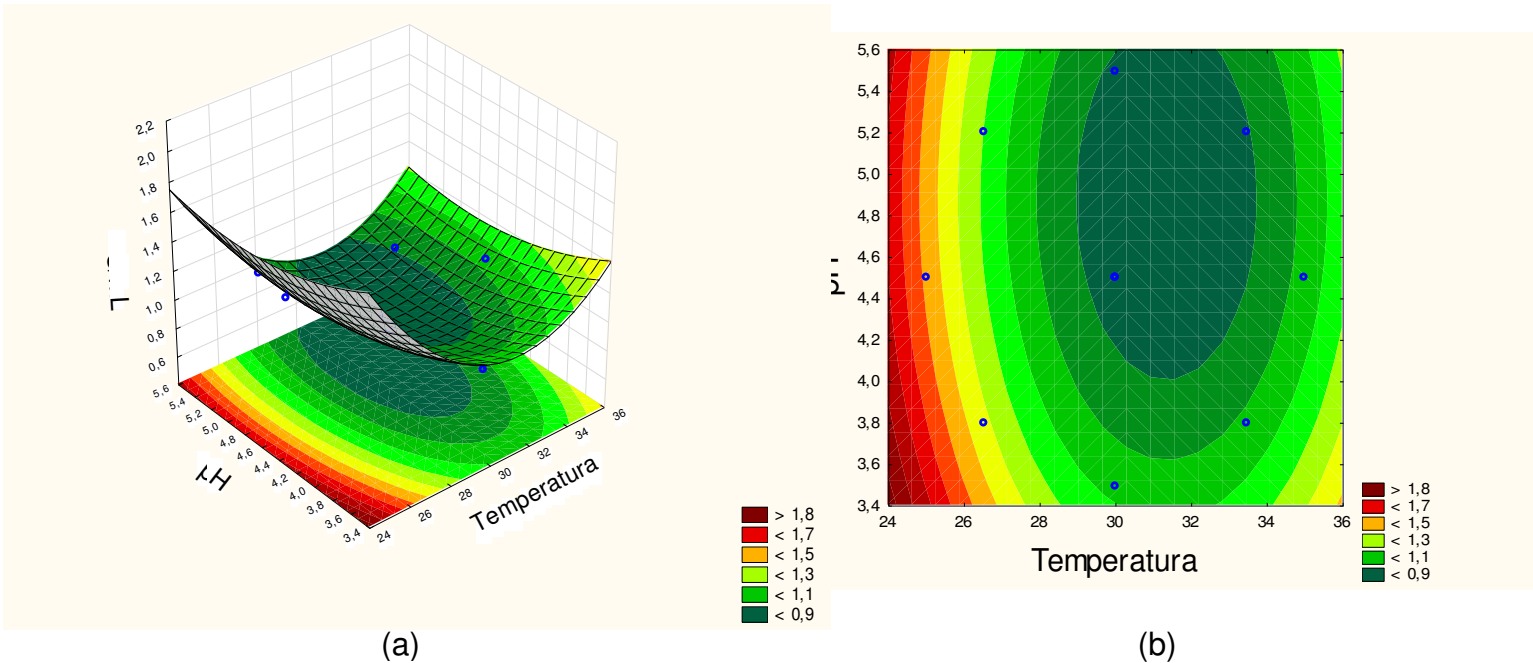
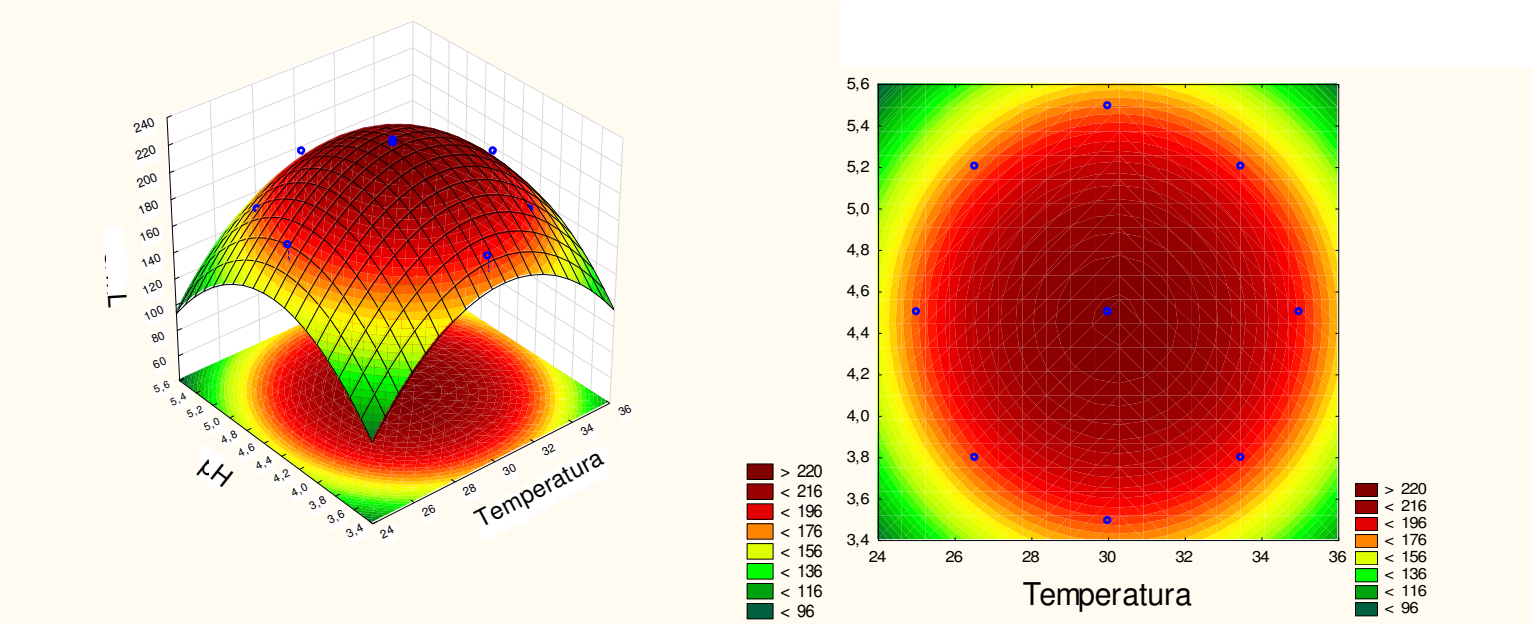


Figura 1.15: Superfície de resposta para atividade de Exoglucanase (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Esses ensaios de DCCR para as enzimas xilanolíticas foram satisfatórios, visto que, os ensaios de validação foram aceitáveis, mesmo tendo diferenças nos valores experimentais dos preditos (Tabela 1.18).

Tabela 1.17: Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de Exoglucanase e para o substrato T1+ Sac em 10 dias de cultivo.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Média	-2712,82	424,8140	-6,38589	0,001394	-3568,8	-1856,7
X ₁ - (1)Temp(L)	120,26	19,8799	6,04958	0,001779	80,21	160,32
X ₁ - Temp(Q)	-1,83	0,3016	-6,07351	0,001748	-2,44	-1,22
X ₂ - (2)pH (L)	503,49	87,1631	5,77638	0,002187	327,85	679,13
X ₂ - pH (Q)	-49,38	7,5411	-6,54875	0,001244	-64,58	-34,19
X ₁ X ₂ - 1L by 2L	-2,10	1,8169	-1,15503	0,300275	-5,76	1,56



(a) (b)

Figura 1.16: Superfície de resposta para atividade de Xilanases (U/mL): (a) curvas de contorno; (b) em função da temperatura (°C) e pH.

Tabela 1.18: Valores preditos para o delineamento experimental (DCCR2²).

	Valores Previstos					Valor experimental
	Previsto	-90,% Conf.	+90,% Conf.	-90,% Pred.	+90,% Pred.	
FPU/mL ^a	0,7309	0,7016	0,7603	0,6685	0,7934	0,7031
U/mL ^b	2,2514	2,2052	2,2976	2,1532	2,3496	2,25
U/mL ^c	1,0088	0,9292	1,0884	0,8397	1,1780	0,982
U/mL ^d	219,52	217,84	221,20	215,95	223,09	219,76

^aCelulases Totais, R-sqr=0,98026, Adj:0,960539; ^bEndoglucanase, R-sqr=0,9512, Adj:0,91866 96776; ^cExoglucanase, R-sqr=0,92558, Adj:0,87596 92558; ^dXilanasas, R-sqr=0,90874, Adj:0,84791.

Nesta etapa de caracterização das melhores condições de pH e temperatura, os resultados ficaram dentro dos índices já utilizados nas etapas anteriores para o cultivo do *T. reesei*, como já reportado na literatura (TANGNU et al., 1981; SILVA et al., 2016).

Assim, através da superfície de resposta gerada pelos modelos (Figuras 2.9; 2.10 e 2.12 – *Blara*+*Sac* e Figuras 2.13; 2.14 e 2.16), pode-se visualizar as interações entre os parâmetros (pH e temperatura) para a produção das enzimas celulolíticas e xilanolíticas. De acordo com o perfil elíptico observado de contorno para pH e temperatura houve uma forte interação entre esses dois

parâmetros. Assim, a maior produção de celulases totais, endoglucanase e xilanases foram obtidas nas faixas entre 28-31 °C e pH 4,2-4,6. A atividade para exoglucanase foram invertidos aos resultados obtidos para as atividades celulolíticas (Figuras 2.11 e 2.15). Esses resultados apontam que para elevar a produção dessas enzimas é necessário diminuir mais a temperatura (20 a 28 °C) e o pH (2,5 a 4,5). Desta forma é possível afirmar que a produção das exoglucanases necessita de condições especiais, onde a variação da temperatura e pH diferem das demais celulases, como demonstrado nos estudos de HÄKKINEN et al. (2015). Já a demais enzimas celulolíticas, como a endoglucanase, conseguem manter uma estabilidade de produção e atividade enzimática quando mantida as condições ótimas para o fungo *T. reesei*, como demonstrado nos estudos de CHOKHAWALA et al. (2015), que trabalharam com a expressão gênica e produção de endoglucanase com *T. reesei* mutados, e cultivados em diferentes temperaturas.

De acordo com os modelos gerados é possível concluir que o intervalo ótimo para a produção de todas as enzimas fibrolíticas em fermentação submersa, utilizando-se *BLara+Sac* ou *T1+Sac* é entre o pH 4,20-4,60 e temperatura de 28-31 °C. Resultados na literatura corroboram com os dados obtidos nessa etapa desse trabalho. ORTIZ et al. (2015) que estudaram *Trichoderma reesei* CBS 836.91 em sua caracterização, otimização e scale-up para produção de celulases, foi reportado que a faixa de pH para melhor produção de celulases totais (FPU/g) foi de 6,4-7,1 e para endoglucanase (U/g) foi de 5,94-6,61. O trabalho de CASTRO & PEREIRA (2010) verificou que as enzimas do complexo celulolítico apresentam como melhor faixa de pH os valores de pH 4 a 5. BASSO et al. (2010) trabalho com os fungos *Trichoderma reesei* QM 9414 e *T. reesei* RUT C30 e fungos isolados, o pH foi de 4,8 e o máximo de atividade de celulases totais foi de 2,3 U/g (15 dias de cultivo). No trabalho que visou determinar a influencia do pH e soluções tampões na produção de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei* Rut C-30 FERREIRA et al. (2009) reportou que o melhor pH de produção foi pH 4,8, com 1,6 FPU/mL. Com esses resultados ficou evidente que a faixa ótima de produção das enzimas fibrinolíticas, avaliadas nesse trabalho, esta de acordo com dados apresentados na literatura.

3.4. Experimentos com Fermentador de 2 litros

Com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores e visando um maior estudo sobre os dados coletados, novos cultivos foram feitos para aumento de escala e em condições físico-químicas controladas. Desta forma, novos ensaios foram investigados a partir de resultados prévios em fermentadores de 2 Litros. Os substratos selecionados foram o bagaço de laranja (polpa cítrica) suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose (*BLara+Sac* – Tabela 1.1) e *T1+Sac* (Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente pelo *P. ostreatus* e suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose) nas condições ótimas pré-definidas (item 3.3). Estas fermentações foram realizadas usando o *T. reesei* QM 9414 em 28 °C, pH 4,5 durante 15 dias. Amostras foram retiradas ao longo da fermentação e avaliadas perante as atividades fibrolíticas.

3.4.1. *BLara+Sac* em fermentador agitado (2 litros)

Os resultados para Celulases Totais (FPU/mL) produzidas pelo *T. reesei* QM 9414, em fermentador de agitação de 2 L (escala de laboratório) e em incubadora orbital (80 mL – protocolos de pequena escala), estão apresentados na Figura 1.17. Com o bagaço de laranja (*BLara+Sac* – Tabela 1.19) obteve-se o pico de produção de enzimas do complexo celulolítico em fermentador de 2 Litros no 15º dia de cultivo com 1,76±0,00 FPU/mL ou 58,66±0,07 FPU/g de substrato (Equação 5).

Uma análise estatística demonstrou que, além do crescimento de atividades com o passar do tempo, elas foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Entretanto, somente após o 7º dia de cultivo ocorreu um aumento expressivo na produção dessas enzimas, elevando-se de 0,44±0,00 FPU/mL para 1,42±0,00 FPU/mL ($p > 0,05$), uma elevação de aproximadamente 3,3 vezes.

Em adição a isso, e comparando as atividades obtidas com o cultivo em incubadora orbital (80 mL – item 3.2), ficou evidente (Figura 1.17) que o cultivo em pequena escala não respondeu com a mesma eficiência, quando comparado o 7º com o 10º dia, respectivamente, 0,62±0,04 FPU/mL e 0,85±0,07 FPU/mL – ganho de aproximadamente de 1,3 vezes. Assim, o melhor resultado

do fermentador de 2 L foi aproximadamente 2 vezes superior ($1,76 \pm 0,00$ FPU/mL – 15º dia, contra $0,85 \pm 0,07$ FPU/mL – 10º dia) (Tabela 1.6 e 22), porém esse ganho de eficiência foi somente após o 10º dia de cultivo.

Tabela 1.19: Produção enzimática com Bagaço de laranja (*BLara+Sac*) cultivado em fermentador de 2 litros em condições controladas e diferentes dias de cultivo.

Exerim.^a	Celulases Totais(FPase) FPU/mL	Endoglucanase (CMCase) U/mL	Exoglucanase (Avicelase) U/mL	Xilanase U/mL
3 dia	$0,35 \pm 0,00^a$	$0,32 \pm 0,03^{a'}$	$0,05 \pm 0,00^{a''}$	$6,54 \pm 0,50^{a'''}$
5 dia	$0,27 \pm 0,01^b$	$0,51 \pm 0,08^{b'}$	$0,04 \pm 0,00^{a''}$	$22,96 \pm 1,02^{b'''}$
7 dia	$0,44 \pm 0,00^c$	$0,59 \pm 0,09^{b'}$	$0,05 \pm 0,00^{a''}$	$29,99 \pm 1,88^{c'''}$
10 dia	$1,42 \pm 0,00^d$	$2,81 \pm 0,03^{c'}$	$0,23 \pm 0,00^{b''}$	$32,57 \pm 2,00^{d'''}$
15 dia	$1,76 \pm 0,00^e$	$4,28 \pm 0,09^{d'}$	$0,56 \pm 0,00^{c''}$	$36,85 \pm 2,21^{e'''}$

^a 3 dias – 72 h; 5 dias – 120 h; 7 dias – 168 h; 10 dias – 240 h; 15 dias – 360 h. Diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As atividades de endoglucanase em fermentador de 2 L, nos diferentes tempos de amostra, então na Tabela 1.19. Ao avaliar as atividades obtidas ficou evidente que, novamente, somente após o 7 dia de cultivo ocorreu um aumento considerável da atividade endoglucanase (7º dia – $0,59 \pm 0,09$ U/mL e 10º dia – $2,81 \pm 0,03$ U/mL) ($p < 0,05$), sendo uma elevação de aproximadamente 4,8 vezes.

A comparação de ambas as atividades endoglucanase produzidas, tanto em fermentador de 2 litros como em incubadora orbital (80 mL), estão na Figura 1.18. A produção enzimática em fermentador de 2 Litros revelou o pico de atividade com o resultado de $4,28 \pm 0,09$ U/mL ou $142,94 \pm 3,07$ U/g de substrato (Equação 5). Esse resultado foi aproximadamente 1,5 vezes superior ao apresentado pelo melhor dia de produção para o cultivo em Incubadora orbital (80 mL), sendo que o maior valor de atividade endoglucanase foi no 10º dia de fermentação, $3,14 \pm 0,10$ U/mL ou $104,69 \pm 3,34$ U/g (Equação 5) ($p < 0,05$).

Na quantificação das exoglucanase (Avicelase – U/mL) para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose (*BLara+Sac*) os resultados estão plotados na Tabela 1.19. Para essas enzimas o cultivo em fermentador

foi desfavorável, contudo o mesmo padrão é averiguado em relação ao crescimento em eficiência em sua produção.

No 7º dia de cultivo o valor de atividade foi de apenas $0,05 \pm 0,00$ U/mL, já no 10º dia a atividade subiu para $0,23 \pm 0,00$ U/mL, uma elevação de aproximadamente 4,7 vezes. O mesmo padrão foi demonstrado no cultivo em incubadora orbital, que após o décimo dia de fermentação ocorreu uma queda na concentração e atividade das exoglucanase.

A comparação entre as atividades exoglucanase do fermentador e da incubadora orbital está na Figura 1.19. Os resultados obtidos demonstraram que a incubadora orbital foi mais eficiente na produção dessas enzimas, com atividade enzimática de $0,79 \pm 0,06$ U/mL e $26,64 \pm 2,09$ U/g (Equação 5) (10º dia de cultivo), contra no máximo $0,55 \pm 0,00$ U/mL e $18,33 \pm 0,07$ U/g (Equação 5) no fermentador de 2 litros em 15 dias de fermentação ($p < 0,05$).

O perfil de produção das enzimas xilanolíticas em fermentador de 2 L estão na Tabela 22. Neste caso, a elevação da produção enzimática já aconteceu após o 3º dia de fermentação, que subiu de $6,54 \pm 0,50$ U/mL para $22,96 \pm 1,02$ U/mL, uma elevação de aproximadamente 3,6 vezes (Figura 1.20). Assim como os demais perfis das demais enzimas fibrolíticas produzidas, ocorreu um crescimento significativo ($p > 0,05$) da atividade para cada dia avaliado e não ocorreu uma queda das atividades xilanolíticas no 15º dia de fermentação.

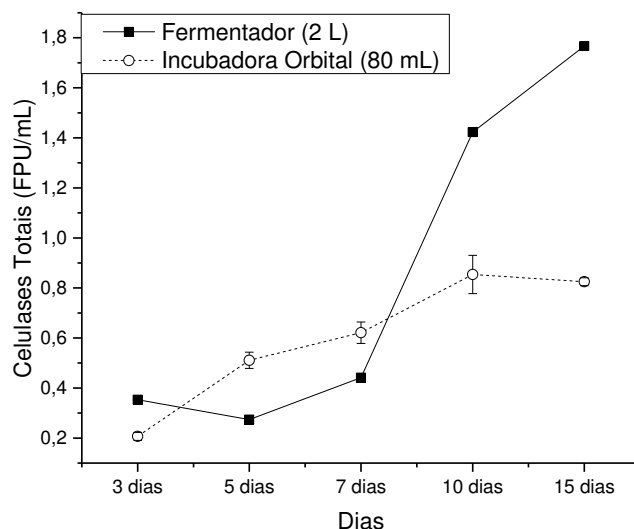


Figura 1.17: Produção de enzimas fibrolíticas – Celulases Totais (FPU/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.

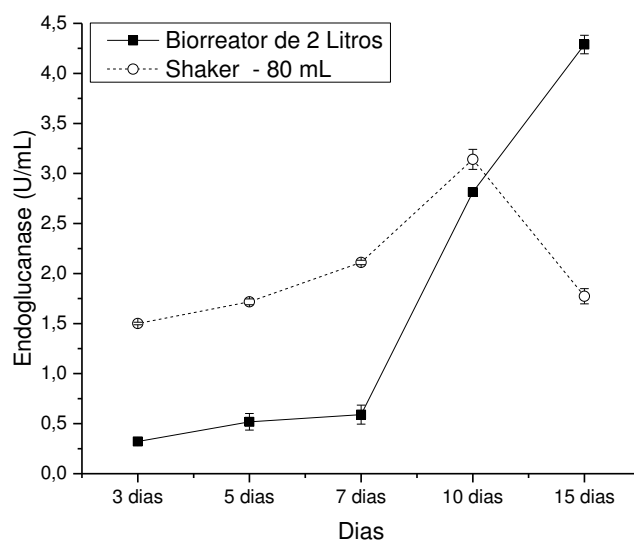


Figura 1.18: Produção de enzimas fibrolíticas – Endoglucanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.

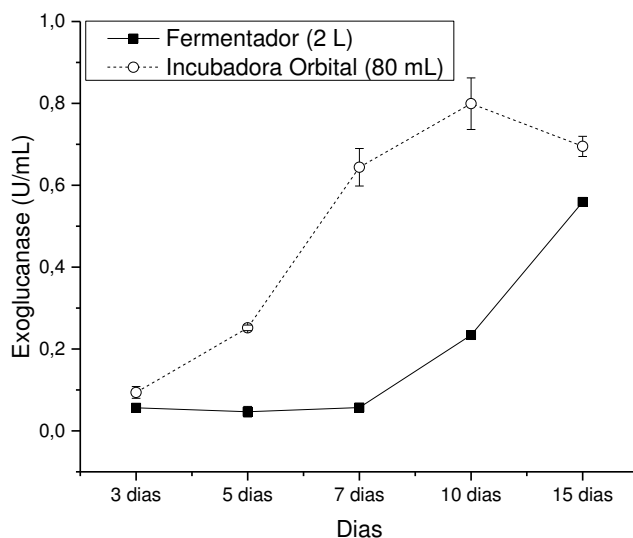


Figura 1.19: Produção de enzimas fibrolíticas – Exoglucanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5

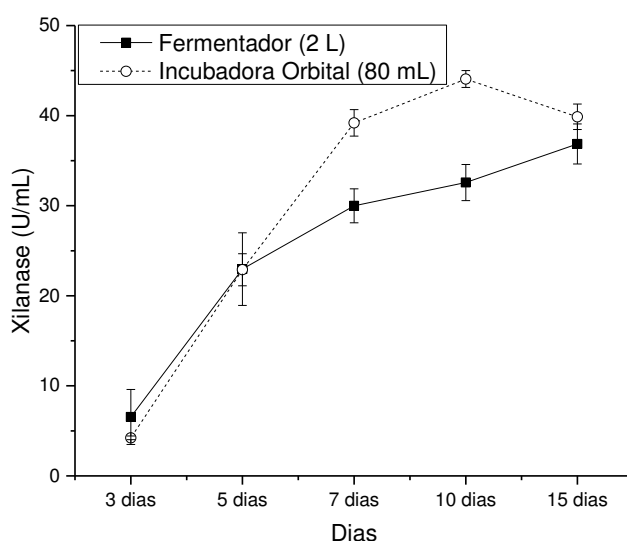


Figura 1.20: Produção de enzimas fibrolíticas – Xilanase (U/mL) – para o bagaço de laranja suplementado com 1% (m.v⁻¹) sacarose, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5

3.4.2. T1+Sac em fermentador agitado (2 litros)

Nesta etapa do trabalho foi cultivado o *T. reesei* QM 9414 em fermentador agitado com o substrato T1+Sac, em 28 °C, pH 4.5, 250 RPM e as demais condições descritas anteriormente. Os principais resultados enzimáticos estão na Tabela 1.20.

Tabela 1.20: Produção enzimática com Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado biologicamente – T1+Sac (Capítulo 3) cultivado em fermentador de 2 litros em condições controladas e diferentes dias de fermentação

Exerim.^a	Celulases Totais(FPase) FPU/mL	Endoglucanase (CMCase) U/mL	Exoglucanase (Avicelase) U/mL	Xilanase U/mL
3 dia	0,09±0,00 ^a	1,20±0,05 ^{a'}	0,18±0,00 ^{a''}	26,25±3,05 ^{a'''}
5 dia	0,08±0,01 ^a	1,46±0,02 ^{b'}	0,31±0,01 ^{b''}	42,96±4,02 ^{b'''}
7 dia	0,08±0,00 ^a	1,60±0,04 ^{c'}	0,39±0,00 ^{c''}	42,72±2,80 ^{b'''}
10 dia	0,22±0,00 ^b	2,23±0,05 ^{d'}	0,59±0,00 ^{d''}	63,53±2,05 ^{c'''}
15 dia	0,44±0,00 ^c	3,59±0,02 ^{e'}	0,86±0,02 ^{e''}	100,10±9,27 ^{d'''}

^a3dias – 72 h; 5 dias – 120 h; 7 dias – 168 h; 10 dias – 240 h; 15 dias – 360 h.

Diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As enzimas quantificadas demonstrou que a produção em incubadora orbital foi superior ao fermentador de 2 Litros, ou muito próxima (Tabela 1.20). A produção de Celulases Totais (FPU/mL) foi significativa a partir do 10º dia de cultivo, subindo de 0,08±0,00 FPU/mL para 0,22±0,00 FPU/mL, uma aumento de aproximadamente 3 vezes. Entretanto, o cultivo em incubadora orbital (80 mL) foi superior (0,72±0,01 FPU/mL) no 7º dia. Todavia já no 10º dia ocorreu uma queda significativa 1,2 vezes (10º dia - 0,60±0,04 FPU/mL) (Figura 1.21). A compilação dos dados mostrou que no fermentador o pico de produção de enzimas do complexo celulolítico foi no 15º dia, com 0,44±0,00 FPU/mL ou 14,77±0,07 FPU/g de substrato (Equação 5), enquanto para o incubadora orbital (80 mL) o pico de atividade foi aproximadamente 1,7 vezes superior (7º dia – 0,72±0,01 FPU/mL).

As atividades endoglucanase em fermentador de 2 L, nos diferentes tempos de amostra, então na Tabela 1.20. Nesse caso, o crescimento em atividade de endoglucanase foi pontual, obtendo-se um aumento significativo de atividade, e como visto em outras atividades obtidas em fermentador, a

partir do 10º dia de fermentação, elevando a atividade em aproximadamente 1,5 vezes.

Entretanto, para as enzimas endoglucanase produzidas em incubadora orbital (80 mL) e para esse substrato, não ocorreu à queda após 10 dias de cultivo, sendo que o pico ocorreu no 15º dia (Figura 1.22). A produção enzimática em fermentador de 2 Litros atingiu um valor máximo de endoglucanase de $3,59 \pm 0,02$ U/mL ou $119,94 \pm 0,70$ U/g de substrato (Equação 5), enquanto a fermentação em incubadora orbital o máximo de atividade foi de $3,63 \pm 0,11$ U/mL ou $121,02 \pm 3,70$ U/g, também no 15º dia, sem diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Os resultados da quantificação das exoglucanase (Avicelase – U/mL) no fermentador e para o substrato *T1+Sac* estão plotadas na Tabela 1.20. A comparação entre as atividades do fermentador e do incubadora orbital estão na Figura 1.23. Os resultados obtidos demonstraram que o incubadora orbital foi mais eficiente na produção dessas enzimas, tendo com valores de atividade enzimática de $1,17 \pm 0,01$ U/mL e $39,28 \pm 0,44$ U/g (Equação 5) (15º dia de cultivo), contra, no máximo, $0,86 \pm 0,02$ U/mL e $28,93 \pm 0,89$ U/g (Equação 5) para o fermentador em 15 dias de fermentação ($p < 0,05$).

O perfil de produção das enzimas xilanolíticas em fermentador de 2 L estão plotados na Tabela 1.20. Neste caso, o máximo de atividade foi conseguido no 15º dia de fermentação com $100,10 \pm 9,27$ U/mL, sendo superior aos demais dias de atividade ($p > 0,05$). Para a fermentação em incubadora orbital o pico de produção dessas enzimas foi no 10º dia de fermentação com $219,97 \pm 3,99$ U/mL e $7332,48 \pm 133,15$ U/g de substrato, sendo praticamente 2,2 vezes superior ao fermentador. Entretanto, após esse pico de atividade ocorreu uma queda significativa para a atividade de xilanase (15º dia – $111,36 \pm 5,22$ U/mL) (Figura 1.24).

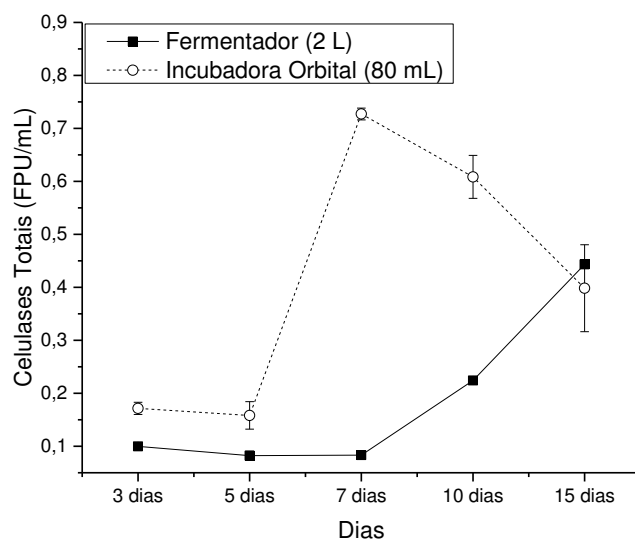


Figura 1.21: Produção de enzimas fibrolíticas – Celulases Totais (FPU/mL) – para o substrato *T1+Sac*, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.

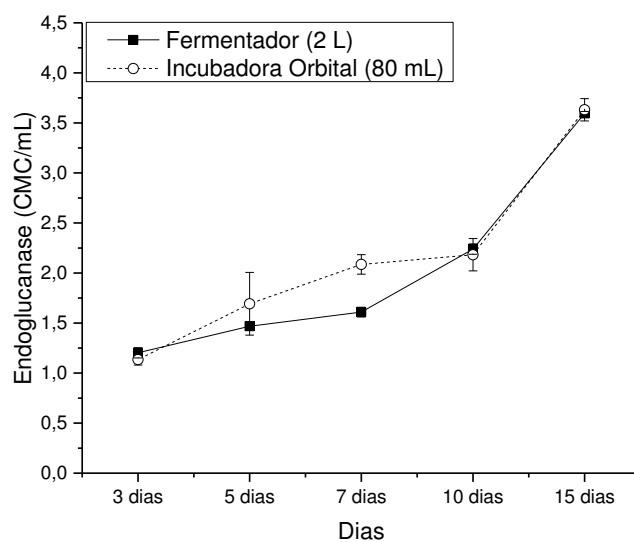


Figura 1.22: Produção de enzimas fibrolíticas – Endoglucanase (U/mL) – para o substrato *T1+Sac*, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.

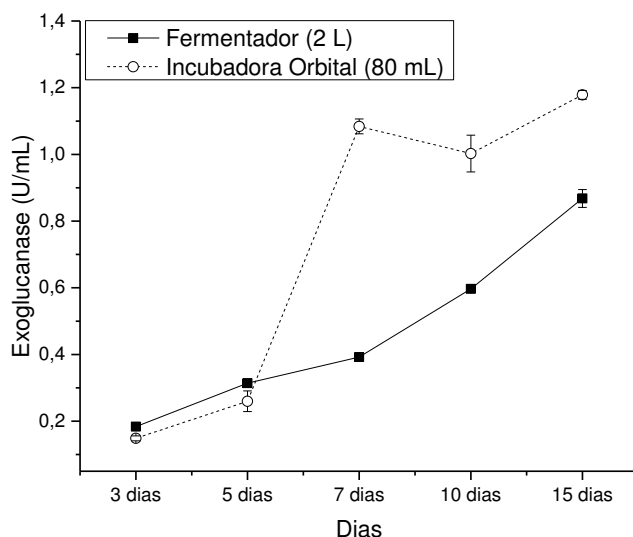


Figura 1.23: Produção de enzimas fibrolíticas – Exoglucanase (U/mL) – para o substrato *T1+Sac*, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.

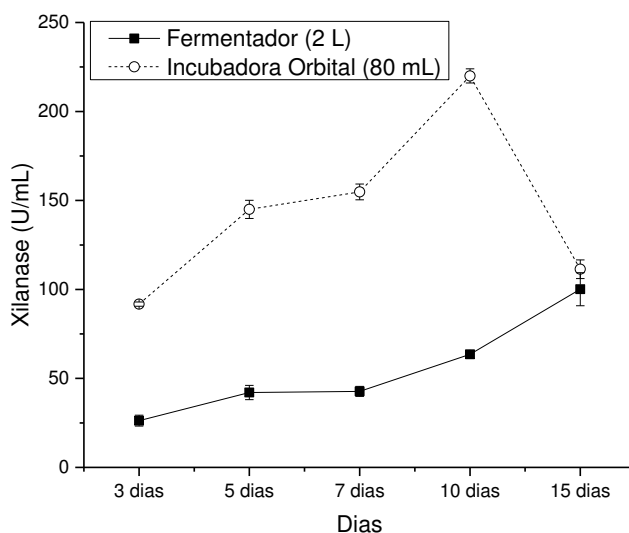


Figura 1.24: Produção de enzimas fibrolíticas – Xilanase (U/mL) – para o substrato *T1+Sac*, cultivado com *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 litros e incubadora orbital (80 mL), 15 dias, 28 °C e pH 4,5.

