



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES JEQUITINHONHA E
MUCURI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

LÍDIA MANFRIN DIAS

Produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* utilizando sorgo biomassa como principal fonte de carbono

UBERLÂNDIA

2017

LÍDIA MANFRIN DIAS

Produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* utilizando sorgo biomassa como principal fonte de carbono

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal Uberlândia / Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Química, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Orientadora: Prof^a Dr^a Milla Alves Baffi

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D541p
2017 Dias, Lídia Manfrin, 1990-
 Produção de celulases e hemicelulases por Aspergillus fumigatus e
A. niger utilizando sorgo biomassa como principal fonte de carbono /
Lídia Manfrin Dias. - 2017.
 87 f. : il.

Orientadora: Milla Alves Baffi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis.
Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis - Teses. 2. Sorgo - Teses. 3. Biomassa vegetal -
Teses. 4. Hemicelulose. Teses. 5. Aspergillus niger - Teses. I. Baffi,
Milla Alves, 1977-. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Biocombustíveis. III. Título.

CDU: 662.756



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 12/PPBIC.

DATA: 14/07/2017

DISCENTE: Lídia Manfrin Dias

MATRÍCULA: 11522PGB004

TÍTULO DO TRABALHO: "Produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* utilizando sorgo biomassa como principal fonte de carbono".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis

LINHA DE PESQUISA: Processos químicos e bioquímicos aplicados à conversão de biomassas a biocombustíveis

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biogás (metano e hidrogênio), bioetanol, celulose nanocristalina e outros bioprodutos químicos de valor agregado.

Às nove horas do dia quatorze de Julho do ano dois mil e dezessete, no Auditório Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, do Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Daniel Pasquini, da Universidade Federal de Uberlândia, Daniela Alonso Bocchini, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, e Milla Alves Baffi, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora,

o título do trabalho será

mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 15 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof(a). Dr(a). Daniel Pasquini

Prof(a). Dr(a). Daniela Alonso Bocchini

Prof(a). Dr(a). Milla Alves Baffi

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pelo dom da vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Milla Alves Baffi pela paciência, pela oportunidade e sabedoria.

Aos professores Prof. Dr. Daniel Pasquini (Instituto de Química, UFU) e Prof.^a Dr.^a Daniela Alonso Bocchini (Instituto de Química, UNESP, campus de Araraquara, SP) por aceitarem o convite para participarem da banca avaliadora do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Juliano Brant Albuquerque, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pelo fornecimento das amostras de sorgo biomassa para o desenvolvimento do projeto.

À Prof.^a Dr.^a Libia Diniz Santos, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas, MG e ao Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta, da Universidade Federal de Ouro Preto, MG (UFOP) pela colaboração com algumas análises realizadas no trabalho.

À Ms. Beatriz Vieira dos Santos, técnica do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMIC-UFU) pelo apoio, paciência e toda a ajuda durante todo o trabalho desenvolvido.

À Dr.^a Júlia Araújo, técnica do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMIC-UFU), por toda ajuda e auxílio durante a execução deste trabalho.

À minha família pelo amor, paciência, atenção, ensinamentos, lições de vida e pelos exemplos que me passaram e passam até hoje.

Ao Thales por todo o apoio, carinho, cuidado, paciência, amor e companheirismo.

A todos os companheiros do laboratório pela amizade e parceria.

RESUMO

A produção de celulases e hemicelulases microbianas tem sido alvo de intensas pesquisas devido a sua ampla utilização nos setores industriais e energético, como por exemplo, na produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais. Neste trabalho, a produção dessas enzimas foi realizada por Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando linhagens fúngicas de *Aspergillus* (*A. fumigatus* SCBM6 e *A. niger* SCBM1), em meio de cultivo contendo sorgo biomassa (SB) e farelo de trigo (FT), como fontes de carbono, e diferentes fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, sulfato de amônia e ureia). Diferentes condições de FES foram avaliadas com o objetivo de se escolher a melhor associação entre fontes de carbono e nitrogênio para estimular a indução da produção de enzimas hemi- e celulolíticas. A produção de cinco enzimas fundamentais para o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica foi avaliada, a saber: β -glicosidase, β -xilosidase, xilanase, avicelase (exoglucanase) e carboximetilcelulase (endoglucanase). A FES realizada com SB associado à peptona e utilizando *A. niger* SCBM1 como inóculo foi escolhida como a melhor condição para a indução da produção da maioria das enzimas citadas, na qual se obteve máxima produção de xinalase e avicelase (exoglucanase) em 72 horas de fermentação (300,07 e 30,64 U/g, respectivamente), β -glicosidase e carboximetilcelulase (endoglucanase) em 120 horas (54,90 e 41,47 U/g, respectivamente) e β -xilosidase em 144 horas (64,88 U/g). A caracterização química indicou a predominância de celulose (39,84 %) em SB, o que pode estar associada à produção mais significativa de celulases. O presente trabalho representa o primeiro estudo em que o sorgo biomassa é utilizado como fonte de carbono na produção de celulases e hemicelulases por FES, apresentando-o como uma nova e promissora fonte de biomassa para diversas aplicações biotecnológicas, como por exemplo, na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: sorgo biomassa, celulases, hemicelulases, fermentação em estado sólido, *Aspergillus*.

ABSTRACT

The production of microbial cellulases and hemicellulases has been the subject of intense researches due to its wide use in the industrial and energetic sectors, for example, in the second generation ethanol production from agroindustrial wastes. In this work, the production of these enzymes was performed by Solid State Fermentation (SSF), using fungal strains of *Aspergillus* (*A. fumigatus* SCBM6 and *A. niger* SCBM1), in culture medium containing biomass sorghum (BS) and wheat bran (WB), as carbon sources and different nitrogen sources (peptone, yeast extract, ammonium sulfate and urea). Different SSF conditions were evaluated in order to select the best association between carbon and nitrogen sources for the induction of the production of hemi and cellulolytic enzymes. The production of five essential enzymes for the saccharification process of lignocellulosic biomass was evaluated (β -glucosidase, β -xylosidase, xylanase, exoglucanase and endoglucanase). The SSF performed with BS associated to peptone and *A. niger* SCBM1 as inoculum was selected as the best condition for the induction of the most of the enzymes mentioned, in which maximum production of xynalase and avicellase (exoglucanase) was obtained in 72 hours of (300.07 and 30.64 U/g, respectively), β -glucosidase and carboxymethylcellulose (endoglucanase) in 120 hours (54.90 and 41.47 U/g, respectively) and β -xylosidase in 144 hours (64.88 U/g). The chemical characterization of BS indicated the predominance of cellulose (39.84%) in BS, which may be associated to the most significant production of cellulases. The present work represents the first study in which sorghum biomass is used as a carbon source in the production of cellulases and hemicellulases by SSF, presenting it as a new and promising source of biomass for several biotechnological applications, such as the production of second generation ethanol.

Keywords: Biomass sorghum, cellulases, hemicellulases, solid state fermentation, *Aspergillus*.

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura de um tecido vegetal.....	13
Figura 2 - Estrutura da celulose.....	14
Figura 3 - Representação das ligações de hidrogênio na estrutura cristalina da celulose. A) ligações de hidrogênio intermoleculares e B) ligações de hidrogênio intramoleculares.....	14
Figura 4 - Regiões cristalinas e amorfas da celulose.....	15
Figura 5 - Representação de uma xilana de madeira macia composta de arabino-4-O-metilglucuroxilanos.....	15
Figura 6 - Unidades precursoras da lignina: álcoois cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III) e principais núcleos aromáticos encontrados na lignina: p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S).....	17
Figura 7 - Estrutura proposta de lignina de faia.....	18
Figura 8 - Hidrólise da cadeia de celulose a celobiose por exoglucanases.....	21
Figura 9 - Representação esquemática dos principais locais de ação das celulases sobre o polímero de celulose.....	22
Figura 10 - Representação esquemática da ação das hemicelulases sobre um polímero de hemicelulose.....	25
Figura 11 - Modelo esquemático representando o sinergismo de ação de celulases e hemicelulases para hidrólise de material lignocelulósico.....	27
Figura 12 - Microscopia óptica de estrutura reprodutiva de <i>Aspergillus</i>	31
Figura 13 - Vista lateral de uma lavoura comercial de sorgo biomassa em florescimento.....	36
Figura 14 - Produção de β-glicosidase por <i>A. niger</i> SCBM1, <i>A. fumigatus</i> SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e p<0,05.....	58
Figura 15 - Produção de β-xilosidase por <i>A. niger</i> SCBM1, <i>A. fumigatus</i> SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e p<0,05.....	58
Figura 16 - Produção de xilanase por <i>A. niger</i> SCBM1, <i>A. fumigatus</i> SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e p<0,05.	59
Figura 17 - Produção de avicelase por <i>A. niger</i> SCBM1, <i>A. fumigatus</i> SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e p<0,05.	59

Figura 18 - Produção de CMCase por <i>A. niger</i> SCBM1, <i>A. fumigatus</i> SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	60
Figura 19 - Produção de β-glicosidase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	62
Figura 20 - Produção de β-xilosidase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	63
Figura 21 - Produção de xilanase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	63
Figura 22 - Produção de avicelase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	64
Figura 23 - Produção de CMCase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	64
Figura 24 - Atividade de FPase por FES por <i>A. niger</i> SCBM1 utilizando sorgo biomassa como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	66
Figura 25 - Produção de β-glicosidase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	68
Figura 26 - Produção de β-xilosidase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	68
Figura 27 - Produção de xilanase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	69
Figura 28 - Produção de CMCase por <i>A. niger</i> SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e p<0,05.....	69

Índice de tabelas

Tabela 1- Composição química das fontes de carbono.....	54
Tabela 2 - Valores de pH das soluções salinas contendo as fontes de nitrogênio.....	55
Tabela 3 - Composição em carbono, hidrogênio e nitrogênio das fontes de nitrogênio.....	56
Tabela 4 - Atividades máximas de celulases e hemicelulases encontradas (em U/g) no presente trabalho, pelo cultivo dos fungos em sorgo biomassa (SB) e farelo de trigo (FT) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, considerando o tempo total.....	61
Tabela 5 - Atividades máximas de celulases e hemicelulases encontradas (em U/g) em seus respectivos tempos de fermentação, até 168 horas (7 dias).....	61
Tabela 6 - Máximas produções enzimáticas (em U/g) encontradas nas fermentações em que as proporções entre as fontes de carbono foram testadas (SB: sorgo biomassa; FT: farelo de trigo). A. niger SCBM1 foi utilizado como inóculo e peptona 0,5% como fonte de nitrogênio em todas as fermentações.....	70
Tabela 7- Síntese de todas as atividades enzimáticas máximas encontradas (em U/g) no presente estudo. Destaque em negrito: maiores valores de atividades enzimáticas encontrados. Linha destacada: condição de fermentação selecionada.....	72
Tabela 8 - Comparação da composição química de sorgo biomassa (SB) e bagaço de cana-de-açúcar (BCC).....	73
Tabela 9 - Atividades máximas de celulases e hemicelulases encontrados em outros trabalhos e respectivas caracterizações de seus substratos (SB: sorgo biomassa, BCC: bagaço de cana-de-açúcar e FT: farelo de trigo).....	75

Lista de abreviaturas

BCC	Bagaço de cana-de-açúcar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulases
DNS	Ácido-dinitrosalissílico
EC 3.2.1.4	Endo-1,4- β -D-glucanase
EC 3.2.1.91	1,4- β -Celobiohidrolase
EC 3.2.1.21	β -Glicosidase
EC 3.2.1.8	Endo-1,4- β -xilanase
EC 3.2.1.37	Xilana 1,4- β -xilosidase
FES	Fermentação em Estado Sólido
FT	Farelo de Trigo
PNPG	ρ -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo
ρ NP	ρ -Nitrofenol
PNPX	ρ -Nitrofenil β -D-xilopiranosídeo
SB	Sorgo Biomassa
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry

Sumário

1 Introdução.....	12
1.1 Biomassas lignocelulósicas.....	12
1.2 Estrutura do material lignocelulósico.....	13
1.2.1 Celulose.....	13
1.2.2 Hemiceluloses.....	15
1.2.3 Lignina.....	16
1.3 Microrganismos produtores de enzimas.....	18
1.4 Enzimas para a sacarificação.....	20
1.4.1 Celulases.....	20
1.4.2 Hemicelulases.....	23
1.5 Aplicações no uso de celulases e hemicelulases para produção de biocombustíveis....	27
1.5.1 Biocombustíveis e o cenário atual.....	27
1.5.2 Etanol como fonte de energia.....	29
1.6 Produção de celulases e hemicelulases por <i>Aspergillus sp</i>	30
1.7 Nutrição e metabolismo dos fungos.....	32
1.8 Sorgo biomassa como substrato para a produção de enzimas.....	34
1.9 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	36
2 Objetivo Geral.....	39
2.1 Objetivos específicos.....	39
3 Material e Métodos.....	40
3.1 Caracterização química das fontes de carbono.....	40
3.1.1 Teor de umidade.....	40
3.1.2 Teor de cinzas.....	41
3.1.3 Teor de lignina.....	41
3.1.3.1 Teor de lignina Klason insolúvel.....	41
3.1.3.2 Teor de lignina Klason solúvel.....	42
3.1.4 Conteúdo de holocelulose.....	43
3.1.5 Teor de α -celulose.....	45
3.1.6 Conteúdo de hemiceluloses.....	46
3.1.7 Quantificação de celulose e hemiceluloses por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	46
3.1.8 Conteúdo de proteínas.....	47

3.1.9 Análise elementar das fontes de carbono e nitrogênio.....	49
3.2 Microrganismos.....	49
3.3 Preparo do substrato.....	50
3.4 Fermentação em estado sólido (FES).....	50
3.4.1 Seleção do microrganismo.....	50
3.4.2 Seleção da fonte de nitrogênio.....	50
3.4.3 Seleção da fonte de carbono.....	51
3.5 Extração enzimática.....	51
3.6 Dosagem de celulases.....	52
3.7 Dosagem de hemicelulases.....	52
3.8 Dosagem de celulase total (FPase).....	53
4 Resultados e discussão.....	54
4.1 Caracterização química das fontes de carbono.....	54
4.2 Caracterização química das fontes de nitrogênio.....	55
4.3 Produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido.....	57
4.3.1 Seleção do microrganismo.....	57
4.3.2 Seleção da fonte de nitrogênio.....	62
4.3.3 Seleção da fonte de carbono.....	67
4.3.4 Condição ótima para produção de celulases e hemicelulases por <i>Aspergillus niger</i> SCBM1.....	73
5 Conclusões.....	76
6 Referências Bibliográficas.....	77

1 Introdução

1.1 Biomassas lignocelulósicas

As biomassas lignocelulósicas, como biomassa lenhosa, resíduos agrícolas, de processamento de alimentos, florestais, sólidos industriais e municipais são importantes recursos para utilização em biorrefinarias, pois contribuem显著mente na produção de produtos químicos orgânicos, além de serem consideradas recursos potenciais para a produção de energia e bioetanol em todo o mundo (MATHEW et al., 2008).

O bioetanol (também conhecido como etanol de segunda geração) é o álcool etílico produzido por processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica presente em resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de milho, entre outros, seguido de fermentação alcóolica (DEMIRBAS, 2008).

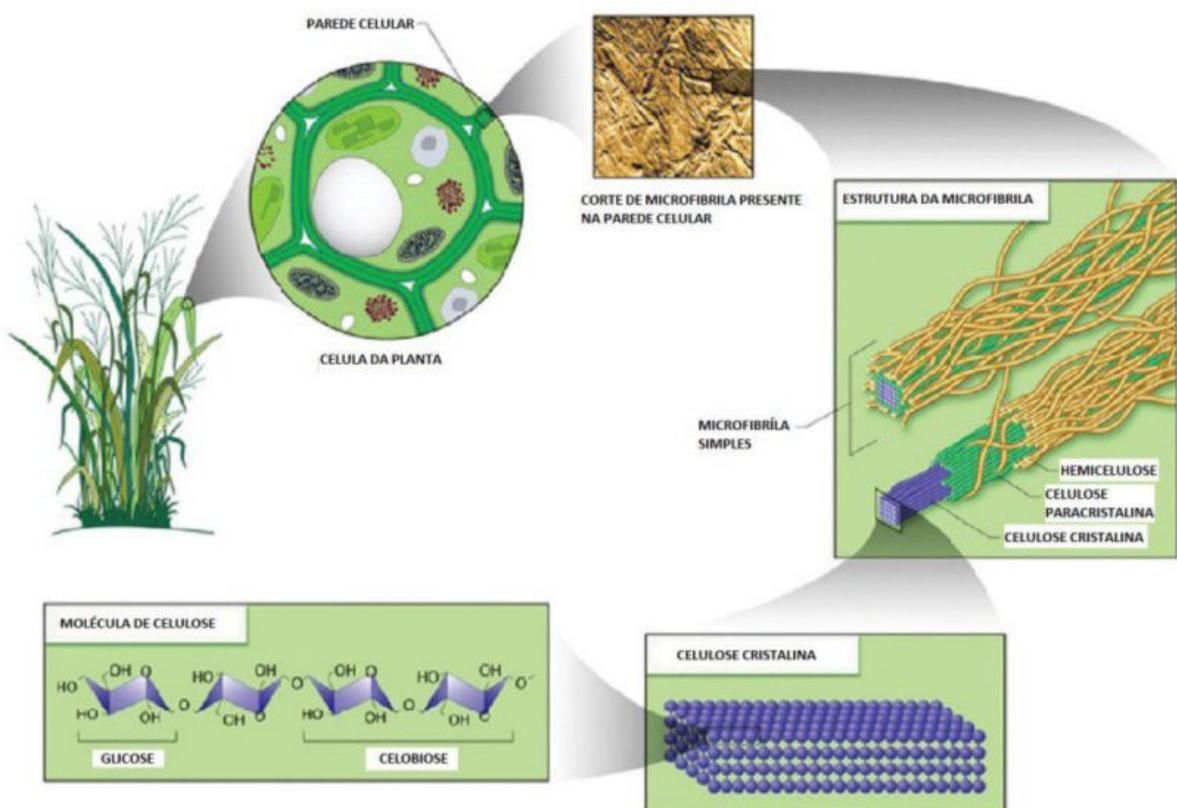
Biomassas lignocelulósicas não são apenas um material renovável, como também de baixo custo, abundante e sustentável. A palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e o bagaço de cana-de-açúcar são os principais resíduos agrícolas que têm sido estudados atualmente para a produção de bioetanol. Outros resíduos como o bagaço de sorgo sacarino, casca de arroz, palha de colza, *Miscanthus* (capim), casca de avelã e resíduos hortícolas também têm sido reaproveitados para a produção de bioetanol (THANGAVELU et al., 2016).

A parede celular vegetal de tais materiais é constituída por três camadas: lamela média, parede celular primária e parede celular secundária. Todas as camadas presentes na parede celular têm duas fases, a microfibrilar e a matriz. A fase microfibrilar, de fase cristalina, é composta por microfibrilas de celulose e a matriz, uma fase não cristalina, é composta por uma variedade de polissacarídeos (pectinas e hemiceluloses), proteínas e compostos fenólicos (lignina, ácido ferúlico, ácido cumárico e outros) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007). A Figura 1 ilustra a estrutura de um tecido vegetal.

As biomassas lignocelulósicas diferem das culturas que são utilizadas para produção de etanol de primeira geração, como a sacarose da cana-de-açúcar e o amido do milho, em relação à sua composição. Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são celulose, hemiceluloses e lignina. Estas biomassas apresentam seus açúcares (monossacarídeos) na forma polimerizada, ou seja, na forma de celulose principalmente. Dentro do complexo lignocelulósico, a celulose possui função de principal componente estrutural das paredes celulares da planta. Hemiceluloses estão em estreita associação com a

celulose na parede celular, e lignina está incorporada interpenetrando as fibrilas e fortalecendo assim as paredes celulares (FENGEL & WEGENER, 1984).

Figura 1 - Estrutura de um tecido vegetal.



Fonte: Smith, 2007.

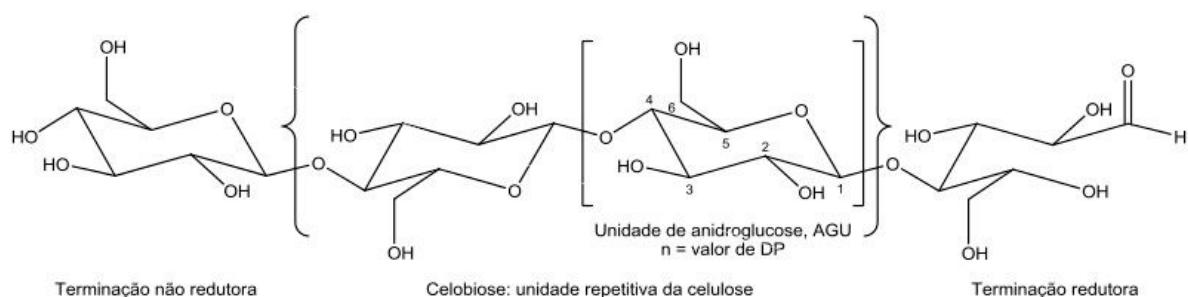
1.2 Estrutura do material lignocelulósico

1.2.1 Celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante na Terra. Esta macromolécula é um polímero de porções de β -D-glicopiranoses (β -D-glicoses) unidas por ligações β -(1,4) glicosídicas. O grau de polimerização da celulose varia de acordo com o material. A unidade de repetição da celulose é o dissacarídeo celobiose, composto por duas unidades de glicose (Figura 2). As cadeias de celulose, que podem variar de 20 a 300 unidades na fibra, são agrupadas em microfibrilas, que são associadas para formar as fibras de celulose. Cada unidade de glicose contém três grupos de hidroxilos livres, que tendem as formar ligações de

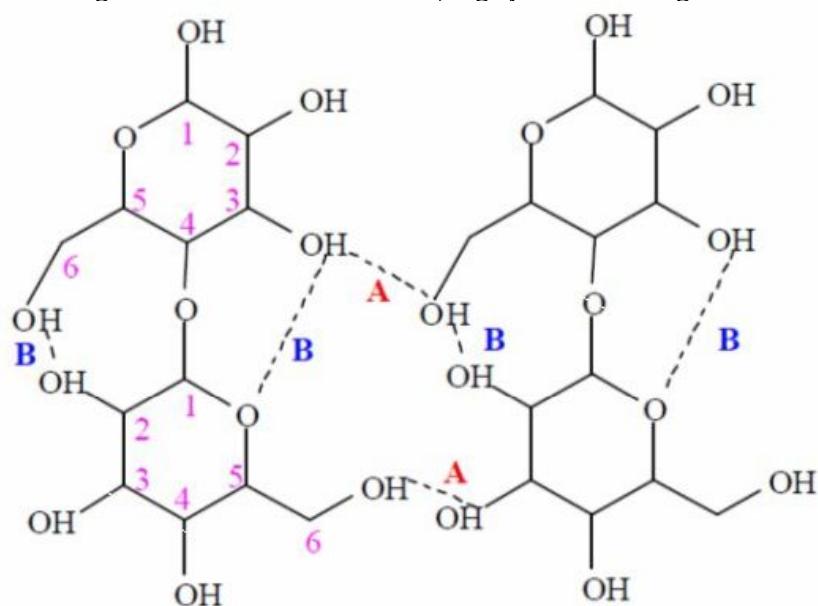
hidrogênio entre si, mantendo a estrutura da celulose. Essas ligações ocorrem entre os grupos hidroxilas de uma mesma cadeia e entre grupos hidroxila adjacentes (paralelas) das cadeias de celulose, fazendo interações intramoleculares e intermoleculares, respectivamente (Figura 3). As ligações de hidrogênio dentro da microfibrila determinam a linearidade da cadeia, assim como podem induzir a ordem (cristalinidade) ou a desordem (estrutura amorfa) da celulose. As regiões altamente ordenadas, ou seja, cristalinas, são pouco acessíveis por solventes, reagentes e consequentemente, enzimas, enquanto as regiões desordenadas (amorfas) são mais acessíveis (Figura 4) (de ALMEIDA, 2009; AGBOR et al., 2011).

Figura 2 - Estrutura da celulose.



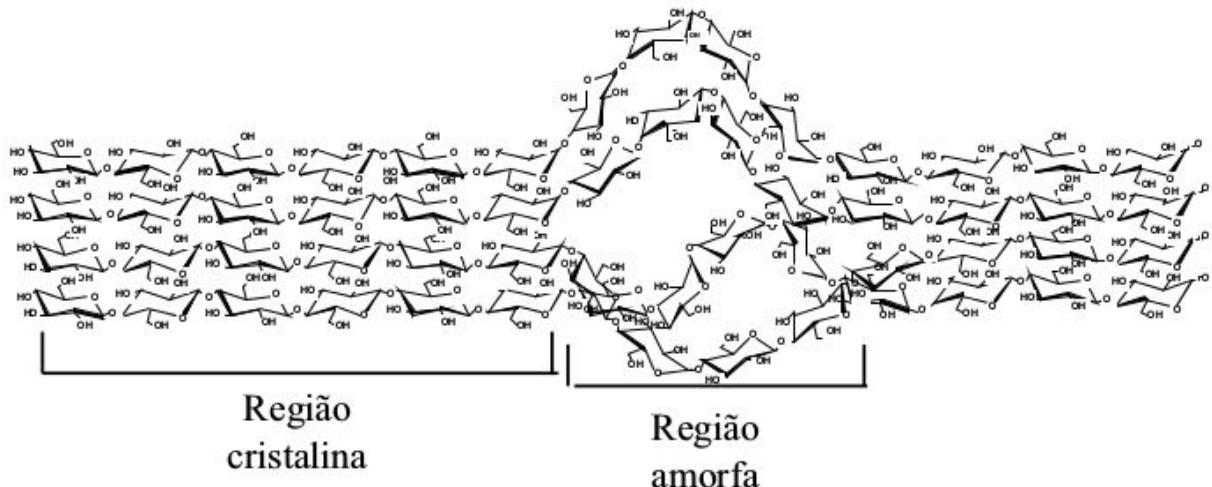
Fonte: Klemm et al., 2005.

Figura 3 - Representação das ligações de hidrogênio na estrutura cristalina da celulose. A) ligações de hidrogênio intermoleculares e B) ligações de hidrogênio intramoleculares.



Fonte: de Almeida, 2009.

Figura 4 - Regiões cristalinas e amorfas da celulose.

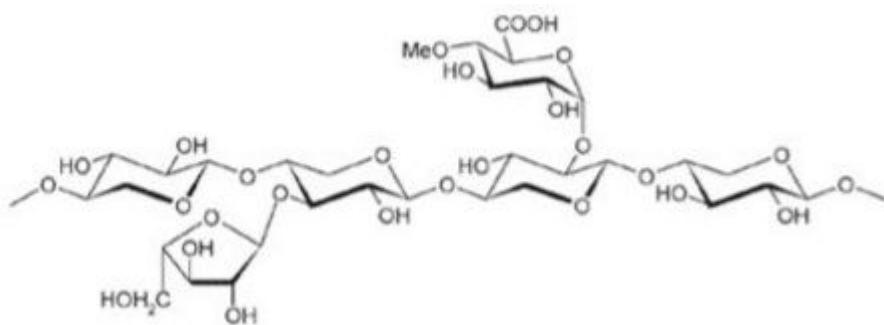


Fonte: Farinas, 2011.

1.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polímeros ramificados e heterogêneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcares acetilados, que revestem as fibrilas de celulose. Possuem um peso molecular mais baixo em comparação com a celulose e ramificações com cadeias laterais curtas e amorfas, o que as tornam parcialmente solúveis em água e mais facilmente hidrolisáveis (POTUMARTHI et al., 2013). As hemiceluloses variam em composição dependendo da biomassa, sendo que as mais comuns são as xilanás e as glucomananas. Em biomassas lignocelulósicas, o principal componente das hemiceluloses é a xilana (AGBOR et al., 2011).

Figura 5 - Representação de uma xilana de madeira macia composta de arabino-4-O-metilglucuroxilanos.



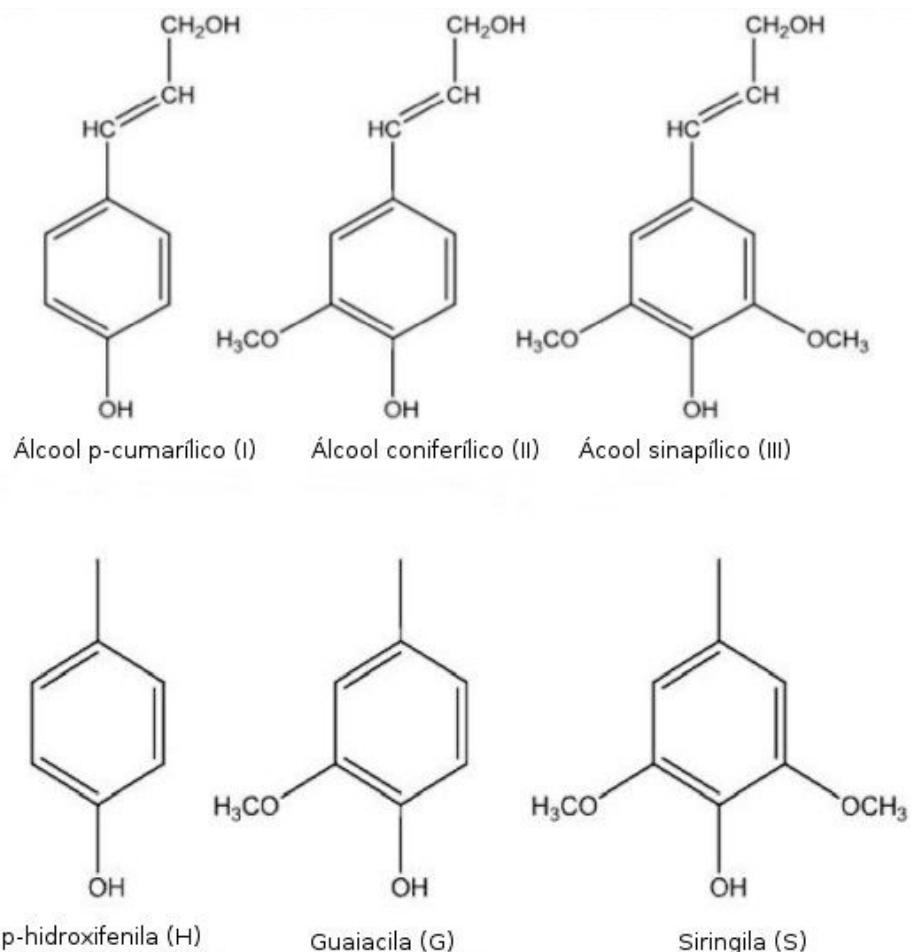
Fonte: Beg et al (2001).