O principal ponto dessa etapa foi a ampliação da escala, tendo como objetivo a elevação da atividade enzimática no extrato produzido. O cultivo feito com o bagaço de laranja (polpa cítrica) demonstrou um aumento nas celulases produzidas quando cultivado em fermentador de 2 Litros. Entretanto o mesmo

comportamento não foi averiguado para o substrato *T1*. Provavelmente a concentração de açúcares e cadeias de oligossacarídeos na polpa cítrica mostrou-se mais adequado nessa etapa, visto que a polpa cítrica é composta não somente por bagaço de laranja, mas por sementes e frutas descartadas (MENEGETTI & DOMNGUES, 2008). Além de ser uma biomassa lignocelulósica energética, com 23% de proteína bruta, elevados níveis de carboidratos e apenas 3% de lignina (ÍTALO et al.; 2000). Assim, sua constituição pode ter influenciado na capacidade do fungo *T. reesei* conseguir manter a produção enzimática mesmo após a ampliação da escala.

Porém, para ambos os substratos cultivados em fermentador de 2 Litros o limite nutricional, químico ou físico não foi atingido, pois para ambos todas as atividades quantificadas demonstraram crescimento até o último dia avaliado. Assim, tanto para as enzimas quantificadas pelas técnicas de celulasas como a de xilanasas, ficou evidente que a fermentação em volume maior e condições controladas de pH e temperatura proporcionaram um ganho na produção dessas enzimas, principalmente após o 7º e o 10º dia de cultivo, onde ocorreu um aumento destacável. Como no caso da atividade de celulasas totais para o bagaço de laranja que no 7º dia de cultivo ocorreu um aumento expressivo na produção dessas enzimas, elevando-se de 0,44 FPU/mL para 1,42 FPU/mL ($p>0,05$), uma elevação de aproximadamente 3,3 vezes. Ou mesmo para as exoglucanase que no 7º dia de cultivo apresentava apenas 0,05 U/mL, já no 10º dia a atividade subiu para 0,23 U/mL, uma elevação de aproximadamente 4,7 vezes (Tabela 1.19). O mesmo acontecendo para AHAMED et al. (2008), que cultivou em fermentador de 3 Litros os fungos *T. reesei* RUT-C30 e *A. niger* LMA e reportaram uma atividade máxima de 7,1 FPU/mL após vários dias de cultivo.

Estes resultados podem ser explicados pela maior eficiência do fermentador quanto a agitação, transferência de oxigênio e controle do pH (ESPERANÇA et al., 2014). A faixa de pH entre 4 e 4,5 foi mais favorável para a produção da enzima, como observado nos testes do DCCR (item 3.3). Sendo que essa faixa de pH já foi reportada na literatura como favorável na produção enzimática, como nos estudos TANGNU et al. (1981) que trabalhou com produção enzimática em fermentador com controle de pH.

As enzimas produzidas em incubadora orbital (80 mL) apresentaram quedas de atividade após alguns dias de cultivo, como no caso da endoglucanase produzida tendo como fonte o bagaço de laranja (polpa cítrica), apresentando no 10º dia de cultivo $3,14 \pm 0,01$ U/mL e já no 15º a atividade caiu para $1,77 \pm 0,03$ U/mL ($p < 0,05$). Esse padrão de queda foi repetidos em praticamente todas as enzimas fibrolíticas produzidas em incubadora orbital (870mL) e avaliadas nesse trabalho, inclusive para as xilanases, que apresentou uma perda de atividade de até 40% quando comparado o 10º com o 15º dia de cultivo (Tabela 1.20). Essa queda provavelmente aconteceu devido ao esgotamento das condições físico-químicas do cultivo em pequena escala, visto que o volume é bem inferior ao fermentador de 2 Litros e não apresenta um controle constante de pH. Podendo também ser devido à produção de metabólitos secundários que são tóxicos para o micro-organismo, e ao memos tempo pode causar a desnaturação das enzimas. Como por exemplo, as enzimas proteolíticas produzidas e acumuladas ao longo do bioprocessamento, visto que ambos os substratos apresentam uma boa concentração de proteína bruta, poderiam possivelmente degradar as enzimas celulolíticas (HAAB et al., 1990; SILVA et al., 2016). Assim, apesar da superioridade na eficiência demonstrada para algumas atividades enzimáticas obtidas em incubadora orbital (80 mL), é verificável que, por se tratar de um volume mais baixo, o meio de cultivo chegou a seu limite, o que refletiu diretamente na perda da atividade após um período mais longo de cultivo. Enquanto que com a metodologia utilizando o fermentador de 2 Litros, às atividades mantiveram-se com uma elevação constante e significativa até o último dia de cultivo, mostrando que o limite para esse meio de cultivo ainda não foi atingido.

A partir dos dados obtidos e discutidos acima, pode-se relatar que a utilização do método de cultivo em fermentador para o bagaço de laranja (polpa cítrica) suplementado com sacarose mostrou-se mais eficiente para algumas atividades celulolíticas. Entretanto, para o substrato *T1+Sac* essa eficiência ainda não foi contemplada. A ação combinada do controle de condições e o substrato efetivo como fonte de carbono resultou em um impacto significativo sobre a produção das enzimas estudadas, mesmo que para o *T1+Sac* não tenha ultrapassado a fermentação em pequena escala. Pois, para ambos os

substratos ficou evidente que o limite de produção e do meio de cultivo não foi atingido. Assim, essa metodologia em fermentador deve ser considerada no desenvolvimento e aperfeiçoamento da engenharia de bioprocessos na produção enzimática.

3.5. Testes de estabilidade do complexo fibrolítico produzido

3.5.1. Efeito na atividade enzimática em diferentes temperaturas e pH do meio reacional

Os complexos enzimáticos fibrolíticos obtidos pelo cultivo em fermentador de 2 Litros em 15 dias de fermentação com os substratos *BLara+Sac* e *T1+Sac*, foram avaliados para determinar a melhor temperatura para estas enzimas fibrolíticas, através da técnica de Celulases Totais (FPU/mL) realizadas em pH 5,6, utilizando-se papel de filtro como substrato desta reação (Tabela 1.21).

Tabela 1.21: Teste de temperatura para os complexos fibrolíticos produzidos em fermentador de 2 litros em condições controladas – 15 dias.

Temperatura (°C)	<i>BLara+Sac</i>	<i>T1+Sac</i>
	Celulases Totais (FPU/mL)	Celulases Totais (FPU/mL)
30	0,78±0,08 ^a	0,12±0,01 ^{a'}
35	0,89±0,05 ^a	0,15±0,03 ^{a'}
40	1,02±0,06 ^b	0,25±0,02 ^{b'}
45	1,45±0,05 ^c	0,28±0,01 ^{b'}
50	1,76±0,02 ^d	0,46±0,01 ^{c'}
55	1,82±0,02 ^e	0,47±0,02 ^{c'}
60	1,86±0,04 ^e	0,46±0,09 ^{c'}
65	1,50±0,08 ^c	0,32±0,01 ^{d'}
70	1,00±0,07 ^b	0,12±0,00 ^{a'}
75	0,62±0,08 ^a	0,05±0,02 ^{e'}
80	0,35±0,09 ^f	0,03±0,01 ^{e'}

Diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A temperatura ótima para a reação enzimática com as enzimas fibrolíticas de *BLara+Sac*, quantificada pela técnica de Celulases totais, foi na faixa de 50 a 60 °C (respectivamente, 1,76±0,02 FPU/mL e 1,86±0,04 FPU/mL), entretanto foi observado uma diferença estatística entre eles ($p > 0,05$), os resultados estão plotados na Figura 1.25. Contudo, na temperatura de 65 °C ocorreu uma perda de atividade de 30%, caindo para

$0,32 \pm 0,01$ FPU/mL. A atividade celulolítica apresentou uma redução mínima de 19% quando incubados em temperatura mais alta, caindo de $1,86 \pm 0,04$ FPU/mL ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) para $1,50 \pm 0,08$ FPU/mL ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$) ($p < 0,05$). As enzimas produzidas pelo cultivo com a fonte de carbono *T1+Sac*, assim como com *BLara+Sac*, apresentaram temperatura ótima de 50 a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($0,46$ FPU/mL) (Figura 1.25).

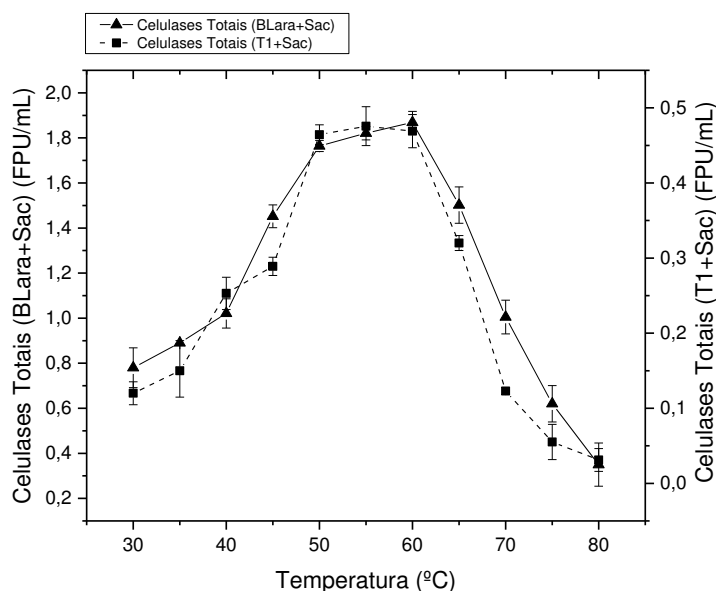


Figura 1.25: Efeito da temperatura na atividade enzimática para o complexo fibrolítico produzido pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 L e substratos: *BLara+Sac* e *T1+Sac*.

O complexo enzimático obtido para ambos os substratos na metodologia de fermentador, também foram avaliados para a faixa ótima de pH (Tabela 1.22). Os resultados obtidos para as enzimas produzidas com o substrato *BLara+Sac*, nos diferentes pHs de reação enzimática com o papel de filtro, foram influenciados de forma mais significativas nos extremos. Desta forma, a faixa ótima de pH foi de 5,0 a 6,0, quantificada pela técnica de Celulases Totais. Todavia, o valor máximo alcançado foi no pH 5,5 com $1,78 \pm 0,05$ FPU/mL. Sendo que ocorreu uma queda de 15% quando o pH subiu para 6,5 (Figura 1.26). Para as enzimas produzidas com a fonte de carbono *T1+Sac* o pico de atividade também ocorreu com a reação enzimática no pH 5,5 ($0,44 \pm 0,01$ FPU/mL), sendo que a faixa ótima para esse complexo enzimático

foi a mesma que para o outro substrato testado, ou seja, entre os pHs 5,0 até 6,0 (Figura 1.26).

Tabela 1.22: Atividade enzimática em diferentes pHs para os complexos fibrolíticos produzidos em fermentador de 2 litros.

pH	<i>BLara+Sac</i>	<i>T1+Sac</i>
	Celulases Totais (FPU/mL)	Celulases Totais (FPU/mL)
3,0	1,59±0,02 ^a	0,25±0,00 ^a
3,5	1,60±0,04 ^a	0,32±0,01 ^b
4,0	1,68±0,03 ^b	0,37±0,01 ^c
4,5	1,69±0,02 ^b	0,39±0,01 ^c
5,0	1,75±0,02 ^c	0,43±0,00 ^d
5,5	1,78±0,05 ^c	0,44±0,01 ^d
6,0	1,70±0,04 ^b	0,42±0,01 ^d
6,5	1,43±0,02 ^d	0,39±0,02 ^c
7,0	1,30±0,03 ^e	0,33±0,01 ^b
7,5	0,91±0,04 ^f	0,21±0,01 ^e
8,0	0,65±0,06 ^g	0,18±0,00 ^f
8,5	0,42±0,03 ^h	0,12±0,01 ^g
9,0	0,32±0,06 ⁱ	0,11±0,00 ^g
10,0	0,02±0,00 ^j	0,05±0,00 ^h

Diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

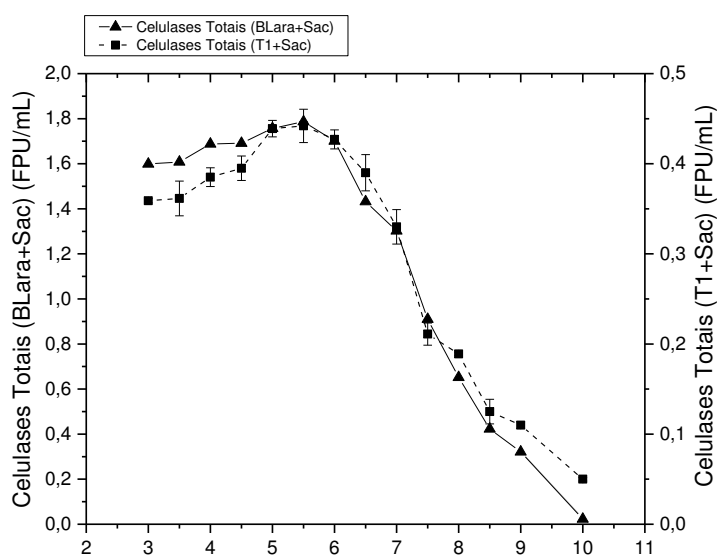


Figura 1.26: Atividade enzimática em função do pH de reação medido por Celulases Totais (FPU/mL) no complexo fibrolítico produzido pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 L e substratos: *BLara+Sac* e *T1+Sac*.

3.5.2. Estabilidade térmica do extrato fibrolítico

Neste trabalho foram feitos testes rápidos (até 1 h) e mais prolongados (até 48 h). Os complexos enzimáticos produzidos e avaliados em pH 5,6 por

até 1 hora de incubação foram testados inicialmente à 50 °C, temperatura dentro da faixa ótima determinada em ensaios anteriores, realizados em Erlenmeyer com 30 mL. Nestas condições, o complexo enzimático para ambos os substratos testados retiveram 100% da atividade fibrolítica até aproximadamente 40 minutos para o *BLara+Sac* ($1,80 \pm 0,04$ FPU/mL) e 45 minutos para o substrato *T1+Sac* ($0,45 \pm 0,00$ FPU/mL). Após esse período ocorreu uma redução significativa para ambos, no caso, para o bagaço de laranja a queda na atividade foi de aproximadamente 21% após 55 minutos ($0,90 \pm 0,03$ FPU/mL), e de quase 29% para o substrato T1 em 55 minutos ($0,32 \pm 0,00$ FPU/mL) (Tabela 1.23 e Figura 1.27).

Tabela 1.23: Estabilidade térmica a 50 °C até 60 minutos dos complexos fibrolíticos produzidos em fermentador de 2 litros em condições controladas.

Tempo (minutos)	<i>BLara+Sac</i>	<i>T1+Sac</i>
	Celulases Totais (FPU/mL)	Celulases Totais (FPU/mL)
5	$1,77 \pm 0,03^a$	$0,43 \pm 0,00^{a'}$
10	$1,77 \pm 0,05^a$	$0,44 \pm 0,02^{a'}$
15	$1,76 \pm 0,02^a$	$0,44 \pm 0,03^{a'}$
20	$1,75 \pm 0,02^a$	$0,43 \pm 0,04^{a'}$
25	$1,78 \pm 0,06^a$	$0,47 \pm 0,03^{a'}$
30	$1,74 \pm 0,04^a$	$0,44 \pm 0,00^{a'}$
35	$1,79 \pm 0,03^a$	$0,45 \pm 0,01^{a'}$
40	$1,80 \pm 0,04^a$	$0,46 \pm 0,02^{a'}$
45	$1,50 \pm 0,05^b$	$0,45 \pm 0,00^{a'}$
50	$1,42 \pm 0,03^c$	$0,35 \pm 0,00^{b'}$
55	$0,90 \pm 0,03^d$	$0,32 \pm 0,00^{c'}$
60	$0,62 \pm 0,04^e$	$0,20 \pm 0,00^{d'}$

Diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Testes feitos a pH 5,6.

Os testes de estabilidade por período mais longo e em diferentes temperaturas foram feitos somente com o substrato *T1+Sac* em fermentador. Assim, foram analisadas as diferentes atividades fibrolíticas em fermentador de 2 Litros mantidos por até 48 h em diferentes temperaturas (Tabela 1.24 e Figura 1.28). A temperatura que resultou em uma menor variação foi a de 30 °C, visto que em 1 h a atividade de Celulases totais foi de $0,44 \pm 0,01$ FPU/mL, enquanto após 48 horas a atividade foi de $0,43 \pm 0,01$ FPU/mL, sem diferenças estatísticas ($p > 0,05$). O mesmo aconteceu a 35 °C, não tendo diferenças

estatísticas entre 1 h ($0,39 \pm 0,01$ FPU/mL) e 48 h ($0,37 \pm 0,01$ FPU/mL) ($p > 0,05$), apesar da queda de 11% em 1 hora, com posterior estabilização. Na temperatura de 40 °C a estabilidade do complexo enzimático foi até 12 h de incubação, onde a atividade teve uma queda significativa ($0,36 \pm 0,01$ FPU/mL – $p < 0,05$) de aproximadamente 7%. Quando essa atividade foi avaliada a 45° C, já após 1 h ocorreu uma alta perda de atividade enzimática, chegando a aproximadamente 28%. Esses resultados confirmam os testes de curta duração realizados anteriormente (55 min a 50 °C ocorreu uma queda de 21% da atividade celulolítica).

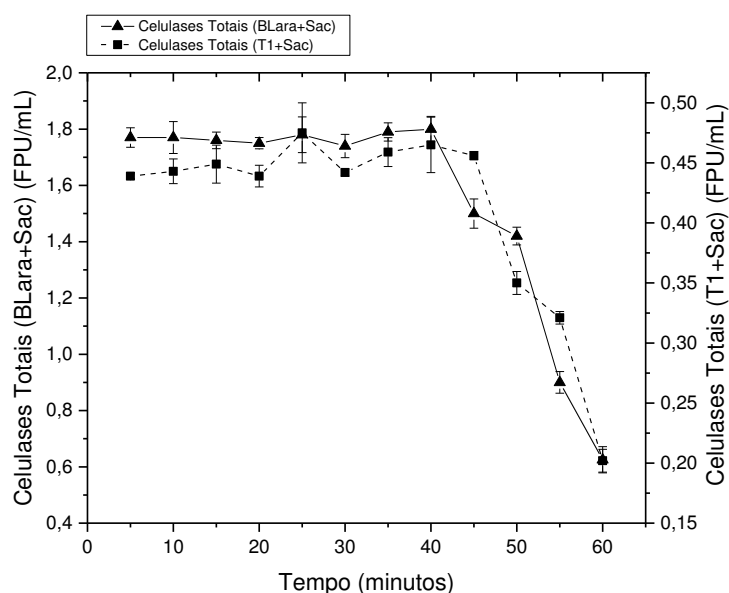


Figura 1.27: Estabilidade enzimática a 50 °C e pH 5,6 medida pela técnica de Celulases Totais (FPU/mL) a partir do complexo enzimático fibrolítico produzido pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 L e substratos: *BLara+Sac* e *T1+Sac*.

Em relação à atividade de Endoglucanase avaliada em diferentes tempos e diferentes temperaturas (Tabela 1.24), o padrão da estabilidade foi semelhante da técnica de Celulases Totais (Figura 1.29). A temperatura que apresentou uma menor variação ao longo do tempo foi a de 30 °C (1 h – $3,61 \pm 0,09$ U/mL e 48 h – $3,65 \pm 0,02$ U/mL – $p > 0,05$) e a maior variação foi a de 45 °C (1 h – $2,60 \pm 0,01$ U/mL e 48 h – $2,08 \pm 0,01$ CMC/ mL – $p < 0,05$). A 45 °C foi verificada uma queda de aproximadamente 27% de atividade de endoglucanase após 1 h.

O perfil de estabilidade para as enzimas exoglucanase nesse ensaio de estabilidade da temperatura versus o tempo está na Tabela 1.24. Entretanto os resultados não seguiram exatamente o mesmo padrão que as outras enzimas celulolíticas avaliadas anteriormente. Apenas a 30 °C foi mantido uma boa estabilidade enzimática (1 h – $0,88 \pm 0,02$ U/mL e 48 h – $0,87 \pm 0,02$ U/mL – $p > 0,05$). Contudo, para as outras temperaturas estudadas ocorreu uma queda significativa na eficiência das atividades, como no caso de 35 °C, a enzima mostrou-se estável até 24 h. Posteriormente, ocorreu uma perda de aproximadamente 18%, chegando a 25% de perda da atividade em 48 h. Os resultados estão plotados na Figura 1.30. A 45 °C e 48 h houve a máxima perda da atividade, quase 50%.

Assim, como as demais atividades fibrolíticas, as xilanases (Tabela 1.24) mostraram-se também mais estáveis na temperatura de 30 °C (1 h – $101,75 \pm 8,72$ U/mL e 48 h – $95,49 \pm 4,89$ U/mL – $p > 0,05$). Essas enzimas conseguiram manter uma boa estabilidade a 40 °C, tendo em vista que a queda da atividade aconteceu somente após 24 h ($67,04 \pm 6,27$ U/mL). Como todas as outras atividades avaliadas, a 45 °C ocorreu uma perda significativa de atividade em 1 h de incubação (25%). Esses resultados estão de acordo com os outros previamente realizados (Figura 1.31).

A termoestabilidade da enzima refere-se à sua resistência às condições extremas e não sofrer desnaturação enzimática, assim sua capacidade de hidrolisar compostos em temperaturas específicas (AKCAPINAR et al., 2015). Através dos dados obtidos foi possível determinar que a temperatura ótima para a reação enzimática com as enzimas fibrolíticas produzidas para ambos os substratos testados (bagaço de laranja e T1) foi na faixa de 50 até 60 °C, enquanto para o pH foi na faixa de 5,0 até 6,0 (Figuras 2.25 e 2.26). A partir desses dados, é possível afirmar que mesmo tendo utilizado diferentes fontes de carbono as enzimas produzidas pelo fungo *T. reesei* QM 9414 apresentaram a mesma isoforma. Assim sendo, não somente a estabilidade enzimática é provada, mas também a capacidade do fungo de sintetizar o mesmo complexo proteico com ação hidrolítica. A grande vantagem desse complexo enzimático é que, como já discutido em literatura, a hidrólise de

biomassas lignocelulósicas ocorre com mais efetividade em temperaturas relativamente elevadas (acima de 50 °C) (VIKARI et al., 2007).

Tabela 1.24: Estabilidade térmica do extrato enzimático produzido a partir do substrato *T1+Sac* em fermentador de 2 Litros, para as diferentes atividades fibrolíticas.

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Celulases Totais (FPU/mL)	Endoglucanase (U/mL)	Exoglucanase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
Controle ^a		0,44±0,00	3,59±0,09	0,86±0,00	100,10±9,21
30	1	0,44±0,01	3,61±0,09	0,88±0,02	101,75±8,72
35		0,39±0,01	3,29±0,01	0,92±0,05	92,69±7,26
40		0,39±0,01	3,17±0,02	0,68±0,04	95,88±6,27
45		0,32±0,00	2,60±0,01	0,56±0,01	74,78±2,21
30	5	0,42±0,01	3,68±0,08	0,85±0,03	98,14±4,11
35		0,40±0,01	3,21±0,01	0,90±0,01	89,37±7,09
40		0,39±0,00	3,19±0,01	0,69±0,03	99,07±6,92
45		0,27±0,01	2,40±0,01	0,55±0,00	69,19±5,61
30	10	0,45±0,01	3,62±0,01	0,88±0,04	99,55±4,92
35		0,39±0,01	3,16±0,10	0,86±0,01	106,19±7,26
40		0,39±0,01	3,12±0,09	0,67±0,07	95,38±7,01
45		0,26±0,01	2,43±0,01	0,51±0,04	54,80±3,21
30	12	0,43±0,00	3,59±0,05	0,86±0,01	100,10±9,21
35		0,36±0,01	3,22±0,09	0,87±0,02	104,00±4,70
40		0,36±0,01	2,92±0,01	0,70±0,04	91,10±2,59
45		0,25±0,01	2,19±0,01	0,46±0,02	55,80±4,11
30	24	0,42±0,00	3,59±0,09	0,86±0,02	93,14±8,12
35		0,37±0,01	3,11±0,10	0,71±0,02	90,93±4,35
40		0,35±0,01	2,35±0,00	0,69±0,07	67,04±6,27
45		0,27±0,00	2,17±0,07	0,45±0,01	45,79±7,70
30	48	0,43±0,01	3,65±0,02	0,87±0,02	95,49±4,89
35		0,37±0,01	3,28±0,05	0,65±0,01	93,25±2,57
40		0,30±0,01	2,33±0,04	0,62±0,00	56,78±3,01
45		0,25±0,00	2,08±0,01	0,44±0,00	40,53±6,18

^aControle – Atividades obtidas nas análises enzimáticas para o extrato produzido (*item 3.2*).

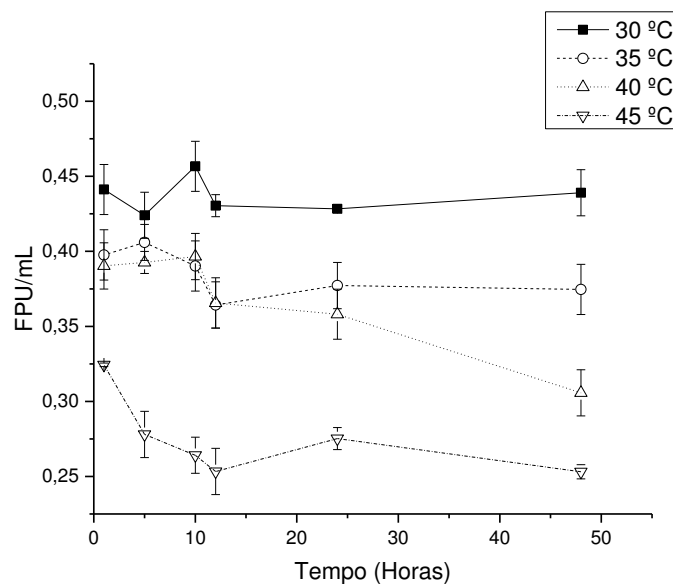


Figura 1.28: Estabilidade enzimática em diferentes tempos e temperaturas – Celulases Totais para enzimas de *T. reesei* QM 9414 produzidas em fermentador, 15 dias de cultivo e substrato *T1+Sac*.

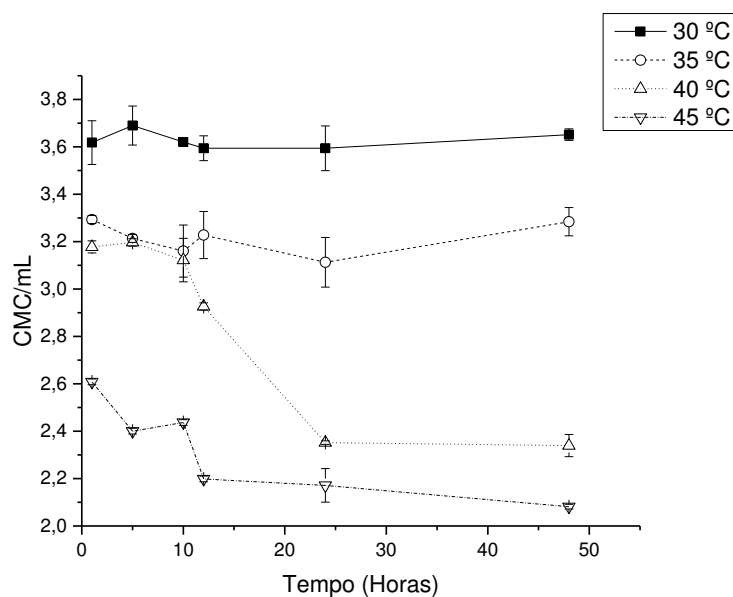


Figura 1.29: Estabilidade enzimática avaliado em diferentes tempos e temperaturas – Endoglucanase (U/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato *T1+Sac*.

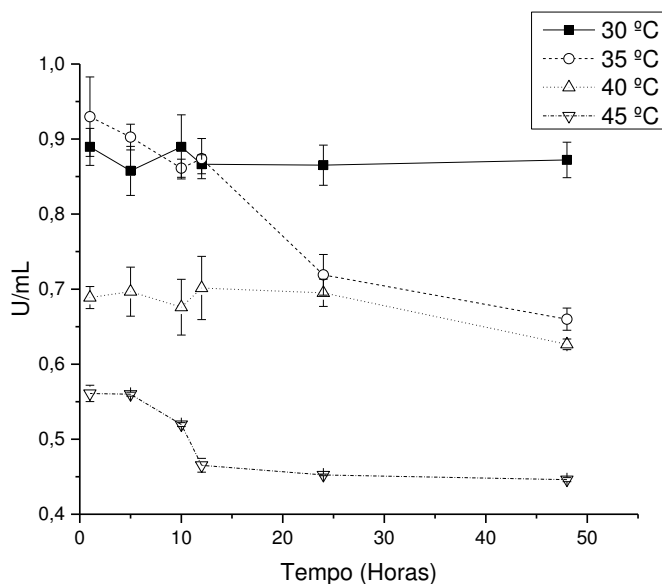


Figura 1.30: Estabilidade enzimática avaliada em diferentes tempos e temperaturas – Exoglucanase (U/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato *T1+Sac*.

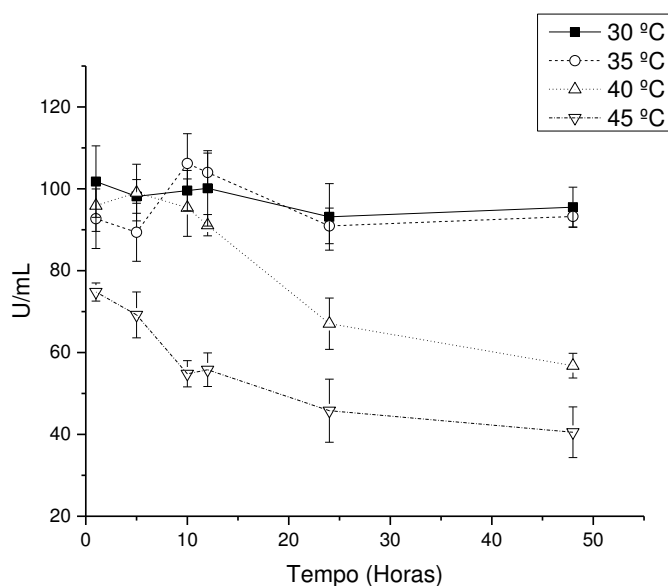


Figura 1.31: Estabilidade enzimática avaliada em diferentes tempos e temperaturas – Xilanases (U/mL). O complexo fibrolítico foi produzido pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador de 2 L, 15 dias de cultivo e substrato *T1+Sac*.

Esses resultados em temperatura mais elevadas também foram reportados por DELABONA et al. (2012a), onde foi estudado *A. fumigatus* P40M2 em FEs e por KUPSKI et al. (2014), trabalhando com *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e *Trichoderma reesei* QM 9414.

Com a compilação dos dados destes ensaios de estabilidade térmica a períodos mais longos ficou evidente que a temperatura mais estável foi a 30 °C para todas as atividades fibrolíticas. Entretanto, como o objetivo dessa etapa do trabalho foi determinar a temperatura mais efetiva para aplica-la na técnica de concentração. Desta forma, a temperatura com o melhor balanço geral de todas as variáveis estudadas foi a de 40 °C. Essa temperatura mostrou-se estável para todas as atividades fibrolíticas por mais de 12 h, assim sendo, foi a selecionada para ser utilizada na metodologia de concentração.

A baixa estabilidade térmica é um dos maiores obstáculos para a utilização do complexo fibrolítico em processos industriais, pois pode promover o alto custo e baixa produtividade, sendo que a capacidade de determinar mecanismos de produzir enzimas que apresentam uma estabilidade térmica mais elevada é um fator crucial para sua aplicação em processos industriais (CHANG et al., 2016). Na literatura foram encontrados enzimas fibrolíticas com valores de temperatura semelhantes ao conseguido nesse trabalho, como DASHTBAN et al. (2009) que obtiveram celulasas de *T. reesei* e estabilidade em temperaturas próximas de 50 °C. TRUDEAU et al. (2014) trabalhando com celulasas fúngicas modificadas e termoestáveis conseguiram manter a atividade de hidrólises dessas enzimas em uma temperatura ótima de 70 °C em 60 h, entretanto o fungo utilizado nesse trabalho foi geneticamente modificado. Nos trabalhos MURRAY et al. (2004) conseguiram enzimas termoestável de β -glucosidase, nas quais mostiveram-se estáveis por 62 minutos a 71,5 °C, esse resultado superior provavelmente foi pela expressão do gene do fungo *Talaromyces emersonii*, conhecidamente é um fungo termofílico. DELLABONA et al. (2012a) conseguiram manter uma boa termoestabilidade por 50 minutos e 60 °C, entretanto o fungo celulolítico foi uma linhagem de *A. fumigatus*. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram valores viáveis de atividades fibrolíticas mesmo após várias horas em temperaturas moderadas, essa termoestabilidade dos complexos

enzimáticos permitiu a posterior aplicação da metodologia de concentração por evaporação.

3.6. Concentração do extrato enzimático

Com base nos dados obtidos em etapas anteriores os extratos obtidos em fermentadores de 2 Litros foram concentrados a 40 °C por 8 h sob vácuo. Os extratos enzimáticos produzidos a partir dos substratos *BLara+Sac* e *T1+Sac* ambos inicialmente com 400 mL, após 8 h sob agitação no próprio fermentador de 2L (60 rpm) foram concentrados 2 vezes (Tabela 1.25). Houve um aumento da atividade fibrolítica com a concentração dos extratos. Para o extrato produzido com o *BLara+Sac*, mesmo que com a concentração volumétrica de 2 vezes, houve a elevação de algumas atividades para mais de 2 vezes. As Celulases Totais (Extrato bruto – 1,76±0,00 FPU/mL e Concentrado – 5,14±0,09 FPU/mL) e Endoglucanase (Extrato bruto – 4,28±0,09 U/mL e Concentrado – 12,65±0,13 U/mL) aumentaram aproximadamente 2,9 vezes. Já a atividade Exoglucanase teve um acréscimo de 1,9 vezes, de 0,55±0,00 U/mL (Extrato bruto) para 1,07±0,07 U/mL ou 35,92±2,57 U/g (Concentrado); enquanto as Xilanases – Extrato bruto: 36,85±2,21 U/mL e Concentrado: 83,93±2,99 U/mL) a elevação foi de aproximadamente 2,2 vezes.