1.2.3 Lignina

A lignina também está presente na parede celular das células vegetais e confere rigidez, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo. A lignina é uma macromolécula amorfa de unidades de fenilpropano unidas por ligações éter e ligações entre carbonos. É uma rede tridimensional polifenólica constituída por três monômeros de monolignol: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que podem ser metoxilados em vários graus. Estes lignóis são incorporados à lignina sob a forma de unidades fenilpropanóico p-hidroxifenila (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (Figuras 6 e 7) (GUPTA et al., 2016).

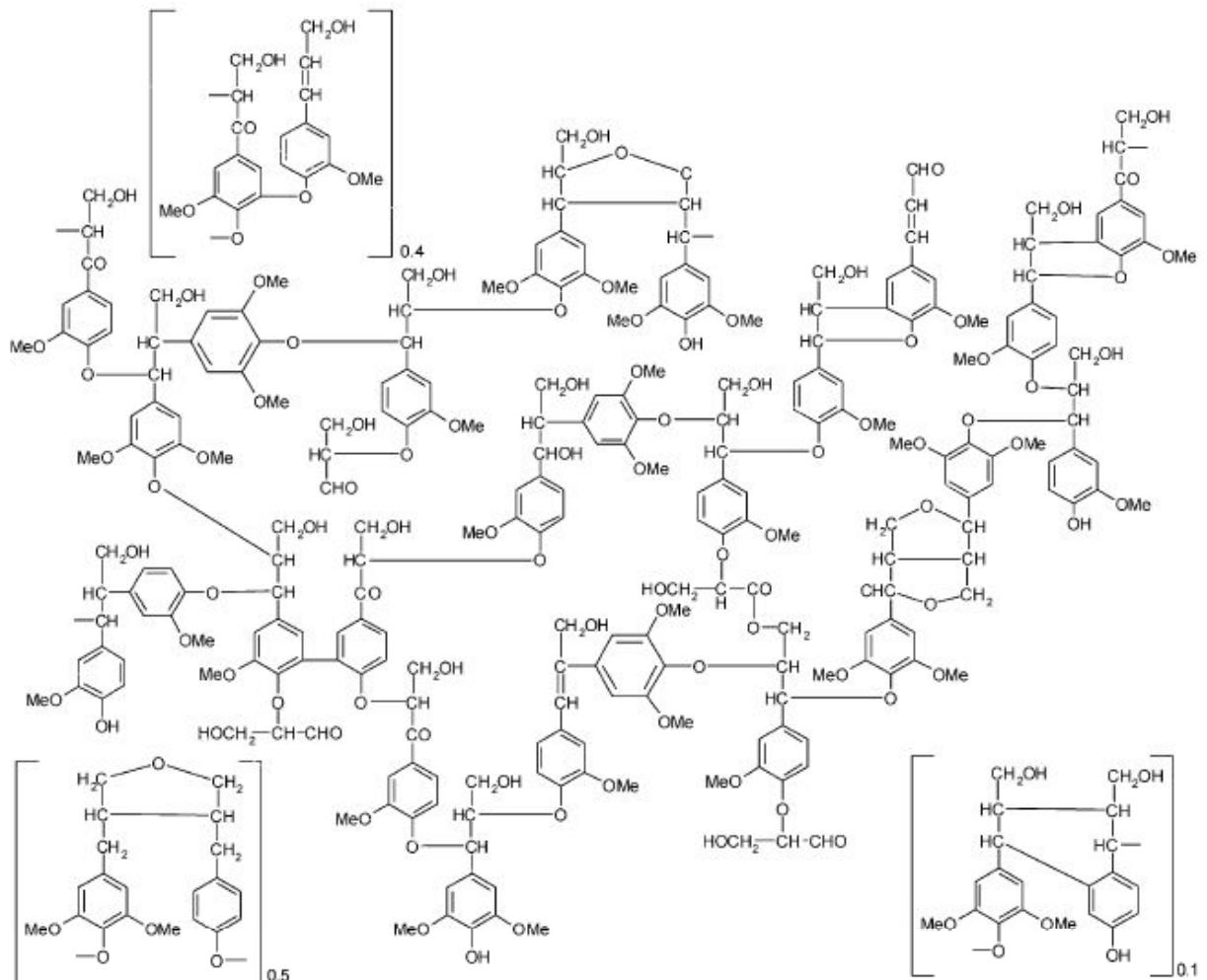
A lignina possui uma estreita relação com as fibrilas de celulose e atua fazendo uma associação com os diferentes componentes da biomassa lignocelulósica, o que a torna insolúvel em água e representa um impedimento à hidrólise enzimática da biomassa. Assim como as hemiceluloses, a lignina está presente em diferentes proporções nos diferentes tipos de biomassas. Além de representar uma barreira física à digestibilidade da celulose, a lignina interfere na ligação das enzimas celulolíticas promovendo adsorções enzimáticas inespecíficas. A extração da lignina da biomassa aumenta significativamente a área de superfície interna e, consequentemente, a acessibilidade das enzimas celulolíticas às fibrilas da celulose (AGBOR et al., 2011).

Figura 6 - Unidades precursoras da lignina: álcoois cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III) e principais núcleos aromáticos encontrados na lignina: *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S).



Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

Figura 7 - Estrutura proposta de lignina de faia.



Fonte: Sharma et al., 2004.

1.3 Microrganismos produtores de enzimas

A glicose presente nas microfibrilas de celulose possui diversas aplicações e para ser utilizada, este polímero presente nas biomassas lignocelulósicas deve ser hidrolisado, etapa que objetiva quebrar a macromolécula em monômeros de glicose livres. A hidrólise enzimática hoje representa um desafio devido ao alto custo das enzimas necessárias para realizá-la (BAEYENS et al., 2015). Atualmente, as enzimas utilizadas para hidrolisar tais materiais podem ser produzidas por fermentação bacteriana ou fúngica. Existe uma vasta gama de microrganismos capazes de produzir essas enzimas, tais como bactérias aeróbias e

anaeróbias, fungos anaeróbios, fungos de podridão mole, fungos de podridão branca e fungos de podridão marrom (YOON et al., 2014).

Os fungos em especial são considerados como importantes produtores de enzimas e têm sido amplamente estudados (ALFENOR e MOLINA-JOUVEA, 2016; BANSAL et al., 2011; CHEN et al., 2015; JIANG et al., 2016). Eles possuem a capacidade de produzir enzimas constitutivas, adaptativas e indutíveis. As enzimas constitutivas são produzidas de forma constante, ou seja, não necessitam de indução para sua síntese por um substrato. As enzimas indutíveis necessitam da presença de um substrato para estimular sua síntese ou atividade enzimática para degradar o mesmo, por exemplo as celulases e hemicelulases. Os fungos também são capazes de produzir enzimas adaptativas. Neste caso, quando em presença de um substrato não utilizado normalmente pelo fungo, um núcleo mutante é selecionado dentro da população de núcleos, para a síntese de enzimas necessárias para a utilização do substrato em questão (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

A maioria dos fungos é capaz de produzir um sistema de celulases mais completo em comparação com as bactérias (YOON et al., 2014). A escolha destes microrganismos se deve a sua capacidade de degradar seletivamente ou simultaneamente materiais lignocelulósicos, o elevado potencial redox de suas enzimas e a termoestabilidade das enzimas produzidas pelos mesmos. A chave para sua capacidade de degradação são as enzimas que secretam extracelularmente. Os fungos celulolíticos mais estudados são *Trichoderma*, *Pencelluim*, *Humicola*, e *Aspergillus*. Entre as bactérias, se destacam os gêneros: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Actinomucor* e *Streptomyces* (GUPTA e TUOHY, 2013).

Diferentes tipos de fungos apresentam sistemas enzimáticos que atacam cada componente da matriz lignocelulósica separadamente. As enzimas modificadoras de lignina (LMEs) são capazes de romper os componentes recalcitrantes, as celulases agem nas microfibrilas de celulose objetivando reduzir os polímeros a unidades de glicose e as hemicelulases atuam clivando os diferentes polímeros de cadeia principal e cadeia lateral das hemiceluloses (GUPTA e TUOHY, 2013).

As LMEs são um grupo de enzimas que degradam lignina, e compreendem lacases, lignina peroxidases, manganês peroxidases, fenol oxidases, tirosinases, catecol oxidases e catalase-fenol oxidases, todas capazes de oxidar vários compostos fenólicos. As celulases abrangem endo-1,4- β -glucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As hemicelulases incluem endo-1,4- β -xilanases, β -xilosidases, endo-1,4- β -mananases e β -manosidases, entre outras (GUPTA e TUOHY, 2013). Os fungos filamentosos são particularmente interessantes na

produção de tais enzimas, uma vez que excretam as mesmas no meio e os níveis de enzimas produzidas são mais elevados do que os produzidos por leveduras e bactérias. Como exemplo, *A. niger*, *H. insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *T. longibrachiatum* e *T. koningii* têm sido utilizados como fontes industriais de xilanases comerciais (GÍRIO et al., 2010). Celulases comerciais são mais comumente produzidas a partir de duas estirpes de fungos de podridão mole, nomeadamente *T. reesei* e *A. niger* (YOON et al., 2014).

O uso de celulases e hemicelulases tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente na indústria têxtil, alimentícia, cervejaria e na produção de vinho, nas indústrias de papel e celulose, assim como na produção de biocombustíveis a partir de biomassas lignocelulósicas. As celulases correspondem a cerca de 20% no mercado de enzimas e são obtidas principalmente por espécies *Trichoderma* e *Aspergillus* (MATHEW et al., 2008; OBENG et al., 2017).

1.4 Enzimas para a sacarificação

1.4.1 Celulases

As celulases agem penetrando nas fibrilas de celulose e promovem a despolimerização das cadeias (GUPTA e TUOHY, 2013). O complexo celulolítico consiste de três diferentes tipos de enzimas: as *endoglucanases*, *exoglucanases* e β -glicosidases. As endoglucanases (EG, EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações glicosídicas internamente em cadeias de celulose enquanto que as exoglucanases (CBH, EC 3.2.1.91) atuam preferencialmente nas extremidades da cadeia. Os produtos dessas reações enzimáticas são o dissacarídeo conhecido por celobiose e em menor proporção celo-oligossacarídeos, que são hidrolisados pelo terceiro grupo de enzimas, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (DASHTBAN et al., 2009). A Figura 2 representa uma porção de uma cadeia de celulose, destacando a unidade repetitiva do dímero de celobiose.

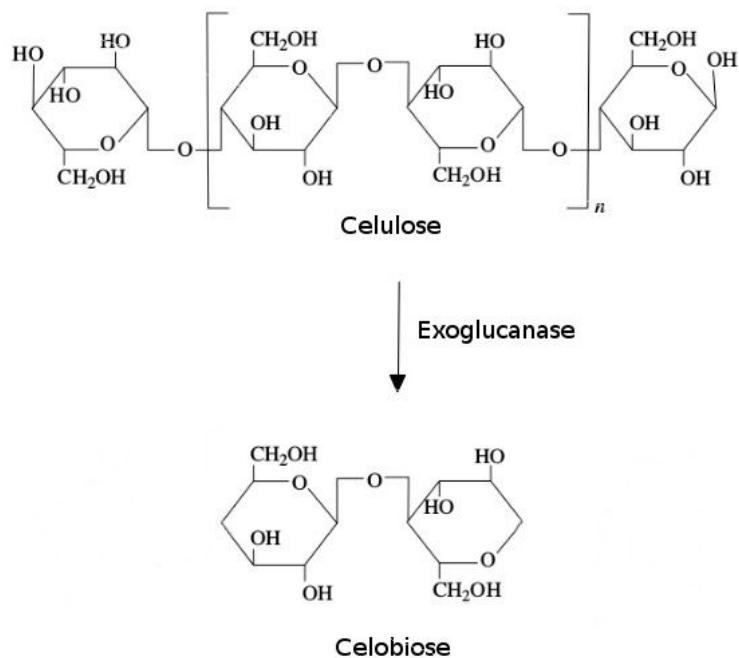
As celulases fúngicas têm uma arquitetura simples contendo um domínio catalítico (DC) e um domínio de ligação à celulose (DLC), ligados por meio de um peptídeo ligante. CBD fixa o substrato de celulose permitindo que o CD desempenhe a sua função catalítica. Esse domínio de ligação é responsável pela ligação seletiva da enzima à celulose cristalina,

aumentando a sua atividade catalítica (DASHTBAN et al., 2009; GUPTA e TUOHY, 2013; JUTURU et al., 2014).

As endoglucanases, também referidas como carboximetilcelulases (CMCases) são proteínas monoméricas que possuem baixo ou nenhum grau de glicosilação. Elas possuem pH ótimo entre 4,0 e 5,0 e temperatura ótima entre 50 a 70°C. As endoglucanases possuem papel central na redução do grau de polimerização da celulose. Elas iniciam a degradação da celulose atacando as regiões amorfas da celulose, mais especificamente as ligações β -1,4-glicosídicas internas da cadeia de celulose, aumentando as extremidades de cadeia livre (DASHTBAN et al., 2009; GUPTA e TUOHY, 2013).

As exoglucanases, também conhecidas como celobiohidrolases (CBH) ou avicelases são proteínas monoméricas com baixo grau de glicosilação, com pH ótimo entre 4,0 e 5,0 e temperatura ótima entre 37 e 60°C (RAY, 2015). Elas agem preferencialmente na hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas das extremidades terminais da cadeia, produzindo celobiose como produto principal (Figura 8). A celobiose, o produto final das CBHs, atua como um inibidor que pode limitar a capacidade das enzimas para degradar todas as moléculas de celulose no material lignocelulósico (DASHTBAN et al., 2009; GUPTA e TUOHY, 2013).

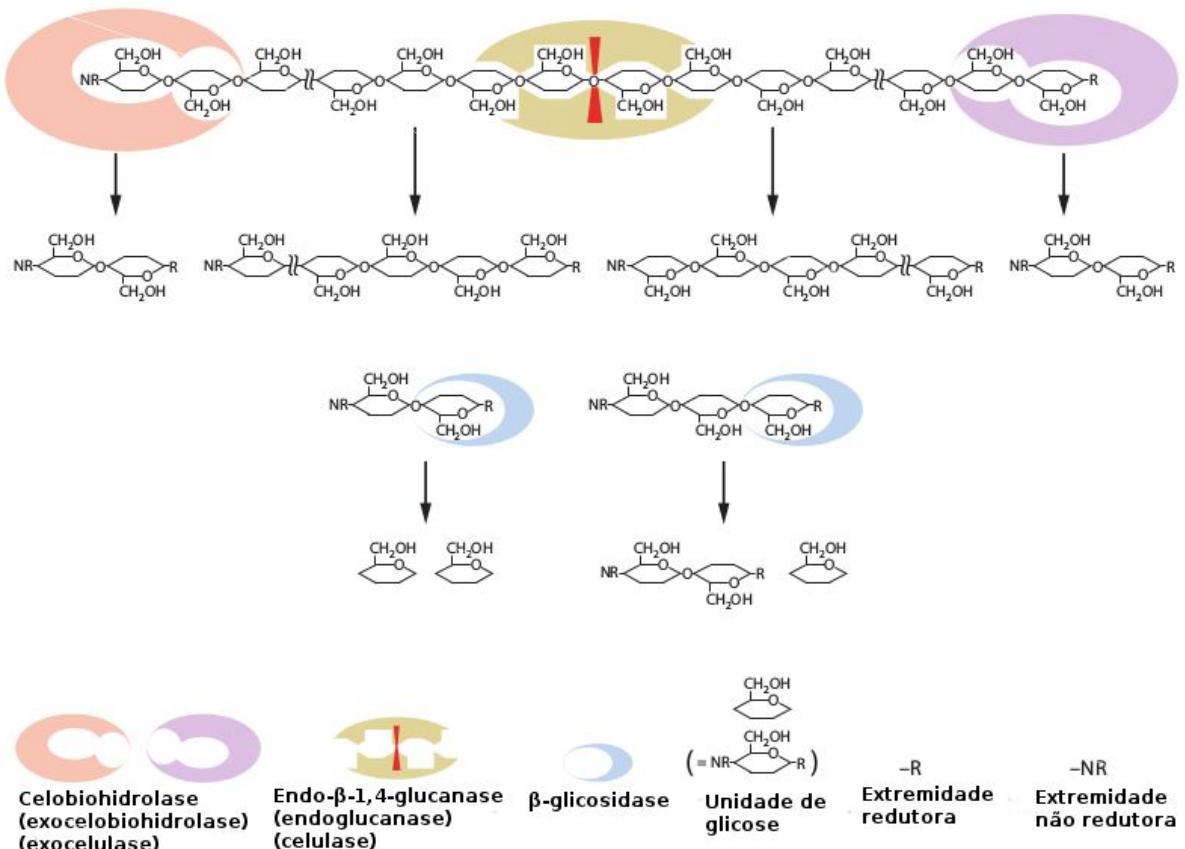
Figura 8 - Hidrólise da cadeia de celulose a celobiose por exoglucanases.