Tabela 1.25: Extratos enzimáticos sem concentrar e concentrados.

Extratos	Exp.	Celulases Totais (FPU/mL)	Endoglucanase (U/mL)	Exoglucanase (U/mL)	Xilanase (U/mL)
<i>BLara+Sac</i>	Extra.bruto	1,76±0,00	4,28±0,09	0,55±0,00	36,85±2,21
	Concentrado	5,14±0,09	12,65±0,13	1,07±0,07	83,93±2,99
<i>T1+Sac</i>	Extra.bruto	0,44±0,00	3,59±0,09	0,86±0,00	100,10±9,21
	Concentrado	1,43±0,00	11,32±0,23	1,84±0,00	197,95±7,30

Em relação à concentração do extrato produzido pelo substrato *T1+Sac*, os resultados não foram muito diferentes dos apresentados anteriormente, no caso as Celulases Totais tiveram um acréscimo de 3,2 vezes (Extrato bruto –

0,44±0,00 FPU/mL e Concentrado – 1,43±0,00 FPU/mL), a Endoglucanase um acréscimo de 3,1 vezes (Extrato bruto – 3,59±0,09 U/mL e Concentrado – 11,32±0,23 U/mL), a Exoglucanase se elevou em 2,1 vezes (Extrato bruto – 0,86±0,00 U/mL e Concentrado – 1,84±0,00 U/mL) e, por fim, as Xilanases tiveram uma elevação da atividade em 1,9 vezes (Extrato bruto – 100,10±9,21 U/mL e Concentrado – 197,95±7,30 U/mL).

Tendo como base que o desenvolvimento de novos métodos e técnicas de separação e purificação de bioprodutos tem sido essencial para os avanços obtidos na área de pesquisas biotecnológicas (QUEIROZ et al., 2001). Um ponto interessante a ser discutido é a elevação da atividade acima da concentração, como no caso para as celulasas totais e endoglucanase que foi obtido um aumento de até 2,9 vezes quando comparado ao extrato bruto e concentração volumétrica de apenas 2 vezes. No caso, esta diferença de atividade a mais pode ser devida pelo efeito da evaporação de possíveis compostos voláteis que poderiam estar inibindo a ação enzimática. Tais compostos poderiam bloquear ou modificar o sítio catalítico da enzima alterando-se a sua conformação tridimensional (GAMA et al., 2002; NELSON & COX, 2006; RADZICKA & WOLFENDEN, 1995).

As enzimas produzidas no fermentador, para ambos os substratos, e concentradas pela metodologia testada nessa etapa do trabalho foram utilizadas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado no segundo capítulo desse trabalho.

4. Conclusão

Quando comparada a produção de enzimas fibrolíticas entre *Aspergillus fumigatus* e *Trichoderma reesei* o destaque foi para o *T. reesei* QM 9414. O meio C contendo $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (MAP) se mostrou eficiente na produção enzimática e reduziu a importância do extrato de levedura na formulação do meio o que reduz o custo final com nutrientes. No entanto, a presença de maiores concentrações deste último nutriente aumenta a produção de proteases pelo fungo *T. reesei* QM 9414.

Os substratos que se destacaram para a produção de enzimas fibrolíticas foram o bagaço de laranja com sacarose (*BLara+Sac*) e o resíduo do bagaço de cana após cultivo com *Pleurotus ostreatus* suplementado com sacarose (*T1+Sac*). Entretanto para a produção de xilanases, além dos dois substratos anteriormente citados, o Capim Napier pré-tratado por ação física (121 °C) e suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose (*Napier_Trat+Sac*) também se sobressaiu na produção deste complexo enzimático. De uma forma geral, o pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar apesar de não ter sido o melhor, favoreceu a produção das enzimas celulolíticas pelo fungo *T. reesei* QM 9414, enquanto que pré-tratamento alcalino facilitou a produção das xilanases. Já o delineamento composto central rotacional (DCCR 2²) mostrou que as condições físico-químicas foram nas faixas de 28 a 30 °C e pH de 4,0 a 5,0.

O cultivo em fermentador agitado nas condições físico-químicas determinadas mostrou-se viável para a produção do complexo fibrolítico, principalmente para o bagaço de laranja com sacarose (*BLara+Sac*), quando comparados com os testes em Erlenmeyer, resultados promissores para o escalonamento da produção destas enzimas. E, após essa etapa, a caracterização dos extratos enzimáticos produzidos revelou que as enzimas são estáveis na faixa de pH ácido 3,0-5,5, com a atividade ótima em pH 5,0. Para a estabilidade térmica, foi constatado que na faixa de 50 a 65 °C ocorreu uma boa estabilidade, e a 40 °C foi mantida a atividade fibrolítica estável por mais de 24 h.

A metodologia de concentração enzimática por evaporação sob vácuo e agitação mecânica foi efetiva, assim, foi possível atingir valores de 5,14 FPU/mL para Celulases Totais e 197,95 U/mL para Xilanases.

Capítulo 2: *Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar in natura ou pré-tratado para obtenção de açúcares fermentescíveis*

Resumo

Nesta etapa do trabalho foi feito estudos de pré-tratamento alcalino visando à desestruturação das fibras recalcitrantes, para posterior hidrólise enzimática e obtenção de açúcares redutores. O melhor substrato parcialmente deslignificado (CPD) foi utilizado também como fonte de carbono e produção enzimática pelo fungo *T. reesei* (Capítulo 1). A metodologia envolveu planejamento fatorial DCCR 2³, para temperatura (°C), NaOH (%) e tempo (min) e, posteriormente, novos estudos em condições físico-químicas pré-fixadas (4, 5 e 6 % de NaOH, em 48, 85 e 121 °C por 45 minutos). O melhor pré-tratamento alcalino foi a 121 °C e 6% (m.v⁻¹) de NaOH, com liberação de 0,94±0,02 mg de AR em 1 h (5,88% de AR total em 1 hora), desta forma, amostras desse pré-tratamento (CPD) foram sacarificadas utilizando-se concentrações diferentes de enzimas fibrolíticas – comercial e produzida. O complexo enzimático produzido a partir do substrato *T1+Sac* (concentrado 2x) foi o que obteve maior liberação de AR, tendo para cada 2 g de biomassa CPD uma liberação de 1,38±0,00 mg de AR (36 h) – rendimento de conversão de 69%; seguido pelo complexo produzido a partir do bagaço de laranja (*BLara+Sac*) com 1,17±0,00 mg de AR para cada 2 g (36 h) – rendimento de conversão de 58,9%. Além disso, cerca de 78% da hemicelulose foi extraída junto com a lignina solúvel, podendo desta forma também ser aproveitada para outras finalidades. O desempenho do complexo fibrolítico desenvolvido foi cerca de 23% superior ao maior valor apresentado pela complexo enzimático da empresa ABenzyme, demonstrando a eficiência da tecnologia desenvolvida.

Palavras chave: Resíduos agroindustriais lignocelulósicos, pré-tratamento alcalino; complexo fibrolítico; sacarificação.

1. Introdução

Os resíduos lignocelulósicos podem servir como ricas fontes de carboidratos fermentescíveis (CASTRO & PEREIRA, 2010; GUERRIERO et al., 2016) e produção de novos produtos de interesse para a sociedade. Dentre os diferentes insumos produzidos pela agroindústria brasileira, destacam-se como quantidades significativas: casca de cereais, palha e farelo de arroz, palha e farelo de trigo, de soja, bagaço de cana-de-açúcar, folha de mandioca, bagaço de laranja, resíduos de algodão, palha de bananeira, dentre outros (CARDOSO et al., 2015; FILHO & FRANCO, 2015). Estes podem servir como substratos para o cultivo de fungos lignocelulolíticos e produção de suas enzimas (SAINI et al., 2015; SHARMA & ARORA, 2015).

Entretanto, os materiais lignocelulósicos são resistentes a bioconversão e requerem um pré-tratamento para aumentar sua digestibilidade e tornar a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas. O pré-tratamento da biomassa é visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e, por isso, apresenta um grande necessidade em melhorar a sua eficiência, tendo por consequência diminuir o custo da sua aplicação (ALVIRA et al., 2016; ; MOSIER et al., 2005; SAINI et al., 2016; YAO et al., 2015).

As tecnologias de conversão das biomassas ou resíduos em etanol estão evoluindo rapidamente e os obstáculos sendo identificados e superados. Desta forma, e com a constante busca por novos processos biotecnológicos, a comercialização deste produto está cada vez mais próxima de se tornar viável e aplicável para a sociedade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Industrial e Microbiologia da Faculdade de Ciências e Letras – Campus de Assis da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. As etapas e metodologias desse capítulo estão resumidas na Figura 2.1.

Neste trabalho o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com soluções de NaOH em diferentes concentrações e sob diferentes condições físico-químicas, variando tanto o tempo como a temperatura. Posteriormente foram feitos testes de sacarificação com o melhor pré-tratamento alcalino. Para tanto foi utilizado uma enzima celulolítica comercial, assim como, o complexo enzimático produzido no Capítulo 2 – enzimas produzidas tendo como base o *T. reesei* QM 9414, dois diferentes substratos: *BLara*+*Sac* e *T1*+*Sac*, em fermentador de 2 L e concentrado). Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicatas.

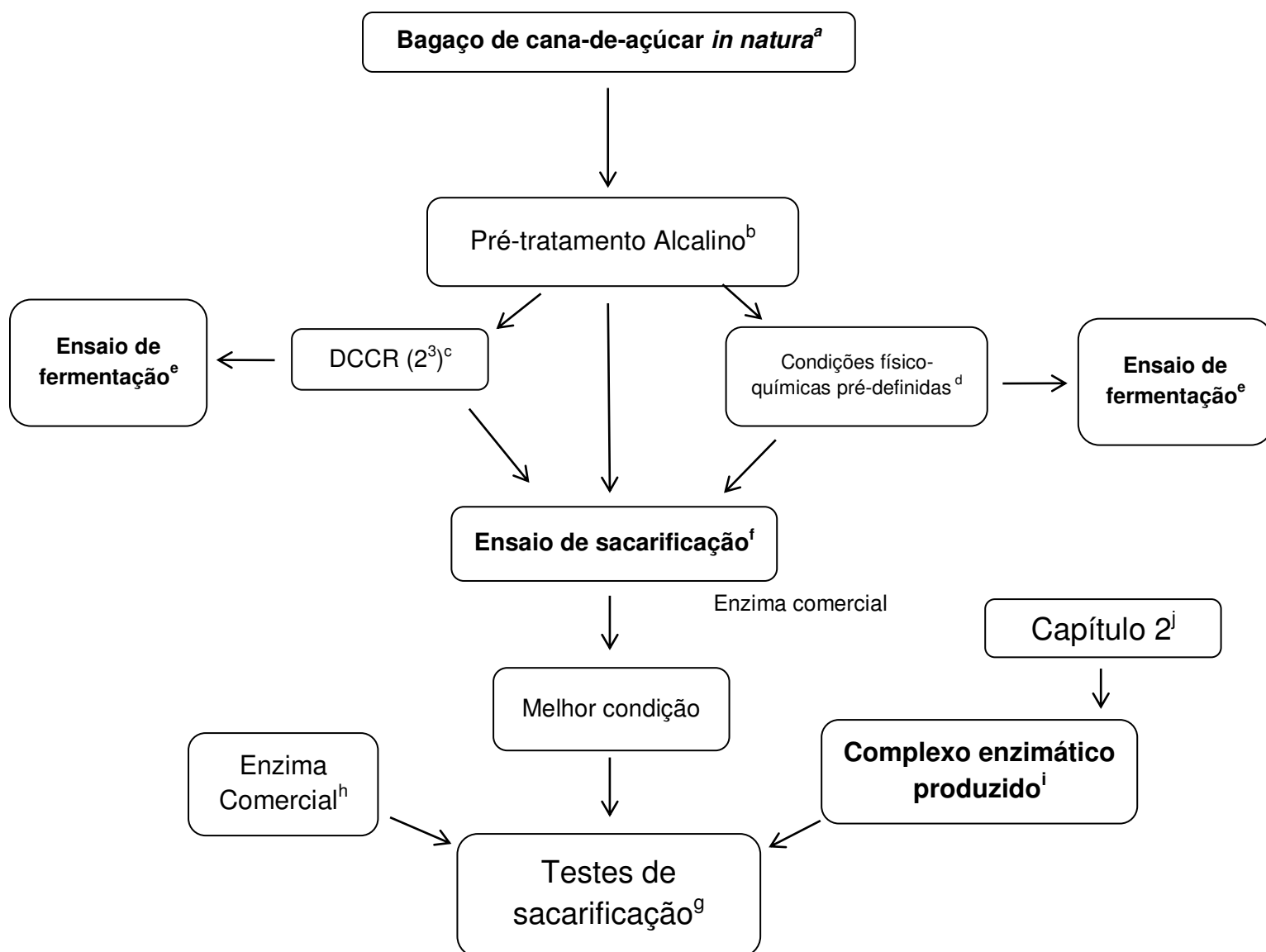
2.1. Materiais

2.1.1. Celulase comercial (E.C.3.2.1.4)

Preparações de celulasas (1,4- β -glucanase) de origem microbiana de *Trichoderma reesei* adquirida da empresa AB Enzymes (ROHAMENT® CL) foram utilizadas, com atividade mínima de 15.000 ECU/g, de acordo com a empresa, sendo que esta unidade é definida como a produção de um nmol de açúcar redutor (AR) em um segundo. Diluída até as concentrações desejadas em tampão acetato a 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6, para sua utilização na sua forma livre nos ensaios de atividade celulolíticas e sacarificação do substrato.

2.1.2. Resíduos agroindustriais utilizados

O bagaço de cana-de-açúcar que foi utilizado como resíduo lignocelulósico teve como procedência a Usina de Açúcar de Alcool São Joaquim – Cândido Mota.



^aBagaço preparado (item 2.2.1); ^bItem 2.2.2; ^cItem 2.2.2.1; ^dItem 2.2.2.2; ^eItem 2.2.3; ^fItem 2.2.5.1; ^gItem 2.2.4; ^hEnzima Abenzyme (E.C.3.2.1.4); ⁱComplexo enzimático produzido a partir de fermentação submersa e *T. reesei* QM 9414; ^jEtapas de produção e concentração enzimática.

Figura 2.1: Fluxograma do processo biotecnológico.

2.1.3. Reagentes e Substratos

Os seguintes reagentes (Synth) foram utilizados: tampão Acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,6); Celulases comercial (E.C. 3.2.1.4) (1,4-β-glucanase - ABEnzymes - ROHAMENT® CL); para dosagem das atividades hidrolíticas: papel de filtro Whatman nº1; 5-ácido dinitrosalicílico para a técnica do DNS; hidróxido de sódio (NaOH) para os pré-tratamentos, Ácido sulfúrico (H₂SO₄). E, demais reagentes em nível de laboratório.

2.1.4. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: espectrofotômetro UV/Vis (Ultrospec 1100 Pro - Pharmacia); balança analítica (Gehaka mod. AG 200); incubadora com agitação orbital e controle de temperatura marca Tecnal mod;TE 421 (Piracicaba – SP); Autoclave vertical (Marca Phoenix) e estufa (Marca Quimis); Moinho de facas (Cienlab); HPLC (Agilent 1100); demais equipamentos em nível analítico.

2.2. Metodologia

2.2.1. Preparo do bagaço de cana-de-açúcar

As amostras do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foram coletadas durante as safras de 2014 e 2015, da usina já supracitada. Após a coleta elas foram levadas ao laboratório e permaneceram por uma semana para homogeneização em temperatura ambiente – aproximadamente 25 ± 3 °C, e umidade relativa do ar de $65 \pm 2\%$. Após isto, cerca de 1000 g da biomassa foi lavada em água corrente para a retirada de coloides e demais sujeiras de origem não orgânica ou não pertencente à biomassa lignocelulósica. Essa biomassa foi encaminhada para estufa de secagem e permaneceu a 60 °C por 48 h.

Após a secagem dos bagaços de cana, tanto o *in natura* como o pré-tratados, estes foram triturados utilizando um moinho de facas com tela de 40-mesh, a fim de obter um material bruto de tamanho aproximado de 2 x 2 x 2 mm. E, novamente foram levados a estufa a 105 °C por 24 h, ou até o demonstrar peso constante, para a obtenção de um substrato livre totalmente de qualquer umidade. Posteriormente estes substratos foram encaminhados para os demais testes e ensaios.

2.2.2. Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio

Nesta etapa buscou-se realizar um pré-tratamento alcalino no bagaço de cana-de-açúcar, visando à desestruturação das fibras lignocelulósicas. Desta forma, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi primeiramente submetido à moagem (*item 2.2.1*), para seu preparo e redução de tamanho (40-mesh). Assim, o bagaço de cana moído foi pré-tratado com Hidróxido de Sódio

(NaOH), assim gerando um substrato de celulose parcialmente deslignificado (CPD). E, posteriormente foram utilizados tanto para ensaios com enzima comercial (*item 2.2.5.1*) e testes de sacarificação (*item 2.2.4*) como para fermentação e produção de enzimas fibrolíticas (*item 2.2.3* e Capítulo 2).

2.2.2.1. Pré-tratamento por Planejamento Experimental (DCCR 2³) e produção do CPD

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e seco foi triturado (*item 2.2.1*) e caracterizado quimicamente (*item 2.2.5.4*). Em seguida esse bagaço *in natura* foi tratado com uma solução de Hidróxido de Sódio. As condições de reação empregadas foram as seguintes: 30 g de bagaço *in natura* (base seca) a ser utilizado numa proporção de 1:20 (m.v⁻¹) em relação ao volume final de NaOH, ou seja, 600 mL de NaOH. Para esta etapa de pré-tratamento foi realizado um planejamento fatorial com 17 experimentos (4 pontos fatoriais, pontos axiais e triplicata no ponto central – DCCR de 2³), através de valores codificados e não codificados. Assim, as variáveis independentes foram: tempo (30-60 minutos), concentração de NaOH (3-7% – m.v⁻¹), e temperatura (30-121 °C); e como variável dependente foi utilizada a liberação de açúcar redutor (AR) através da reação enzimática (*item 2.2.5.1*).

Os valores codificados e reais para os níveis de cada uma das variáveis; quando relacionados tempo, concentração de NaOH e temperatura, nos experimentos estão apresentadas na Tabela 2.1.

Após o término destes pré-tratamentos, as amostras foram lavadas com água deionizada, secas e pesadas, sendo em seguida caracterizados quimicamente (*item 2.2.5.4*). Posteriormente, sobre os bagaços pré-tratados foram feitos ensaios de atividade celulolítica com enzima comercial (ABEnzymes) (*item 2.2.5.1*) e um ensaio de fermentação submersa (FSm) para produção de enzimas fibrolíticas (*item 2.2.3*).

Tabela 2.1: Pré-tratamento com hidróxido de sódio e obtenção dos CPDs nos diferentes parâmetros estudados.

Ensaio	Tempo (min)	NaOH (% - m.v⁻¹)	Temp. (°C)	Tempo (min)	NaOH (% - m.v⁻¹)	Temp. (°C)
1	-1	-1	-1	36	3,8	48,5
2	-1	-1	1	36	3,8	102,0
3	-1	1	-1	36	6,2	48,5
4	-1	1	1	36	6,2	102,0
5	1	-1	-1	54	3,8	48,5
6	1	-1	1	54	3,8	102,0
7	1	1	-1	54	6,2	48,5
8	1	1	1	54	6,5	102,0
9	-1,68	0	0	30	5,0	75,5
10	1,68	0	0	60	5,0	75,5
11	0	-1,68	0	45	3,0	75,5
12	0	1,68	0	45	7,0	75,5
13	0	0	-1,68	45	5,0	30,0
14	0	0	1,68	45	5,0	121,0
15	0	0	0	45	5,0	75,5
16	0	0	0	45	5,0	75,5
17	0	0	0	45	5,0	75,5

2.2.2.2. Pré-tratamento do bagaço de cana em condições pré-definidas de temperatura e NaOH

Nesta etapa foram feitos experimentos em diferentes condições de concentração de NaOH e temperaturas sobre o bagaço de cana-de-açúcar, por 45 minutos (Tabela 2.2 – condições físico-químicas de acordo com os resultados obtidos no *item 3.1*), na concentração de 1:20 (m.v⁻¹) de bagaço de cana (seco – *item 2.2.1*) e soluções de NaOH – em diferentes concentrações, ou seja, 30 g de bagaço *in natura* para 600 mL de NaOH, totalizando 9 tratamentos diferentes.

Após o término destes pré-tratamentos as amostras dos CPD foram lavadas com água deionizada, secas e pesadas, sendo em seguida caracterizados quimicamente (*item 2.2.5.4*). Com posterior tratamento enzimático (celulase comercial – ABEnzyme – *item 2.2.5.1*) para a liberação e quantificação do AR (*item 2.2.5.3*) e ensaios de fermentação submersa (*item 2.2.3*).

Tabela 2.2: Diferentes condições de tratamento físico/químico sobre o bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	Temperatura (°C)	NaOH (%)*	Tempo (minutos)
1	48	4,0	45
2		5,0	
3		6,0	
4	85	4,0	45
5		5,0	
6		6,0	
7	121	4,0	45
8		5,0	
9		6,0	

*Porcentagem em relação ao volume final da solução (m.v⁻¹) – Condições definidas de acordo com os resultados no *item 3.1*.

2.2.3. Ensaio de FSm em incubadora orbital (80 mL)

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em ambas as metodologias (*item 2.2.3*) e *in natura* foram fermentados utilizando o fungo *T. reesei* QM 9414 (selecionado no Capítulo 2) seguindo a metodologia modificada de SILVA et al. (2016): um círculo de 10 mm de diâmetro de PDA com o fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 (previamente cultivado - Capítulo 2) foi transferido assepticamente para Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de meio formulado: 3% (m.v⁻¹) do substrato e solução nutriente (Capítulo 2): 0,11% (m.v⁻¹) - K₂HPO₄; 0,1% (m.v⁻¹) - (NH₄)₂SO₄; 0,0017% (m.v⁻¹) - MgSO₄.7H₂O; 0,0028% (m.v⁻¹) - ZnSO₄.7H₂O; 0,1% (m.v⁻¹) - extrato de levedura; 0,1% (m.v⁻¹) - NH₄H₂PO₄; 0,06 % (m.v⁻¹) – KCl (Capítulo 2). Os meios formulados foram autoclavados a 121 °C por 15 min e em seguida colocados em uma incubadora a 180 RPM, 28 °C, pH 4,5 por 7 dias (168 h).

Posteriormente a esse período de cultivo, os extratos enzimáticos foram separados dos sólidos residuais através de filtração em gazes e algodão, e avaliados para a produção das enzimas fibrolíticas pela técnica de Celulases Totais (FPase – FPU/mL – *item 2.2.5.2*).

2.2.4. Testes de sacarificação

O CPD que demonstrou uma maior desestruturação das fibras, avaliado pelo ensaio de liberação de AR (*item 2.2.5.1*), assim como o bagaço de cana-

de-açúcar *in natura* foram utilizados como substrato para as reações de sacarificação. Assim, nessa etapa foi avaliada a eficiência dos processos de sacarificação, assim como, da produção enzimas fibrolíticas. Foram utilizadas a enzima comercial e os dois melhores complexos fibrolíticos produzidos pelos substratos *BLara+Sac* e *T1+Sac* (fermentador de 2 L) bem como bagaço de cana *in natura* (*BC*) produzido em incubadora orbital (Capítulo 2).

Desta forma, foram utilizadas as seguintes concentrações enzimáticas:

- 0,8 FPU/g de substrato do extrato fibrolítico produzido pelo *T. reesei* QM 9414 utilizando-se como substrato o bagaço de cana *in natura* (*BC*);
- 0,8 FPU/g de substrato – enzima comercial (ABEnzyme);
- 15 FPU/g de substrato - enzima comercial (ABEnzyme);
- 30 FPU/g de substrato - enzima comercial (ABEnzyme);
- 30 FPU/g de substrato produzido pelo *T. reesei* QM 9414 utilizando-se o substrato o *T1+Sac*, com posterior concentração do extrato enzimático de 2x;
- 30 FPU/g de substrato produzido pelo *T. reesei* QM 9414 utilizando-se o substrato *BLara+Sac* e concentração do extrato enzimático de 2x.

Para cada amostra avaliada foi adicionado 1 g de biomassa *in natura* ou pré-tratada (CPD) para 25 mL do extrato enzimático contendo as concentrações previamente listadas, ou seja, na proporção de 1:25 – m.v⁻¹. Essas amostras foram incubadas a 50 °C, pH 5,6 – condições físico-químicas estudadas e otimizadas para as enzimas produzidas (Capítulo 2) – e incubadas por 3 dias. Alíquotas de aproximadamente 2 mL do líquido reacional foram retiradas a 0, 5, 12, 24, 48 e 72 horas e fervidas por 10 minutos, em tubos identificados, para a inativação do complexo enzimático. Posteriormente foram avaliadas quanto a concentração de AR liberado (*item 2.2.5.1*).

2.2.5. Procedimentos analíticos

2.2.5.1. Ensaio de liberação de AR para bagaços pré-tratados

As amostras de CPD (substrato de celulose parcialmente deslignificado) obtidos após os pré-tratamentos foram avaliadas quanto à liberação de AR (*item 2.2.5.3*). Desta forma, foi aplicado um tratamento enzimático com a celulase comercial de 50 FPU_{Total} para cada 1 grama de biomassa. A hidrólise enzimática foi de acordo com a técnica modificada de FPase (MANDELS et al., 1976). As amostras obtidas foram imediatamente quantificadas para concentração de AR pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959) (*item 2.2.5.3*).

2.2.5.2. Determinação das Celulases Totais (Atividade de Papel de Filtro - FPase)

As atividades de celulases totais do extrato produzido pelos fungos e da enzima comercial foram medidas através da técnica de FPase (MANDELS et al., 1976). Os procedimentos desta técnica foram apresentados no Capítulo 2.

2.2.5.3. Determinação do Açúcar Redutor

A liberação de açúcar redutor foi quantificada a partir da amostra obtida e pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

2.2.5.4. Determinação do Teor de Lignina pelo Método Klason

O teor de lignina da biomassa *in natura* ou pré-tratados (*item 2.2.3*) foi quantificada pelo método KLASON (TAPPI, T-222) modificado. Assim, em um primeiro momento as amostras foram preparadas, para tanto elas foram trituradas (40-mesh – *item 2.2.1*) e secas em estufa a 105 °C (*item 2.2.1*).

Após a etapa de preparo, tomaram-se amostras de 0,2 g do material livre de extrativos (base seca) e foram macerados em 3,0 mL de 72% (v.v⁻¹ – água destilada) ácido sulfúrico. Esta etapa ácida foi feita por 2 horas, realizando a maceração a cada 10 minutos.

A biomassa submetida à extração ácida permaneceu em repouso durante um dia em meio ácido. A seguir, os materiais foram transferidos para um balão de 250 mL, diluído em 84 mL de água destilada. As amostras, então,

foram invertidas em frascos de vidro – seguida da lacração e, posteriormente, foram autoclavados durante 1 h a 121 °C – juntamente com padrões de açúcares: Arabinose, Galactose, Glucose, Xilose e Manose. Assim que foi terminado este processo, realizou a filtração funil de vidro com porosidade média, lavou-se o material residual (lignina KLASON) com 500 mL de água a 50 °C. Em seguida, o material sólido foi colocado para secar em estufa à até atingir peso constante utilizando-se de cadinho de porcelana previamente tarado, determinando, assim, a lignina insolúvel.

A amostra líquida, após a filtração, foram analisadas em espectrofotômetro e absorvância de 205 nm. Sendo que a lignina solúvel (ASL) foi mensurada pela equação 1.

Equação 1

$$[ASL] = Absorb(205) \times DF \times 0,00909 \text{ g/L}$$

Onde:

ASL = lignina solúvel;

Absob (205) = valor obtido na leitura em espectrofotômetro;

DF = fator de diluição;

O teor de lignina foi determinado dividindo-se a massa de lignina obtida (insolúvel + solúvel) por 0,2 g e convertendo-se em porcentagem conforme equação 2:

Equação 2

$$\text{Lignina método de klason (\%)} = \frac{\text{Massa de lignina obtida (g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}} \times 100$$

Na fração líquida ainda foi analisadas por meio do HPLC: carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel. O controle foi realizado com a hidrólise total do bagaço de cana-de- açúcar (SLUITER et al., 2010).

2.3. Tratamento Estatístico

Os testes de atividades enzimáticas foram conduzidos em triplicata e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa estatístico GraphPad InStat – versão 3.05 (Rutgers University). As análises de superfície resposta das matrizes experimentais foram feitas no programa Statistica – versão 7.0. Os gráficos foram feitos no programa OriginPro – versão 9.1 64Bit. Os experimentos foram analisados e considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Pré-tratamento álcali do bagaço de cana avaliado por delineamento composto central rotacional (DCCR 2³)

3.1.1. Tratamento físico/químico e liberação de AR por ação da celulase comercial

O pré-tratamento do bagaço de cana com NaOH foi realizado com um planejamento fatorial com 17 experimentos (4 pontos fatoriais, pontos axiais e triplicata no ponto central – DCCR de 2³), e a variável dependente foi a liberação de AR por ação enzimática da biomassa residual. Para cada 1 g de substrato pré-tratado foi adicionado 50 FPU_{Total} e incubados por 1 h a 50 °C (Tabela 2.3 e na Figura 2.2).

Para os dados e resultados obtidos foram considerados significativos os parâmetros com p menores que 5% ($p < 0,05$). Assim, para a liberação de AR para somente parâmetro de temperatura quadrática (X_3) não foi considerado significativo. A massa de AR liberada por ação da enzima comercial nos experimentos de DCCR 2³ variaram de 0,307 mg de AR (ensaio 9) até 0,849 mg AR (ensaio 14) nos 17 ensaios realizados (Tabela 2.3) para cada 16 mg de bagaço pré-tratado.

A Tabela 2.4 descreve os coeficientes do modelo de regressão, a partir da matriz codificada para a liberação de AR, os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos com a letra Q, sendo que X_1 é o tempo (minutos), X_2 é a concentração de NaOH (% – m.v⁻¹) e X_3 é a temperatura (°C).

A equação da regressão obtida após uma análise de variância (ANOVA) caracteriza a liberação de AR em função das variáveis independentes testadas. O modelo reparametrizado está representado na equação 3.

Equação 3

$$AR \text{ (mg)} = - 4,8071 + 0,1351X_1 - 0,00155X_1^2 + 0,4657X_2 - 0,0534X_2^2 + 0,00573X_1X_2 - 0,00029X_1X_3 - 0,00331X_2X_3; (R) = 0,983.$$

Através da superfície de resposta gerada pelo modelo (Figura 2.2a), pode-se visualizar as interações entre os parâmetros: concentração de NaOH (m.v^{-1}) e tempo (minutos), relacionado na liberação de açúcar pela ação da enzima comercial. De acordo com o perfil elíptico observada nestes gráficos houve uma forte interação entre esses dois parâmetros e ficou caracterizada a faixa ótima. Portanto a maior liberação de AR foi nas faixas entre 40-55 minutos e concentração de NaOH (m.v^{-1}) de 4-6 %.

Tabela 2.3: Liberação de AR (mg) para os diferentes parâmetros do pré-tratamento alcalino no bagaço de cana-de-açúcar.

Exp.	Tempo (min)	NaOH (%)	Temp (°C)	AR (mg)^a	% de liberação em 1 hora^b	AR preditos^c
1	36	3,8	48,5	0,429	2,68	0,37
2	36	3,8	102,0	0,790	4,94	0,86
3	36	6,2	48,5	0,328	2,05	0,31
4	36	6,2	102,0	0,407	2,54	0,37
5	54	3,8	48,5	0,377	2,36	0,42
6	54	3,8	102,0	0,599	3,74	0,63
7	54	6,2	48,5	0,667	4,16	0,61
8	54	6,2	102,0	0,321	2,00	0,39
9	30	5,0	75,5	0,307	1,92	0,33
10	60	5,0	75,5	0,437	2,73	0,38
11	45	3,0	75,5	0,666	4,16	0,61
12	45	7,0	75,5	0,349	2,18	0,36
13	45	5,0	30,0	0,502	3,13	0,58
14	45	5,0	121	0,849	5,30	0,80
15	45	5,0	75,5	0,707	4,41	0,69
16	45	5,0	75,5	0,706	4,41	0,69
17	45	5,0	75,5	0,728	4,55	0,69

^a Liberação de AR pelo ensaio de atividade enzimática (*item 2.2.5.1*); ^bConcentração de AR librado durante 1 h de atividade enzimática; ^cLiberação de AR preditas de acordo com os parâmetros considerados significativos.

Em relação aos parâmetros temperatura e concentração de NaOH (Figura 2.2b) verifica-se que não foi possível atingir a faixa ótima, por consequência da temperatura. O gráfico demonstra que a temperatura mais elevada é favorável para a separação das fibras para a ação das enzimas fibrolíticas. Já em relação à concentração de NaOH a faixa seguiu valores próximos ao encontrado anteriormente, porém levemente mais baixos, com valores de 3-4,5% de NaOH (m.v^{-1}).