Fonte: a autora.

As β -glicosidases atuam hidrolisando a celobiose solúvel e as celodextrinas em glicose e são inibidas pela glicose. Estas enzimas podem ser proteínas monoméricas, diméricas ou mesmo triméricas. Além disso, a maioria das β -glicosidases são glicosiladas, em diferentes graus. Elas são classificadas em três diferentes grupos, incluindo intracelulares, extracelulares e associadas à parede celular. O pH ótimo varia de acordo com a localização da enzima e a temperatura ótima varia de 45 a 75°C (DASHTBAN et al., 2009; GUPTA e TUOHY, 2013).

Figura 9 - Representação esquemática dos principais locais de ação das celulases sobre o polímero de celulose.



Fonte: Watanabe e Tokuda, 2010.

As celulases são enzimas induzidas por seus substratos e são reguladas por repressão catabólica, ou seja, são inibidas quando em presença de alta concentração de seus produtos. Sendo assim, a alta concentração de glicose e de celobiose no meio ou a ausência de celulose impedem a produção e a atuação de tais enzimas (CHINEDU et al., 2008).

A regulação da produção de celulases pela repressão catabólica ocorre para evitar excessos desnecessários de açúcares produzidos. Neste caso, a inibição de celobiohidrolases (CBHs) por celobiose pode ser amenizada pela presença de β -glicosidase, que converte este dissacarídeo em glicose (DASHTBAN et al., 2010; VÁRNAI et al., 2014). Dessa forma, para efetiva e completa degradação de celulose, é ideal que se tenha um extrato enzimático com presença de endoglucanases e celobiohidrolases e também quantidades suficientes de β -glicosidase, para impedir que excessos de celobiose inibam a ação de CBHs.

A celulose, além de possuir uma estrutura altamente polimerizada e cristalina, também possui alto peso molecular, o que inviabiliza sua entrada na célula pela membrana celular. Entretanto, há evidências que podem explicar como esse polímero consegue induzir a produção do complexo celulolítico no interior da célula. Os fungos são capazes de produzir baixos níveis de expressão constitutiva de celulases, que atuam na liberação inicial de um composto indutor solúvel da cadeia altamente polimérica de celulose. Esse composto é então capaz de penetrar na célula e exercer seu papel indutor desencadeando a expressão de níveis ainda mais altos de celulases (CARLE-URIOSTE et al., 1997; KUBICEK et al., 2009; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010; ILMÉM et al., 1997).

1.4.2 Hemicelulases

As hemiceluloses, por terem característica heterogênea em relação aos componentes poliméricos em sua cadeia, não formam estruturas cristalinas ou microfibrilas, o que as tornam mais acessíveis às enzimas fúngicas extracelulares. Por outro lado, é necessária uma variedade de enzimas com diferentes funcionalidades para hidrolisá-las completamente (DASHTBAN et al., 2009; GUPTA e TUOHY, 2013).

Xilanases são os polissacarídeos hemicelulósicos mais comuns nas paredes celulares de plantas terrestres e constituem cerca de 30-35% do peso seco total (BEG et al., 2001). As xilanases são o grupo de enzimas que atuam nos heteropolímeros de xilana e compreendem as endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8), que clivam ligações glicosídicas na cadeia polimérica liberando xilo-oligosacarídeos, que são hidrolisados por outro grupo de hemicelulases, as β -xilosidases (EC 3.2.1.37), liberando moléculas de xilose livres (GUPTA e TUOHY, 2013).

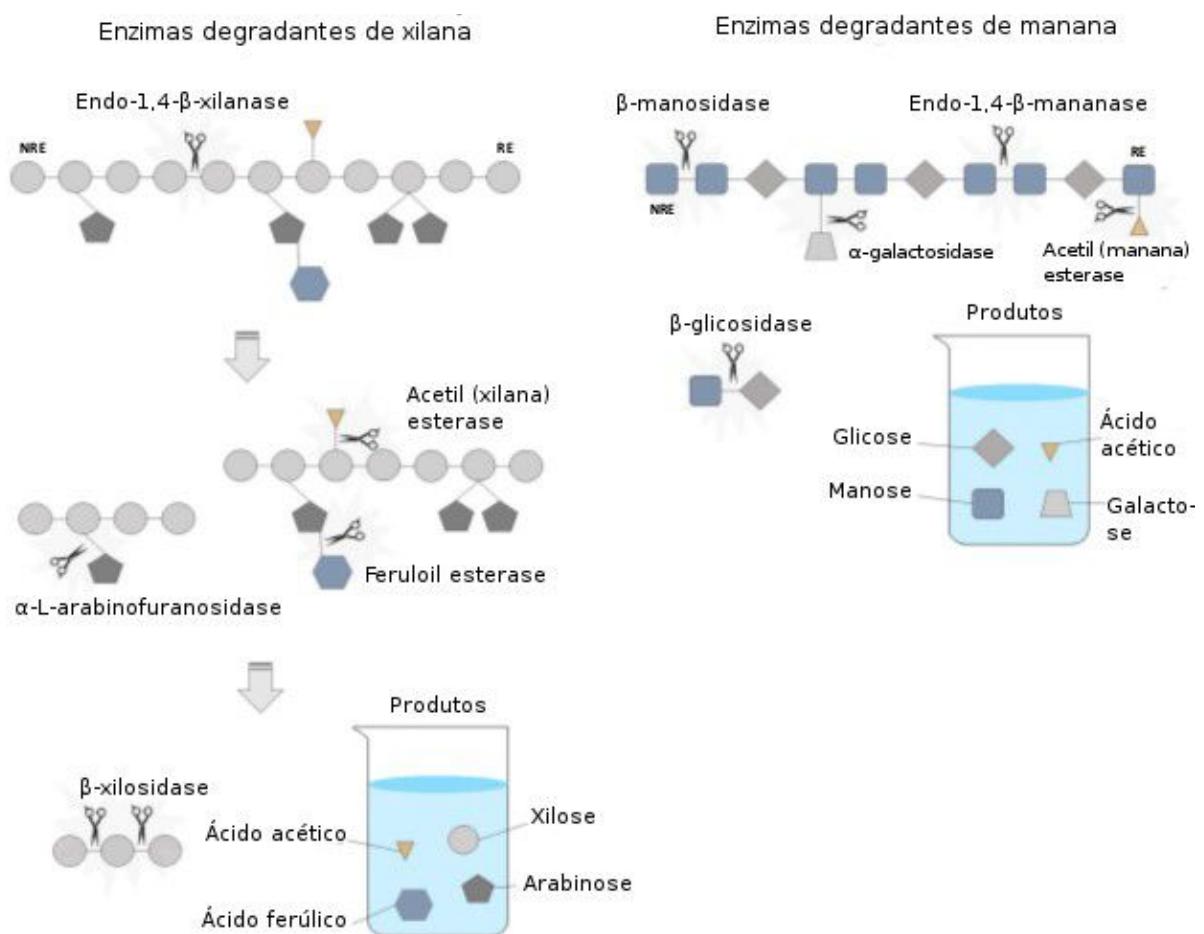
As endo-1,4- β -xilanases clivam as ligações glicosídicas da cadeia de xilana provocando uma redução no grau de polimerização do substrato. A xilana não é atacada aleatoriamente, mas as ligações hidrolisadas dependem da natureza da molécula do substrato,

do comprimento da cadeia, do grau de ramificação e da presença de substituintes. Os principais produtos da hidrólise por endo-1,4- β -xilanases são, inicialmente, oligômeros de β -D-xilopiranósil e posteriormente, podem ser produzidas moléculas pequenas de mono-, di- e trissacarídeos de β -D-xilopiranósil (GÍRIO et al., 2010; POLIZELI et al., 2005).

As β -xilosidases agem após a cadeia de xilana sofrer hidrólise por xilanases, hidrolisando pequenas moléculas de xilo-oligos-sacarídeos e xilobiose e liberando resíduos de β -D-xilopiranósil de extremidades não redutoras e unidades de xilose, sendo que sua afinidade para xilo-oligos-sacarídeos é inversamente proporcional ao grau de polimerização dos mesmos (GÍRIO et al., 2010; POLIZELI et al., 2005). Os oligômeros de β -D-xilopiranósil, produtos da hidrólise de xilana por endo-1,4- β -xilanases podem inibir as mesmas, porém, as β -xilosidases hidrolisam esses produtos, removendo-os do meio e aumentando a eficiência da hidrólise de xilana (POLIZELI et al., 2005).

A Figura 10 representa um esquema da ação das hemicelulases sobre um polímero de hemicelulose.

Figura 10 - Representação esquemática da ação das hemicelulases sobre um polímero de hemicelulose.



Fonte: Gupta et al., 2016 modificado.

Assim como as celulases, as xilanases também são enzimas indutíveis e são produzidas em resposta à presença de xilanase e resíduos contendo xilanase de várias fontes. Sucessivas reações de hidrólise da xilana por xilanases levam ao acúmulo de resíduos de β -D-xilopiranossil, que podem inibir a endoxilanase. As β -xilosidases então hidrolizam esses resíduos, removendo a causa da inibição aumentando a eficiência da hidrólise da xilana. As xilobioses agem como potentes indutores de endoxilanases e β -xilosidases e a xilose produzida por estas últimas age inibindo o complexo xilanolítico em alguns casos (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005).

Enzimas como as mananases atacam polímeros de galactomanana ou glucomanana com a ajuda de enzimas capazes de remover os resíduos substituídos. As mananases

constituem em β -1,4-mananase (EC 3.2.1.78), que atuam diretamente na cadeia principal e β -manosidases (EC 3.2.1.25) que atuam sobre as substituições de manana. Outras enzimas acessórias como α -L-arabinofuranosidase (AAF, EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) e ácido ferúlico esterase (EC.1.1.73) também fazem parte do complexo hemicelulolítico (DASHTBAN, et al., 2009; GUPTA; TUOHY, 2013).

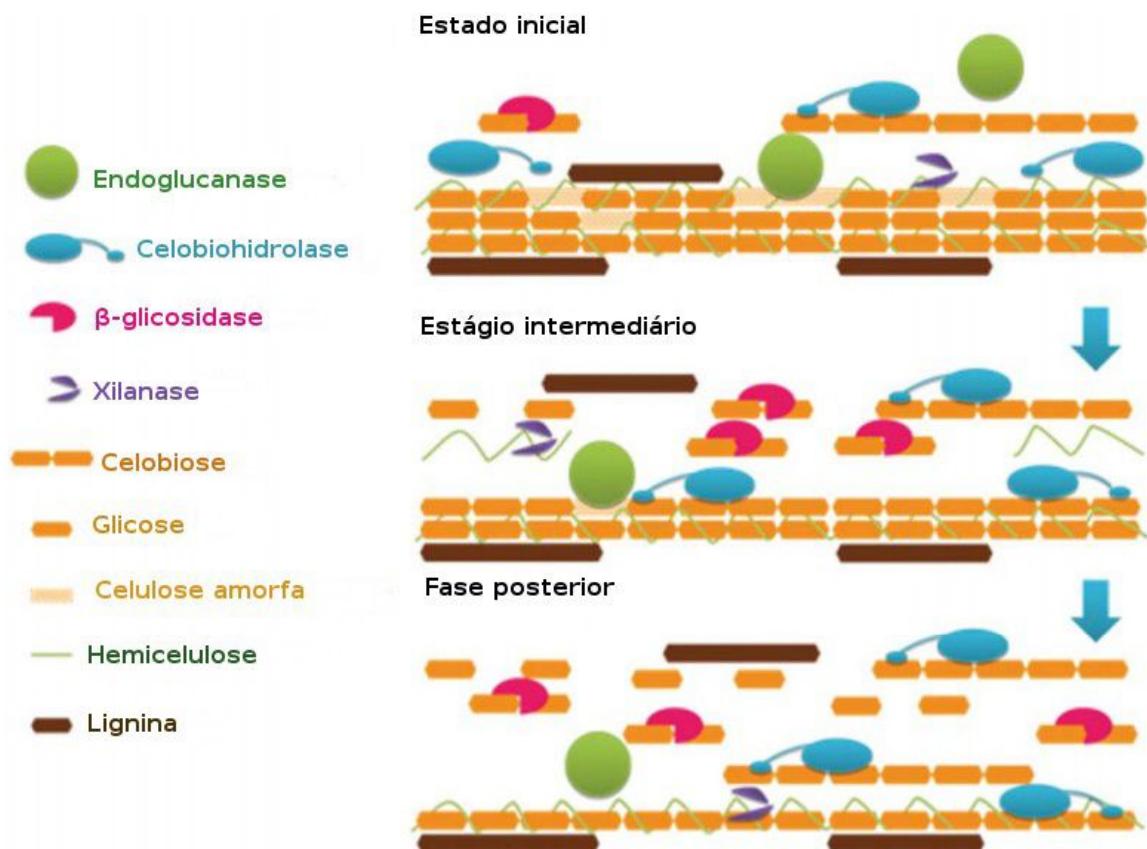
O sistema de regulação da síntese de celulases e hemicelulases ocorre de forma separada. No entanto, as hemicelulases possuem um papel fundamental para aumentar a eficiência das celulases na hidrólise da biomassa vegetal. A produção de xilanases é induzida quando microrganismos são cultivados em meio contendo preferencialmente xilana, enquanto celulose é capaz de induzir a produção tanto de celulases quanto hemicelulases. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de o substrato de celulose poder conter vestígios de hemiceluloses (POLIZELI et al., 2005).

A eficiência na hidrólise da celulose depende da ação cooperativa das celulases e hemicelulases. A ação das hemicelulases degrada a matriz hemicelulósica e aumenta a acessibilidade das fibras de celulose, favorecendo a ação das celulases (ALVIRA et al., 2013). As endoglucanases hidrolisam o polímero de celulose internamente, expondo as extremidades redutoras e não redutoras e as exoglucanases fragmentam essas extremidades redutoras e não redutoras, liberando celobiose e celo-oligossacarídeos (hidrólise primária). O processo é finalizado na hidrólise secundária através da ação da β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21), que cliva a celobiose, liberando duas moléculas de glicose como produto final (GOTTSCHALK et al., 2010; YOON et al., 2014).