Tabela 2.4: Coeficientes de regressão para a liberação de açúcar redutor para os pré-tratamentos utilizando NaOH.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Mean/Interc.	-4,80714	1,019014	-4,7174	0,002164	-7,2167	-2,3975
X_1 - (1)Tempo(L)	0,13517	0,026893	5,0262	0,001520	0,07158	0,19876
X_1 - Tempo(Q)	-0,00155	0,000257	-6,0546	0,000514	-0,0021	-0,0009
X_2 - (2)NaOH (%) (L)	0,46502	0,186137	2,4982	0,041097	0,02487	0,90516
X_2 - NaOH (%) (Q)	-0,05349	0,014442	-3,7034	0,007620	-0,0876	-0,0193
X_3 - (3)Tempera (L)	0,03550	0,007311	4,8553	0,001845	0,01821	0,05278
X_3 - Tempera (Q)	-0,00002	0,000028	-0,7818	0,459908	-0,0000	0,00004
$X_1 X_2$ - 1L by 2L	0,00573	0,002253	2,5413	0,038590	0,00040	0,01106
$X_1 X_3$ - 1L by 3L	-0,00029	0,000101	-2,8954	0,023134	-0,0005	-0,0000
$X_2 X_3$ - 2L by 3L	-0,00331	0,000758	-4,3663	0,003289	-0,0051	-0,0015

Ao comparar os parâmetros temperatura ($^{\circ}\text{C}$) com o tempo (minutos) (Figura 2.2c), novamente mostra-se evidente que a temperatura não atingiu os valores ótimos, visto que, quanto maior é a temperatura maior foi a desestruturação das fibras para a ação da enzima. Entretanto para o tempo, os valores ficaram dentro da faixa ótima já descrita anteriormente, sendo valores de 40-55 minutos, sendo mais precisamente 45 minutos o tempo ótimo para as condições estudadas nessa etapa do trabalho.

Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos (Tabela 2.3), pode-se considerar que os resultados obtidos nos ensaios de validação foram satisfatórios, tendo como valor experimental (45 minutos, 5% (m.v⁻¹) de NaOH e 121 $^{\circ}\text{C}$) igual a 0,83 AR (mg) e os valores preditos foram de 0,77 e 0,84 AR (mg) (Tabela 2.5).

Para todos os ensaios e amostras testadas, ocorreu uma perda de aproximadamente 50%, ou seja, de 10 g utilizadas no início do protocolo de pré-tratamento alcalino, a média, após o tempo pré-determinado para cada um, foi de aproximadamente $5 \pm 0,5$ g.

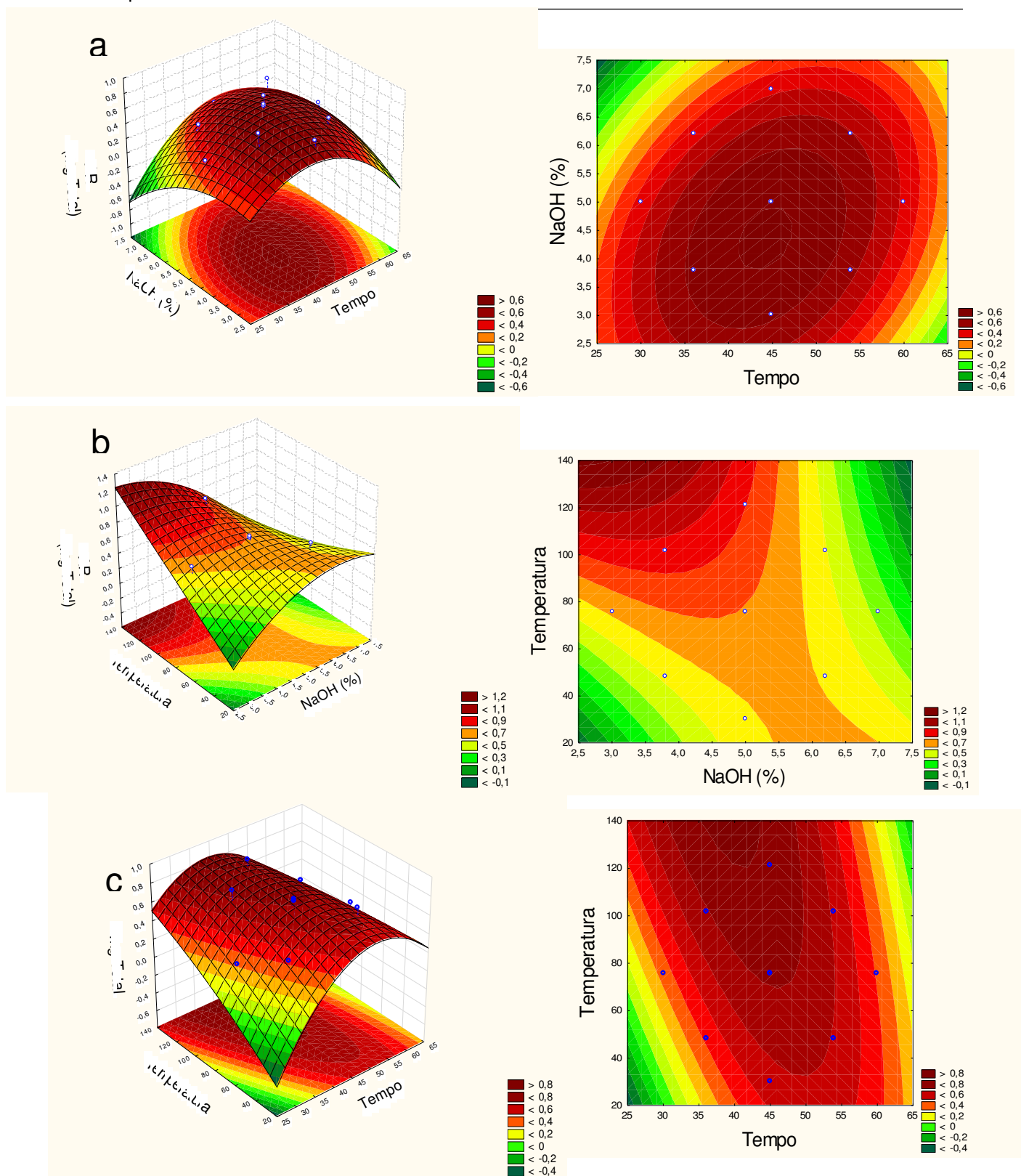


Figura 2.2: Análise de superfície de resposta da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado por álcali: Liberação açúcares redutores (AR) em função: a) do tempo e NaOH; b) temperatura e NaOH; c) temperatura e tempo.

Tabela 2.5: Valores preditos para o delineamento experimental (DCCR2³).

	Valores Previstos					Valor experimental
	Previsto	-95,% Conf.	+95,% Conf.	-95,% Pred.	+95,% Pred.	
AR (mg)^a	0,80645	0,77183	0,84107	0,74160	0,87130	0,83107

^aAR (mg); R-sqr=0,93279; Adj:0,86559.

3.1.2. Cultivo de *T. reesei* QM 9414 a partir de meio formulado com bagaço submetidos a tratamento com NaOH (DCCR) para produção enzimática

Os substratos obtidos na etapa anterior (*item 3.1.1*) foram utilizados em ensaios de fermentação submersa com o *T. reesei* QM 9414, nas condições pré-estabelecidas (caldo nutriente – Capítulo 2, pH 4,5, 28 °C, 180 RPM e 7 dias). Desta forma, a produção das enzimas fibrolíticas – avaliadas pela técnica de Celulases Totais (FPU/mL) – serviu como variável dependente dos pré-tratamentos alcalino (Tabela 2.6).

Para Celulases Totais produzidas, somente a interação entre tempo (X_1) e temperatura (X_3) não foram significativos ($p>0,1$). Os valores de atividade de celulase totais obtido nos experimentos de DCCR 2³ variaram de 0,098 FPU/mL (ensaio 15) a 0,019 FPU/mL (ensaio 6) nos 17 ensaios realizados (Tabela 2.6). Na Tabela 2.7 encontram-se os coeficientes do modelo de regressão a partir da matriz codificada para a produção de Celulases Totais (FPase – FPU/mL).

A partir da Tabela 2.7 o modelo reparametrizado da atividade de Celulases Totais (FPU/mL) em função do tempo, NaOH (%) e temperatura, corresponde a equação 4.

Equação 4

$$\text{Celulases Totais (FPU/mL)} = 0,436649 - 0,008385 + 0,000045X_1^2 - 0,036474X_2 + 0,002837X_2^2 - 0,002077X_3 + 0,000013X_3^2 + 0,000594X_1X_2 - 0,000197X_2X_3; (R) = 0,985.$$

Tabela 2.6: Produção e atividade do complexo fibrolítico nos diferentes parâmetros estudados no cultivo do *T. reesei* QM 9414.

Exp.	Tempo (min)	NaOH (%)	Temp (°C)	FPU/mL^a	FPU/mL predito^b
1	36	3,8	48,5	0,083	0,079
2	36	3,8	102,0	0,045	0,047
3	36	6,2	48,5	0,093	0,088
4	36	6,2	102,0	0,034	0,031
5	54	3,8	48,5	0,046	0,050
6	54	3,8	102,0	0,019	0,018
7	54	6,2	48,5	0,086	0,085
8	54	6,2	102,0	0,030	0,028
9	30	5,0	75,5	0,054	0,059
10	60	5,0	75,5	0,034	0,033
11	45	3,0	75,5	0,041	0,040
12	45	7,0	75,5	0,049	0,055
13	45	5,0	30,0	0,098	0,100
14	45	5,0	121	0,023	0,025
15	45	5,0	75,5	0,036	0,036
16	45	5,0	75,5	0,037	0,036
17	45	5,0	75,5	0,036	0,036

^aAtividade de Celulases Totais (FPU/mL) (item 2.2.5.2); ^bAtividades de Celulases Totais (FPU/mL) preditas de acordo com os parâmetros considerados significativos.

Tabela 2.7: Coeficientes de regressão para a produção de enzimas fibrolíticas – quantificadas por Celulases Totais – pela FSm e *T. reesei* QM 9414.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite Superior
Mean/Interc.	0,436649	0,067481	6,4707	0,000343	0,30880	0,56449
X₁ - (1)Tempo(L)	-0,008385	0,001781	-4,7083	0,002187	-0,0117	-0,0050
X₁ - Tempo(Q)	0,000045	0,000017	2,6266	0,034080	0,00001	0,00007
X₂ - (2)NaOH (%) (L)	-0,036474	0,012326	-2,9590	0,021133	-0,0598	-0,0131
X₂ - NaOH (%) (Q)	0,002837	0,000956	2,9662	0,020918	0,00102	0,00464
X₃ - (3)Tempera (L)	-0,002077	0,000484	-4,2913	0,003605	-0,0029	-0,0011
X₃ - Tempera(Q)	0,000013	0,000002	6,8360	0,000245	0,00000	0,00001
X₁ X₂ - 1L by 2L	0,000594	0,000149	3,9780	0,005337	0,00031	0,00087
X₁ X₃ - 1L by 3L	0,000007	0,000007	1,0309	0,336887	-0,0000	0,00002
X₂ X₃ - 2L by 3L	-0,000197	0,000050	-3,9176	0,005766	-0,0002	-0,0001

Os resultados obtidos nos ensaios de validação foram satisfatórios, com resultados de 0,027 FPU/mL e 0,025 FPU/mL para o previsto (Tabela 2.8).

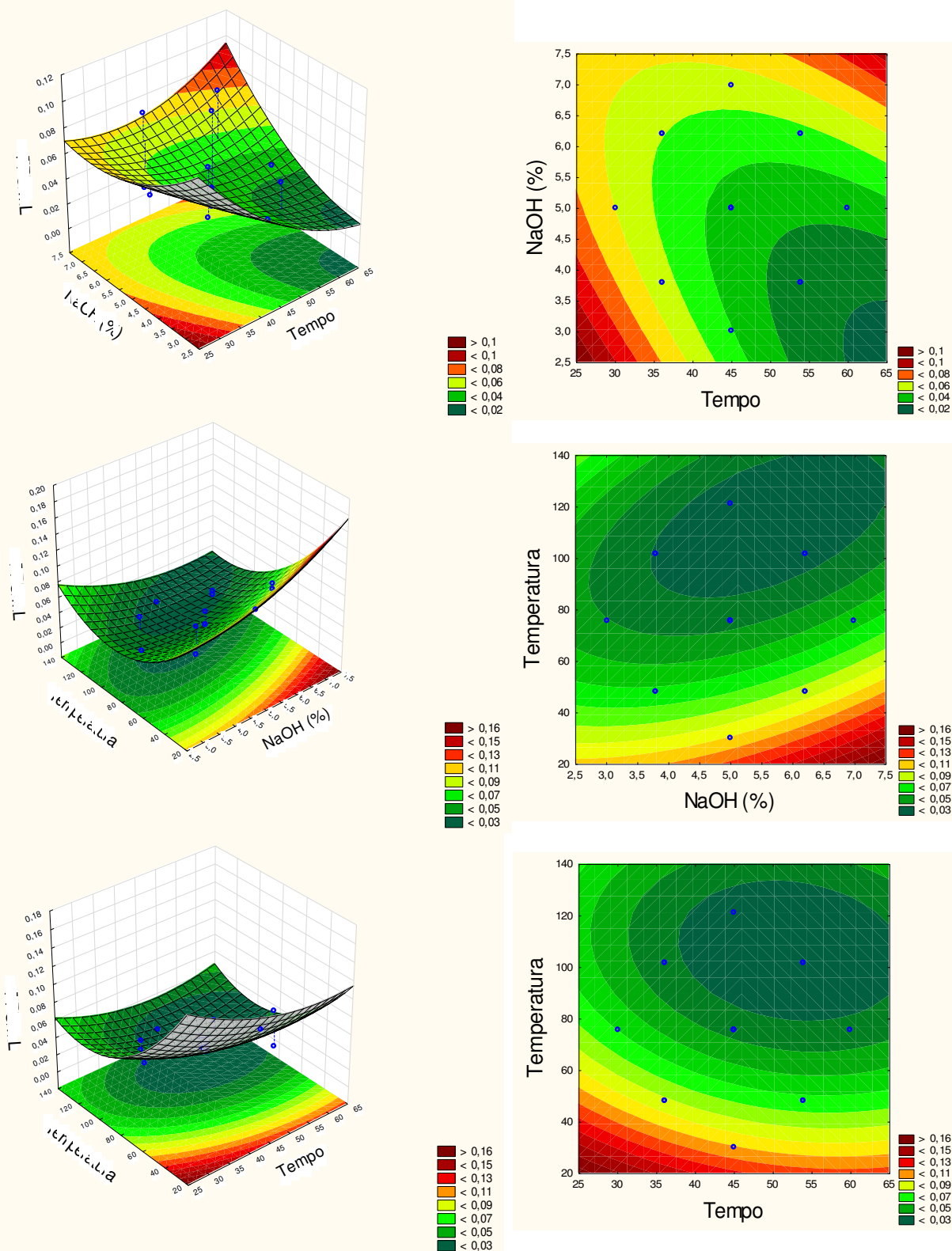


Figura 2.3: Análise do cultivo de *T. reesei* QM 9414 para produção enzimática usando-se bagaço pré-tratado por hidrólise alcalina, em função: a) tempo e NaOH; b) temperatura e NaOH; c) temperatura e tempo.

Tabela 2.8: Valores preditos para o delineamento experimental (DCCR2³).

	Valores Previstos					Valor experimental
	<i>Previsto</i>	<i>-95,% Conf.</i>	<i>+95,% Conf.</i>	<i>-95,% Pred.</i>	<i>+95,% Pred.</i>	
FPU/mL^a	0,025185	0,023139	0,027232	0,021880	0,028491	0,027195

^aFPU/mL, R-sqr=0,98294; Adj:0,96587.

A liberação de AR foi maior proporcionalmente a maior intensidade do pré-tratamento, e contrariamente a produção enzimática por esses CPDs, discutio mais aprofundamente no próximo item. Desta forma, em um primeiro momento ficou evidente que o pré-tratamento alcalino e a desestruturação das fibras lignocelulósicas favorece o ataque enzimático e inibe a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *T. reesei* QM9414.

Quando comparado os parâmetros todos os parâmetros estudados (Figura 2.3), o perfil elíptico para produção enzimática demonstra resultados invertidos, como já comentados, ao obtido para o ensaio e liberação de AR para estas amostras de CPD (Figura 2.2). Tal resultado demonstrou que para as condições estudadas, quanto mais intensas forem, mesmo que tenha uma maior desestruturação das fibras da biomassa lignocelulósica, pior será a produção das enzimas fibrolíticas.

3.2. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana a partir de condições previamente estabelecidas no DCCR

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de DCCR (*item 3.1*) foi refeito um pré-tratamento nas melhores condições obtidas. Foi proposto refazer essa metodologia no tempo de 45 minutos, concentrações de NaOH de 4, 5 e 6% (m.v⁻¹) e temperaturas 48, 85 e 121 °C. Esses experimentos em diferentes condições físico-químicas sob o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (seco e moído), totalizaram 9 diferentes tratamentos. Após os processos de pré-tratamento, as amostras do CPD foram hidrolisados pela enzima comercial nas condições previamente apresentadas (*item 2.2.5.1*). Os resultados estão descritos na Tabela 2.9 e Figura 2.4.

A compilação dos resultados mostrou que o melhor pré-tratamento alcalino foi a 121 °C e 6% (m.v⁻¹) de NaOH, com liberação de 0,94±0,02 mg de AR em 1 h (5,88% de AR total/hora), seguido do pré-tratamento a 121 °C e 5%

(m.v⁻¹) de NaOH, com 0,90±0,00 mg de AR em 1 h, representado que 5,68% (m.m⁻¹) do total de CPD foi convertido em AR em 1 hora de reação (Figura 2.4). Apesar dessa pequena diferença entre ambos os pré-tratamentos, foi demonstrada uma diferença estatística ($p<0,05$). Já a amostra de CPD que demonstrou uma menor liberação de AR foi o ensaio 1, reportando apenas 2,99% em uma hora de reação, o qual passou pelo pré-tratamento menos intenso (48 °C e 4% (m.v⁻¹) de NaOH), obtendo-se apenas 0,48±0,00 mg de AR. Sendo que todos os pré-tratamentos foram superiores para a liberação de AR quando comparados ao bagaço *in natura* (0,19±0,01 mg de AR - 1,20% de AR total em 1 h) ($p<0,05$).

Tabela 2.9: Hidrólise e liberação de açúcares redutores (AR) de acordo com os diferentes tipos de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana.

Ensaio.	Temperatura (°C)	NaOH (%)*	Tempo (minutos)	AR (mg)^a	% de liberação em 1 hora^b
<i>In natura</i>	-	-	-	0,19±0,01 ^a	1,20
1		4,0		0,48±0,00 ^b	2,99
2	48	5,0	45	0,61±0,02 ^c	3,80
3		6,0		0,59±0,07 ^c	3,69
4		4,0		0,58±0,00 ^c	3,23
5	85	5,0	45	0,70±0,01 ^d	4,35
6		6,0		0,70±0,04 ^d	4,35
7		4,0		0,75±0,05 ^d	4,71
8	121	5,0	45	0,90±0,00 ^e	5,68
9		6,0		0,94±0,02 ^f	5,88

^a Liberação de AR pelo ensaio de atividade enzimática (*item 2.2.5.1*) em 1 hora de hidrólise; ^bConcentração de AR librado durante 1 h de atividade enzimática. Diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

A metodologia klason foi utilizada para avaliar a deslignificação e remoção de hemicelulose das amostras pré-tratadas de bagaço de cana. Foi feita uma hidrólise ácida para determinar a concentração de lignina, com posterior quantificação dos demais compostos em HPLC (*item 2.2.5.5*) e, assim, determinar as concentrações das demais fibras. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.10 e Figura 2.5.

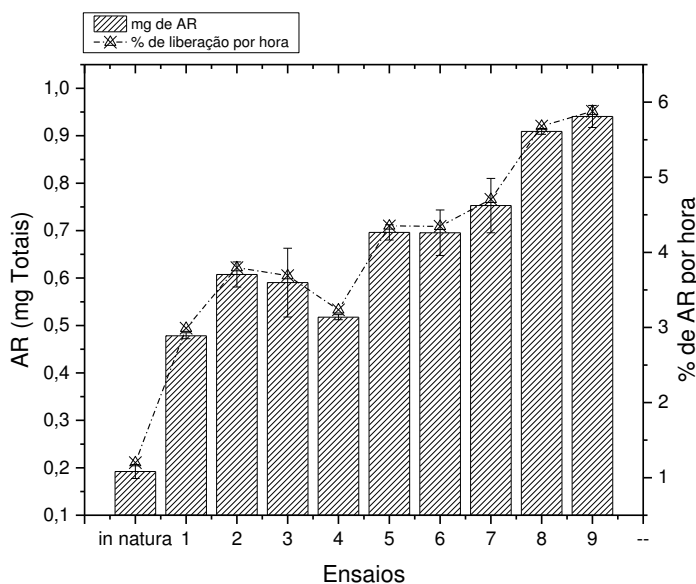


Figura 2.4: Liberação de AR por ação enzimática para cada amostra de CPD obtidas e o bagaço de cana *in natura*.

Tabela 2.10: Avaliação da deslignificação e remoção de hemicelulose do bagaço tratado por diferentes hidrólises alcalinas.

Ensaio	Temp (°C)	NaOH (%) ^a	Tempo (min)	% de perda de biomassa ^a	Celulose (%) ^b	Hemicelulose (%) ^c	Lignina (%) ^d
In natura	-	-	-	-	47,09±1,02 ^a	26,40±0,91 ^a	24,85±2,92 ^a
1	48	4,0	45	26,50	50,12±2,05 ^b	26,17±1,08 ^a	23,67±2,01 ^a
2		5,0		29,70	54,35±1,15 ^c	26,94±0,81 ^a	16,17±1,05 ^b
3		6,0		33,11	61,27±1,09 ^d	23,55±2,01 ^b	14,57±1,01 ^b
4	85	4,0	45	36,63	63,97±3,25 ^d	21,24±1,12 ^b	13,29±2,03 ^b
5		5,0		42,33	67,99±2,20 ^d	18,04±1,98 ^c	12,78±4,02 ^b
6		6,0		45,83	70,08±0,05 ^e	16,24±1,03 ^d	13,10±2,02 ^b
7	121	4,0	45	49,50	74,09±1,05 ^f	12,23±0,98 ^e	12,54±0,91 ^b
8		5,0		50,26	73,06±2,01 ^f	13,61±0,79 ^e	11,58±1,09 ^b
9		6,0		50,56	76,76±2,87 ^f	11,23±1,03 ^e	10,09±0,54 ^c

^aCálculo de rendimento de perda após o pré-tratamento alcalino: **% perda = (massa inicial – massa final/massa inicial)x100**; ^bConcentração de celulose (item 2.2.5.5); ^cConcentração de hemicelulose (item 2.2.5.5); ^dConcentração de lignina calculada pela técnica de Klason (item 2.2.5.5). Triplicatas e diferentes letras indicam que são estatisticamente diferentes ($p<0.05$).

As amostras pré-tratadas por hidrólise alcalina quando comparadas ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, apresentaram uma boa liberação de AR (Figura 2.4 e 3.5). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos no com a metodologia do DCCR, sendo que provavelmente houve uma maior

desestruturação das fibras lignocelulósicas e, por consequência, uma maior liberação de AR por hidrólise enzimática.

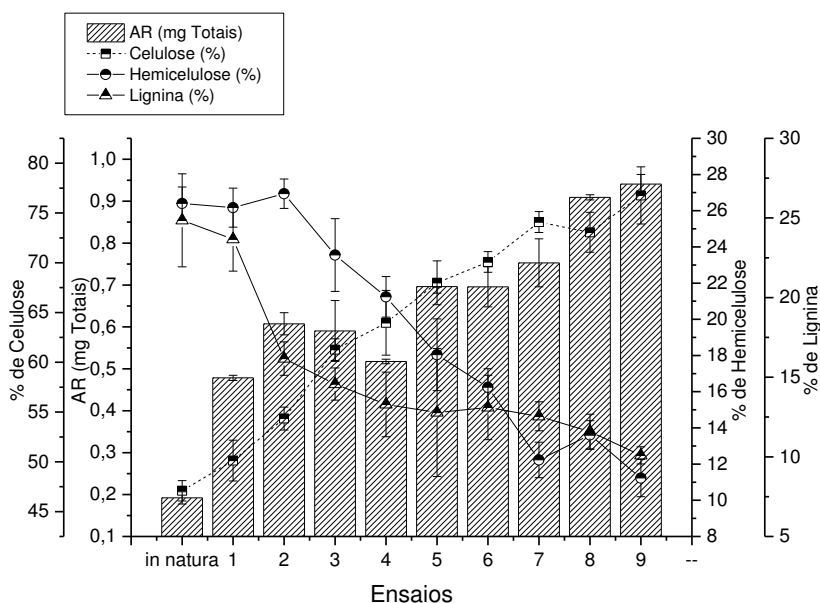


Figura 2.5: Relação da hidrólise enzimática por liberação de açúcares redutores (AR) em 1 h de reação em função dos substratos pré-tratados com suas diferentes constituições químicas (celulose, hemicelulose e lignina) e bagaço de cana *in natura*.

As amostras pré-tratadas por hidrólise alcalina quando comparadas ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, apresentaram uma boa deslignificação, tendo uma diminuição de 24,85% (bagaço *in natura*) para 10,09% de lignina no pré-tratamento mais extremo dessa etapa, a 121 °C, 6 % (m.v⁻¹) de NaOH e 45 minutos (Tabela 2.10). O mesmo comportamento ocorreu para a hemicelulose, no qual diminuiu de 26,4% (bagaço *in natura*) para 11,2% (ensaio 9). Com isso, a concentração de celulose apresentou uma elevação de 47,09 % (bagaço *in natura*) para 76,76% (ensaios 9) (Tabela 2.10). Essas análises demonstram que com a intensificação das condições físico-químicas do pre-tratamento alcalino do bagaço, ocorreu uma maior desestruturação da fibra, comprovada pela diminuição da lignina e da hemicelulose, elevação da concentração de celulose, e maior exposição desta última ao ataque enzimático, como verificado na Figura 2.4, através da maior liberação de AR.

Como relatado por KIM (2016), o pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas remove, principalmente, substâncias amorfas – lignina e hemicelulose. E, segundo o mesmo autor, uma boa remoção de lignina seria a redução de aproximadamente 10%, resultados que foram facilmente superados por esse trabalho (Tabela 2.10). Esse pré-tratamento resultou em um total de 6,35 g de lignina extraída das 30 g de bagaço *in natura* ofertado no início, esse valor equivale a aproximadamente 21,1% de remoção de lignina da biomassa pré-tratada. A remoção da lignina por tratamento alcalino se baseia na sua clivagem e saponificação dos grupos ésteres (HIMMEL, et al.; 2007) o que torna a fração celulósica mais reativa, justificando a maior eficiência das celulasas na liberação de AR. Ou seja, quanto mais intenso é o pré-tratamento, maior é a deslignificação, perda de hemicelulose, e concentração de celulose, além de tornar a biomassa menos recalcitrante (CHANG et al.; 2002; KÄRCHERA et al., 2016).

Esta combinação de fatores possibilita uma melhor ação das enzimas fibrolíticas (CHANG et al., 2002), resultados mostrado na Figura 2.5. Para o bagaço *in natura*, que apresenta as maiores concentrações de lignina (24,8%) e hemicelulose (26,4%) e de apenas 47,9% de celulose a liberação de AR foi de apenas $0,19 \pm 0,01$ mg de AR em 1 h, enquanto o ensaio 9 que apresentou menores concentrações de lignina (10,0%) e hemicelulose (11,2%) e maior de celulose (76,7%), a liberação de AR foi de $0,94 \pm 0,02$ mg de AR em 1 h (Figura 2.5). A elevação na concentração da celulose também pode ter possibilitado uma maior hidrólise enzimática, visto que essas enzimas atacam diretamente essa fração da fibra (DASTBAN et al., 2010; GUPTA et al., 2016).

A remoção de hemicelulose e lignina sem grande degradação da celulose deve ser considerada como um processo favorável (SINGHA et al., 2015). Segundo CHANG et al., (2002), o principal efeito do pré-tratamento com hidróxido é a remoção da lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos polissacarídeos restantes. Este autor também afirma que o pré-tratamento remove os grupos acetil e a adição de ar/oxigênio à mistura reacional melhora a deslignificação da biomassa, especialmente para materiais altamente lignificados.

O pré-tratamento do ensaio 9 que demonstrou melhor eficiência na deslignificação, e maior concentração de celulose, foi também aquele que ocorreu maior perda de biomassa (50%), o que significa que os carboidratos, celulose e hemicelulose, também foram perdidos. Assim apesar da concentração de celulose ter aumentado para 76,76%, a massa total foi de apenas 11 g; enquanto para a massa de celulose no bagaço *in natura* com 47% de celulose foi de 14 g. Essa perda de celulose correspondeu a 21,4% do total e pode ser aceitável ou não dependendo do processo industrial.

O outro carboidrato, a hemicelulose que representava 26,4% do bagaço seco *in natura* correspondendo a 7,92 g de massa total, caiu para 11,23% no bagaço pré-tratado, correspondendo a 1,68 g de massa total. Essa queda em massa de hemicelulose significa que houve uma redução de 78,5%, ou uma extração de 20,8% deste carboidrato quando comparado à biomassa ofertada no começo do processo. A deslignificação foi intensa neste tratamento tendo em vista que no bagaço *in natura* a concentração foi de 24,8%, o que representou 7,4 g de massa total, e após o tratamento 9, o bagaço apresentou 10,09% de lignina ou somente 1,05 g de massa total, portanto uma queda de 85,8%.

Assim, todos os carboidratos ficaram no líquido residual após o pré-tratamento, juntamente com a lignina solúvel também extraída. Uma hipótese para o reaproveitamento é a utilização, por exemplo, da hemicelulose, que pode ser reaproveitada na produção de xilooligossacarídeos (XOS) ou xilose (KULKARNI & SHENDYE 1999; CARVALHO et al., 2013). Este possui um grande potencial biotecnológico (CARVALHO et al., 2013), como por exemplo, em aplicações como ingredientes de cosméticos, medicamentos, produtos agrícolas e pré-bióticos (CANO et al, 2006; CARVALHO et al., 2013; KIYOHARA et al, 2006). E, na literatura existem muitos tratamentos para a extração da xilana de materiais lignocelulósicos visando à produção dos XOS, sem sua degradação ou produção de altas concentrações de compostos tóxicos, dentre estes tratamentos o que mais se destaca é o álcali (CARVALHO et al., 2013; YOON et al., 2006; ZHU et al., 2006).

Pode-se considerar portanto que o processo utilizado possibilita uma alta taxa de extração de hemicelulose, quando comparados com os rendimentos obtidos por outros trabalhos (YOON et al., 2006; KIM, 2006; ZHU et al., 2006), demonstrando que o uso do NaOH para esse fim é justificável.

3.3. Cultivo de *T. reesei* QM 9414 para produção de enzimas fibrolíticas com meios formulados com bagaço de cana pré-tratado

O cultivo do *T. reesei* QM 9414 com caldo nutriente (condições descritas no capítulo 2) e em condições físico-químicas também já descritas (pH 4,5, 28 °C, 180 RPM e 7 dias) foi realizado visando a produção de enzimas fibrolíticas. Como meio de cultivo foi utilizado o bagaço pré-tratado em condições previamente estabelecidas (item 3.2). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.11.

Tabela 2.11: Produção do complexo fibrolítico pela atividade de Celulases Totais (FPU/mL) com substratos CPD e *in natura*.

Ensaio	Temp (°C)	NaOH (%)[*]	Tempo (min)	3^o dia^a	5^o dia^a	7^o dia^a
<i>In natura</i>	-	-	-	0,04±0,00 ^{a, I}	0,07±0,00 ^{a, II}	0,11±0,00 ^{a⁺, III}
1		4,0		0,02±0,03 ^{b, I}	0,04±0,01 ^{b⁺, II}	0,05±0,00 ^{b⁺, II}
2	48	5,0	45	0,02±0,00 ^{b, I}	0,03±0,00 ^{b⁺, II}	0,04±0,00 ^{b⁺, II}
3		6,0		0,02±0,00 ^{b, I}	0,03±0,00 ^{b⁺, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, I}
4		4,0		0,02±0,00 ^{b, I}	0,03±0,00 ^{b⁺, I}	0,03±0,00 ^{b⁺, I}
5	85	5,0	45	0,01±0,00 ^{b, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, II}	0,03±0,01 ^{b⁺, II}
6		6,0		0,02±0,00 ^{b, I}	0,03±0,00 ^{b⁺, I}	0,03±0,00 ^{b⁺, I}
7		4,0		0,01±0,00 ^{b, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, I}
8	121	5,0	45	0,02±0,00 ^{b, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, I}
9		6,0		0,02±0,00 ^{b, I}	0,02±0,00 ^{b⁺, I}	0,02±0,01 ^{b⁺, I}

^aAtividade de Celulases Totais (item 2.2.5.2). Diferentes letras ou números indicam que são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Com os dados obtidos na FSm para esses substratos foi verificado que, novamente, quanto mais intenso for o pré-tratamento alcalino, menor foi a produção enzimática. Como já verificado no item 3.1, o fungo *T. reesei* QM 9414 quando cultivado com substratos menos recalcitrantes produz uma baixa concentração de enzimas, provavelmente por que com uma menor concentração de lignina ou hemicelulose maior a facilidade do fungo usar a

celulose (CHANG et al., 2002), algum composto inibidor da síntese destas enzimas pode ter sido gerado pelo pré-tratamento (KÄRCHERA et al., 2016).