Uma variedade de hemicelulases (arabinofuranosidases, mananases) agem exclusivamente sobre as cadeias laterais. Com a liberação das cadeias laterais, a cadeia principal de xilana é exposta à clivagem pelas xilanases. Xilanases, acetil-xilana-esterases e feruloil-esterases atuam em conjunto para produzir xilo-oligossacarídeos substituídos, com a concomitante liberação de ácido ferúlico e ácido acético. As arabinofuranosidases e glucuronidases, em seguida, liberam arabinose e ácido glucurônico destes xilo-oligossacarídeos. A cadeia principal então fica livre para as xilosidases converterem os xilo-oligossacarídeos em seus açúcares constituintes, principalmente xilose (FARINAS, 2011).

A Figura 11 esquematiza o processo de ação das celulases e hidrólise por hemicelulases.

Figura 11 - Modelo esquemático representando o sinergismo de ação de celulases e hemicelulases para hidrólise de material lignocelulósico.



Fonte: Du et al., 2013.

1.5 Aplicações no uso de celulases e hemicelulases para produção de biocombustíveis

1.5.1 Biocombustíveis e o cenário atual

Os combustíveis de origem fóssil são gerados a partir de materiais orgânicos sintetizados há milhões de anos, que levam centenas de anos para serem formados e não podem ser regenerados em um curto período de tempo. Entre estes combustíveis destacam-se o petróleo bruto, o gás natural e o carvão, que são utilizados atualmente no consumo de 80% da energia global (LUQUE et al., 2016). O processo de decomposição da matéria orgânica para a sua produção ocorre de maneira lenta e a velocidade de consumo dos mesmos não acompanha a velocidade de produção, sendo considerados recursos naturais não renováveis

(MARQUES, 2007). Estima-se que as reservas de combustíveis fósseis esgotarão em 40 a 100 anos, dependendo das condições em que serão utilizadas (LUQUE et al., 2016).

Os combustíveis de origem fóssil quando queimados por combustão completa liberam gás carbônico (CO_2) e água. A liberação excessiva de CO_2 na atmosfera gera o aumento do efeito estufa, com alterações climáticas significativas, que vêm se intensificando nos últimos anos com o aumento populacional e consequente aumento no uso desses combustíveis.

Atualmente, os combustíveis fósseis são amplamente utilizados no transporte, agricultura, comércio e setores domésticos e industriais para a geração de energia elétrica ou mecânica. Cerca de 98% de toda a energia consumida no mundo é utilizada no setor de transportes e é derivada de tais combustíveis (LIEW et al., 2014). Devido ao fato de que esses combustíveis não são renováveis, o seu uso indiscriminado pode levar ao esgotamento das reservas naturais e consequentemente, à ameaça de uma crise energética. Dessa forma, a busca por fontes alternativas de energia tem crescido consideravelmente nos últimos anos (LIEW et al., 2014).

A procura por fontes renováveis de energia aumentou durante a segunda metade do século XX devido a problemas no abastecimento de petróleo, elevação dos preços de combustíveis fósseis em virtude dos custos de produção e aumento do impacto ambiental (RAMOS et al., 2011). Existem várias fontes de energias renováveis, como o vento, a chuva, as marés dos oceanos, e a biomassa. No entanto, tais energias de um modo geral, não são adaptáveis a todas as comunidades devido a fatores como distribuição dos recursos naturais, que dependem das localizações geográficas (MOHTASHAM, 2015).

Neste contexto, surge então, o interesse no uso dos biocombustíveis como fontes alternativas de energia. Estes podem ser definidos como combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos derivados de fontes renováveis como biomassa, gorduras animais, plantações ou óleos usados (LIEW et al., 2014). Os biocombustíveis líquidos abrangem os bioálcoois, os óleos vegetais, o biodiesel e os óleos brutos e sintéticos. Estes combustíveis possuem numerosas vantagens em relação aos combustíveis fósseis, como: são menos poluentes, em virtude da menor emissão de gases de efeito estufa (especialmente CO_2), são mais acessíveis, estimulam o desenvolvimento rural e o aumento de empregos nos países em desenvolvimento (DEMIRBAS, 2009).

Os biocombustíveis podem ainda ser produzidos a partir de culturas energéticas como árvores e gramíneas de rápido crescimento e de algas, com a vantagem de que essas culturas podem crescer de forma sustentável em terras que não suportam culturas alimentares

intensivas (MOHTASHAM, 2015). Além disso, por ser possível sua geração a partir de uma ampla gama de fontes de biomassa, é possível sua produção nas mais diversas localizações geográficas, sendo uma fonte de energia bastante versátil.

Assim, programas de incentivo à produção e uso de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, foram implantados em vários países. O Brasil se destaca como o pioneiro na América Latina a instituir leis que versam sobre o tema, como as Leis Nº 737 de 1938 e, posteriormente, a Lei Nº 723 de 1993, que tratam da obrigatoriedade do uso de etanol misturado à gasolina (RAMOS et al., 2011).

1.5.2 Etanol como fonte de energia

Atualmente, o etanol é o combustível alternativo mais utilizado no mundo. É considerado um combustível limpo, renovável e é uma alternativa ao uso da gasolina devido às características como alto número de octanagem, alto calor de vaporização e baixa pressão de vapor. Além disso, o etanol é facilmente miscível, sendo usado como porção oxigenada na gasolina e pode ser usado diretamente nos carros, sem a necessidade de modificações no motor (DEMIRBAS, 2009). Este biocombustível possui ainda vantagens em relação ao biodiesel devido à maior sustentabilidade das matérias-primas das quais é obtido, menor emissão de gases de efeito estufa (GEE) e menor custo de produção (THANGAVELU et al., 2016). O etanol produzido a partir de culturas bioenergéticas (culturas também utilizadas na alimentação) é denominado etanol de primeira geração e sua produção é derivada de grãos de milho ou do caldo da cana-de-açúcar (DEMIRBAS, 2009; SALADINI et al., 2016). Porém, tal produção compete com o setor alimentício (THANGAVELU et al., 2016). Além disso, essas matérias-primas não são suficientes para suprir a demanda mundial, sendo necessária a produção de etanol em larga escala a partir de resíduos agroindustriais (HAHN – HÄGERDAL, 2006).

Para a produção deste etanol, são utilizadas biomassas ricas em amido (como o milho) ou sacarose (a partir do caldo da cana-de-açúcar). No caso da cana-de-açúcar, primeiramente a sacarose é hidrolisada a glicose e frutose pela enzima invertase. Em seguida, ocorre a fermentação dos monossacarídeos em etanol. Ambos os processos são realizados comumente nas usinas por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em etapas relativamente rápidas. Já matérias-primas compostas por amido como o milho, por sua vez, devem passar por uma etapa de hidrólise do amido e conversão em glicose. Essa etapa consiste em permitir

que o grão germe, produzindo a enzima amilase. Após o grão maltado ser triturado, a amilase converte os amidos em monômeros de glicose. Para a produção do etanol combustível, a hidrólise do amido em glicose pode ser realizada mais rapidamente por tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído, amilase produzida por fungos, ou uma combinação de ambos (BAEYENS et al., 2015). Em seguida, as moléculas de glicose são fermentadas em etanol por *S. cerevisiae* ou outras espécies de leveduras (DEMIRBAS, 2008).

No caso do bioetanol, os carboidratos presentes nos materiais vegetais podem ser convertidos em açúcares simples e então podem ser submetidos à fermentação alcóolica, processo no qual os monossacarídeos, principalmente glicose, são convertidos a álcool adicional pela ação de leveduras. No entanto, atualmente, o custo de produção do bioetanol é elevado em comparação ao etanol de primeira geração e aos combustíveis fósseis baseados em petróleo devido à necessidade da utilização de celulases e hemicelulases para hidrólise da biomassa lignocelulósica (THANGAVELU et al., 2016).

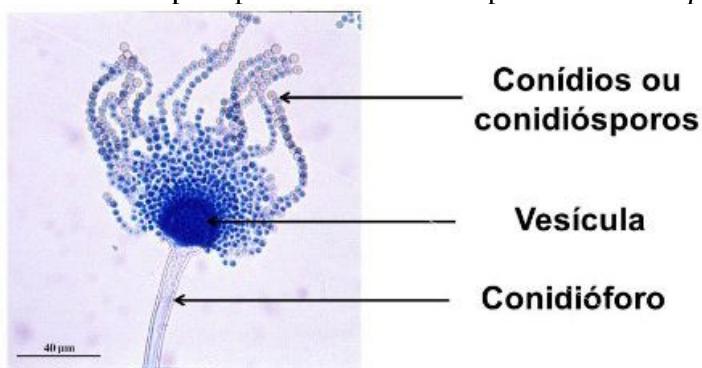
1.6 Produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus sp*

Os fungos são organismos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos e podem ser identificados considerando características morfológicas da colônia e dos esporos reprodutivos. Suas colônias são descritas como estruturas vegetativas, compostas de células envolvidas no catabolismo e no crescimento (TORTORA, 2012). Os fungos filamentosos apresentam corpo (talo) em forma de filamentos longos de células conectadas, que são denominadas hifas. Cada hifa é capaz de crescer por alongamento das extremidades. A porção de uma hifa envolvida na obtenção de nutrientes é chamada hifa vegetativa, enquanto a porção envolvida com a reprodução é chamada de hifa reprodutiva (TORTORA, 2012).

O gênero *Aspergillus*, pertencente à família *Trichocomaceae*, é um gênero cosmopolita, cujas espécies estão amplamente distribuídas no ambiente, como solo e plantas (MONTEIRO, 2012). As mais importantes espécies para aplicações industriais são aquelas pertencentes ao grupo de *Aspergillus* pretos, como *A. niger* e *A. tubingensis* (VRIES e VISSER, 2001). As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais abundantes em todo o mundo e não são muito seletivas em relação às condições de crescimento abiótico (KRIJGSHELD et al., 2013). A reprodução de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* ocorre por meio de esporos assexuais produzidos por mitose e subsequente divisão celular

formando conidiósporos (conídios), que são produzidos em cadeias na extremidade do conidióforo (Figura 12) (TORTORA, 2012).

Figura 12 - Microscopia óptica de estrutura reprodutiva de *Aspergillus*.



Fonte: Tortora, 2012.

A. niger é um fungo filamentoso que cresce aerobicamente em matéria orgânica. Na natureza, é encontrado no solo, lixo, em resíduos e no material vegetal em decomposição. Estes possuem conidiósporos de coloração preta e são capazes de crescer em uma ampla variação de temperatura, de 06 a 37°C, sendo, predominantemente mesofílicos. O valor limite de atividade de água (aw) em que crescem é de 0,88, o que é relativamente alto, quando em comparação com outras espécies de *Aspergillus*. *A. niger* também é capaz de crescer em uma ampla variedade de pHs. Essas características e a sua abundante produção de conidiósporos, que são distribuídos pelo ar, asseguram a ocorrência dessa espécie em todos os lugares, com maior frequência em lugares quentes e úmidos (SCHUSTER et al., 2002). Outra espécie de *Aspergillus*, *A. fumigatus*, por sua vez apresenta conidiósporo de coloração verde musgo, são capazes de crescer em uma faixa de temperaturas de 10 a 55°C, podendo ser mesofílicos, termotolerantes ou termofílicos e crescer em uma ampla variedade de pH (de 3,0 a 8,0). O valor limite de aw é de 0,82 e algumas linhagens apresentam características patogênicas, podendo causar aspergiloses em humanos (KRIJGSHELD et al., 2013).

Esses fungos apresentam numerosas características que os tornam organismos ideais para aplicações industriais, como boa capacidade para fermentação, altos níveis de proteínas secretadas e em particular, a grande variedade de enzimas produzidas para a degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas (VRIES e VISSER, 2001). O fato de secretar enzimas extracelulares e a sua particular forma de crescimento filamentoso, com células alargadas de crescimento apical, os tornam os microrganismos mais adaptados à utilização de

uma ampla gama de substratos, pois além de degradar os substratos, também são capazes de penetrar neles (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

A. niger é um fungo filamentoso amplamente estudado no uso para produção de enzimas e ácidos orgânicos. As celulases, hemicelulases, pectinases, amilases, inulinases, lipases e proteases produzidas por essa espécie são utilizadas em uma ampla gama de aplicações industriais, como na produção de alimentos, indústria têxtil, produção de detergentes e na biorrefinaria, para produção de produtos químicos de valor agregado e biocombustíveis a partir de biomassa (JUTURU e WU, 2014; FLORENCIO et al., 2016). Algumas linhagens de *A. niger* e *A. fumigatus* são consideradas boas produtoras de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, tais como xilanases, β -xilosidases e β -glicosidases (dos SANTOS et al., 2015; GOMES et al., 2016). Além disso, algumas dessas β -glicosidases são tolerantes ao seu produto de reação, a glicose (MATHEW et al., 2008).

Com o aumento no número de pesquisas no setor energético, especialmente na produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, a procura por celulases tenderá a crescer muito nos próximos anos e, considerando o alto custo das enzimas disponíveis no mercado, a pesquisa na produção de celulases e hemicelulases por fungos filamentosos representa uma alternativa promissora ao crescente mercado de enzimas existente atualmente (KUHAD et al., 2011).

1.7 Nutrição e metabolismo dos fungos

Para que ocorra a produção de enzimas, os fungos necessitam de condições adequadas no meio para que possam crescer, se desenvolver e secretar as celulases e hemicelulases de interesse. Além da água, um dos fatores essenciais para o crescimento dos fungos é o carbono, elemento necessário para a síntese de todos os compostos orgânicos da célula, sendo que os fungos são capazes de crescer e se desenvolver em uma ampla gama de fontes de carbono para a produção de enzimas (TORTORA et al., 2012). O carbono orgânico, para ser assimilado pelas células dos fungos, deve ser retirado das fontes de carbono assimiladas pelos mesmos. Estes microrganismos inicialmente degradam as macromoléculas complexas, despolimerizando-as em unidades menores, como oligômeros e monômeros, por meio das enzimas que secretam, como celulases e hemicelulases, os quais podem então entrar nas células e ser catabolizados pelas vias do metabolismo central (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010; NELSON e COX, 2011; TORTORA et al., 2012).

O nitrogênio é, junto com o carbono (45 a 55%), o oxigênio (16 a 22%) e o hidrogênio (7 a 10%), um dos constituintes mais importantes da matéria seca da biomassa, representando cerca de 12 a 16% da mesma. O nitrogênio é necessário para síntese de proteínas, onde são essenciais para formar o grupo amino dos aminoácidos; e ácidos nucleicos nas células fúngicas. Este elemento pode ser assimilado pelos fungos na forma de nitrato (NO_3^-), amônia ou íon amônio ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) e N orgânico (ALTERTHUMM, 2001; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010; TORTORA et al., 2012).

O nitrato (NO_3^-) pode ser assimilado por diversos fungos, especialmente os filamentosos. O nitrato pode ser fornecido no meio de crescimento para os fungos na forma de nitrato de potássio (KNO_3), nitrato de amônio (NH_4NO_3) ou nitrato de sódio (NaNO_3). Este composto entra nas células dos fungos possivelmente por difusão, movido por um gradiente. Seu metabolismo ocorre inicialmente via redução a nitrito (NO_2^-) por nitrato redutase e, em seguida, a NH_3 catabolizada por nitrito redutase (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010; TORTORA et al., 2012).