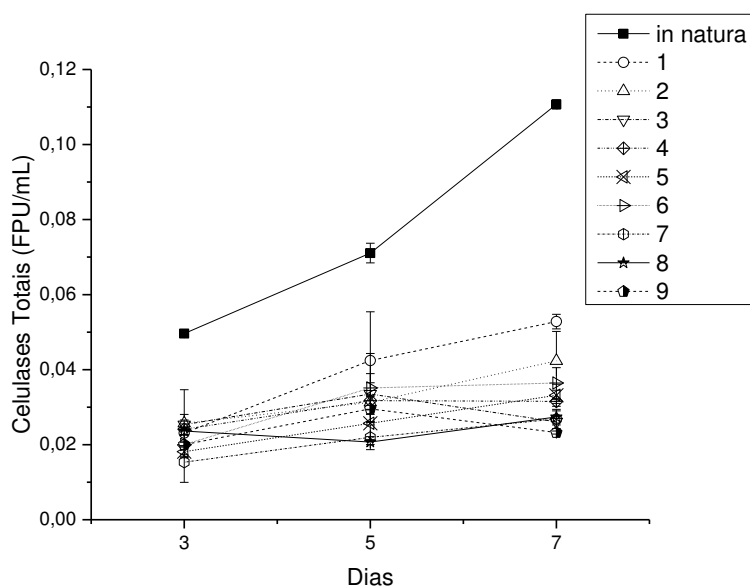


Figura 2.6: Produção de enzimas fibrolíticas pelos diferentes CPDs e bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Quando comparada a produção enzimática do meio de cultura formulado com o bagaço *in natura* e com os demais tratamentos (Figura 2.6), a produção com bagaço *in natura* foi muito superior àquelas onde o bagaço foi pré-tratado com álcalis na formulação do meio de cultura ($p < 0,05$). Como por exemplo, o ensaio 9 (pré-tratamento mais intenso) apresentou uma produção enzimática extremamente baixa, de apenas $0,02 \pm 0,00$ FPU/mL (3º dia de cultivo), e mesmo após 7 dias de cultivo, não ocorreu uma elevação na concentração enzimática ($p > 0,05$) (Figura 2.6). Esse comportamento não ocorreu com o bagaço *in natura* que aumentou a síntese das enzimas do 3º para o 7º dia ($0,04 \pm 0,00$ para $0,11 \pm 0,00$ FPU/mL - $p < 0,05$). O ensaio 9, que foi o de maior eficiência na sacarificação, foi utilizado também em teste anterior de cultivo de até 15 dias (*BC_NaOH* – Capítulo 2), e neste caso, mesmo após esse período, o máximo de Celulases Totais foi de $0,043 \pm 0,00$ FPU/mL, e quando suplementado com 1% (m.v⁻¹) de sacarose (*BC_NaOH+Sac* – Capítulo 2) o

resultado foi ainda mais baixo, sendo que o máximo alcançado foi de apenas $0,024 \pm 0,00$ FPU/mL em 72 h (3 dias).

Entretanto, para esse substrato pré-tratado (*BC_NaOH* – Capítulo 2), em 15 dias de cultivo ocorreu uma produção de $93,08 \pm 3,27$ U/mL de xilanases, superior ao alcançado com o bagaço *in natura* (*BC* – $21,11 \pm 2,05$ U/mL). Provavelmente isso ocorreu, pois após esse longo período de crescimento do fungo devido ao maior acesso à porção celulósica da fibra, provocada pela sua desestruturação, tendo em vista a grande remoção de lignina (Tabela 2.10). Assim, mesmo também tendo diminuído a concentração de hemicelulose quando comparado ao substrato *in natura*, as altas concentrações de lignina e a sua capacidade de adsorção de enzimas influenciava de forma desfavorável a produção das enzimas, em destaque para as xilanases (LEE et al., 2015; SAINI et al., 2016), como já discutido em etapas anteriores.

As ligações da lignina na fibra são os maiores obstáculos para a hidrólise dos carboidratos, pois a fibra compactada atua como uma barreira física contra o ataque enzimático (CASTRO & PEREIRA, 2010; FENGEL & WEGENER, 1989; SUN & CHENG, 2002; SAINI et al., 2016). Provavelmente exista um nível de compactação e estruturação da fibra que estimule o fungo à produção enzimática.

3.4. Sacarificação e hidrólise enzimática

Após a avaliação de cada pré-tratamento pela metodologia de DCCR (*item 3.1*) e, posteriormente, utilizando condições alcalinas e físico-químicas pré-definidas (*item 3.2*), foi concluído que a melhor amostra do CPD (celulose parcialmente deslignificado) foi o ensaio 9 (Tabela 2.9 e Figura 2.5). Assim, esse último substrato foi utilizado para os ensaios de sacarificação.

As enzimas utilizadas nesta etapa e respectivas concentrações podem ser resumidas em: 0,8; 15 e 30 FPU/g de substrato para os extratos fibrolíticos produzidos pelo *T. reesei* QM 9414 em cultivo com bagaço de cana *in natura*, bagaço de laranja e T1, estes últimos concentrados duas vezes. Além disso, a enzima comercial ABenzyme também foi utilizada nestas mesmas dosagens. Como substrato (2 g) para a reação de sacarificação foi utilizado o bagaço de

cana pré-tratado (ensaio 9) e o bagaço *in natura*. A liberação de AR em até 72 h de reação de hidrólise está descrita na Tabela 2.12.

Tabela 2.12: Liberação de açúcares redutores obtidos pela hidrólise enzimática de diferentes substratos e complexos enzimáticos a 50 °C e pH 5,6.

AR (mg) liberado com Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>							
Complexo enzimático	1 h	5 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
0,8 FPU/g (BC) ^a	0,01±0,00 ^I	0,04±0,00 ^{II}	0,07±0,00 ^{III}	0,09±0,00 ^{IV}	0,10±0,00 ^{IV}	0,10±0,00 ^{IV}	0,00±0,00
0,8 FPU/g (enzi) ^b	0,03±0,00 ^I	0,09±0,00 ^{II}	0,15±0,00 ^{III}	0,11±0,01 ^{II}	0,12±0,00 ^{II}	0,10±0,02 ^{II}	0,00±0,00
15 FPU/g (enzi) ^b	0,08±0,00 ^I	0,09±0,00 ^I	0,17±0,00 ^{II}	0,05±0,00 ^{III}	0,05±0,00 ^{III}	0,06±0,00 ^{III}	0,00±0,00
30 FPU/g (enzi) ^b	0,09±0,00 ^I	0,14±0,00 ^{II}	0,19±0,00 ^{III}	0,03±0,00 ^{IV}	0,03±0,00 ^{IV}	0,03±0,01 ^{IV}	0,00±0,00
30 FPU/g (T1+Sac) ^a	0,12±0,00 ^I	0,20±0,00 ^{II}	0,32±0,00 ^{III}	0,17±0,01 ^{IV}	0,07±0,00 ^V	0,05±0,00 ^{VI}	0,00±0,00
30 FPU/g (BLara+Sac) ^a	0,03±0,00 ^I	0,12±0,00 ^{II}	0,15±0,00 ^{III}	0,06±0,00 ^{IV}	0,02±0,00 ^I	0,00±0,00	0,00±0,00
AR (mg) liberado com Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado							
Complexo enzimático	1 h	5 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
0,8 FPU/g (BC)	0,09±0,00 ^I	0,17±0,00 ^{II}	0,22±0,00 ^{III}	0,33±0,00 ^{IV}	0,21±0,00 ^V	0,14±0,00 ^{VI}	0,13±0,01 ^{VII}
0,8 FPU/g (enzi)	0,18±0,00 ^I	0,58±0,00 ^{II}	0,52±0,00 ^{III}	0,84±0,02 ^{IV}	0,84±0,02 ^{IV}	0,49±0,00 ^V	0,15±0,01 ^{VI}
15 FPU/g (enzi)	0,25±0,00 ^I	0,72±0,01 ^{II}	0,91±0,00 ^{III}	1,24±0,02 ^{IV}	0,81±0,01 ^V	0,59±0,05 ^{VI}	0,09±0,02 ^{VII}
30 FPU/g (enzi)	0,27±0,00 ^I	0,70±0,01 ^{II}	0,87±0,00 ^{III}	0,97±0,01 ^{IV}	0,60±0,00 ^V	0,55±0,04 ^V	0,51±0,03 ^{VI}
30 FPU/g (T1+Sac)	0,27±0,00 ^I	0,99±0,00 ^{II}	1,18±0,00 ^{II}	1,26±0,03 ^{IV}	1,38±0,00 ^V	0,27±0,00 ^I	0,23±0,00 ^{VI}
30 FPU/g (BLara+Sac)	0,23±0,00 ^I	0,88±0,01 ^{II}	1,05±0,00 ^{III}	1,13±0,01 ^{IV}	1,17±0,00 ^V	0,38±0,00 ^{VI}	0,36±0,00 ^{VII}

^a Enzimas produzidas por *T. reesei* QM 9414 (Capítulo 2); ^b enzima ABEnzyme;

Para o substrato bagaço *in natura*, verificou-se que o melhor complexo enzimático para a hidrólise da biomassa e liberação de AR foi o extrato produzido por *T. reesei* a partir do T1+Sac (Capítulo 2), com liberação de 0,32 mg de AR em 12 h. Isso correspondeu a uma liberação 40,6% superior àquela obtida com enzima comercial, mesmo essa possuindo a mesma quantidade de 30 FPU/g (Tabela 2.12 e Figura 2.7). Ficou evidente a superioridade de hidrólise com esta última dosagem com a enzima obtida pelo tratamento T1+Sac, no qual apresentou 16% de sacarificação (em relação a 2 g de substrato) em 12 h.

Ao reagir o substrato pré-tratado (121 °C/6% (m.v⁻¹) de NaOH/45 min) com as enzimas fibrolíticas ficou evidente a maior liberação de AR, mesmo para a menor dosagem – 0,8 FPU/g (BC), para a qual foi obtida 0,33 mg de AR em 24 h (Tabela 2.12). Este resultado foi superior ao bagaço *in natura*, provavelmente devido às diferenças já discutidas sobre as fibras pré-tratadas ou não.

A partir da hidrólise com 30 FPU/g substrato usando a enzima de *T. reesei* obtida pelo substrato *T1+Sac* (concentrado 2x) obteve-se a maior liberação de AR, ou 1,38 mg de AR para cada 2 g de CPD, em 36 h, equivalendo a 69% de conversão. O segundo melhor resultado foi com 30 FPU/g a partir da enzima de *T. reesei* obtida por *BLara+Sac*, duas vezes concentrada, com liberação de 1,17 mg de AR (36 h) para cada 2 g de biomassa ou conversão de 58,9% (Figura 2.8).

Ambos os complexos fibrolíticos de *T. reesei*, 30 FPU/g (*T1+Sac*) e 30 FPU/g (*BLara+Sac*), foram aproximadamente 23% superiores ao maior valor apresentado pela enzima comercial (0,97±01 mg de AR – 24 h e 48% de rendimento de conversão), com a mesma dosagem em FPU/g de substrato (Tabela 2.12 e Figura 2.8).

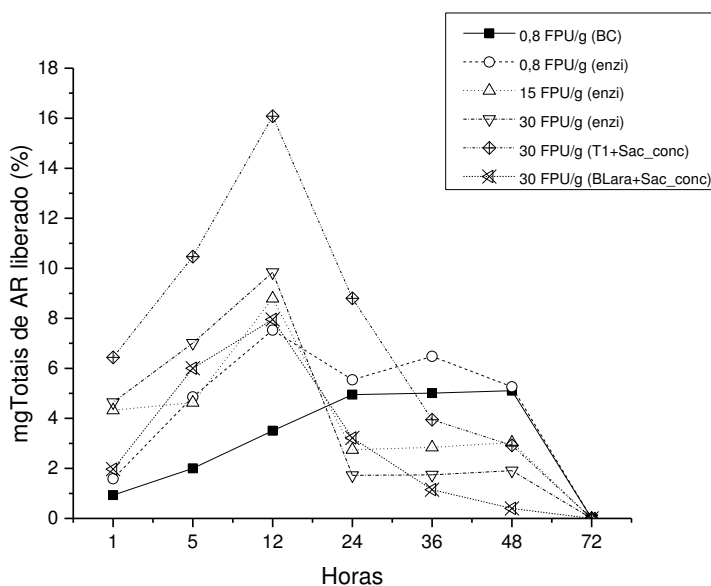


Figura 2.7: Porcentagem de mg de AR liberado (até 72 h) para os diferentes tipos de complexos fibrolíticos avaliados e bagaço *in natura*.

As enzimas produzidas no capítulo 1 desse trabalho foram mais efetivas que a enzima comercial na hidrólise das biomassas, *in natura* ou pré-tratada (Figura 2.7 e 3.8). Esse resultado é explicado pelos diferentes tipos de enzimas que compõe cada complexo fibrolítico. No caso das enzimas produzidas por *T. reesei*, para as 30 FPU/g das enzimas produzidas por *T1+Sac* estão envolvidas 237 U/g de Endoglucanase, 38,60 U/g de Exoglucanase e 4152,79 U/g de Xilanases; enquanto para as 30 FPU/g do complexo produzido a base do

BLara+*Sac*, estão envolvidas 74,63 U/g de Endoglucanase, 6,31 U/g de Exoglucanase e 495,18 U/g de Xilanase. Já as 30 FPU/g do complexo enzimático comercial ABenzyme, apresenta apenas 64 U/g de Endoglucanase, 2 U/g de Exoglucanase e não demonstrou atividade xilanolítica.

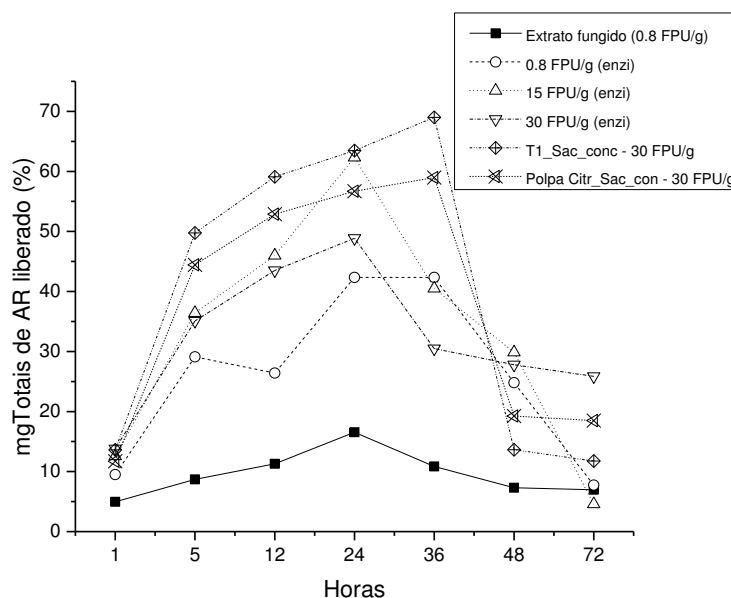


Figura 2.8: Porcentagem de AR liberado após hidrólise de bagaço pré-tratado com diferentes complexos fibrolíticos.

Para as enzimas utilizadas nas reações de sacarificação com bagaço *in natura* ou pré-tratado também foi observado que ocorreu uma queda drástica da concentração de AR após algumas horas de reação (Figura 2.7 e 3.8). Como exemplo, o meio tratado com o complexo enzimático 30 FPU/g (*T1*+*Sac*) demonstrou uma queda de 80% de 36 h para 48 h (Figura 2.8). Tal fato provavelmente aconteceu devido a uma contaminação bacteriana, visto que esses micro-organismos têm o crescimento favorecido por açúcares redutores e de fácil metabolização, além de temperatura e pH propício para o seu crescimento (KOMPALA et al., 1986; MASSUCCI et al., 2015; MANFREDI et al., 2016).

Avaliando o rendimento real do pré-tratamento até a sacarificação do bagaço pode-se calcular que: a partir de 2 g de bagaço *in natura* hidrolisados

com as enzimas produzidas (*T1+Sac*) houve liberação de AR de 0,32 g ou conversão final de 16% (m.m^{-1}) biomassa sacarificada.

Já para o cálculo usando-se o bagaço pré-tratado (ensaio 9) como substrato de reação de sacarificação deve ser considerada a perda da biomassa durante o pré-tratamento. Neste caso, para obter-se 2 g de substrato pré-tratado para a reação enzimática são necessários 4,02 g de bagaço *in natura*, tendo em vista que a perda da biomassa no pré-tratamento foi de 50,5%. Para a reação de sacarificação neste caso com conversão de 69% obteve-se 1,38 g de biomassa sacarificada (açúcares redutores). Calculando-se, portanto, a conversão final será de $1,38\text{g}/4,02\text{ g}$ de bagaço *in natura* ou conversão final de 34,3 % (m.m^{-1}) de biomassa sacarificada (Tabela 2.13).

Tabela 2.13: Balanço geral da conversão de biomassa em AR por hidrólise enzimática.

Substrato	Massa inicial ofertada (g)	% de perda durante o pré-tratamento ^c	Massa ofertada para na sacarificação (g) ^d	Massa de AR liberada após sacarificação (g) ^e	% de conversão em açúcares redutores (AR) ^f	Balanço geral de conversão de biomassa em AR (%) ^g
Bagaço <i>in natura</i> ^a	2	-	2	0,32	16%	16%
Bagaço pré-tratado (CPD) ^b	4,02	50,2%	2	1,38	69%	34,3%

^aBagaço de cana-de-açúcar *in natura*; ^bSubstrato pré-tratado com NaOH; ^cPerda de biomassa durante o pré-tratamento (Tabela 2.10) – **% de perda = [(massa inicial – massa final)/massa inicial] x 100**; ^d**massa sacarificação = massa inicial - % de perda durante o pré-tratamento**; ^eQuantificado experimentalmente; ^f**% de conversão = (massa de AR liberada x 100)/massa ofertada**; ^g**Balanço geral (%) = (massa de AR liberada x 100)/massa inicial**.

Entretanto, mesmo que no balanço geral da conversão de biomassa para o substrato pré-tratado tenha sido de 34,3%, deve ser considerada que toda a biomassa perdida durante o pré-tratamento, como já discutido, pode ser convertida em produtos de alto valor. Como no caso da hemicelulose, como já relatada, a perda com o pré-tratamento foi de 78,5%. Considerando-se que em 4,02 g de bagaço *in natura* há 26,4% de hemicelulose ou 1,061 g, e após o pré-

tratamento alcalino ocorreu extração de 78,5% ou 0,832 g, a partir deste pré-tratamento alcalino. Assim para cada 100 g de bagaço *in natura*, ocorreria uma extração 20,72 g de hemicelulose para cada 100 g de bagaço *in natura*, ainda que misturado com a lignina solúvel extraída. A hemicelulose pode ser aproveitada para outros fins. Por exemplo, ela poderá ser convertida em xilooligossacarídeos (XOS) pela ação de enzimas xilanolíticas (CARVALHO et al., 2013).

Portanto se a hemicelulose extraída do tratamento alcalino utilizado for aproveitada, pode-se calcular um rendimento global dos carboidratos a partir de 100 g de bagaço *in natura* de: 34,3 g de açúcares redutores hidrolisados e 20,72 g de hemicelulose, totalizando-se 55,02 g de carboidratos totais obtidos do bagaço *in natura*. Esses valores são sem levar em consideração a celulose extraída (21,4% do total de celulose inicial) e da lignina (85,8% de extração da lignina inicial). No caso, a lignina poderia ser convertida em produtos como óleos, fenol, resina formaldeído (SCHUCHARDT et al., 2001). Assim, o processo pode ter uma maior eficiência com base na ideia de “biorrefinaria”, se basendo na separação seletiva de frações constituintes de uma dada matéria prima, no caso, o bagaço de cana, de acordo com suas características químicas (LASER et al., 2002; GARROTE et al., 2002). O que poderia elevar a eficiência do processo.

Desta forma, é possível afirmar que houve um bom rendimento de carboidratos (hemicelulose e açúcares redutores) extraídos do bagaço de cana (55,02%) (YAOA et al., 2015). Considerando-se só a produção de açúcares redutores, provavelmente deve haver um predomínio de glicose proveniente da celulose, tendo em vista que houve uma extração de cerca de 78% da hemicelulose. Estes açúcares redutores poderão ser convertidos em bioetanol de segunda geração caso esse líquido seja concentrado.

4. Conclusão

O bagaço de cana submetido ao tratamento alcalino é mais eficiente que o *in natura* para a hidrólise enzimática, entretanto ineficaz para a produção de enzimas fibrolíticas com o fungo *T. reesei* QM 9414.

As melhores condições de pré-tratamento alcalino, tendo como consequente a desestruturação das fibras, pode ser obtido em processos rápidos (40 a 50 minutos), concentrações moderadas de NaOH (3,5 a 6% m.v⁻¹) e em temperaturas elevadas, preferencialmente 121 °C ou mais. Este tratamento atua através de uma grande remoção de lignina e hemicelulose. Quanto mais intenso for este pré-tratamento, maior e mais rápida será a liberação de AR via hidrólise, porém maior também será a perda da biomassa. A liberação de AR por ação das enzimas celulolíticas é proporcional à concentração de celulose na fibra, e inversamente proporcional em relação à concentração da lignina e hemicelulose.

O complexo enzimático concentrado, tendo como base os substratos *BLara+Sac* e *T1+Sac*, apresentaram uma alta eficiência de hidrólise do bagaço com conversão da biomassa em AR, tanto para o substrato *in natura* (16%) como o pré-tratado por hidrólise alcalina (69%), esta última devido à elevada deslignificação e remoção de hemicelulose nestes substratos.

Capítulo 3: *Produção integrada do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, enzimas fibrolíticas e composto proteico por Fermentação em Estado Sólido com diferentes resíduos lignocelulósicos*

Resumo

Nesta etapa do trabalho foi utilizado um fungo *Basidiomycota* para o cultivo utilizando-se resíduos agroindustriais como fonte de carbono. O cultivo visou a produção de cogumelos, enzimas fibrolíticas e um resíduo final a ser avaliado como fonte de produção enzimática utilizado no capítulo 1, como forma de integração de diferentes bioprocessos. Foram verificados diferentes resíduos agroindustriais no cultivo do *P. ostreatus*, tendo como consequência a produção de uma biomassa residual, além dos cogumelos e enzimas. O fungo foi cultivado em diferentes concentrações de resíduos, temperaturas e umidade. O melhor tratamento foi o T1 – 50% (m.m⁻¹) de bagaço de cana *in natura*, 40% (m.m⁻¹) de farelo de trigo, 10% (m.m⁻¹) de farelo de algodão, na temperatura de 20 °C e 80% (v.m⁻¹) de umidade. O cultivo axênico de *P. ostreatus* utilizando o T1 foi feito em 30 dias, seguido de 5 dias para a ativação da frutificação e mais 5 dias para a frutificação. Foram observados 106,18% de eficiência biológica e 9,26% de rendimento. Os cogumelos apresentaram 4,7% de proteína bruta e para a biomassa residual foi obtido uma elevação de aproximadamente 191,1% para as proteínas presentes no substrato após o cultivo e colheita. Foram produzidas 0,13±0,02 FPU/g de substrato (Celulases Totais); 1,62±0,15 CMC/g de substrato (Endoglucanases); 78,07±0,21 U/g de substrato - Xilanases; e 67,13±1,01 U/g de substrato - Lacases; e 6,63±0,10 U/g de substrato para MnP.

Palavras chave: Resíduos agroindustriais lignocelulósicos; bagaço de cana-de-açúcar; cultivo axênico; *Pleurotus ostreatus*; cogumelos; enzimas lignocelulolíticas.

Capítulo 3

1. Introdução

Os fungos do grupo *Basidiomycota* são abundantes na natureza com mais de 25.000 espécies, que possuem como estrutura reprodutiva característica o basídio (do grego = pequeno pedestal ou base pequena). Os cogumelos, que são organismos degradadores de materiais lignocelulósicos, através do seu complexo enzimático formado por celulasas, ligninases, peroxidases, lacases, proteases, manganases e fenol (TONINI, 2007). Sendo assim, a maioria dos *Basidiomycota* podem utilizar os componentes da madeira para seu crescimento, pelo fato de possuírem este sistema enzimático, tornando-os capazes de degradar fontes complexas de carbono, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (PASCHOLATI, 1998). Dentre todos os cogumelos existentes na natureza apenas 20 são cultivadas comercialmente e somente sete espécies são produzidas em nível industrial, destacando-se: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea*, *Pholiota nameko*, *Flammulina velutipes* e *Agaricus blazei* (PASCHOLATI, 1998).

O cultivo Axênico de cogumelos comestíveis; visando a produção de biomassa proteica; em substratos sintéticos à base de diversos resíduos agroindustriais vem ganhando espaço na produção comercial destes fungos, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é mais elevada (TONINI et al, 2007). E durante a fermentação FSs ocorre a hidrólise e a degradação da lignina, que pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas lignolíticas que desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (CASTRO & PEREIRA, 2010; DURÁN & ESPOSITO, 2008; LEE & MOON, 2003). As enzimas do complexo lignocelulolítico possui um potencial econômico elevado, encontrando aplicações em diversas áreas, como na indústria de alimentos. A partir da transformação enzimática, os resíduos lignocelulósicos podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis, sendo este o ponto de partida para inúmeras outras aplicações.

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* têm sido estudados intensivamente pela sua habilidade em colonizar e degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos (VELÁZQUEZ- CEDEÑO et al., 2002; TISDALE et al., 2006). Além das propriedades gastronômicas, os cogumelos do gênero *Pleurotus* são alimentos ricos em proteínas e vitaminas e contêm fibras, elementos minerais e baixo teor de gorduras (BREENE, 1990; FURLANI & GODOY, 2005) e possuem elevado potencial farmacológico (LINDEQUIST et al., 2005). O fungo *Pleurotus ostreatus* (Figura 3.1) é uma rica fonte proteica, e um organismo com habilidade efetiva de bioconverter diversos materiais lignocelulósicos (WANG et al., 2001; SUGUIMOTO et al., 2001). Além disso, o substrato utilizado após a colheita dos cogumelos pode ser empregado como fertilizante e como parte da alimentação animal (YILDIZ et al., 1997).



Figura 3.1: Fungo *Pleurotus ostreatus*. Fonte: mushroomobserver.org

A através do cultivo de fungos lignocelulolíticos é possível utilizar resíduos com a produção de enzimas e gerando resíduos finais enriquecidos em proteínas. Desta forma este capítulo teve como objetivo a produção de cogumelos e a avaliação da atividade do complexo lignocelulolítico, assim como a produção de uma biomassa proteica utilizando como substratos resíduos agroindustriais de baixo custo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Industrial e do laboratório associado IPBEN - Assis da Faculdade de Ciências e Letras – Campus de Assis da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. As etapas desse capítulo estão resumidas na Figura 3.2.

Neste trabalho foi cultivado, em fermentação em estado sólido, o fungo comestível *Pleurotus ostreatus*, primeiramente diferentes temperaturas, umidade e resíduos lignocelulolítico agroindústrias de baixo custo em teste em placas (item 2.2.5). Posteriormente, em condições pré-definidas, foi realizado o cultivo axênico (item 2.2.6), para a produção do complexo enzimático, cogumelos e biomassa proteica residual. O complexo enzimático produzido foi analisado, e a biomassa residual da fermentação foi qualificada em relação à concentração de proteínas e fibras lignocelulósicas; e posteriormente foi utilizada para produção de enzimas fibrolíticas – Capítulo 2.

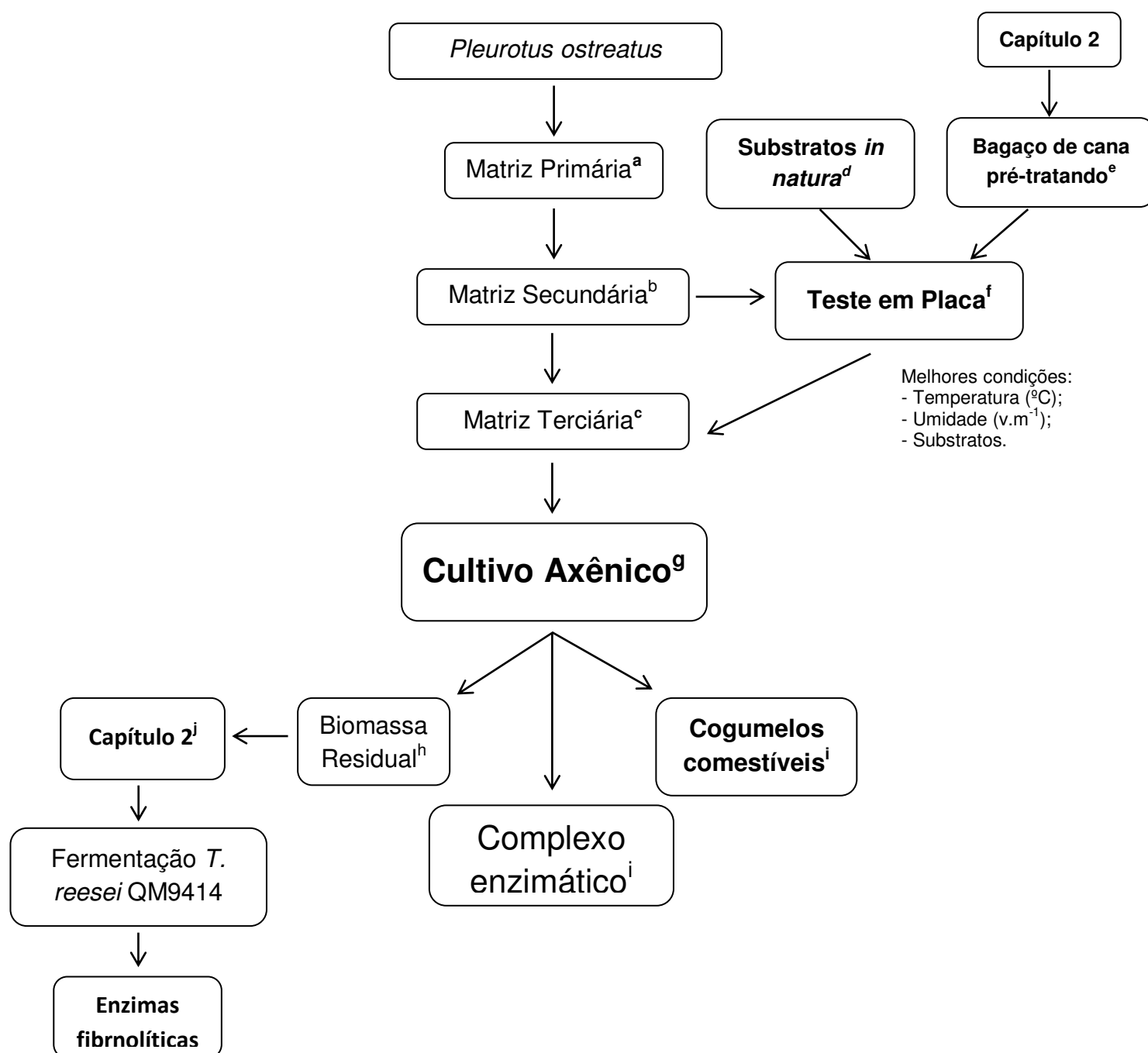
2.1. Materiais

2.1.1. Micro-organismos

O micro-organismo utilizado nesta etapa foi o fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, pertencente ao estoque de culturas do Laboratório de Biotecnologia Industrial da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP.

2.1.2. Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais utilizados foram o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Usina de Açúcar de Alcool São Joaquim – Cândido Mota), polpa cítrica (bagaço de laranja processado - Citrovita – Agroind. Catanduva - SP), torta de algodão (Louis Dreyfus Commodities – Paraguaçu Paulista - SP) e farelo de trigo (Moinho Nacional – Assis - SP).



^aItem 2.2.1); ^bItem 2.2.2; ^cItem 2.2.3; ^dItem 2.2.4; ^eSubstrato pré-tratado – Capítulo 2; ^fItem 2.2.5; ^gItem 2.2.6; ^hItem 8.2.4; ^hBiomassa residual proteica – T1, utilizada na produção das enzimas fibrinolíticas no Capítulo 2; ⁱItem 2.2.7; ^jItem 2.2.9

Figura 3.2: Fluxograma do processo biotecnológico.

2.1.3. Reagentes e Substratos

Os reagentes utilizados foram: tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,6) tampão citrato-fosfato 0,05 mol.L⁻¹ (pH 5,0), tampão succinato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (pH 4,5), papel de filtro Whatman nº1, carboximetilcelulose (Sigma),

siringaldazine (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde-azine) (Sigma), celulose microcristalina (Sigma), lactato de sódio 0,25 mol.L⁻¹, albumina bovina e vermelho fenol (Sigma) para dosagem das atividades hidrolíticas; 5-ácido dinitrosalicílico para a técnica do DNS; Ácido sulfúrico (H₂SO₄); PDA (potato dextrose agar – merck) para o cultivo e preparo da matriz primária e secundária; grãos de trigo, carbonato de cálcio (CaCO₃) para o controle do pH e para a preparação da matriz terciária, além do sulfato de cálcio (CaSO₄); sacarose para o cultivo sólido e demais reagentes laboratoriais.

2.1.4. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: espectrofotômetro UV/Vis (Ultrospec 1100 Pro - Pharmacia); balança analítica (Gehaka mod. AG 200); incubadora com agitação orbital e controle de temperatura marca Tecnal mod. TE 421 (Piracicaba – SP); Autoclave vertical (Marca Phoenix), moinho de facas (Cienlab), estufa de secagem (Marca Quimis), banho maria (Marconi MA-184); Moinho de facas (Cienlab); e sala aclimatizada (3 m x 3 m).

2.2. Métodos

2.2.1. Preservação, cultivo e inóculo primário (matriz primária) do *Pleurotus ostreatus*

Para a manutenção da cultura do fungo filamentoso, o *P. ostreatus* foi cultivado em tubos contendo 5 mL de meio PDA meio sólido inclinado estéril a 28 °C, e após crescimento foram mantidas a 4 °C, sendo estas denominadas inóculo primário ou matriz primária. Para preservação mais duradoura, os fungos foram mantidos em óleo mineral autoclavado e condicionados em geladeira (4 °C).

2.2.2. Inóculo secundário

A partir do inóculo primário do *P. ostreatus* foi preparada o inóculo secundário ou matriz secundária pela propagação em placas de Petri contendo PDA (45 g.L⁻¹ estéril) autoclavado (121 °C) por 20 min (DAS et al., 2007). Assim foram preparadas placas de petri contendo 30 mL de PDA, após a solidificação deste meio de cultivo nestas placas, foi realizada a inoculação do micélio. Para isso foi inoculado um fragmento (1 cm²) de micélio proveniente da

matriz primária, no centro da placa, em câmara de fluxo laminar. As placas foram mantidas em estufa sob temperatura controlada de 25 ± 1 °C na ausência de luz, até o completo preenchimento da placa pelo micélio, aproximadamente 8 dias. Estas placas foram denominadas Matriz Secundária.

2.2.3. Inóculo terciário

Para a produção do inóculo terciário, também conhecido como matriz terciária foi utilizado como substrato grãos de trigo. Para tanto, foi empregado a seguinte composição: grãos de trigo, carbonato de cálcio e sulfato de cálcio. O grão de trigo foi utilizado por se tratar do nutriente indicado para o preparo do inóculo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* e por proporcionar um crescimento micelial rápido (BONONI et al., 1999). 100 g de grãos de trigo na proporção de 1:2 (gramas do grão: mL volume de água em mL) em Becker foram previamente cozidos por 60 minutos em autoclave sem estar vedada. Após o cozimento, os grãos foram escorridos e acrescentados 0,2% (m.v⁻¹) de carbonato de cálcio e 0,8% (m.v⁻¹) de sulfato de cálcio na proporção do peso dos grãos, para ajustar e manter o pH, em torno de 7,0.

Posteriormente, amostras de 75 g do substrato preparado foram colocadas em frascos cilíndricos de 500 mL e abertura de 2-3 cm, vedados com tampa e coberta com papel filtro. Os frascos foram esterilizados em autoclave (121 °C ou 1 atm) por 60 minutos. Após a esterilização, os frascos contendo as amostras foram colocados em câmara de fluxo com luz ultravioleta, até resfriarem, seguidos da inoculação. Para tanto, a matriz secundária foi fracionada em porções circulares (10 mm de diâmetro), sendo que 4 a 5 círculos foram transferidos de forma asséptica para os frascos contendo a substrato autoclavado. Os frascos, agora contendo o substrato e a matriz secundária, foram levados à estufa a 25 ± 1 °C e ausência de luz por 15 dias ou até a completa colonização da matriz terciária, também conhecida como semente (Figura 3.3). E, para uma preservação mais duradoura deste fungo, uma porção da matriz terciária foi transferida para sacos plásticos – previamente esterilizados – e armazenados a 4 °C.



Figura 3.3: Inóculo terciário (matriz terciária) pronto, composta por grão de trigo, carbonato de cálcio e sulfato de cálcio.

2.2.4. Preparo dos Substratos

As amostras do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foram coletadas durante as safras de 2014 e 2015, da usina supracitada. Após a coleta elas foram climatizadas a 25 ± 3 °C e umidade relativa do ar de $65 \pm 2\%$. Em seguida o bagaço foi seco em estufa de secagem, a 60 °C por 48 h.

A polpa cítrica (bagaço de laranja) foi triturada em moinho de faca (40-mesh e tamanho aproximado de 2 x 2 x 2 mm). Sendo em seguida encaminhados para os demais testes e ensaios. Os farelos de trigo e algodão foram utilizados de forma *in natura* sem nenhum tratamento físico.

2.2.5. Teste em placa

Os ensaios em placa de Petri objetivaram estudar a influência da temperatura e umidade na velocidade de crescimento micelial radial e assim determinar as melhores condições físico-químicas para o cultivo, assim como a melhor composição dos resíduos lignocelulósicos para o crescimento fúngico. Desta forma, foram utilizados diferentes tipos de tratamentos (Tabela 3.1), nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C em 40, 50, 60 e 80 % (v.m⁻¹) de umidade.

Tabela 3.1: Diferentes tratamentos com diferentes concentrações dos resíduos agroindustriais (m.m^{-1}).

Trat.	Bagaço de cana (%) ^a	Bagaço de laranja (%) ^b	Farelo de Trigo (%)	Farelo de Algodão (%)	Sacarose (%) ^c	CaCO ₃ (%) ^d
T1	50	0	40	10	0	6
T2	50	0	40	10	5	6
T3	0	50	40	10	0	6
T4	0	50	40	10	5	6,
T5	50	30	20	0	0	6
T6	50	30	20	0	5	6
T7	50	30	0	20	0	6
T8	50	30	0	20	5	6
T9	40	40	10	10	5	6
T10	50 ^e	0	40	10	0	6
T11	50 ^e	0	40	10	5	6

^aBagaço de cana-de-açúcar *in natura* (m.m^{-1}) – tratados de acordo com o item 2.2.4;

^bPolpa cítrica (m.m^{-1}); ^cSuplementação com sacarose (m.m^{-1}); ^dCarbonato de cálcio (m.m^{-1}); ^eBagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 6% (m.v^{-1}) de NaOH/121 °C/45 min – Capítulo 2.

Para estes ensaios foram pesados 3 g de massa total para cada tratamento (Tabela 3.1) e colocados em placas. Estas foram esterilizadas em autoclave (121°C, 1 atm por 60 minutos). Após esta etapa, o resfriamento foi feito em câmara de fluxo laminar e luz ultravioleta – objetivando-se reduzir ao máximo a contaminação. Ao atingir 25 ± 3 °C foi adicionado em cada placa o volume de água estéril (autoclavada em 121°C, 1 atm por 60 minutos) correspondente a cada tratamento. A inoculação com o fungo foi feita com a adição do inóculo (matriz secundária) através da retirada de um disco de 10 mm de diâmetro e colocado no centro de cada placa.

As placas inoculadas foram mantidas em estufa nas diferentes temperaturas testadas, e na ausência de luz. Para a medição do crescimento micelial as placas foram divididas em quatro quadrantes para a sua quantificação, e feita a medição do diâmetro, expresso em centímetros (Figura 3.4). Assim, a cada 5 dias e até à colonização completa das placas o crescimento micelial foi mensurado.

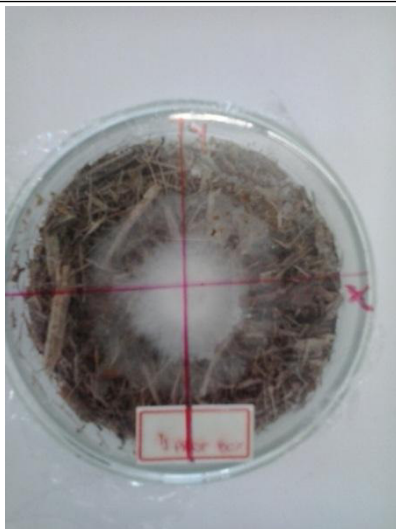


Figura 3.4: Exemplo de uma placa dividida em quadrantes para a quantificação do crescimento micelial de *P.ostreatus* em bagaço de cana.

2.2.6. Cultivo Axênico de *Pleurotus ostreatus* para produção de enzimas fibrolíticas e cogumelos

A FEs ou cultivo em estado sólido do cogumelo foi feito de forma asséptica, em cultivo axênico, de acordo com a técnica descrita EIRA & MINHONI (1997), porém modificada. Assim, o cultivo foi feito em sacos de polipropileno (PP) liso com dimensões de 18 cm de largura por 30 cm de altura. Nos quais foram preenchidos com a melhor combinação de substratos previamente testados (*item 2.2.5*) e adicionados 6% (m.m^{-1}) de CaCO_3 para a manutenção do pH (7,0) do meio reacional; formando blocos de biomassa. Nestes blocos foi adicionada água para alcançar o teor de umidade pré-determinado em etapas anteriores (*item 2.2.5*). Após o preenchimento dos sacos – com a biomassa e o volume de água – um tubo cilíndrico de vidro foi colocado no centro dos blocos para formar um orifício para a posterior introdução do inóculo – matriz terciária (*item 2.2.3*). Os sacos foram vedados com respiradores cilíndricos, aproximadamente 50 mm formados por gazes e algodão (Figura 3.5). Os respiradores foram embrulhados com papel alumínio e kraft, sendo posteriormente esterilizados.

Os sacos devidamente preparados foram esterilizados em autoclaves, 121 °C (1 atm) por 60 minutos. A inoculação foi feita em câmara de fluxo laminar, através do preenchimento do espaço formado pelo tubo cilíndrico de

vidro no centro do saco com a matriz terciária e com o auxílio de uma pinça esterilizada. Como inóculo foi utilizado 10% (m.m⁻¹) de matriz terciária.

Após a inoculação, os sacos foram colocados na Sala de Frutificação (aclimatizada), em temperatura e umidade pré-definidas (item 2.2.5) e controladas.

A indução dos primórdios e formação dos corpos de frutificação (cogumelos) foi realizada após a completa colonização dos blocos pelo micélio – cerca de 30 dias, por meio da redução da temperatura da Sala de Frutificação para 15^o±1 °C durante 5 dias, ou o tempo necessário para a formação dos primórdios.

Os primórdios são corpos de frutificação muito pequenos e de coloração cinza escuro. Os tamanhos dos cogumelos variam entre 5 a 15 cm em média e seus esporos são de coloração branca (EIRA, 1997).

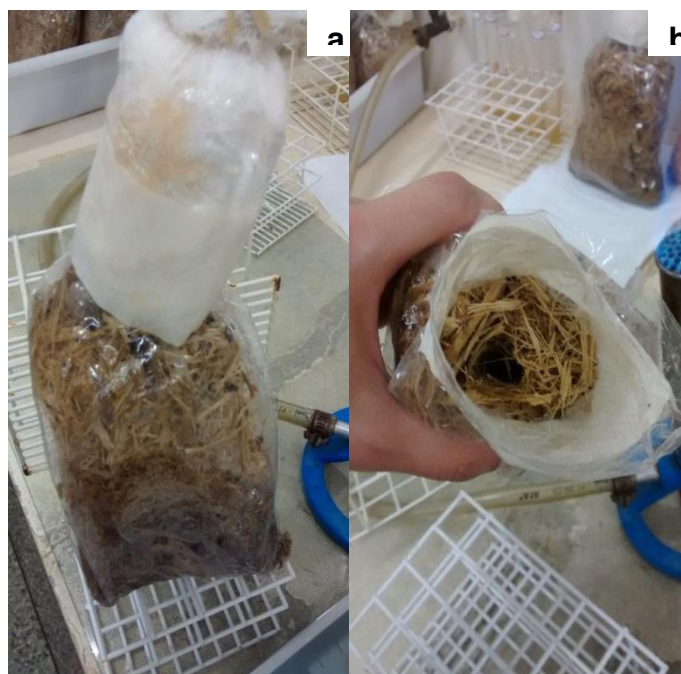


Figura 3.5: Preparo do cultivo axênico: a) Bloco de biomassa para o crescimento do fungo *P. ostreatus* e o respirador feito por algodão e gazes; b) Orifício formado pelo tubo cilíndrico, no qual foi utilizado posteriormente para a inoculação das sementes – inóculo terciário ou matriz terciária (item 2.2.3).

2.2.7. Colheita e Avaliação dos cogumelos

Após o surgimento dos primórdios, os sacos plásticos que protegiam os blocos foram removidos gradativamente para permitir o desenvolvimento dos basidiomas – micélio reprodutivo dos cogumelos, e para evitar possíveis contaminações e perda da umidade. A colheita dos fungos foi realizada um pouco antes da abertura total do píleo, cerca de 5 a 7 dias depois do surgimento do primórdio.

Após a colheita, os cogumelos foram quantificados e pesados. Em seguida, foram colocados em estufa com circulação forçada de ar, 45°C para secagem, até o peso ficar constante e, assim, determinar a biomassa seca.

Para a avaliação da produção foram usados os seguintes parâmetros: massa fresca dos cogumelos (MF), eficiência biológica (EB), massa seca dos cogumelos (MS), rendimento (R), massa seca do substrato (MS).

A eficiência biológica (Equação 1) é determinada segundo TISDALE et al., 2006. Sendo que esse índice é o mais utilizado pelos pesquisadores, o que facilita a comparação dos resultados com a literatura (TISDALE et al., 2006; DAS E MUKHERJEE, 2007). Sua definição original é a correlação do substrato seco em corpos frutíferos frescos. Outro parâmetro de produção adotado foi o rendimento (Equação 2) em peso seco (R), para representar a conversão de substrato seco em corpos frutíferos secos (TISDALE et al., 2006), uma vez que o teor de umidade dos basidiomas varia em função das condições de cultivo. Ou seja, a obtenção do valor real em massa de cogumelos.

Eficiência biológica – EB (%):

Equação 1

$$EB = \frac{PF}{MS} \times 100$$

Onde:

MF = Massa fresca dos cogumelos (g)

MS = Massa seca do substrato (g)

Rendimento – R (%):

Equação 2

$$R = \frac{PS}{MS} \times 100$$

Onde:

MS = massa seca dos cogumelos (g)

MS = massa seca do substrato (g)

2.2.8. Coleta das Amostras

Após a coleta dos cogumelos, aproximadamente 40 dias após a inoculação na sala de Frutificação, foram coletadas amostras de 10 g de cada bloco. Posteriormente, as amostras foram lavadas com 50 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 mol.L⁻¹ (pH 5,0) – proporção de 1:5, agitadas em shaker por 15 minutos (30 RPM), deixadas em repouso por 20 minutos e, finalmente, filtradas. Os substratos filtrados foram desidratados a 45 °C até o peso ficar constante e, assim, determinar a biomassa seca e, posteriormente, encaminhados à análise de proteína bruta (*item 2.2.9.6*). O filtrado líquido foi utilizado como extrato enzimático e avaliado para as atividades celulolíticas, xilanolíticas e lignolíticas.

2.2.9. Procedimentos analíticos

2.2.9.1. Determinação de Celulases Totais (FPase – FPU/g)

As atividades de celulases totais do extrato produzido pelos fungos e da enzima comercial foram medidas através da técnica de FPase (MANDELS et al., 1976). Os procedimentos desta técnica foram apresentados no capítulo 2.

2.2.9.2. Determinação da Atividade da Endoglucanase (CMCase – U/g)

A atividade da endoglucanase foi determinada através da determinação de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboximetilcelulose (CMC), seguindo a técnica de GHOSE (1987) modificada. Os procedimentos desta técnica foram apresentados no capítulo 2.

2.2.9.3. Determinação das Xilanases (U/g)

A atividade xilanase foi feita através da determinação de açúcares redutores liberados durante a degradação da xilana (sigma), seguindo a técnica de GOMES et al. (1992) modificada. Os procedimentos desta técnica foram apresentados no capítulo 2.

2.2.9.4. Determinação do Açúcar Redutor

A liberação de açúcar redutor foi quantificada a partir da amostra obtida e pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

2.2.9.5. Atividade das enzimas ligninolíticas

2.2.9.5.1. Atividade da Lacase (Lac) (U/g)

A atividade da lacase foi determinada, utilizando-se siringaldazine (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine), segundo o protocolo de SZKLARZ (1989). Assim, foram utilizados quatro tubos de ensaio 10 x 100mm, três para amostra não fervida e um para amostra fervida. A cada tubo foi adicionado 0,6 mL da amostra que foi analisada e 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 m.L⁻¹ (pH 5,0). Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1mL de siringadazine (0,1% m.v⁻¹, 0,05 g reagente em 50 mL de etanol). Posteriormente foi feita outra medição no tempo final de 10 minutos. Em que 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas e não fervidas foram medidas e lidas na absorbância de 525 nanômetros. Os resultados foram expressos em μmol de substrato oxidado durante um minuto, por g de substrato (U/g).

2.2.9.5.2. Atividade da Manganês Peroxidase (MnP) (U/g)

A atividade da MnP foi determinada, utilizando o vermelho fenol, segundo protocolo de KUWAHARA et al., (1984). Assim, quatro tubos foram utilizados. Destes, três foram para amostra não fervida e um para amostra fervida. A mistura da reação (1,0 mL) foi constituída por 500 μL da amostra, 100 μL de lactato de sódio (0,25 m.L⁻¹), 200 μL de albumina bovina (0,5%), 50 μL MnSO₄ (0,2 m.L⁻¹M), 50 μL H₂O₂ (0,2 m.L⁻¹) em tampão succinato de sódio

0,2 m.L⁻¹ (pH 4,5). Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado.

O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1mL de vermelho fenol (0,1%). A mistura foi incubada a 30 °C por 10 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH 2,0 m.L⁻¹. Em que 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas ou não foram lidas na absorbância de 610nm. Os resultados foram expressos em µmol de substrato oxidado durante um minuto, por g de substrato em solução enzima (U/g).

2.2.9.5.3. Cálculo das atividades lignolíticas

Para o cálculo das atividades lignolíticas foi utilizada na equação 3 (SZKLARZ, 1989).

Equação 3

$$UI/L = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6$$

Onde,

ΔAbs = absorbância ($Abs_{final} - Abs_{inicial}$);

ϵ = coeficiente de absorção molar;

R = quantidade de solução da amostra;

t = tempo de reação em minutos;

UI/L = Unidade Internacional, µmol . min⁻¹

Coeficiente de absorção molar:

$$\epsilon_{525nm} = 65000 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{610nm} = 44600 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

2.2.9.6. Determinação da proteína bruta nas amostras secas pela técnica Kjeldahl

Na determinação da concentração de proteínas das amostras dos cogumelos, da biomassa para o cultivo axênico e do substrato residual (*item 2.2.8*) foram quantificados pela técnica de Kjeldahl.

O termo Proteína Bruta (PB) envolve um grande grupo de substâncias com estruturas semelhantes, porém com funções fisiológicas muito diferentes. Baseado no fato das proteínas terem porcentagem de nitrogênio quase constante é possível determinar o nitrogênio e por meio de um fator de conversão e transformar o resultado em PB.

Desta forma, PB significa o nitrogênio total contido em um material analisado, multiplicado pelo fator convencional 6,25. Este processo considera todo nitrogênio da amostra na forma proteica, e que a proteína contém 16 % de nitrogênio ($100 \div 16 = 6,25$). Para determinar a PB dos resíduos secos foi utilizado o método do digestor de Kjeldahl Macro (HORWITZ, 2000).

2.3. Tratamento Estatístico

Os testes de atividades enzimáticas foram conduzidos em triplicata e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o programa estatístico GraphPad InStat – versão 3.05 (Rutgers University). Os gráficos foram feitos no programa OriginPro – versão 9.1 64Bit. Os experimentos foram analisados e considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

3. Resultado e Discussão

3.1. Teste em placa

Os ensaios de teste em placa ou FEs teve como objetivo determinar a melhor combinação de substratos e condições físico-químicas de temperatura e umidade, para formar a base do cultivo axênico (*item 3.2*). Desta forma, a compilação dos dados referente ao crescimento micelial (cm) em placas estão plotados na Tabela 3.2.

Os resultados apresentados demonstram que a umidade teve grande influência no crescimento micelial, como por exemplo, quando comparado o tratamento T1 a 20 °C, 5 dias e 40% (v.m⁻¹) de umidade, o crescimento foi de apenas 1,9±0,09 cm. Enquanto para o mesmo tratamento, porém com a umidade de 80% (v.m⁻¹), o crescimento atingiu o máximo da placa (4,5 cm) (Figura 3.6). Essa elevação foi gradativa e acompanhou a elevação da umidade, em 5 dias, 20 °C e 50% de umidade apresentou 2,4±0,37 cm; a 60% foi de 3,1±0,43 cm; e a 80% foi de 4,5 cm de crescimento micelial (Figura 3.7).

O mesmo padrão aconteceu com os demais tratamentos, como no caso do T10, em 10 dias de cultivo, 20 °C e 40% (v.m⁻¹) de umidade o crescimento foi de apenas 1,3±0,25 cm, e ao aumentar a umidade o crescimento micelial foi de 1,8±0,25 cm (50% de umidade); 2,0±0,10 cm (60% de umidade) e 3,8±0,10 cm de crescimento micelial (80%). A baixa umidade não favoreceu o crescimento do micélio do fungo, mesmo ao longo do tempo, pois após 15 dias de cultivo, o T1 com 40% (v.m⁻¹) de umidade e 20 °C obteve o máximo crescimento de 2,4±0,21 cm. Esse resultado demonstra a importância da água para o crescimento do fungo (Figura 3.8).

Outro ponto importante que se deve chamar a atenção é em relação à temperatura. Utilizando o mesmo exemplo, o tratamento T1, em 20 °C, 5 dias e em umidades de 40 e 80% (v.m⁻¹) o crescimento foi de 1,2±0,09 e 4,5±0,00 cm, respectivamente. Entretanto ao elevar a temperatura, nota-se que o crescimento micelial caiu (Tabela 3.2 e Figura 3.9). Outro exemplo, o tratamento T11 em 5 dias e 40% de umidade a 20 °C o crescimento foi de 1,3±0,09 cm, enquanto para as mesmas condições mas em 30 °C o crescimento foi de apenas 0,7±0,05 cm.

Tabela 3.2: Crescimento micelial (cm) do *P. ostreatus* após 5, 10 e 15 dias de cultivo, em 50, 60 e 80% de umidade, e 20 25 e 30 °C.

5 dias												
Trat. ^a	40 % de umidade ^b			50 % de umidade ^b			60 % de umidade ^b			80 % de umidade ^b		
	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
T1	1,9±0,09	1,2±0,11	0,8±0,77	2,4±0,37	1,7±0,14	1,9±0,48	3,1±0,43	2,3±0,45	2,1±0,31	4,5±0,00	3,8±0,29	3,0±0,35
T2	1,3±0,11	1,0±0,23	1,1±0,45	1,4±0,24	1,4±0,37	0,0±0,00	1,8±0,12	2,0±0,77	1,7±0,02	3,5±0,90	3,0±0,95	1,8±0,39
T3	0,7±0,20	0,7±0,05	0,5±0,07	1,3±0,23	0,6±0,01	0,4±0,41	1,1±0,06	1,1±0,46	0,5±0,50	1,4±0,50	1,3±0,23	1,0±0,9
T4	0,9±0,18	0,7±0,11	0,4±0,08	0,8±0,13	1,0±0,44	0,5±0,26	1,0±0,05	1,1±0,59	0,7±0,15	1,1±0,90	1,0±0,10	0,4±0,40
T5	1,3±0,49	1,0±0,22	1,1±0,30	1,0±0,10	1,7±0,32	1,8±0,39	1,3±0,16	1,7±0,30	1,8±0,48	1,7±0,25	1,1±0,25	0,0±0,00
T6	1,0±0,13	1,0±0,33	0,9±0,14	1,2±0,13	1,2±0,18	0,2±0,20	1,3±0,12	1,2±0,23	1,4±0,55	1,4±0,90	1,1±0,08	0,0±0,00
T7	1,1±0,18	0,9±0,07	1,1±0,25	1,2±0,24	1,3±0,28	0,4±0,40	1,6±0,27	2,4±0,08	1,6±0,38	1,5±0,90	1,0±0,20	1,2±0,40
T8	0,8±0,05	1,2±0,21	0,9±0,46	1,1±0,08	0,9±0,23	0,9±0,40	1,4±0,32	1,9±0,17	1,0±0,29	1,3±0,20	0,9±0,49	0,9±0,20
T9	0,9±0,22	1,2±0,31	0,3±0,54	0,9±0,08	1,0±0,20	0,9±0,42	1,0±0,17	1,3±0,09	1,4±0,17	1,3±0,50	1,6±0,38	0,7±0,10
T10	1,0±0,05	1,2±0,10	0,7±0,10	1,4±0,25	1,5±0,90	1,8±0,68	2,1±0,09	2,0±0,35	1,9±0,02	2,0±0,15	1,8±0,18	0,8±0,05
T11	0,9±0,05	1,0±0,30	0,7±0,90	1,3±0,25	1,5±0,80	1,9±0,65	2,0±0,10	1,8±0,40	1,9±0,54	1,8±0,10	1,9±0,54	0,9±0,15
10 dias												
Trat.	40 % de umidade			50 % de umidade			60 % de umidade			80 % de umidade		
	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
T1	2,2±0,77	1,4±0,59	1,0±0,96	3,3±0,48	1,9±0,05	2,1±0,50	4,3±0,42	3,5±0,54	2,44±0,10	4,5±0,00	4,5±0,00	4,0±0,51
T2	2,1±0,76	1,1±0,40	1,2±0,57	1,4±0,21	1,5±0,53	0,0±0,00	3,5±0,33	2,7±1,24	2,2±0,44	4,5±0,00	4,0±0,65	1,8±0,39
T3	0,5±0,56	0,0±0,00	0,0±0,00	2,2±1,00	0,0±0,00	0,0±0,00	1,5±0,34	0,0±0,00	0,4±0,69	1,5±0,65	0,0±0,00	0,0±0,00
T4	0,9±0,21	0,0±0,00	0,0±0,00	0,7±0,19	0,0±0,00	0,0±0,00	1,3±0,29	0,0±0,00	0,0±0,00	1,3±0,82	0,0±0,00	0,0±0,00
T5	2,0±1,27	0,0±0,00	0,0±0,00	1,1±0,11	0,0±0,00	0,0±0,00	3,0±0,60	2,2±0,82	0,0±0,00	1,6±0,35	0,8±0,25	0,0±0,00
T6	1,0±0,20	0,4±0,77	0,8±0,26	1,5±0,33	1,1±0,13	0,0±0,00	1,9±0,18	0,0±0,00	0,0±0,00	1,3±0,90	1,1±0,08	0,0±0,00
T7	1,1±0,08	0,0±0,00	0,0±0,00	1,6±0,22	1,2±0,30	0,0±0,00	2,1±0,23	3,2±0,51	2,2±0,42	1,4±0,67	1,0±0,20	0,5±0,25
T8	0,9±0,34	0,0±0,00	0,0±0,00	1,2±0,16	0,0±0,00	0,0±0,00	2,0±0,61	1,9±0,36	0,9±0,25	1,8±0,80	0,8±0,39	0,7±0,20
T9	1,2±0,51	0,0±0,00	0,0±0,00	1,2±0,24	0,0±0,00	0,0±0,00	1,9±0,78	1,5±0,18	1,8±0,89	1,7±0,50	0,0±0,00	0,0±0,00
T10	1,8±0,12	1,3±0,11	0,8±0,10	1,4±0,25	1,7±0,50	1,7±0,88	2,1±0,09	2,1±0,55	2,0±0,40	3,9±0,25	2,0±0,12	0,9±0,07
T11	1,3±0,25	1,4±0,28	0,7±0,05	1,8±0,25	1,4±0,45	1,3±0,35	2,0±0,10	1,9±0,54	2,1±0,42	3,8±0,10	2,1±0,11	1,4±0,32
15 dias												
Trat.	40 % de umidade			50 % de umidade			60 % de umidade			80 % de umidade		
	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C	20 °C	25 °C	30 °C
T1	2,4±0,21	1,3±0,35	0,0±0,00	3,6±0,61	1,7±0,23	2,2±0,66	4,5±0,00	3,6±0,57	2,7±0,07	4,5±0,00	4,5±0,00	4,2±0,31
T2	1,9±0,97	1,6±0,48	0,0±0,00	1,2±0,24	1,1±0,30	0,0±0,00	3,9±0,57	2,1±1,90	2,3±0,33	4,5±0,00	4,5±0,00	4,5±0,00
T3	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	2,6±1,62	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T4	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T5	2,1±1,23	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T6	0,9±0,24	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T7	1,2±0,17	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T8	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T9	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00

T10	1,2±0,32	0,8±0,21	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
T11	1,1±0,15	0,7±0,29	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00

^aOs diferentes tratamentos esta na Tabela 3.1; ^bUmidade em v.m⁻¹

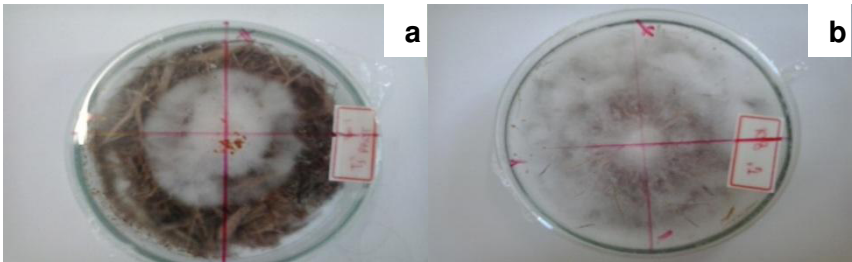


Figura 3.6: Crescimento micelial do fungo *P. ostreatus* para o tratamento T1: a) 20 °C, 5 dias e umidade de 40% (v.m⁻¹); b) 20 °C, 5 dias e umidade de 80% (v.m⁻¹).

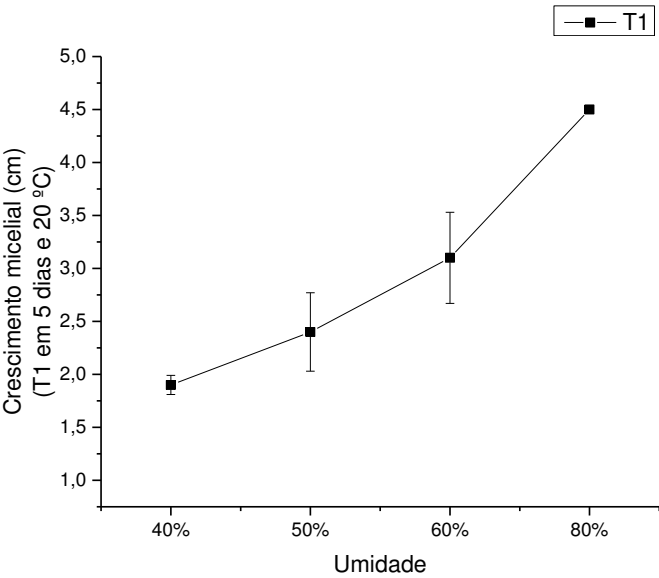


Figura 3.7: Crescimento micelial do fungo *P. ostreatus* para o tratamento T1, 5 dias de cultivo e 20 °C nas diferentes umidades.

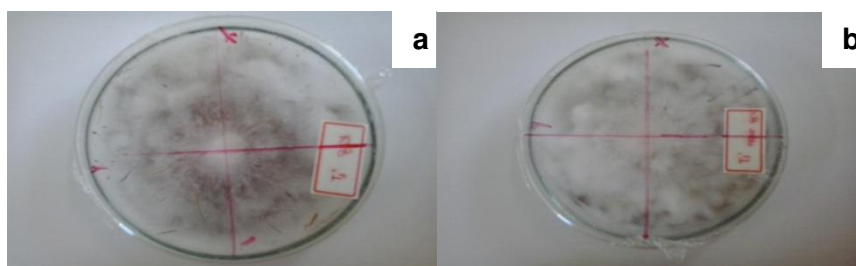


Figura 3.8: Densidade micelial do *P. ostreatus* entre os 15 dias de cultivo para o tratamento T1 e 80%: a) 5 dias; b) 15 dias.

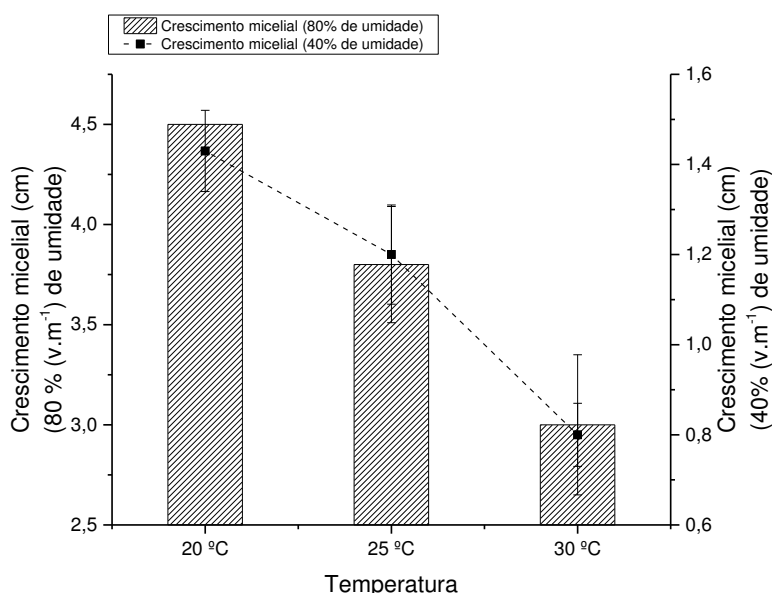


Figura 3.9: Crescimento micelial (cm) em relação à temperatura, para os teores de umidade de 40 e 80% (v.m^{-1}) de umidade e em 5 dias.

A suplementação de sacarose na formulação dos meios de cultivo não demonstrou ganho em eficiência, sendo que, em alguns casos, o crescimento foi reprimido. O tratamento T2, que foi a composto pelas mesmas concentrações do tratamento T1, porém suplementado com sacarose (Tabela 3.1), apresentou um crescimento prejudicado. Enquanto, por exemplo, o tratamento T1 já apresentou 100% de crescimento e tomada da placa ($4,5 \pm 0,00$ cm – 80% de umidade 5 dias de crescimento), o tratamento T2 obteve $3,5 \pm 0,90$ cm de crescimento micelial, uma perda de eficiência de aproximadamente 23%. Somente após o 10º dia de cultivo (Tabela 3.2), esse tratamento obteve o máximo de crescimento.