O íon amônio (NH_4^+) é uma das formas de nitrogênio assimiláveis pelos fungos, a mais facilmente utilizada, pois seu grau de oxidação (-3) é o mesmo do que o átomo de nitrogênio presente nas moléculas biológicas como aminoácidos, purinas e pirimidinas, não sendo necessárias, portanto, reações de óxido-redução para sua conversão. Este íon pode ser fornecido no meio de cultivo de fungos sob a forma de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e nitrato de amônio (NH_4NO_3). O amônio entra nas células por transporte ativo e sua absorção ocorre de forma constitutiva, diferentemente de nitrato (NO_3^-), em que necessita da indução de uma NO_3^- redutase (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

O nitrogênio orgânico está disponível na forma de aminoácidos, aminas e amidas e encontra-se presente nas fontes complexas de nitrogênio, como hidrolisados enzimáticos, como por exemplo, o extrato de levedura. A absorção de aminoácidos ocorre por transporte ativo, necessitando de uma gama de carreadores, específicos para cada aminoácido diferente (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010; TORTORA et al., 2012).

Peptídeos e proteínas também são fontes de nitrogênio orgânico e podem ser absorvidos pelas células, desde que sejam hidrolisados extracelularmente por enzimas antes de serem assimilados. Peptona e caseína são exemplos de fontes de nitrogênio que contêm peptídeos e proteínas com nitrogênio orgânico (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

A ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) também é um exemplo de fonte de nitrogênio que pode ser utilizada pelos fungos. Sua hidrólise necessita da presença de urease, enzima comum em

fungos, que libera dióxido de carbono (CO_2) e amônio a partir da mesma (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Outros macroelementos importantes para o crescimento dos fungos são fósforo e enxofre, que representam cerca de 1 a 2% e 0,4 a 0,8%, em matéria seca, respectivamente. O fósforo pode ser fornecido no meio de cultivo para os fungos na forma de sais inorgânicos, como fosfato monopotássico (KH_2PO_4), em íons PO_4^{2-} que conseguem entrar ativamente nas células dos fungos e ainda na forma de fontes orgânicas, como o fitato. O fósforo é importante na biossíntese de compostos de alta energia como ATP e ADP, NAD e FAD e de ácidos nucleicos e fosfolipídeos. O enxofre pode ser assimilado pelos fungos na forma de sulfatos (SO_4^{2-}), sulfitos (SO_3^{2-}) e tiosulfatos ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). Estes íons entram na célula por transporte ativo, onde sofrem redução e são assimilados para a síntese de proteínas (síntese de aminoácidos como cisteína e metionina) e algumas vitaminas como biotina e tiamina (ALTERTHUMM, 2001; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Micronutrientes também são requeridos para o crescimento fúngico e são utilizados como cofatores de enzimas e reguladores osmóticos. Alguns exemplos são: potássio (K), ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica; magnésio (Mg), ativador de enzimas extracelulares e fator importante na esporulação; ferro (Fe), necessário para síntese de citocromo e certos pigmentos e outros elementos como manganês (Mn), cálcio (Ca), zinco (Zn), etc (ALTERTHUMM, 2001; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

1.8 Sorgo biomassa como substrato para produção de enzimas

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma espécie versátil que abrange diversos segmentos no mercado agrícola mundial. É um cereal que apresenta cinco tipos diferentes, podendo ser utilizado para produção de grãos (sorgo granífero), para a produção de massa para ensilagem (sorgo forrageiro), para a produção de biomassa lignocelulósica (sorgo lignocelulósico ou sorgo biomassa), para a produção de etanol de primeira geração (sorgo sacarino) e até para a produção de vassouras (sorgo vassoura) (MAY et al., 2014).

O sorgo é uma gramínea originária do continente africano, pertencente à família Poaceae (CABRAL et al., 2013) de origem tropical e possui preferência por regiões de clima quente para seu desenvolvimento. No Brasil, ele é cultivado em regiões cujas temperaturas médias estão acima de 20°C. O sorgo é uma planta que se adapta a vários tipos de solos,

como solos heteromórficos, latossolos e até solos aluviais, mas não apresenta boa adaptação em solos com acidez elevada e alumínio tóxico (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008). É também uma cultura que possui alta eficiência fotossintética, ou seja, usa o ciclo C4, a forma mais eficiente de fotossíntese, possui resistência à seca, salinidade, alcalinidade, e não tem muitas exigências quanto à fertilidade (KORADIYA et al., 2016; MATSAKAS e CHRISTAKOPOULOS, 2013).

O sorgo é uma cultura energética promissora, pois tanto o suco como o bagaço podem ser utilizados como fonte de açúcares (KORADIYA et al., 2016; MATSAKAS e CHRISTAKOPOULOS, 2013). Esta planta possui um curto tempo de cultivo, de três a cinco meses (150 a 180 dias) e pode ser facilmente cultivado entre culturas principais, como soja e cana-de-açúcar (KORADIYA et al., 2016; MATSAKAS e CHRISTAKOPOULOS, 2013). O sorgo permite uma operação de implantação totalmente mecanizável, pois sua propagação é realizada por sementes e podem ser utilizados os mesmos equipamentos de plantio, cultivo e colheita utilizados para culturas de grãos como soja, arroz e trigo. Além disso, seu manejo inicial é facilitado devido ao desenvolvimento vigoroso e rápido das plantas em ambientes tropicais, principalmente em regiões com elevadas temperaturas diurnas e noturnas (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008).

O sorgo biomassa é um tipo de sorgo que apresenta como característica a alta produção de biomassa por hectare. Algumas variedades deste sorgo apresentam porte de cinco metros de altura e potencial para produzirem mais de 50 t/ha de matéria seca por ciclo médio semestral (Figura 13) (MAY et al., 2014). Visando atender essa demanda por biomassa, o programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu híbridos de sorgo biomassa sensíveis ao fotoperíodo. O sorgo sensível ao fotoperíodo é uma planta de dias curtos, que floresce em períodos do ano com noites longas. Dessa forma, se o dia for longo, a planta não floresce, enquanto se o dia for curto, menor que 12 horas e 20 minutos, ocorrerá a indução floral e a planta florescerá. Assim, os cultivares de sorgo biomassa sensíveis ao fotoperíodo que forem cultivados em épocas do ano e regiões cujo fotoperíodo seja maior que 12 horas e 20 minutos, tardarão o desenvolvimento da gema floral, ampliando o ciclo vegetativo, possibilitando maior produção de biomassa por hectare/ciclo em comparação a cultivares insensíveis ao fotoperíodo (PARRELA et al., 2011). Dessa forma, a produção de cultivares com elevados teores de biomassa tornou-se promissora para a produção de etanol celulósico (PARRELA et al., 2011).

Figura 13 - Vista lateral de uma lavoura comercial de sorgo biomassa em florescimento.



Fonte: May et al., 2015.

Além da alta produtividade de biomassa, o sorgo biomassa é uma cultura que apresenta em sua composição baixo teor de lignina e maior conteúdo em hemiceluloses (15 a 25%), o que torna uma cultura promissora para a produção de etanol de segunda geração, pois a lignina, que confere maior recalcitrância à biomassa, está presente em menor quantidade (MAY et al., 2014). Uma das etapas mais caras na produção de etanol de segunda geração é, além da produção de enzimas para hidrólise, o pré-tratamento, para reduzir a interação entre os carboidratos da parede celular e a lignina (MOONEY et al., 1998; SIMS et al., 2010). Dessa forma, têm-se buscado o desenvolvimento de cultivares de sorgo biomassa com menor teor de lignina por meio da manipulação de genes (DAMASCENO et al., 2012).

1.9 Fermentação em Estado Sólido (FES)

O método utilizado para produção de enzimas por microrganismos é a fermentação, onde se faz o uso de um substrato que fornecerá os nutrientes necessários para o crescimento microbiano e indução na produção enzimática, sob condições ótimas e controladas de temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio. A fermentação submersa é definida como a fermentação em estado líquido. Quase todas as produções em larga escala de produção de enzimas utilizam a tecnologia da fermentação submersa devido ao melhor monitoramento e fácil manuseio (SINGHANIA et al., 2010). Já a fermentação em estado sólido (FES) é

definida como a fermentação envolvendo sólidos na ausência (ou quase ausência) de água livre (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2010).

A fermentação submersa (FSm) apresenta uma desvantagem que está associada à baixa concentração de produtos finais, sendo necessárias etapas de purificação, o que resulta em processos adicionais, contribuindo para o aumento no custo de produção de enzimas. Devido a essa inconveniência, pesquisadores estão estudando como melhorar a produção de enzimas, bem como reduzir os custos (DHILLON et al., 2012; FLODMAN e NOUREDDINI, 2013; KUMAR et al., 2011). Uma das soluções é o uso da fermentação em estado sólido (FES) como uma rota de produção alternativa para várias enzimas industriais, como as celulases, devido à semelhança às condições do habitat natural dos fungos filamentosos produtores de tais enzimas, elevando a taxa de produção em FES quando comparado à FSm (YOON et al., 2014).

A fermentação em estado sólido (FES) tem potencial para produção em larga escala e é realizada sem a presença de água livre, porém, com uma umidade suficiente para promover o crescimento de fungos no substrato. Neste caso, a produção das enzimas tem seu custo reduzido em cerca de 10 vezes quando comparado à produção por FSm (GUPTA e TUOHY, 2013; YOON et al., 2014). Algumas razões são: menor consumo de energia, emprego de substratos lignocelulósicos de baixo custo como resíduos agroindustriais e maior produtividade (YOON et al., 2014). Além disso, o extrato enzimático bruto contendo diferentes tipos de enzimas (ligninases, hemicelulases e celulases) pode ser utilizado diretamente na hidrólise do substrato lignocelulósico.

Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos são os microrganismos que têm recebido mais atenção nas pesquisas nessa área, pois apresentam melhor capacidade de crescimento nessas condições (BIANCHI et al., 2001). Os fungos, além de apresentarem boa adaptação neste tipo de meio, também possuem a capacidade de penetrar nos espaços inter e intragranulares, fixando-se no substrato através de suas hifas, ramificando-se e penetrando na parede celular do substrato pela ação das enzimas extracelulares secretadas por eles (BIANCHI et al., 2001).

Nesse processo, a composição do meio de fermentação, a duração da fermentação, pH, temperatura e teor de umidade podem afetar a produção de celulases e hemicelulases. O meio de fermentação consiste em fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, elementos traço e minerais. A celulose no substrato lignocelulósico atua como a fonte de carbono essencial para

a indução de celulases. Além disso, a produção de celulases e de biomassa fúngica também pode ser estimulada pela fonte de nitrogênio presente no meio (YOON et al., 2014).

O substrato deve ter algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo, através do aumento do grau de acessibilidade do microrganismo no meio, tais como porosidade, tamanho e formato das partículas. Com relação ao tamanho da partícula, quanto menor, maior a área superficial e consequentemente, maior grau de transformação pelos microrganismos. Tais partículas de substrato devem ter tamanho suficiente para permitir a circulação de ar e permitir a dissipação de gases e de calor produzido, os quais podem prejudicar o rendimento do processo. A porosidade, por sua vez, se refere à capacidade de absorção de água, que pode facilitar o transporte de enzimas e metabólitos entre o meio e o microrganismo. Dessa forma, para adequar o substrato, alguns processos podem ser empregados, como esmagamento, quebra, moagem e peneiramento do meio para adquirir a granulometria desejada; embebição, para regular o teor de umidade inicial do processo; processo de esterilização, visando eliminar possíveis contaminações; suplementação de nutrientes e correção de pH, visando condições ideais de crescimento microbiano (BIANCHI et al., 2001).

A duração da fermentação varia de acordo com a espécie fúngica. Além disso, pode ser necessária uma duração de fermentação diferente para que as diferentes celulases atinjam sua atividade máxima, já que possuem um sinergismo de ação. O pH normalmente é de difícil monitoramento na FES e é ajustado somente no início do processo. A temperatura é um parâmetro que depende do fungo utilizado. É desejável ainda que se faça a produção enzimática na temperatura ideal de crescimento do fungo (mesofílico ou termofílico), onde as enzimas mantêm sua estrutura tridimensional e consequentemente sua atividade enzimática (BIANCHI et al., 2001).

O teor de umidade também é um importante parâmetro a ser avaliado. Quando a umidade no meio está baixa, a solubilidade dos nutrientes é limitada e dificulta a efetiva absorção pelos fungos, afetando o crescimento microbiano e diminuindo, consequentemente, a produção de enzimas. Quando a umidade está demasiada alta, as partículas de substrato ficam rodeadas por uma espessa camada de água e tendem a se unir, diminuindo a porosidade do substrato, o que limita a difusão de ar entre as partículas, com consequente decréscimo de trocas gasosas, podendo ainda aumentar o risco de contaminação por bactérias (BIANCHI et al., 2001; YOON et al., 2014).

2 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de celulases e hemicelulases por *A. fumigatus* (SCBM6) e/ou *A. niger* (SCBM1), utilizando sorgo biomassa (SB) e farelo de trigo (FT) em diferentes proporções como fontes de carbono e variando as fontes de nitrogênio.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterização das fontes de carbono (SB e FT) quanto ao teor de celulose, hemiceluloses e lignina;
- Caracterização das fontes de nitrogênio (sulfato de amônia, ureia, peptona ou extrato de levedura) quanto ao teor deste elemento presente em suas moléculas e o pH da solução nutritiva utilizando as respectivas fontes;
- Escolha do melhor inóculo microbiano para a produção de enzimas por FES (*A. fumigatus*, *A. niger* ou ambos em co-cultivo), utilizando SB e FT, na proporção 1:1, como fontes de carbono e sulfato de amônia como fonte de nitrogênio;
- Escolha da melhor fonte de nitrogênio, utilizando SB como fonte de carbono e o microrganismo selecionado na etapa anterior;
- Escolha da melhor fonte de carbono (SB e/ou FT) em diferentes proporções, utilizando a melhor fonte de nitrogênio e o microrganismo escolhidos nas etapas anteriores.

3 Material e Métodos

3.1 Caracterização química das fontes de carbono

Amostras de sorgo biomassa (SB), da variedade LE 299 (melhorada geneticamente para aumento no teor de biomassa e sensível ao fotoperíodo com ciclo tardio e porte alto) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Juliano Brant Albuquerque, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). O farelo de trigo (FT) foi obtido de casas agropecuárias da cidade de Uberlândia, MG. Ambos os substratos foram lavados em água corrente para retirada do amido presente e posteriormente secos em estufa a 50°C.

Para a caracterização química do SB e FT, foram realizadas determinações dos teores de umidade, cinzas, Lignina Klason insolúvel e solúvel, holocelulose, celulose e hemiceluloses. Para FT o teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl (KJELDAHL, 1883).