Os tratamentos T10 e T11 foram constituídos pelas mesmas concentrações que os tratamentos T1 e T2, entretanto o bagaço de cana ofertado foi substrato pré-tratado com tratamento alcalino (Capítulo 2). Nesse caso, o pré-tratamento foi conduzido com 6% (m.v⁻¹) de NaOH, em 121 °C e 45 minutos, foi o que se obteve os melhores resultados para a sacarificação e liberação de AR (Capítulo 2). Entretanto, para o crescimento do *P. ostreatus* em cultivo em estado sólido, quando comparado ao substrato *in natura* não foi favorável (Figura 3.10). O máximo de crescimento foi de 3,9±0,85 cm após 10 dias de cultivo, 80% (v.m⁻¹) de umidade e 20 °C; e após 15 dias de cultivo o fungo foi eliminado da placa (Tabela 3.12 e Figura 3.10).

O substrato bagaço de laranja (polpa cítrica) mostrou-se prejudicial para o crescimento do *P. ostreatus*, visto que, os tratamentos que foram conduzidos com concentrações desse substrato apresentaram baixos rendimentos (Tabela 3.2). Já para os tratamentos T3 e T4, que possuíam somente o bagaço de laranja como fonte de biomassa lignocelulósica, o crescimento micelial foi reprimido. Em adição, após 15 dias de cultivo, todos os substratos que tiveram a adição do bagaço de laranja tiveram seu crescimento reprimido e o fungo foi eliminado das placas.

A escolha de utilização da fermentação em estado sólido foi pelo fato que os mecanismos envolvidos no controle e na regulação do crescimento micelial, para o fungo em questão, são melhores estudados em meio sólido – FEs, do que em cultivos submersos, pois estes fungos (basidiomycetos) são mais adaptados ao crescimento em substratos sólidos (REESLEV & KJOLLER, 1996). Dentre os dados coletados, ficou evidente que a umidade demonstrou ser um fator crucial no crescimento desse fungo, visto que em umidades baixas o crescimento ficou muito prejudicado (Tabela 3.2).

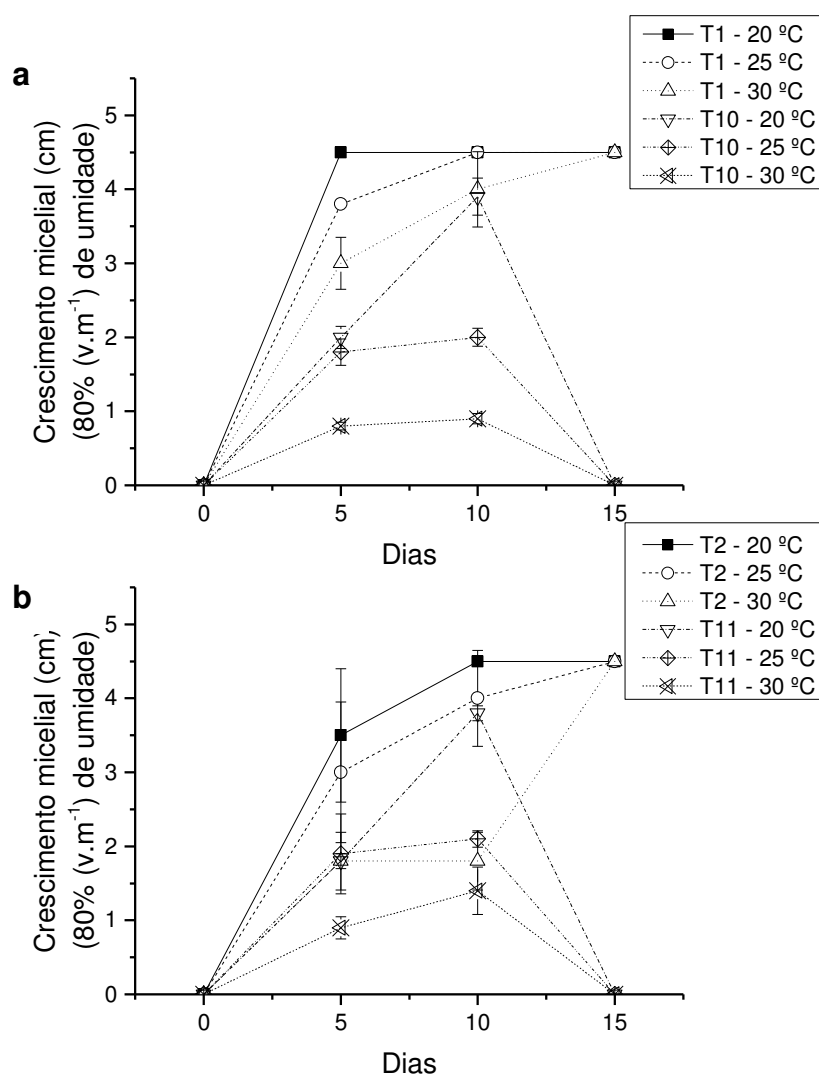


Figura 3.10: Bagaço de cana *in natura* e pré-tratado (Capítulo 2) no crescimento micelial em teste em placas do *P. ostreatus*: a) Tratamentos sem suplementação de sacarose – T1 e T10; b) Tratamentos com suplementação de sacarose – T2 e T11; dados para os 15 dias de cultivo e 80% (v.m⁻¹) de umidade.

Na literatura é descrito que a umidade é uma variável crítica que limita o crescimento microbiano, a produção de metabólitos e a eficácia deste (PASCUAL et al, 1999;. VALIK & PIECKOVA, 2001). SHEN et al. (2008) realizaram um estudo com *L. edodes* cultivado em FEs e diferentes teores de umidade, sobre o rendimento de cogumelos. Segundo os autores, os maiores crescimentos e rendimentos foram com os maiores valores de umidade. Em

adição os ensaios que foram feitos em temperaturas acima de 20 °C, mesmo mantendo uma alta umidade, muitos tratamentos reprimiram o cultivo do fungo (Tabela 3.2). Esses resultados são plausíveis aos encontrados na literatura, tendo em vista que temperaturas mais altas afetam de forma negativa o crescimento e o rendimento do crescimento micelial (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990; SILVA, 2005).

A presença de uma fonte mais fácil de ser degradada não foi favorável ao crescimento desse fungo em testes de placa, pois quando não adicionado, em determinados tratamentos, o fungo atingiu o máximo crescimento logo após 5 dias de cultivo. Esse fato demonstra que a presença de uma fonte de carbono simples de metabolizar não tem influência no rendimento e crescimento deste fungo. No caso do tratamento T2, houve uma diferença de quase 50% quando comparado ao tratamento sem suplementação com sacarose (T1). Nos trabalhos de SILVA et al. (2005), os autores constataram que o tipo e a concentração dos suplementos nutricionais influenciaram o crescimento dos fungos basidiomicetos. No caso, para melhorar as formulações dos substratos de crescimento destes fungos, o mais importante são substratos que elevam a concentração de nitrogênio, como o farelo de arroz, de trigo e soja podendo aumentar o crescimento micelial (TROCHA et al, 2016). Pois, de acordo com estes autores, esses substratos possuem concentrações favoráveis de nitrogênio e quando adicionados ao meio de cultivo juntamente com substratos lignocelulósicos, promovem o crescimento micelial.

Não somente a presença ou ausência da sacarose teve influência sobre o crescimento micelial, mas a presença da lignina foi fundamental para o *P. ostreatus* manter o micélio viável. Pois ao avaliar o crescimento entre o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* ou pré-tratado (Capítulo 2), o rendimento do micélio foi extremamente baixo, e após 10 dias de cultivo, todos os substratos a base de bagaço pré-tratado levaram a inibição do crescimento micelial e a morte do fungo. Tal resultado contrasta com substrato *in natura*, provavelmente devido as diferentes concentrações de fibras lignocelulósicas, onde no pré-tratamento ocorreu uma extração de aproximadamente 85,8% de lignina e de 78,4% de hemicelulose com base no peso final após o pré-tratamento (Capítulo

2). Assim, evidencia-se que o *P. ostreatus* necessita da presença dessas fibras para o seu crescimento. Esse fungo, assim como os demais basidiomicetos, utiliza a hidrólise lignolítica, através de diferentes enzimas extracelulares (KIRK, 1986; COHEN et al., 2002), para a obtenção de açúcares metabolizáveis e, por consequência, crescem nas biomassas lignocelulósicas (ERIKSSON, 1990; KIRK, 1986; HATAKKA, 1994; LEE & MOON, 2003; FERRAZ, 2004; JORGENSEN, 2005). Ou seja, a ausência da lignina provavelmente inibiu a produção, não somente das ligninases e oxidades (DAOU et al., 2016), mas também das celulasas que tem como substrato a celulose. Os fungos do gênero *Pleurotus* produzem diferentes enzimas hidrolíticas da lignina, como a MnP, peroxidases, lacases (COHEN et al., 2002).

Com base nos dados obtidos ficou evidente que a melhor combinação de substratos de resíduos lignocelulósicos utilizados nesse trabalho foi o T1 e/ou T2. Entretanto, a suplementação de sacarose nos tratamento T2 não demonstrou ganho significativo em eficiência (Tabela 3.2). Assim, foi selecionado como melhor substrato para o crescimento do *P. ostreatus* e sua aplicação no cultivo axênico, para esse trabalho, o tratamento T1. Da mesma forma, através dos ensaios e teste em placa, foi selecionada a temperatura e a umidade que obtiveram melhores resultados para o crescimento micelial, no caso para a temperatura foi de 20 °C e umidade de 80% (v.m⁻¹).

3.2. Cultivo Axênico e coleta dos cogumelos

Esta etapa do trabalho visou avaliar a produção de uma biomassa residual rica em proteína, na qual também foi utilizada como substrato para a produção de enzimas fibrolíticas pelo *T. reesei* QM 9414 (Capítulo 2), assim como a produção de enzimas lignolíticas e cogumelos comestíveis.

O cultivo axênico em FEs foi conduzido com base nas informações obtidas na etapa anterior. Para este cultivo foi preparado blocos de 100 g de substrato tendo como base a composição do tratamento T1, ou seja, 50% (m.m⁻¹) de bagaço de cana *in natura*, 40% (m.m⁻¹) de farelo de trigo, 10% (m.m⁻¹) de farelo de algodão, e para a manutenção do pH neutro do meio de cultivo foi adicionado 6% de CaCO₃ em relação ao peso final.

Entretanto, na literatura é afirmado que muitas espécies de basidiomicetos possuem a capacidade auto-reguladora de pH, ou seja, eles possuem a tendência de ajustar o pH para seu crescimento (VIEIRA et. al., 2008). E as condições físico-químicas de temperatura e umidade também foram mantidas de acordo com os dados observados anteriormente, assim a sala climatizada foi mantida durante todo o cultivo axênico a 20 °C e a umidade do ar de 80% – além disso, durante o preparo dos blocos de cultivos, antes de ser autoclavado, foi adicionado 80 % (v.m⁻¹) de água (Figura 3.5a).

O processo de produção e crescimento do fungo foi acompanhado ao longo de aproximadamente 40 dias. Sendo que após 30 dias de cultivo em sala aclimatizada, os blocos apresentaram completa colonização (Figura 3.11).

Nos trabalhos de FAN et al. (2003) foi cultivado o fungo *Pleurotus ostreatus* em vagem de café, sendo que para esse substrato ocorreu uma total colonização dos blocos de cultivo, segundo os autores, em 25 dias. Nos trabalhos de VEJA et al. (2006) foi analisado a produção de *Pleurotus djamor* e *Pleurotus ostreatoroseus*, assim observou que estas espécies necessitaram de 13 a 20 dias de incubação para emissão de primórdios e de 42 a 51 dias para cultivo total quando cultivado em polpa de café. As espécies do gênero *Pleurotus*, quando adaptadas ao substrato, parecem requer 15 a 30 dias para desenvolvimento micelial e necessitam de um período de 5 a 10 dias para preparação do micélio para emissão dos primórdios (REIS et al., 2010).

A colonização micelial durante o cultivo axênico é dividida em duas fases: o crescimento do micélio sobre o substrato ofertado e a estabilidade ou maturação do micélio. O crescimento do micélio refere-se ao processo imediatamente após a inoculação, até que o substrato seja completamente colonizado pelo fungo (MINHONI et al., 2007). Essa fase foi observada até o 15º e 20º de cultivo (figuras 4.12 e 4.13).

Na Figura 3.12 é possível observar que apesar de um bom crescimento micelial, o mesmo ainda não colonizou totalmente o substrato ofertado. Sendo assim, pode-se afirmar que nesse momento o cultivo axênico se apresentava na fase de crescimento micelial. Na Figura 3.13 o micélio do fungo cobriu totalmente o substrato, entretanto não foi constatado o endurecimento do micélio,

ou seja, o mesmo ainda não estava maturado e pronto para induzir a frutificação. Durante esse tempo, o micélio absorve os nutrientes, que foram utilizados na sua estrutura e na conversão da energia necessária para o seu metabolismo e crescimento. Nesta fase, o micélio utiliza o oxigênio e libera gás carbônico e água (EIRA & MINHONI, 1997).

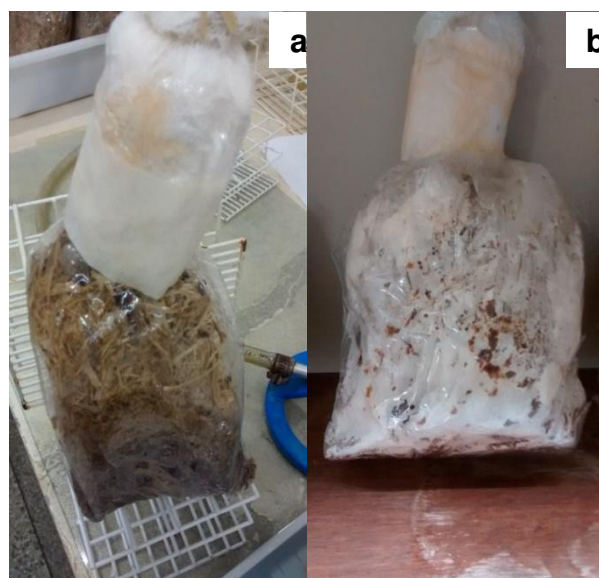


Figura 3.11: Cultivo axênico do T1 em 80% (v.m⁻¹) de umidade inicial e 20 °C: a) Bloco de biomassa após a inoculação com 10% (m.m⁻¹) com a matriz terciária – dia 1; b) Bloco de biomassa após a total colonização - 30 dias de cultivo, fim do cultivo axênico e início do processo de frutificação.



Figura 3.12: Blocos com crescimento micelial após 15 dias de cultivo axênico.



Figura 3.13: Blocos com crescimento micelial após 20 dias de cultivo axênico.

A fase de estabilidade ou maturação do micélio começa após a total tomada do micélio e vai até o endurecimento da capa micelial (MINHONI et al., 2007). Essa fase foi observada após os 30 dias de cultivo (Figura 3.14).



Figura 3.14: Blocos com crescimento micelial após 30 dias de cultivo axênico.

Na Figura 3.14, os blocos já apresentam a maturação do micélio, visto a sua modificação física pelo endurecimento micelial e formação dos primórdios de frutificação. Esta capa protetora é resultado de mudanças metabólicas do micélio, uma resposta natural à maturação ou exposição à luz por algumas semanas (MINHONI et al., 2007). Na fase de estabilidade do micélio, observa-se a formação de “botões” de micélio que são considerados corpos de frutificação em potencial, além de própria capa micelial (MINHONI et al., 2007).

Assim, após a fase de crescimento e da maturação do micélio deu-se início o processo de indução da frutificação. Para tanto, os blocos contendo o tratamento T1 com total colonização do *P. ostreatus* (Figura 3.11b) foram deixados em sala com temperatura de $15^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias, o objetivo dessa etapa foi provocar um choque térmico para induzir a frutificação e formação dos cogumelos (EIRA & MINHONI, 1997). E, segundo os mesmos autores, a indução de primórdios e a formação de basidiomas são as fases em que o controle do ambiente é um fator crítico e decisivo para a obtenção de adequadas colheitas. Com o início da frutificação os sacos plásticos foram abertos em regiões estratégicas – pontos de crescimento dos cogumelos, para permitir a melhor entrada de ar e, conseqüentemente, estimular a pigmentação dos basidiocarpos (EIRA & MINHONI, 1997). Os corpos de frutificação alcançaram a maturidade em aproximadamente 5 dias (Figuras 3.15 e 3.16)



Figura 3.15: Processo de frutificação e formação dos cogumelos: a, b, c) Primeiro dia de frutificação; d, e, f) Segundo dia de frutificação; g, h, i) Terceiro dia de frutificação.



Figura 3.16: Processo de frutificação e formação dos cogumelos: a, b, c) Quarto dia de frutificação; d, e, f, g) Quinto dia de frutificação e momento de coleta dos cogumelos.



Figura 3.17: Cogumelos de *P. ostreatus* produzidos e coletados.

O crescimento do micélio é resultado de uma fusão de hifas, gerando uma associação entre hifa e substrato que proporciona um forte suporte físico necessário à formação dos corpos de frutificação – cogumelos. Quando este estado é atingido, o micélio é considerado como estabilizado (DAS & MUKHERJEE, 2007; MARINO et al., 2009) – etapa foi alcançada, nesse trabalho, após 30 dias de cultivo (Figura 3.14) e a mudança para o estágio reprodutivo está normalmente condicionada à variação de fatores físicos como decréscimo de temperatura e aumento de umidade (EIRA & MINHONI, 1997).

Após todas essas etapas – inoculação, cultivo axênico, frutificação e colheita, as amostras da biomassa ofertada e residual, assim como os cogumelos produzidos, foram conduzidas para os processos de obtenção das enzimas, cálculos de eficiência, rendimento e quantificação das proteínas brutas.

Na Tabela 3.3 estão os resultados de eficiência biológica e rendimento para o cultivo axênico realizado nesse trabalho. Onde a *EB* e o *R* foram calculados e plotados, sendo que o *EB* é a correlação entre os cogumelos fresco e a biomassa residual seca e o *R* é a correlação dos pesos secos dos cogumelos e da biomassa residual (TISDALE et al., 2006).

Após o período de frutificação e formação dos cogumelos (Figuras 3.15 e 3.16) foi realizado a colheita dos cogumelos. A colheita foi realizada quando o basidioma apresentou características físicas desejadas para a comercialização

e/ou consumo. Os basidiomas foram colhidos manualmente, eles foram segurados pela base do estipe e, posteriormente, foi provocado um movimento de rotação e pressão em direção ao bloco de substrato (EIRA & MINHONI, 1997) (Figura 3.17). Apesar do tempo de colheita para cada bloco poder durar de 3 a 6 meses com várias retiradas de cogumelos ao longo do tempo, tudo dependendo das condições ambientais durante a frutificação, formulação do substrato, espécie cultivada e forma de indução dos primórdios (MINHONI et al., 2007), nesse trabalho foi feita apenas uma colheita. Pois as biomassas residuais foram utilizadas no bioprocesso integrado de produção de enzimas a partir do fungo *T. reesei* QM 9414 no Capítulo 1.

Tabela 3.3: Cultivo de *P. ostreatus* – eficiência biológica e rendimento

Tratamento ^a		Peso dos cogumelos (g) ^b	Peso inicial de biomassa (g) ^c	Peso final de biomassa (g) ^d	Eficiência Biológica (%) ^e	Rendimento (%) ^f
T1	Úmido	83,99±7,15	259,29±15,16	247,19±9,05	106,18	9,26
	Seco	7,33±0,62	100,01±10,21	79,10±2,89		

^aT1 – 50% (m.m⁻¹) de bagaço de cana in natura, 40% (m.m⁻¹) de farelo de trigo, 10% (m.m⁻¹) de farelo de algodão, e 6% de CaCO₃ em relação ao massa final; ^bCogumelos pesados no momento da coleta e após sua secagem em estufa (item 2.2.7); ^cA biomassa dos blocos de cultivo foram pesados antes da inoculação; ^dApós a colheita dos cogumelos as biomassas residuais foram pesadas; ^eEficiência Biológica (EB)=(peso fresco dos cogumelos (MF)/ massa seca do substrato (MS)) x 100; ^fRendimento (R)=(peso seco dos cogumelos (MS)/ massa seca do substrato (MS)) x 100.

Com os resultados observa-se que a eficiência biológica foi de 106,18% e de rendimento foi de 9,26%, sendo resultados elevados quando comparados com a literatura. SOCCOL & FAN (2003) trabalhando com diferentes tipos de basidiomicetos, como espécies de *Pleurotus*, obtiveram 858 g de cogumelos frescos por kg de casca de café seco tratado, EB de 85%, 887 g de cogumelos frescos por kg de borra seca de café, EB de 88%, e 784 g de cogumelos frescos por kg de 50% de casca e 50% de borra, EB de 78%, com fluxos que iniciaram entre 56 a 65 dias.

Testando palha de trigo suplementada com farelo de arroz, UPADHYAY & VIJAY (1991) conseguiram apenas a EB de 65%. VOGEL & SALMONES

(2000) adicionaram farinha de soja e sulfato de cálcio à palha de trigo e também obtiveram valores mais baixos - 64,48% de *EB*. YILDIZ et al. (2002) testaram a serragem de *Fagus orientalis* pura e misturada à palha de arroz, grama, resíduo de papel e folha de avelã. Os autores alcançaram 8,6%; 64,3%; 43,7%; 40,6% e 102% de *EB*, para os respectivos substratos. Sendo que a mistura de folha de avelã à serragem proporcionou o melhor resultado – 102%, valores próximos aos obtidos no presente trabalho.

MARINO et al. (2006) testaram o melhoramento genético do fungo *P. ostreatus* visando linhagens resistentes a temperaturas elevadas, entretanto quando cultivados em serragem de *Eucalyptus sp* reportaram o máximo de *EB* 35,8 e 43,1%, em temperatura de 28 e 15°C, respectivamente. OBODAI et al. (2003), estudando o cultivo de *P. ostreatus* em vários resíduos agrícolas e agroindustriais, reportaram como melhores resultados de *EB* (61,04%) quando utilizaram a serragem, e *EB* foi de 50,64% para o substrato palha de arroz. FAN et al. (2006) obtiveram *EB* de 96,5% no cultivo de *P. ostreatus*. CURVETTO (2003) utilizou resíduos da indústria de processamento de óleo de semente de girassol e obteve uma eficiência biológica (*EB*) acumulada de 108%, com um crescimento micelial de 2,93mm/dia, levando 25-30 dias para colonizar o substrato. BEUX (1995) obteve eficiência biológica de 72,91% com um substrato contendo 80% de bagaço de mandioca e 20% de bagaço de cana.

As amostras também foram quantificadas em relação à proteína bruta presente, no caso o substrato T1 antes de ser inoculado, ou seja, contendo apenas os resíduos lignocelulósicos apresentou apenas 1,13% de proteína bruta. Enquanto o mesmo substrato após os 40 dias de cultivo e frutificação o valor de proteína subiu para 4,16% de proteína bruta. Portanto foi obtida uma expressiva elevação onde o teor proteico quase quadruplicou no substrato após o cultivo e colheita (Tabela 3.4).

O rendimento (%) de produção de cogumelos foi do 9,29% (Tabela 3.3), esse cálculo foi feito a partir da massa seca obtida – 7,33 g, e os cogumelos apresentaram 24,7% de proteína bruta ou 3,95% de nitrogênio total (*item 2.2.9.6*) (Tabela 3.4). Assim, os resultados estão próximos aos descritos na

literatura. JUSTO et al. (1999) descreveram que *P. ostreatus* cultivados em diferentes substratos apresentaram valores de 3,94-4,56% de nitrogênio total encontrado nos cogumelos. Nos trabalhos de BONATTI et al. (2003) quando trabalhando com *P. ostreatus* cultivados em palha de bananeira reportaram um total de 3,70-3,85% de nitrogênio total.

Tabela 3.4: Balanço geral da conversão de biomassa em AR por hidrólise enzimática.

Amostras ^a	Massa (g) ^b	% de proteína ^c	Massa de proteína (g) ^d	% de perda de biomassa no final do cultivo ^e	% de ganho de proteína ^f
T1 – pré-cultivo	100,01	1,13	1,13	-	-
T1 – pós-cultivo	79,10	4,16	3,29	20,9	191,1
Cogumelo	7,33	24,7	1,81	-	100,0

^aAmostras antes e após o cultivo e colheita; ^bPeso seco; ^cValores obtidos com fator de conversão foi de 6,25; T1 – pré-cultivo = 0,18% de nitrogênio total, T1 – pós-cultivo = 0,52% de nitrogênio total e Cogumelo = 3,95% de nitrogênio total (item 2.2.9.6); ^dmassa de proteína = (massa x % de proteína)/100; ^eDiferença entre a massa antes e após cultivo e colheita; ^fGanho de proteína=[(massa de proteína pós-cultivo - massa de proteína pré-cultivo)/proteína pré-cultivo] x 100.

Esse elevado teor de proteínas no substrato residual T1 provavelmente ajudou e influenciou a maior produção de enzimas fibrolíticas pelo fungo *T. reesei* QM 9414 no Capítulo 2, entretanto, não somente as proteínas, mas sim a elevada complexidade desse meio residual, proporcionada pelo crescimento e pré-tratamento do fungo basidiomiceto. E, em adição, essa ação preliminar do *P. ostreatus* sobre o bagaço de cana-de-açúcar, provavelmente permitiu posteriormente, um maior acesso do *T. reesei* as fibras lignocelulósicas.

3.3. Produção enzimática

Entre os fungos de decomposição branca descritos na literatura com elevado potencial de produção enzimática a espécie *Pleurotus ostreatus* se destaca. Essa espécie apresenta capacidade de crescimento em vários materiais celulósicos e lignocelulósicos, sendo a secreção de suas enzimas hidrolíticas é amplamente influenciada pelo tipo de substrato utilizado

(HIGHLEY, 1973; MATA et al., 2007; ELISASHVILI et. al. 2009). Na literatura é reportado que o uso de resíduos lignocelulósicos como substrato de cultivo de basidiomicetos é capaz de estimular significativamente a secreção de enzimas, sem a necessidade de suplementação do meio com indutores (ELISASHVILI et. al. 2009).

Neste contexto, o cultivo de *P. ostreatus* foi estudado em um primeiro momento com testes em placas (*item 3.1*) variando as constituições de diferentes meios de cultivo e fonte de carbono, e assim, avaliar o melhor meio nutriente para o seu crescimento. E, tendo como consequência a produção de enzimas celulolíticas e lignolíticas durante o cultivo axênico (Tabela 3.3).

A amostragem para a determinação do complexo enzimático (*item 2.2.8*) foi feita somente ao final do processo de cultivo e frutificação. Essa escolha foi feita, pois visou aperfeiçoar o estudo, visto que como reportado por diversos trabalhos, um aumento na produção das enzimas hidrolíticas por esse fungo ocorre, principalmente, durante o período de frutificação devido a maior necessidade de energia requerida para formação de estruturas de reprodução (MATA et al., 2007; KURT & BUYUKALACA, 2010). Dessa forma, é possível afirmar que o máximo de produção e liberação de enzimas foi nas etapas finais do cultivo axênico e início do estágio de frutificação.

Os valores de atividades celulolíticas foram relativamente baixos quando comparados aos valores obtidos em etapas anteriores desse trabalho (Capítulo 2), tendo como atividade de Celulases Totais o valor de $0,13 \pm 0,02$ FPU/g e para Endoglucanase $1,62 \pm 0,15$ CMC/g. Para a atividade do complexo xilanolítico o valor também foi baixo quando comparado à produção dessas enzimas em experimentos anteriores, sendo que o valor foi de $78,07 \pm 0,21$ U/g. A produção de Lacases foi de $67,13 \pm 1,01$ U/g, e de $6,63 \pm 0,10$ U/g para MnP. Esse perfil de enzimas lignolíticas foi semelhante ao encontrado na literatura. ALEXANDRINO et al. (2007) trabalhando com o fungo *P. ostreatus* e resíduos de laranja obteve como máxima atividade de 75 U/g de lacase e 6,8 U/g de manganês peroxidase. Estes resultados foram também encontrados por VIKINESWARY et al. (2005), em todos os resíduos agroindustriais testados para a produção de lacase, utilizando o espécies do gênero *Pleurotus*.

Tabela 3.5: Dados de atividades enzimáticas obtidas após a colheita dos cogumelos.

Tratamento ^a	Celulases Totais (FPU/g)	Endoglucanase (U/g)	Xilanase (U/g)	Lacase (U/g) ^d	Manganês Peroxidase (U/g)
<i>T1</i>	0,13±0,02	1,62±0,15	78,07±0,21	67,13±1,01	6,63±0,10

4. Conclusão

Os testes em placas determinaram que o melhor tratamento para o cultivo do *P. ostreatus* foi o tratamento T1, em que o bagaço de cana-de-açúcar não foi submetido a nenhum pré-tratamento (*in natura*). A temperatura afeta muito o crescimento de *P. ostreatus*, devendo-se evitar temperaturas maiores que 20 °C. A presença de uma boa umidade (80% v.m-1) é fundamental para o crescimento micelial. O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH e o bagaço de laranja (polpa cítrica) não demonstraram ser efetivos para o crescimento micelial, quando comparados ao substrato *in natura*.

O cultivo axênico teve um período de 30 dias, seguido por 5 dias de indução da frutificação e 5 dias de frutificação e obtenção dos cogumelos e apresentou uma alta eficiência biológica e rendimento. A biomassa residual teve um expressivo ganho de proteína bruta e o cogumelo apresentou 24,7% de proteína bruta ou 3,95% de nitrogênio total. Já produção enzimática ficou dentro dos valores reportados na literatura.

Conclusão geral

O processo biointegrado realizado nesse trabalho obteve resultados interessantes e aplicáveis, visto que o principal objetivo foi alcançado, que foi a produção do complexo fibrolítico com alta atividade hidrolítica. Para tanto, esses valores elevados de atividade só foram conseguidos por uma ação integrada entre as diferentes etapas desse trabalho. Como no caso do substrato *T1*, este último sendo um dos produtos finais do capítulo 3, serviu como substrato para o cultivo do fungo *T. reesei* QM9414 e produção das enzimas celulolíticas e xilanolíticas. Essas enzimas produzidas e concentradas no capítulo 1 serviram como catalizadores na hidrólise da biomassa deslignificada, que por sua vez foi estudada e produzida no capítulo 2 desse trabalho. Assim ao longo de diversas etapas, que agiram de forma simultânea e sinérgica, foi possível utilizar diferentes biomassas lignocelulósicas para produzir diferentes produtos. Dentre eles, enzimas fibrolíticas com altas atividades, cogumelos comestíveis, biomassa proteica e açúcares redutores, que por sua vez, em futuros estudos poderão ser utilizados na produção do bioetanol de segunda geração ou outros produtos de alto valor agregado. Além de uma boa extração de hemicelulose e lignina que poderão ser utilizadas em futuros estudos de processos biotecnológicos e biorrefinaria.

Referências Bibliográficas

AGBHEVOR, F.A.; WEBER, J. **Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production.** *Process Biochemistry*, v.40, p.669-679, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Dados Estatísticos**, Disponível em www.anp.gov.br. Acessado em março de 2012.

AGUIAR, C.L. & MENEZES, T.J.B. **Produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar.** *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v.18, n.1, p.57-70, 2000.

AHAMED, A.; VERMETTE, P.. **Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor.** *Bioch. Eng. J.* 42, p.41-46, 2008.

AKCAPINAR, G.B.; VENTURINI, A.; MARTELLI, P.L. CASADIO, R.; SEZERMAN, U.O. **Modulating the thermostability of Endoglucanase I from *Trichoderma reesei* using computational approaches.** *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 28:5, p.127-135, 2015.

ALVIRA, P.; NEGRO, M.J.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. **Steam Explosion for Wheat Straw Pretreatment for Sugars Production.** *Bioethanol*, v. 2, p.66-75, 2016.

ARAÚJO, A.E. et al. **Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar.** *Embrapa Algodão Sistemas de Produção*, 1 Jan/2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar>, acessado em: 01/03/2016.

ATALLA, R.H.; HACKNEY, J.M.; UHLIN, I.; THOMPSON, N.S. **Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose.** *Int. J. Biol. Macromol.*, v.15, p.109-112, 1993.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL de 2015 (BEN), Disponível em www.ben.epe.gov.br. Acessado em julho de 2016.

BALAT, M.; BALAT, H., O'ZB, C. **Progress in bioethanol processing.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v.34, p.551-573, 2008.

BÉGUIN, P. **Molecular biology of cellulose degradation.** *Annual Review of Microbiology*, v.44, p.219-248, 1990.

BENOLIEL, B.; TORRES, F.A.G; MORAES, L.M.P. **A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse *in natura*.** *Springer Plus*. 2:656, 2013.

BERLIN, A. et al. **Weak lignin-binding enzymes: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121, p.163-170, 2005.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. **Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants.** *Proc. Okla. Acad. Sci.*, v.72, p.51-56, 1992.

BISCHOF, R.H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. **Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*.** *Microbial Cell Factories*, v.15:106, 2016.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. **Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira.** *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v.4:1, p.31-35, 2003.

BONONI, V. L. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis.** São Paulo, SP: Ícone, 1999.

BONONI, V.L.R.; CAPELARI, M; MAZIERO R.; TRUFEM, S.F.B. **Cultivo de cogumelos comestíveis.** São Paulo: *Cultivo de *Lentinus edodes* (shiitake)*. (Coleção Brasil Agrícola), p.95-104, 1995.

BREENE, W.M. **Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms.** *Journal of Food Protection*, v.53, p.883-894, 1990.

BUCKERIDGE, M. S.; DOS SANTOS, W.; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no brasil.** CORTEZ, L.A.B. Em *Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade*, cap. 7, parte 3, 2010.

BUSWELL, J. A., CAI, Y.J., CHANG, S.T., PEBERDY, J.F., FU, S.Y., YU, H. S. **Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, n.12, p.537-542, 1998.

CALL, H. P.; MUCKE, I. **History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process).** *J. Biotechnol*, v.53, p.163-202, 1997.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. **Effect of Different Pretreatment of Sugar Cane Bagasse on Cellulase and Xylanases Production by the Mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 Grown in Submerged Culture.** *BioMed Research Intern*. p.9, 2014.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. **A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid.** *J. Ind. Microb. Biotec.* 38:9, p.1467-1475, 2011.

CANO, A.; MOSCHOU, E.A.; DAUNERT, S.; COELHO, J.; PALET, C. **Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 29, p. 261-268, 2006.

CARDOSO, J.F.; MIGUEL, P.A.C.; FILHO, N.C. **INOVAÇÃO NA AGRICULTURA BRASILEIRA: UMA ANÁLISE DA LITERATURA.** *Geintec – Gestão, Inovação e Tecnologia*, v.5:4, 2015.

CARVALHO, A.F.A.; OLIVA-NETO, P.; SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. **Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis.** *Food Reser. Intern.* v.51, p.75-85, 2013.

CARVALHO, M.L.A.; CARVALHO, D.F.; GOMES, E.B.; MAEDA, R.N.; ANNA, L.M.M.S.; CASTRO, A.M.; PEREIRA JR, N. **Optimisation of Cellulase Production by *Penicillium funiculosum* in a Stirred Tank Bioreactor Using Multivariate Response Surface Analysis.** *Enz. Reseach.* p.8, 2014.

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

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **Valores do PIB do agronegócio brasileiro, fevereiro de 2016.** Disponível em <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/> . Acessado em julho de 2016.

CHANG, C.J.; LEE, C.C.; CHAN, Y.T.; et al. **Exploring the Mechanism Responsible for Cellulase Thermostability by Structure-Guided Recombination.** *Plosone*, v.11:3, 2016.

CHANG, S.T. & HAYES W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms.** New York: *Academic Press*, 1980.

CHANG, S.T.; LARQUE SAAVEDRA, A.; MARTINEZ CARRERA, D.; MORALES, M.; SOBAL, M. **The cultivation of edible mushrooms as a boost for rural development: a case study from Cuetzalan ara, México: AT Source**, v.20, n.1, p.22-25, 1992.

CHOKHAWALA, H.A.; ROCHE, C.M.; KIM, T.W.; et al. **Mutagenesis of *Trichoderma reesei* endoglucanase I: impact of expression host on**

activity and stability at elevated temperatures. *BMC Biotechnology*, v. 15:11, 2015.

CHUM, H.L.; WARNER, E.; SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C. **A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn.** *Bioprod. Bioref.*, v.8, p.205-223, 2013.

CLAEYSSSENS, M. & TOMME, P. **Structure function relationships of cellulolytic proteins from *Trichoderma reesei***, In: KUBICEK, C.P. et al. **Ed *Trichoderma reesei* Cellulases.** *Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, Technical Communications and Springer Gmb H.*, p.1-11, 1989.

COELHO, M.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.F.; FURTADO, A.A.L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde.** *CEPP*, v.19, n.1, p.33-42, 2001.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. **Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlim, v.58, p.582–594, 2002.

CURVETTO, N.R. **Cultivo de *Pleurotus*, *Lentinula edodes* y *Ganoderma lucidum* sobre substrato conteniendo cáscara de semilla de girasol.** In: *INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN FOOD, HEALTH, TECHNOLOGY AND THE ENVIRONMENT IN BRAZIL*, 1.,2003, Brasília. Proceedings.Brasília: EMBRAPA – Recursos Genéticos, 2003. p.81-87, 2003.

DALSENTER, F.D.H. **Contribuição ao Estudo da proposta ZERI para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico.** Dissertação de Mestrado, FURB, Blumenau, SC, 2000.

DAS, N.; MUKHERJEE, N. **Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plant.** *Bioresour. Technol.*, v.98, p.2723-2726, 2007.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W. **Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison.** *Critical Review in Biotechnology*, v.30, n.4, p.302-309, 2010.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. **Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives.** *Int. J. Biol. Sci.* v.5:6, p.578-595, 2009.

DASILVA E. & SASSON A. **Biotechnologies: an agenda for development.** *Biotechn. Develop. Review*, v.4, p.37-47, 1995.

DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S.; SILVA, M.R.; AZZONI, S.F.; PRADELLA, J.G.C. **Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production.** *Bioresource Technology*, v.107, p.517-521, 2012b.

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

DETROY, R.W. LINDENFELSER, L.A.; SOMMER, S.; ORTON, W.L. **Bioconversion of wheat straw to ethanol: Chemical modification, enzymatic hydrolysis, and fermentation.** *Biotechnology and Bioengineering,* v.23, p.1527-1535, 1981.

DAOU, M.; PIUMI, F.; CULLEN, D.; RECORD, E.; FAULDS, C.B. **Heterologous Production and Characterization of Two Glyoxal Oxidases from *Pycnoporus cinnabarinus*.** *Appl. Environ. Microbiol,* v.82:14, 2016.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. DO. **Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos *Pleurotus ostreatus*.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra.* v.6, n.2, 2006.

DURÁN, N. & ESPOSITO, E. **Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos.** 2008. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia ambiental,* Jaguariúna: CNPM/EMBRAPA, p. 304-319, 2008.

EIRA, A. F. **Cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais: situação atual e perspectivas para o Brasil.** In: *Internacional symposium on mushrooms in food, health, technology and the environment in brazil*, 1., 2003, Brasília. **Proceedings,** Brasília: EMBRAPA – recursos genéticos, p.42-70. 2003.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis.** 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 115pp., 1997

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S.N. **Lignocellulose degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia.** *World J. Microbiol. Biotechnol.,* v.25, p.331–339, 2009.

ELISASHVILI, V.L. **Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher *Basidiomycetes*.** *Applied Biochemistry and Microbiology,* New York, v.29, p.257-266, 1993.

ERIKSSON, K.E. **Biotechnology in the pulp and paper industry.** *Wood Science and Technology,* New York, v.24, p.79-101, 1990.

ESPERANÇA, M.N.; CUNHA, F.M.; CERRI, M.O.; ZANGIROLAMI, T.C.; FARINAS, C.S.; BADINO, A.C. **Gas hold-up and oxygen mass transfer in three pneumatic bioreactors operating with sugarcane bagasse suspensions.** *Bioproc. Biosyst. Eng.* v.37:5, p.805-812, 2014.

FAN, L. et al. **Cultivation of Pleurotus Mushroom on brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid.** *Micologia Aplicada Internacional*, Puebla, v.15:1, p.15-21, 2003.

FAN, L.; SOCCOL, A.T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L.P.S. **Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of Pleurotus on coffee husks.** *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.420-424, 2006.

FAPESP (Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo). **Propriedades do bagaço da cana-de-açúcar.** *Revista Pesquisa FAPESP*, ed.30, abril 1998.

FENGEL, D. & WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastruture, reactions.** *Berlin: Walter de Gruyter*, 613p., 1989.

FERRAZ, A.L. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos.** In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnológica.** Caxias do Sul: Educ., 510p., 2004.

FERREIRA, S.; DUARTE, A.; QUEIROZ, J.; DOMINGUES, F. **Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production.** *Electronic Journal of Biotechnology*, 2009.

FILHO, L.A.B.O. **Cooperação Internacional na Produção de Etanol: Limites e Oportunidades.** 2009. *Dissertação* (Mestrado em Agroenergia) - Escola de Economia de São Paulo, FVG,Campinas, 103pp., 2009.

FILHO, W.B.N.; FRANCO, C.R. **Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil.** *Revista Virtual de Química*, v.7:6, p.1968-1987, 2015.

FREITAS, C.A.; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A.F.A.; LIMA, V.M.G.; OLIVA-NETO, P. **Production and application of amylases of *Rhizopusoryzae* and *Rhizopusmicrosporus* var. oligosporus from industrial waste in acquisition of glucose.** *Chem. Pap.* v.68:4, p.442-450, 2014.

FURLANI, R.P.Z. & GODOY, H.T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.64, n.2, p.149-154, 2005.

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; ESQUEDA, M.; GUTIÉRREZ, A.; SÁNCHEZ, M.B.G.; MATA, G. **Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potencial of viticulture residues.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.71, p.432-439, 2006.

GAMA, F.M.; MOTA, M.; BASTOS, M.; DOURADO, F. **Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate.** *Journal of Biotechnology*, v.99, p.121-131, 2002.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. **Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production.** *J. Food Eng.*, n.52, p.211-218, 2002.

GHOSE, T.K. **Measurement of cellulose activities.** *Pure Appl Chem*, v.59, p.257-268, 1987.

GIORDANO, R.L.C. **Perspectivas e desafios para a engenharia química no século XXI em busca do equilíbrio, ou uma política 3R para o planeta Terra.** *Revista Brasileira de Engenharia Química*, v.21, n.3, p.26-30, 2004.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. **Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.36, p.701-707, 1992.

GONG, C.S. & TSAO, G.T. **Cellulase and biosynthesis regulation.** *Annual Reports on Fermentation Processes*, New York, v.3, p.111-139, 1975.

GRGIC, I.; PERDIH, A. **Stimulation of ligninolytic enzyme production in *Phanerochaete chrysosporium* by polyxyalkanes.** *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.94, p.360-368, 2003.

GRUPO URAKAMI. **Conheça os cogumelos.** Disponível em www.cogumelosurakami.com. Acesso em março de 2012.

GUPTA, V.K.; KUBICEK, C.P.; BERRIN, J.G.; WILSON, D.W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, D.X.F.; EZEJI, T. **Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass.** *Trends in Biochemical Sciences*, v.41:7, p.633-645, 2016.

GUPTA, A.; VERMA, J.P. **Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p.550-567, 2015.

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

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

HAQ, I.U.; JAVED M.M.; KHAN T.S. **An innovative approach for hyper production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10.** *Afr. J. Biotechnol.* v.5:8, p.609-614, 2006.

HÄKKINEN, M.; SIVASIDDARTHAN, D.; ARO, N.; SALOHEIMO, M.; PAKULA, T.M. **The effects of extracellular pH and of the transcriptional regulator PACI on the transcriptome of *Trichoderma reesei***. *Microbial Cell Factories*, v.14:63, 2015.

HATAKKA A. **Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation**. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.13, p 125-135, 1994.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. E.M. *Pulp and Paper Chemistry and Technology*; Ek, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G., eds.; De Gruyter: Stoclm, v.1, p.103-121, 2009.

HIGHLEY T.L. **Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi**. *Spring*, v.5, p.50-58, 1973.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production**. *Science*, v. 315, 804-807, 2007.

HINDERS, R. **Common byproduct feedstuffs nutrient profiles confirmed in California study**. *Feedstuffs*. V.72:25, p.10, 2000.

HON, D.N.S. **Chemical modification of lignocellulosic materials**. Inc. CRC Press, 384p., 1995.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: AOAC - Association of Official Analytical Chemists - Inc., 17ed., v.1 e v.2, 2000.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA – IPEA. **Desempenho e crescimento do agronegócio no Brasil**. Brasília, 43pp., 2004.

ISMAIL, A.S. **Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains**. *Process Biochem.*, v.1, p.645–650, 1996.

ÍTALO, L.C.V., SANTOS, G.T., JOBIM, C.C.; VOLOTINI, T.V.; FARIA, K.P.; FERREIRA, B.C.C. **Composição e digestibilidade aparente da silagem de bagaço de laranja**. *Revi. Bras. Zootec.*, v.29, p.1485-1490, 2000.

JACQUEMIN, L.; MOGNI, A.; ZEITOUN, R.; GUINOT, C.; SABLAYROLLES, C.; SAULNIER, L.; PONTALIERA, P.Y. **Performance evaluation of a semi-industrial production process of arabinoxylans from wheat bran**. *Process Biochemistry*, v. 50:4, p.605-613, 2015.

JORGENSEN, H.; MORKEBERG, A.; KROGH, K.; OLSSON, L. **Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium***

species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, New York v.36, p.42-48, 2005.

JORGENSEN, H.; MORKEBERG, A.; KROGH, K.; OLSSON, L. **Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis.** *Enzyme and Microbial Technology*, New York v.36, p.42-48, 2005.

JOURDIER, E.; COHEN, C.; POUGHON, L.; LARROCHE, C.; MONOT, F.; CHAABANE, F.B. **Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions.** *Biotechnol. Bioeng.*, v.6., 2013.

JUHA'SZ, T.; SZENGYEL, Z.; RE'CZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** *Process Biochemistry*, Londres, v.40, p.3519–3525, 2005.

JUSTO, M.B.; et al. **Calidad proteínica de três cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*).** *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.49:1, p.81-85, 1999.

KAMRA, D. N. & ZADRAZIL, F. **Influence of gaseous phase light and substrate pretreatment on fruit-body formation, lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus spp.*** *Agricultural Wastes*, v.18, p.1-17, 1986.

KÄRCHER, M.A.; IQBAL, Y.; LEWANDOWSKI, I.; SENNA, T. **Efficiency of single stage- and two stage pretreatment in biomass with different lignin content.** *Bioresource Technology*, v. 211, p.787-791, 2016.

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

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M.T. **Effect of structural features on enzymedigestibility of corn stover.** *Bioresources and Technology*, v 97, p.583–591, 2006.

KIN, S.W. **Production of cellulase and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v.91, p.153-156, 2004.

KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M. **Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain.** *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.8, p.27-32, 1986.

KIRK, T.K.; CULLEN, D. **Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi**. In: KIRK, T.K. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons, p.273-30, 1998.

KIYOHARA, M.; HAMA, Y.; YAMAGUCHI, K.; ITO, M. **Structure of 1,3-xylooligosaccharides generated from *Caulerpa racemosa* var. *laete-virens* 1,3-xylan by the action of 1,3-xylanase**. *Journal of Biochemistry*, v.140, p.369-373, 2006.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. **Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66:1, 10-26, 2004.

KLYOSOV, A.A. **Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation**. *Biochemistry*, Washington, v.29, p.10577–10585, 1990.

KOMPALA, D.R.; RAMKRISHNA, D.; JANSEN, N.B.; TSAO, G.T. **Investigation of bacterial growth on mixed substrates: Experimental evaluation of cybernetic models**. *Biotechnology and Bioengineering*, v.28:7, p.1044-1055, 1986.

KOSARIC, N. & VARDAR-SUKAN, F. **Potential Source of Energy and Chemical Products**. *The Biotechnology of Ethanol*. M. Roehr. Weinheim, WILEY-VCH. 2001.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. **Critical Reviews in Biotechnonology**. *Cleveland*, v.13, p.126-139, 1993.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. **Molecular and biotechnology aspects of xylanases**. *FEMS Microbiology Reviews*, v.23, p.411-456, 1999.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F.A.; BUFFON, J.G.; FURLONG, E.B. **Endoglucanase and Total Cellulase from Newly Isolated *Rhizopusoryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, Characterization, and Thermal Stability**. *Appl. Bioch. Biotechnol.*, v.172:1, p.458-468, 2014.

KURT, S. & BUYUKALACA, S. **Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes**. *Bioresource Technology*, v.101, p.3164–3169, 2010.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. **Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. *FEBS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.169, p.247-250, 1984.

LANGH, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. **Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot**

fungi with soil microorganisms. *Microbial Ecology*, New York, v.34, p.1-10, 1997.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL, M.J.; LYND, L.R. **A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol.** *Bioresource Tech.*, v.81, n.1, p.33-44, 2002.

LEE, J.W.; KIMB, J.Y.; JANGA, H.M.; LEEC, M.W.; PARKD, J.M. **Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization.** *Bioresource Technology*, v. 182, p.296-301, 2015.

LEE, K. & MOON, S.H. **Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase.** *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.102, p.261-268, 2003.

LEIGHTON, T.J.; DOI, R.H.; WARREN, R.A.J.; KELLN, R.A. **The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*.** *J. Mol. Biol.*, v.76, p.103-122, 1973.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W.D. **The pharmacological potencial of mushrooms.** *eCAM*. v. 2, p.285-299, 2005.

LOBELLO, E.A. **Seleção de fungos celulolíticos isolados da Mata Atlântica e de bagaço de cana**, [Monografia]. Laboratório de biotecnologia industrial, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, 2009.

LULL, C.; WICHES H.J.; SVELKOU, H.F.J. **Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal ethabolites.** *Mediators of inflammation*, v.2, p.63-80, 2005.

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

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.E.; ROCHE, C. **Measurement of scarifying cellulose.** *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v.6, p.1471, 1976.

MANFREDI, A.P.; PISA, J.H.; VALDEON, D.H.; PEROTTI, N.I.; MARTINEZ, M.A. **Synergistic Effect of Simple Sugars and Carboxymethyl Cellulose on the Production of a Cellulolytic Cocktail from *Bacillus* sp. AR03 and Enzyme Activity Characterization.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p.1-17, 2016.

MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. **Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis.** *Biotechnology Progress*, v.15:5, p.804-816, 1999.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. **Nutrients in edible mushrooms: an interspecies comparative study.** *Food Chemistry*, v.65, p.477-482, 1999.

MARINO, R.H. & ABREU, L.D. **Cultivo de cogumelo Shiitake em resíduo de coco suplementado com farelo de trigo e/ou arroz.** *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.4, n.1, p. 11-16, 2009.

MARINO, R.H.; EIRA, A.F.; CARDOSO, E.Q. **Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm por cruzamento multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor.** *Hoehnea*, v.33, p.349-357, 2006.

MASSUCCI, F.A.; GUIMERA, R.; AMARAL, L.A.N.; SALES-PARDO, M. **Scaling and optimal synergy: Two principles determining microbial growth in complex media.** *PHYSICAL REVIEW E*, v.91:6, 2015.

MATA, G. & PÉREZ-MERLO, R. **Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant.** *Cryobiology*, v.47, p.14-20, 2003.

MATA, G.; CORTÉS, E.G.; SALMONES, D. **Mycelial growth of three *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. species on sugarcane bagasse: production of hydrolytic and oxidative enzymes.** *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v.9, p.385–394, 2007.

MATTILA, P.; SUONPAA, K.; PIIRONEN, V. **Functional properties of edible mushrooms.** *Nutrition*, v.16, p. 694-696, 2000.

MENEGHETTI, C.C. & DOMINGUES, J.L. **Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos.** *Revista Eletrônica Nutritime*, v.5, n2, p.512-536, Março/Abril 2008.

MENEZES, T.J.B. **Os fungos na indústria.** *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.31, n.2, p.116-120, 1997.

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

MINHONI, M.T.A.; ANDRADE, M.C.N.; ZIED, D.C.; KOPYTOWSKI FILHO, J. **Cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler-(Shiitake).** 3.ed. FEPAF – Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, Botucatu, SP. 91pp, 2007.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Agroenergia. Acompanhamento da produção Sucroalcooleira. Dados Estatísticos de 2016,** Disponível em www.agricultura.gov.br, Acessado em julho de 2016.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). **Resenha Energética Brasileira**. pp. 32, Edição de 2015. Disponível em <http://www.mme.gov.br/>. Acessado em julho de 2016.

MONTINI, R.M.C.; PASSOS, J.R.S.; EIRA, A.F. **Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium**. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.37, p 90-95. 2006.

MOSIER, N.S., HENDRICKSON, R., WELCH, G., DRESCHER, R.; DIEN, B. **Corn fiber pretreatment scale up and evaluation in an industrial corn to ethanol facility**. *Paper 6A-04, 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Breckenridge, 2003b.

MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; DRESCHER R. **Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production**. *Paper 103, BIOT Division, 225th American Chemical Society Meeting*, New Orleans, 2003a.

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

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. **Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n.28, p.34-39, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. Tradução de W.R. Loodi e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 4ª Edição, 1202p, 2006.

NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSSENS, M. **Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergism interaction**. *The Biochemical Journal*, Londres, v.298, p.705-710, 1994.

NOVIKOVA, L.N.; MEDVEDEVA, S.A.; VOLCHATOVA, I.V.; BOGATYREVA, S.A. **Changes in Macromolecular characteristics and biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting**. *Applied Biochemistry and Microbiology*, New York, v.38, p. 181-185, 2002.

O'SULLIVAN, A.C. **Cellulose: the structure slowly unravels**. *Cellulose*, v.4, p.171-207, 1997.

OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K.A. **Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus*: Mushroom on different lignocellulosic by-products**. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, v.30, p.146-149, 2003

ODAC – **The Oil Depletion Analysis Centre**. Disponível em www.odac-info.org . Acesso em março de 2012.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T.M.I; E., HANSEN, K.P.; PALMQVIST, E.A. **Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30**. *Enz. Micr. Techn.*, v.33:5, p.612-619, 2003.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. I: inhibition and detoxification**. *Bioresource Technoly*, v.74, p.17–24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. **Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition**. *Bioresource Technoly*, v.74, p.25–33, 2000b.

PALONEN, H. et al. **Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin**. *Journal of Biotechnology*, v. 107, p. 65-72, 2004.

PASCHOLATI, S.F. **Cogumelos – Cultivo e Comercialização** (Shiitake e Cogumelo do sol). Cuiabá: SEBRAE/MT, (Coleção Agroindústria nº 17), 85p., 1998.

PASCUAL, S.; MELGAREJO, P.; MAGAN, N. **Production of the fungal biocontrol agent *Epicoecum nigrum* by sold substrate fermentation: effect of water activity on accumulation of compatible solutes**. *Mycopathologia*, v.9, p.146:83, 1999.

PATRABANSH, S. & MADAN, M. **Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer on different bio-wastes**. *Acta Biotechnology*, v.17, p.107-122, 1997.

PATURAU, J.M. **By-products of the cane sugar industry: an introduction to their industrial utilization**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1989.

PEREIRA Jr., J.A.S.; CORREIA, M.J.; OLIVEIRA, N.T. **Cellulase activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. Strain grown in media containing carboximetilcellulose or microcrystalline cellulose**. *Brazilian archives of biology and technology*, v.46, n.3, p.333-337, 2003.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In: *Series on Biotechnology*, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p, 2008.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Review**. *Appl. Microb. Biotechnol.*, v.67, p.577-591, 2005.

PRZYBYLOWICZ, P. & DONOGHUE, J. **Shiitake Growers Handbook – The art and science of mushroom cultivation**. Dubuque, Iowa: Kendall / Hunt, Publishing Company, 217pp., 1990.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v.2, 214pp., 2002.

QUEIROZ, J.A.; TOMAZ, C.T.; CABRAL, J.M.S. **Hydrophobic interaction chromatography of proteins**. *Journal of Biotechnology*, v.87, p.143-159, 2001.

RADZICKA, A. & WOLFENDEN, R. **A proficient enzyme**. *Science*, v.6, p.90-931, 1995.

REESLEV, M. & KJOLLER A. **Comparison of Biomass Dry Weights and Radial Growth Rates of Fungal Colonies on Media Solidified with Different Gelling Compounds**. *Applied and environmental Microbiology*, v.61:12, p.4236–4239, 1995.

REIS, M.F.; DUCCA, F.; FERDINANDI, D.M.; ZONETTI, P.C.; ROSADO, F.R. **Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida***. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.3:2, p.79-91, 2010.

ROCHA, V.A.L.; MAEDA, R.N.; SANTA, A.; LIDIA, M.M.; PEREIRA, N. **Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium**. *Electron. J. Biotechnol.*, v.16:5, 2013.

ROSSI, I.H.; MONTEIRO, A.C.; MACHADO, J.O. **Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.6, p.887-891, 2001.

RUEGGER, M.J.S. & TAUKE-TORNISIELO, S.M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins**. *Revista Brasil. Bot.*, Rio Claro, v.27, n.2, p.205-211, 2004.

SADLER, M. **Nutritional properties of edible fungi**. *British Nutritional Foundation Nutrition Bulletin*, v.28, p.305-308, 2003.

SAINI, J.K.; PATEL, A.K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R.R. **Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass**. *Renewable Energy*, Abril, 2016.

SAINI, J.K.; SAINI, R.; TEWARI, L. **Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments.** *3 Biotech*, v. 5:4, p.337-353, 2015.

SHARMA, R.K.; ARORA, D.S. **Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality.** *Critical Reviews in Microbiology*, v. 41:1, p.52-60, 2015.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R. **A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria prima?** *Química Nova*, v.24, n.2, p.247-251, 2001.

SHEN, Q.; LIU, P.; WANG, X.; ROYSE, D. J. **Effects of substrate moisture content, log weight and filter porosity on shiitake (*Lentinula edodes*) yield.** *Bioresource Technology*, v.99:17, p.8212-8216, 2008.

SILVA, D.F. **SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS, IMOBILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS CELULASES, PRODUZIDAS E COMERCIAL, NA HIDRÓLISE DA CELULOSE.** *Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, 2012.*

SILVA, D.F.; CAMARGO, R.; CARVALHO, A. F. A.; O-NETO, P. **Cellulolytic enzyme production by the fungi *Trichoderma reesei* QM 9414 and *Trichoderma reesei* CCT2769 using citrus pulp;** *In: VI Simp. Microb. Appl.*, 2013.

SILVA, D.F.; HERGESEL, L.M.; SHINYA, T.Y.; CORREA, F.F.B.; CARVALHO, A.F.A.; OLIVA-NETO, P. **Production of enzyme complexes using cellulolytic filamentous fungi in different culture media.** *Sodebras*, v.11:123, p.75-78, 2016.

SILVA, E.M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A.M.F. **Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains.** *Process Biochemistry*, v.40, p.161-164, 2005.

SINGHA, J.; SUHAGB, M.; DHAKAC, A. **Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review.** *Carbohydrate Polymers*, v.117:6, 624-631, 2015.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, J.S.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignina in biomass.** *Technical Report*, 2010.

SMITH, D.C.; BHAT, K.M.; WOOD, T.M. **Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.7:4, p.475-484, 1991.

SOCCOL, C.R. & FAN, L. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de fungos comestíveis do tipo *Pleurotus*, *Lentinus*, *Flammulina* a partir dos resíduos da agroindústria do café no Brasil.** In: *INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN FOOD, HEALTH, TECHNOLOGY AND THE ENVIRONMENT IN BRAZIL*, Brasília. Proceedings. Brasília: EMBRAPA – Recursos Genéticos, 2003. p. 79-80, 2003.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B.S. **Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solkafloc and bagasse.** *Ind. Crop. Prod.*, v.31:2, 2010.

SOUZA, H.Q. & AGUIAR, I.J.A. **Diversidade de Agaricales (Basidiomycota) na Reserva Biológica Walter Egler, Amazonas, Brasil.** *Acta Amazônica*, v.34, p.43-51, 2004.

SUGUIMOTO, H. H.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, F. H.; GOMES, J. H. C. **Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*.** *FEMS Microbiology Letters*, v.194, p.235-238, 2001.

SUN, H., GE, X., HAO, Z., PENG, M. **Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation.** *Afr. J. Biotechnol.*, v.9:2, p.163-166, 2010.

SUN, Y. & CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** *Bioresour. Technol.*, v.83, 1-11, 2002.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. **Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi.** *Mycologia*, Lancaster, v.81, p.234-240, 1989.

TAJ AWAN, A. **Bagaço de laranja como biomassa para a produção de etanol-2G.** 2013. Publicação Jornal da Unicamp – Instituto de Química (IQ).

TAMANINI, C. & HAULY, M.C.O. **Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol.** *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.25, n.4, p.315-330, 2004.

TANAKA, T.; TANIGUCHI, M.A.; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. **Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*.** *J. Fermen. Technol.*, v.59:3, p.177-183, 1981.

TANGNU, S.K.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. **Enhanced production of cellulase, hemicellulase and b-glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30).** *Biotechnol. Bioeng.*, v.23, p.1837-1849, 1981.

TANNER, D.R.; LAMBERT, W.D.; DU, L.; MA, Y.; LOHA, V.; BURAPATANA, V.; PROKOP, A.; PAMMENT, N.B. **The effect of pH on the**

foam fractionation of β -glucosidase and cellulase. *Bioresource Technology*, v.87, p.247-253, 2002.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. **Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review.** *Process. Biochem.*, v.38:9, p.1327-1340, 2003.

Technical Association of the pulp and paper industry. **TAPPI T-257 om-02. Sampling and preparation wood for analysis**, in *Tappi Test Methods*. Atlanta, GA.

TEIXEIRA, D. E.; da COSTA, A. F.; SANTANA, M. E. **Aglomerado de bagaço de canadeaçúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores.** *Scientia Forestalis*, v.52, p.29-34, 1997.

THYGESEN, A.; THOMSEN, A.B.; SCHMIDT, A.S.; JORGENSEN, H., AHRING, B.K.; OLSSON, L. **Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet oxidized wheat straw.** *Enzy. Microb. Technol.*, v.32:5, p.606-661, 2003.

TISDALE, T.E.; MIYASAKA, S.C.; HEMMES, D.E. **Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.22, p.201-206, 2006.

TONINI, R.C.G.; SANTOS, F.; ISHIKAWA, N.K. ; TAVARES, L.B.B. **Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler.** *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, p. 04-206, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 8ª Edição, reimpressão. *Artmed Editora*, 894 pp., 2008.

TROCHA, L.K.; RUDY, E.; CHEN, W.; DABERT, M.; EISSENSTAT, D.M. **Linking the respiration of fungal sporocarps with their nitrogen concentration: variation among species, tissues and guilds.** *Functional Ecology*, Julho, 2016.

TRUDEAU, D.L.; LEE, T.M.; ARNOLD, F.H. **Engineered thermostable fungal cellulases exhibit efficient synergistic cellulose hydrolysis at elevated temperatures.** *Biotech. Bioeng.*, v.111:12, 2014.

UENOJO, M. & PASTORE, M.G. **Pectinases: aplicações industriais e perspectivas.** *Quim. Nova*, v.30 (2), p.388-394. 2007.

UNTERSEHER, M. & TAL, O. **Influence of Small Scale Conditions on the Diversity of Wood Decay Fungi in a Temperate, Mixed Deciduous Forest Canopy.** *Mycological Research*, v.110, n.2, p.169-178, 2006.

UPADHYAY, R.C. & VIJAY, B. **Cultivation of Pleurotus species during winter in India.** *Em Maher MJ (Ed.) Science and Cultivation of Edible Fungi.* Balkema. Rotterdam, Holandia. p.533-536, 1991.

VALIK, L.; PIECKOVA, E. **Growth modeling of heat resistant fungi: the effect of water activity.** *International Journal of Food Microbiology*, v.63:1, p.11-17, 2001.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. **A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion, and synergy.** *Biotechnol. Adv.*, v.30:6, p.1458-1480, 2012.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. **Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements.** *Bioresour. Techn.*, v.98, p.296-301, 2007.

VIEIRA, G.R.T.; LIEBL, M.; TAVARES, L. B. B.; PAULERT, R ; SMÂNIA JR, A . **Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.561-568, 2008.

VIKINESWARY, S.; NOORLIDAH, A.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G. **Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*.** *Bioresource Technology*, v.97, p.171-177, 2005.

VILELA, D. **Utilização do capim elefante na forma de forragem conservada.** In: *SIMPÓSIO SOBRE CAPIM ELEFANTE, 1990, Coronel Pacheco, MG. Anais.* Juiz de Fora, MG: EMBRAPA-CNPGL, p.89-131, 1990.

VILELA, H. **Produção de briquetes de capim elefante.** Portal Agronomia. 2009.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring.** In: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) **Advances in solid-state fermentation.** Dordrecht: kluwer Academic Publishers, p.5-22, 1997.

VOGEL, F. & SALMONES, D. **Análisis comparativo de la productividad de cepas de *Pleurotus* spp. Cultivadas en una planta comercial.** *Rev. Iberoam. Micol.*, v.17, p.138-141, 2000.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. **Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain.** *Bioresource Technology*, v.78, p.293-300, 2001.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. **Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure.** *Bioresource Technology*, v.96, p.491-499, 2005.

WIDSTEN, P. & KANDELBAUER, A. **Laccase applications in the forest products industry: A review.** *Enzyme Microb. Technol.*, v.42, p.293-307, 2008.

YANG, R.; XU, S.; WANG, Z.; YANG, W. **Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides.** *LWT - Food Science Techn.*, v.38, p.677-682, 2005.

YILDIZ, A.; KARAKAPLAN, M.; AYDIN, F. **Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. Var. *salignus* (Pers. ex Fr.) Konr. Et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores.** *Food Chemistry*, v.61, p.127-130, 1997.

YILDIZ, S.; YILDIZ, Ü.C.; GEZER, E.D.; TEMİZ, A. **Some lignocellulosic waste used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom.** *Proc. Biochem.*, v.38, p.30, 2002.

YAOA, S.; NIEA, S.; YUANA, Y.; WANGA, S.; QINA, C. **Efficient extraction of bagasse hemicelluloses and characterization of solid remainder.** *Bioresource Technology*, v.185, p.21-27, 2015.

YOON, Y.K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. **Enzymatic production of pentoses from hemicellulosies fraction of corn residues.** *LWT - Food Science and Technology*, v.39:4, p.388- 392, 2006.

ZANCAN, L.R.; BARRETO, A.R.; MENEZES, C.R. **Estudo da produção enzimática fúngica por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos.** *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v.19, p.850-860, 2015.

ZHANG, M.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. **Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes.** *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.160, p.1407–1414, 2010.

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

ZHU, Y.; KM, T.H.; LEE, Y.Y.; CHEN, R. **Enzymatic production of xylo-oligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia.** *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.129-132, p.586-598, 2006.