3.1.1 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a norma TAPPI T264 OM-88. Para tanto, cerca de 2 g da fonte de carbono (SB ou FT) foram adicionadas a um cadinho e mantidas em estufa a 105°C, por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. A amostra foi então levada à estufa novamente por 1 hora, a 105°C. O procedimento de resfriamento e pesagem foi repetido até que a massa atingisse valor constante e que não diferisse por mais de 0,002 g. O teor de umidade foi determinado a partir da diferença do percentual entre a massa da amostra inicial e a massa da amostra após a secagem. A equação 1 exemplifica o cálculo do teor de umidade em porcentagem (%):

$$\text{Teor de umidade} = \frac{(MRAU - MRAS) \times 100}{MAU} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

- MRAU = massa do conjunto recipiente/ amostra úmida
- MRAS = massa do conjunto recipiente/ amostra seca
- MAU = massa da amostra úmida

3.1.2 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado de acordo com a norma TAPPI T211 OM-93, com pequenas modificações. Nesta metodologia, foi adicionado 1 g da amostra de substrato (SB ou FT) em um cadinho de porcelana previamente seco e pesado e o conjunto (cadinho + amostra) foi levado à mufla por 2 horas, a 800°C. Em seguida, o cadinho contendo a amostra calcinada foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. O conteúdo de cinzas foi calculado considerando a porcentagem de massa do resíduo calcinado em relação à massa inicial da amostra seca, de acordo com a equação 2 (%):

$$\text{Teor de cinzas totais} = \frac{\text{MRAC} - \text{MR}}{\text{MA}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- MRAC = massa do conjunto recipiente/amostra calcinada
- MR = massa do recipiente
- MA = massa da amostra

3.1.3 Teor de lignina

3.1.3.1 Teor de lignina Klason insolúvel

O teor de lignina Klason insolúvel em SB e FT foi determinado segundo a Norma TAPPI T222 OM-02. Pesou-se cerca de 0,7133 g (base seca) de SB livre de extrativos,

previamente moído (04 a 06 mm), e transferiu-se para um tubo autoclavável de 500 mL contendo 10,7 mL de solução de H₂SO₄ 72% (d = 1,6338 g/mL).

A mistura permaneceu em agitação por 2 horas. Após esse período, terminada a chamada fase de condensação, iniciou-se a etapa de hidrólise. Durante esta etapa, o ácido foi diluído a uma concentração de 3% (m/v) adicionando-se 400 mL de água destilada. Posteriormente, os tubos foram levados à autoclave a 121°C, por 1 hora. Após o término da hidrólise, iniciou-se a etapa de filtração a quente, em um funil de placa sinterizada do tipo ASTM 10-15M previamente seco a 105°C. O funil com o material insolúvel retido foi seco em estufa a 80°C por 24 horas e resfriado em dessecador, até atingir peso constante.

Após esse processo, o material insolúvel foi transferido a um cadiño previamente seco e tarado, e o conjunto cadiño/material insolúvel foi mantido a 525°C em mufla por 2 horas. Os cadiños foram então retirados e levados ao dessecador até atingirem peso constante. Esse procedimento foi realizado para desconsiderar a fração inorgânica insolúvel. Nesta etapa, considerou-se que toda a matéria orgânica perdida no processo de carbonização seria lignina insolúvel. O teor de lignina insolúvel foi determinado gravimetricamente e calculado segundo a equação 3 em porcentagem (%):

$$\text{Teor de lignina insolúvel} = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

- m_f = massa de lignina residual;
- m_i = massa inicial de amostra livre de umidade.

3.1.3.2 Teor de lignina Klason solúvel

A quantidade de lignina solubilizada em meio ácido, obtida através da determinação de lignina insolúvel, foi quantificada por espectroscopia na região do ultravioleta (UV), de acordo com a norma TAPPI T13M-54. As soluções para as análises foram preparadas diluindo o filtrado em água destilada até a concentração final de 0,05 mol.L⁻¹ de H₂SO₄. Uma solução de referência de concentração 0,05 mol.L⁻¹ foi preparada a partir da solução de H₂SO₄.

72%. Foram realizadas medidas de absorbância do filtrado nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm. A concentração de lignina Klason solúvel foi calculada de acordo com a equação 5:

$$C(g/L) = \frac{[(4,53 A_{215}) - A_{280}]}{300}$$

Equação 5

Onde:

- C (g.L^{-1}) = concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido.
- A_{215} = valor da absorbância a 215 nm.
- A_{280} = valor da absorbância a 280 nm.

Os valores de absorbância refletem a necessidade de se fazer uma correção para os compostos de furfural gerados durante a hidrólise, que podem interferir na medição da lignina solúvel. A absorbância em 280 nm corresponde à uma correção para os compostos de furfural, enquanto que a absorbância em 215 nm é uma medida da concentração de lignina solúvel. Assim, a equação 5 é resultante da resolução simultânea das equações:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L \quad \text{Equação 6}$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

- A_{280} = valor da absorbância a 280 nm
- A_{215} = valor da absorbância a 215 nm
- C_D = concentração dos carboidratos (g.L^{-1})
- C_L = concentração da lignina solúvel (g.L^{-1})

3.1.4 Conteúdo de holocelulose

Holocelulose é o termo empregado para designar os carboidratos totais presentes em uma célula vegetal. Ou seja, ela engloba os valores da celulose e dos demais carboidratos presentes na hemicelulose (MORAIS et al., 2010). Assim, a holocelulose é produto da deslignificação da biomassa lignocelulósica, onde resta um material constituído por celulose

e hemiceluloses. Este processo de deslignificação foi realizado pelo método descrito por Browning (BROWNING, 1967), em que utiliza o clorito de sódio (NaClO_2) e está baseado na reação entre lignina e dióxido de cloro (ClO_2), íon hipoclorito (ClO^-), produtos estes formados em reações redox de clorito (ClO^{2-}), em meio ácido segundo a equação 8:



Inicialmente, uma massa de 5 g de substrato (FT) foi colocada em um erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de água destilada. O frasco foi levado ao banho-maria a 75°C e a ele foram adicionados 2,0 mL de ácido acético (CH_3COOH) e 3,0 g de NaClO_2 . O erlenmeyer foi tampado para não ocorrer perdas de gás e foi mantido no banho por 1 hora. Após esse período, adicionou-se novamente 2,0 mL de CH_3COOH e 3,0 g de NaClO_2 . O processo foi repetido por duas vezes. A mistura foi então resfriada a 10°C, filtrada em funil de vidro sinterizado nº2, previamente seco e pesado. Em seguida, o filtrado foi lavado com água destilada a 5°C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído fosse igual ao da água utilizada na lavagem. O funil com o resíduo fibroso foi então seco em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para quantificar o rendimento da holocelulose. A equação 9 exemplifica o cálculo do teor de holocelulose em porcentagem (%):

$$\text{Teor de holocelulose} = \frac{\text{MFH} - \text{MF}}{\text{MA}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

- MFH = massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa
- MF = massa do funil limpo e seco
- MA = massa da amostra

3.1.5 Teor de α -celulose

Segundo a norma TAPPI T203 cm-99 (2009), α -celulose é a celulose não degradada, β -celulose é a celulose degradada e γ -celulose representa, principalmente, hemiceluloses (MORAIS et al., 2010). Experimentalmente, a α -celulose não se dissolve em soluções alcalinas e pode ser determinada através da extração sucessiva da holocelulose (preparada pelo método do clorito ácido com hidróxido de potássio - KOH 5 e 24%), resultando em valores que, se somados, representam a fração de hemiceluloses, sendo que o resíduo fibroso após as duas extrações é designado α -celulose (BROWNING, 1967).

Assim, 3 g de holocelulose seca foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL, onde adicionou-se 100 mL de solução de KOH 5% e fez-se uma atmosfera inerte pelo borbulhamento de gás nitrogênio no frasco, por cinco minutos, a fim de evitar a oxidação da celulose. O frasco foi tampado para preservar a atmosfera inerte e mantido em agitação por duas horas. A mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado n°2, lavada com 50 mL de solução de KOH (5%) e, em seguida, com 100 mL de água destilada. O resíduo fibroso retido no funil foi transferido para o erlenmeyer e o procedimento de extração foi repetido utilizando solução de KOH 24%. Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25 mL de solução de KOH 24%, 50 mL de água destilada, 25 mL de CH₃COOH 10% e novamente 100 mL de água destilada. Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de KOH, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. Posteriormente, o resíduo foi lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 ± 3°C por 6 horas e pesado. O conteúdo de α -celulose foi determinado como a porcentagem da massa de resíduo em relação à massa inicial de amostra seca, levando em consideração o rendimento calculado na obtenção da holocelulose. A equação 10 exemplifica o cálculo do teor de α -celulose em porcentagem (%):

$$\text{Teor de } \alpha\text{-celulose} = \frac{\text{MFA} - \text{MF}}{\text{MAH}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

- MFA = massa do funil somada à massa de α -celulose, após a secagem em estufa
- MF = massa do funil limpo e seco

- MAH = massa da amostra

3.1.6 Conteúdo de hemiceluloses

O conteúdo de hemiceluloses foi determinado como a porcentagem da diferença entre os teores de holocelulose e α -celulose em relação à massa inicial de amostra seca, considerando o rendimento calculado na obtenção da holocelulose.

3.1.7 Quantificação de celulose e hemiceluloses por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os teores de celulose e hemiceluloses em SB foram determinados pela técnica cromatográfica CLAE, onde os componentes analisados foram provenientes do filtrado obtido na determinação de lignina Klason insolúvel (item 3.1.3.1). Essa determinação foi realizada por meio da detecção dos seguintes compostos no hidrolisado: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental, da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com a colaboração do Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta.

As análises dos respectivos açúcares foram realizadas em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE), modelo SHIMADZU equipado com detector de índice de refração (RID-6A SHIMADZU) e coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm BIO-RAD). A mistura eluente foi composta de H_2SO_4 0,005 mol/L e o fluxo no qual o eluente foi bombeado para o sistema foi de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida em 45°C em um forno modelo CTO-10A SHIMADZU.

As condições cromatográficas para determinação dos ácidos orgânicos, FF e HMF foram iguais às utilizadas para determinação dos açúcares, porém, com uma modificação em relação ao tipo de detector utilizado para a quantificação dos compostos. Os ácidos e aldeídos foram detectados por um detector UV-Vis (SPD-10A SHIMADZU) operado em canal duplo, sendo que, para a determinação de ácidos, o comprimento de onda utilizado foi 210 nm e para determinação de FF e HMF, o comprimento de onda foi a 274 nm.

Após a quantificação dos compostos, as massas de celobiose e glicose foram

convertidas em quantidades de glicanas; as massas de xilose e arabinose em xilanás e arabinanas, respectivamente, e a massa de CH₃COOH convertida em grupos acetila. Além disso, os teores de HMF foram convertidos em glicanas e os de FF em xilanás, multiplicando-se a quantidade de HMF e FF pelos fatores de hidrólise 1,286 e 1,375, respectivamente. A conversão dos componentes do hidrolisado em celulose e hemiceluloses foi realizada de acordo com as equações 11 e 12, em porcentagem (%) de celulose e hemiceluloses, respectivamente (BAÊTA, 2016):

Equação 11:

$$\text{Celulose} = \frac{[(0,95 C_{celobiose}) + (0,9 C_{glicose}) + (3,52 C_{ácidoformico}) + (1,29 C_{HMF}) + V_{(H_2O+H_2SO_4)}]}{m_i} \times 100$$

Equação 12:

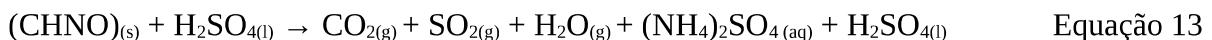
$$\text{Hemiceluloses} = \frac{[(0,88 C_{xilose}) + (0,88 C_{arabinose}) + (1,375 C_{furfural}) + V_{(H_2O+H_2SO_4)}]}{m_i} \times 100$$

3.1.8 Conteúdo de proteínas

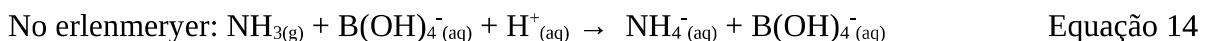
O farelo de trigo (FT) também foi analisado quanto ao teor de proteínas. Sabe-se que um requisito importante na fermentação em estado sólido (FES) é a relação entre carbono e nitrogênio no substrato e o farelo de trigo é geralmente bastante utilizado em FES em combinação com outras fontes de carbono por ser um bom indutor de enzimas do sistema celulolítico, devido ao seu alto teor de proteínas e consequentemente, ser considerado uma boa fonte de nitrogênio (BABU e SATYANARAYANA, 1996; BRIJWANI et al., 2010; CAMASSOLA e DILLON, 2007).

O conteúdo de proteínas em FT foi determinado através do método de Kjeldahl (KJELDAHL, 1883), que se baseia na determinação de nitrogênio total da amostra. Este método é realizado em três etapas, a digestão, destilação e titulação. Na digestão, a amostra foi tratada a quente na presença de H₂SO₄. O nitrogênio presente na amostra foi transformado em íons amônio (NH₄⁺) e os compostos orgânicos convertidos em CO₂ e H₂O. Uma mistura

catalítica composta por sulfato de potássio (K_2SO_4) e sulfato de cobre ($CuSO_4$) foi utilizada para elevar o ponto de ebulação e acelerar a reação, respectivamente. A reação que ocorre na digestão está esquematizada na equação 13.



Na destilação, basificou-se a amostra com hidróxido de sódio ($NaOH$) para a destilação da amônia (NH_3) formada, que foi arrastada pelo vapor no destilador de nitrogênio. O gás amônia liberado foi recolhido em ácido bórico (H_3BO_3), formando borato de amônia ($NH_4H_2BO_3$), como esquematizado na equação 14. O sal formado ($NH_4H_2BO_3$) foi então, titulado com ácido clorídrico (HCl) (Equação 15).



Para a digestão, 0,2 g de amostra foi pesada, embrulhada em papel manteiga e colocada nos tubos. 1 grama de mistura catalítica, composta por sulfato de potássio (K_2SO_4) e sulfato de cobre ($CuSO_4$) foi adicionada em cada tubo. Cerca de 4 mL de H_2SO_4 foram adicionados aos tubos e mantidos na placa digestora por 10 horas, a 300°C. Após esse período, foram adicionados 8 mL de água destilada, seguido de agitação. Os tubos foram levados ao destilador, onde foram acrescidos de 15 mL de $NaOH$ 50%. A reação ocorreu a quente, e o $NH_4H_2BO_3$ gerado foi coletado em erlenmeyers de 125 mL, onde continham 20 mL de H_3BO_3 e indicador misto, composto por vermelho de metila e verde de bromocresol. A titulação de $NH_4H_2BO_3$ foi realizado com HCl 0,06 N.

O cálculo para a determinação do teor de proteínas, em porcentagem, na amostra foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de proteínas} = \frac{N_{HCl} \times (V_{HCl} - V_B) \times f_{HCl} \times 1,4}{P_{\text{amostra}}} \times F_c \quad \text{Equação 16}$$

Onde:

N_{HCl} = normalidade do HCl

V_{HCl} = volume de HCl gasto na titulação

V_B = volume de HCl gasto na reação controle (branco)

f_{HCl} = fator de correção do HCl

$P_{amostra}$ = peso inicial da amostra

F_c (farelo de trigo) = 5,75

3.1.9 Análise elementar das fontes de carbono e nitrogênio

As fontes de carbono SB e FT e as fontes de nitrogênio peptona e extrato de levedura foram caracterizadas quanto à quantidade de carbono, hidrogênio e nitrogênio por Análise Elementar. As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em sulfato de amônia ($(NH_4)_2SO_4$) e ureia foram determinadas através de suas respectivas fórmulas moleculares. A técnica de Análise Elementar é baseada na combustão de massas conhecidas de amostra, em atmosfera de oxigênio puro e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector de condutividade térmica. Para essa caracterização foram pesados cerca de 2 g de cada amostra, onde foram quantificados em um Analisador Elementar PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer. As fontes de nitrogênio também foram caracterizadas quanto ao pH das soluções salinas contendo as respectivas fontes.

3.2 Microrganismos

A produção de enzimas foi realizada por FES utilizando como inóculos os fungos *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 (ambos mesofílicos, com crescimento ótimo a 30°C). Tais linhagens fúngicas foram previamente isoladas de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar (SCB) (Usina Alvorada, Araporã, MG), identificadas em nível de espécie por sequenciamento gênico da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossômico (SANTOS et al., 2015) e armazenadas em água ultrapura (Milli-Q) estéril à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia Ambiental, Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC-UFU). As linhagens *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 foram também mantidas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud estéril a 30°C.

3.3 Preparo do substrato

Os substratos utilizados na FES foram sorgo biomassa - SB (variedade LE 299) e farelo de trigo - FT (obtido de casas agropecuárias da cidade de Uberlândia, MG). Ambos os substratos foram lavados em água corrente para a retirada do amido residual presente e posteriormente secos em estufa a 50°C. SB foi triturado para diminuição do tamanho da partícula até cerca de 5 mm de diâmetro. Ambos os substratos foram armazenados em ambiente seco e temperatura ambiente para posterior utilização.

3.4 Fermentação em estado sólido (FES)

3.4.1 Seleção do microrganismo

Três etapas de experimentos foram realizadas. Na primeira etapa, foram realizadas três fermentações, utilizando como fonte de carbono sorgo biomassa - SB (LE 299) e farelo de trigo (FT), na proporção de 1:1 e sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,50% como fonte de nitrogênio. Esta etapa teve por finalidade escolher o melhor inóculo microbiano para produção de celulases e hemicelulases.

Como inóculos, na fermentação 1 foi utilizado somente *A. niger* SCBM1 e na fermentação 2 somente *A. fumigatus* SCBM6. Na fermentação 3, cultivou-se ambas as linhagens fúngicas em associação (crescimento em co-cultivo ou consórcio microbiano). Os microrganismos em crescimento na placa de Petri, após atingirem um estágio completamente esporulado foram utilizados como inóculos na FES. Para tanto, cinco discos miceliais de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados do meio de cultura. Nas FES utilizando os microrganismos em co-cultivo, três discos miceliais de cada linhagem foram inoculados. Fermentações de 14 dias foram realizadas na primeira etapa de experimentos, enquanto fermentações de 7 dias foram realizadas nas etapas 2 e 3.

3.4.2 Seleção da fonte de nitrogênio

Selecionado o microrganismo, partiu-se para a realização da segunda etapa de experimentos, que consistiu em avaliar a melhor fonte de nitrogênio na concentração de

0,5%, utilizando 5 g de SB como única fonte de carbono. As fontes de nitrogênio utilizadas foram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ureia, peptona e extrato de levedura, todas na concentração de 0,5%.

3.4.3 Seleção da fonte de carbono

Na terceira etapa, foram realizadas fermentações variando as fontes de carbono (SB e FT em diferentes proporções) e mantendo o inóculo e a fonte de nitrogênio selecionados nas etapas anteriores. SB e FT foram utilizados nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1, respectivamente. As FES foram conduzidas em frascos tipo erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato (SB e/ou FT) e 5 mL de solução nutritiva estéril (75% de umidade) contendo 0,5% da fonte de nitrogênio, 0,3% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 0,05% de cloreto de cálcio (CaCl_2) (MORETTI et al., 2012). Os frascos contendo o substrato e a solução nutritiva estéril foram vedados e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com cinco discos miceliais de 0,5 cm de diâmetro do inóculo microbiano escolhido na etapa 1 e o volume final da solução foi completado até 20 mL (MORETTI et al., 2012). As fermentações foram conduzidas em câmara incubadora por 14 dias, a 30°C em duplicatas.

3.5 Extração enzimática

Para as fermentações em que foram utilizados como inóculos *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 separadamente (fermentações 1 e 2), foram realizadas extrações, para obtenção do extrato enzimático bruto, a cada 48 horas. Para a FES em co-cultivo (fermentação 3) a extração foi realizada a cada 24 horas. Nas demais etapas, foram empregadas extrações a cada 24 horas.

Para a extração, 50 mL de água destilada foram adicionados em cada frasco, seguido de agitação manual por 5 minutos. Posteriormente, os frascos foram homogeneizados por 1 hora em agitador a 200 rpm à temperatura ambiente. As amostras foram filtradas em tecido tipo *vual* e centrifugadas a 14534 rcf (10000 rpm) por 10 minutos. Os extratos foram novamente filtrados em papel de filtro e estocados a -20°C. As dosagens enzimáticas foram realizadas em duplicatas para cada extração de cada frasco de fermentação, ou seja, foram realizados quatro ensaios por dia de fermentação.

3.6 Dosagem de celulases

As celulases avaliadas foram β -glicosidase, carboximetilcelulase (endoglucanase) e avicelase (exoglucanase). A atividade de β -glicosidase foi quantificada a 40°C utilizando uma mistura de reação contendo 50 μ L de extrato enzimático bruto, 250 μ L de solução tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹, pH 4,5 e 250 μ L de ρ -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma) como substrato. A reação ocorreu por 10 minutos e foi interrompida pela adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2 mol.L⁻¹. A concentração de ρ -nitrofenol (ρ NP) liberado foi determinada por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ρ NP por minuto de reação, a partir da curva padrão de ρ NP (BAFFI et al., 2011).

As atividades de carboximetilcelulase (CMCase) e avicelase (exoglucanase) foram quantificadas pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), em que foi preparada uma mistura de reação contendo 30 μ L do extrato enzimático, 270 μ L de carboximetilcelulose (CMC) ou avicel (Sigma-Aldrich), ambos a 1% (como substratos, respectivamente) em tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹, pH 4,5 (MILLER, 1959, com pequenas modificações). A reação foi conduzida a 40°C por 10 minutos e foi interrompida pela adição de 300 μ L de DNS (RODRIGUES et al., 2017). O volume final foi fervido por 10 minutos e acrescido de 2400 μ L de água destilada. A quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto de reação, determinado a partir de curva padrão de glicose. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas.

3.7 Dosagem de hemicelulases

As hemicelulases avaliadas foram xilanase e β -xilosidase. A atividade de β -xilosidase foi determinada pelo mesmo procedimento realizado para β -glicosidase, porém utilizando ρ -nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma) como substrato (dos SANTOS et al., 2015). A atividade de xilanase foi quantificada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), utilizando o mesmo método realizado para carboximetilcelulase e avicelase, porém, utilizando xilana 1% (Sigma-Aldrich) como substrato (RODRIGUES et al., 2017).

3.8 Dosagem de celulase total (FPase)

A atividade de celulases totais por unidades de papel de filtro (FPU) foi determinada nos extratos a 50°C utilizando uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8, 0,5 mL de extrato enzimático e uma fita de papel de filtro de 1 cm de largura por 6 cm de comprimento, pesando aproximadamente 50 mg (GHOSE, 1987). A reação ocorreu por 60 minutos e após esse período, foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS e o volume final foi homogeneizado e levado ao banho de ebulição por 5 minutos. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram levados ao banho de gelo e adicionados de 20 mL de água destilada e homogeneizados. Após 20 minutos, o papel de filtro foi macerado com bastão de vidro. A quantidade de glicose liberada foi medida a 540 nm.

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização química das fontes de carbono

A caracterização química da biomassa oferece informações a respeito da composição em celulose, hemiceluloses e lignina na parede celular. Sabe-se que as enzimas hidrolíticas têm natureza indutível, sendo fortemente influenciadas pelos constituintes do meio, ou seja, pelas fontes de carbono (CHINEDU et al., 2008; TIWARI et al., 2015). Tais enzimas são induzidas por seus substratos e a celulose foi reconhecida como o melhor indutor para o complexo de celulases (JUN et al., 2013; RYU e MANDELS, 1980). Assim, o conhecimento da natureza do material lignocelulósico, bem como a composição da biomassa é de extremo interesse para direcionar na escolha da fonte de carbono, de forma a induzir a produção de enzimas hemi- e celulolíticas. Os valores obtidos após a caracterização de ambas as fontes de carbono (sorgo biomassa - SB e farelo de trigo - FT) estão apresentados na Tabela 1 (teores de umidade, cinzas, proteínas, carbono, nitrogênio, celulose, hemiceluloses e lignina).

Tabela 1- Composição química das fontes de carbono.

Componentes	Composição %	
	SB	FT
Teor de Umidade	3,75	9,4
Cinzas	4,10	1,76
Proteínas	-	18,0
Carbono	42,63	45,11
Nitrogênio	0,84	3,69
Celulose	39,80	25,41
Hemiceluloses	24,94	26,95
Lignina Klason	21,72	25,77

Fonte: a autora.

Os resultados obtidos na caracterização química indicam que sorgo biomassa (SB) apresentou 39,80% de celulose, 24,94% de hemiceluloses e 21,72% de lignina na composição de sua parede celular, sugerindo ser um substrato bastante promissor para a produção de celulases. O farelo de trigo (FT) apresentou quantidades equivalentes de celulose (25,41%) e

hemiceluloses (26,95%) e 18,0% em proteínas. Ambas as fontes de carbono apresentaram teores equivalentes e elevados de carbono e podem ser consideradas boas fontes indutoras para o crescimento e desenvolvimento celular de microrganismos.

4.2 Caracterização química das fontes de nitrogênio

Valores muito elevados ou muito baixos de pH podem causar instabilidade nas enzimas, alterando a sua atividade. Essa instabilidade é devido ao fato de que essas proteínas podem sofrer desnaturação em pHs extremos com consequente alteração da sua conformação, devido às alterações das cargas das respectivas resíduos de aminoácidos que as constituem (ABUBAKAR e OLOYEDE, 2013). Todas as fontes de nitrogênio apresentaram caráter ácido, com valores de pH entre 5,0 e 6,0 (Tabela 2). Mrudula e Murugammal (2011) realizaram estudo com *A. niger* em substrato de resíduos de coco e obtiveram máximas produções de CMCCase e FPase em pH de 5,0 – 6,0. Abubakar e Oloyede (2013), em seu trabalho de produção de celulases por *A. niger* com casca de laranja, farelo de arroz e carboximetilcelulose como substratos e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e de extrato de levedura como fontes de nitrogênio, obtiveram atividades máximas em pH 3,0 com farelo de arroz e pH 4,0 em casca de laranja e CMC como substratos. Tiwari et al. (2015), em estudos com *A. niger* SH3 para produção de endoglucanase, FPase, β -glicosidase e xilanase em substrato de palha de trigo e farelo de trigo, demonstraram que este microrganismo também apresentou uma produção de enzimas aumentada em pHs ácidos, e suas respectivas atividades começaram a sofrer uma queda a partir de pH 6,0. Com base nesses dados, concluiu-se que a faixa de pH utilizada no presente trabalho encontra-se adequada para a produção de enzimas hemi- e celulolíticas pelos microrganismos estudados.

Tabela 2 - Valores de pH das soluções salinas contendo as fontes de nitrogênio.

Fonte de nitrogênio na solução salina	pH
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,00
Ureia	6,01
Peptona	6,05
Extrato de levedura	5,68

Fonte: a autora.

Os resultados quanto à composição química das fontes de nitrogênio indicaram que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ureia apresentaram maiores quantidades de nitrogênio em sua composição molecular do que peptona e extrato de levedura (Tabela 3). Os fungos são capazes de utilizar íons amônio do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e assimilar na forma de glutamato e glutamina. A ureia é degradada em amônia, que é utilizada para sintetizar novos compostos nitrogenados (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). A peptona é derivada de leite, carne animal ou soja que são digeridas por enzimas proteolíticas que contém pequenos peptídeos, gorduras, metais, sais, vitaminas e outros compostos biológicos. Ela é amplamente utilizada como fator de crescimento para fungos. O extrato de levedura, por sua vez, é um extrato solúvel em água de células de levedura autolisadas, composto por aminoácidos, peptídeos, vitaminas, sais inorgânicos e carbono (LI et al., 2017).

Apesar da menor porcentagem de nitrogênio encontrada, peptona e extrato de levedura oferecem fatores de crescimento adicionais às fontes, como vitaminas e sais minerais, aminoácidos e peptídeos. Alguns estudos têm sugerido que peptona e extrato de levedura são melhores indutores na produção de enzimas do que outras fontes (AKHILESH et al., 2010; DONG et al., 2005; JUWON e EMMANUEL, 2012; SASI et al., 2010; VAHIDI et al., 2004). Esses dados indicam que, nestas fontes de nitrogênio complexas, durante o crescimento e a produção de enzimas, os fungos hidrolisam o nitrogênio orgânico liberando seu componente mineral e outros fatores de crescimento, em componentes que podem ser facilmente incorporados no metabolismo celular (JUWON e EMMANUEL, 2012). Além disso, a presença de sais minerais, vitaminas e hidrolisados de proteínas podem favorecer o crescimento celular de fungos gerando, consequentemente, maior produção enzimática pelos microrganismos suplementados por estas fontes nitrogenadas complexas (ALTERTHUMM, 2001).

Tabela 3 - Composição em carbono, hidrogênio e nitrogênio das fontes de nitrogênio.

Amostra	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	3,02	21,18
Ureia	19,98	6,66	46,62
Peptona	41,75	6,99	13,32
Extrato de levedura	38,36	6,72	10,78

Fonte: a autora.

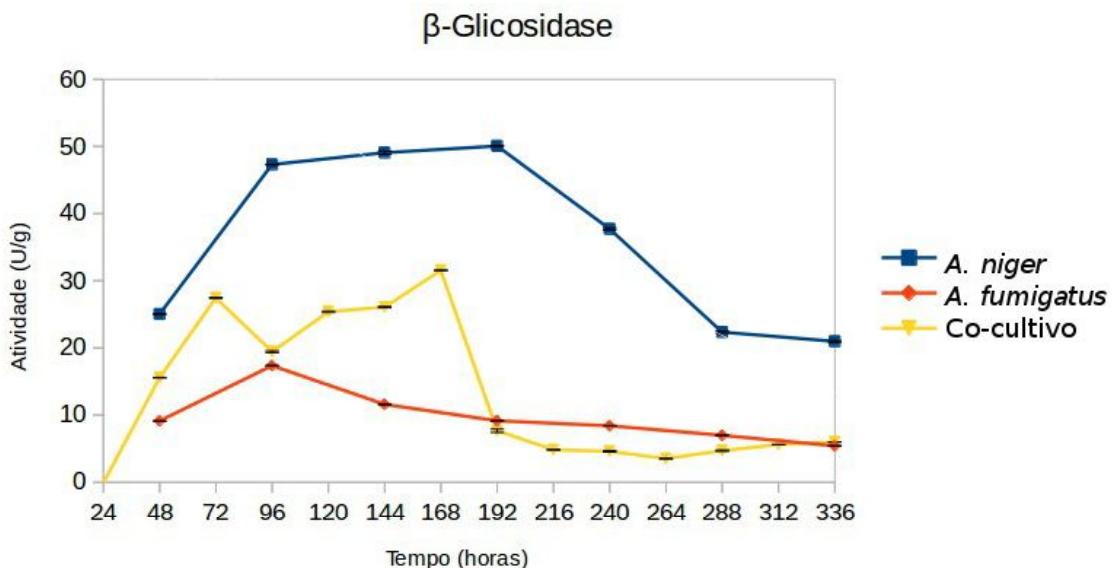
4.3 Produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido

4.3.1 Seleção do microrganismo

Nesta etapa, a produção de celulases e hemicelulases em função do tempo foi avaliada por 14 dias, nas três fermentações. Nas fermentações 1 e 2, fez-se extração enzimática a cada 48 horas, enquanto na fermentação 3, a extração foi realizada a cada 24 horas.

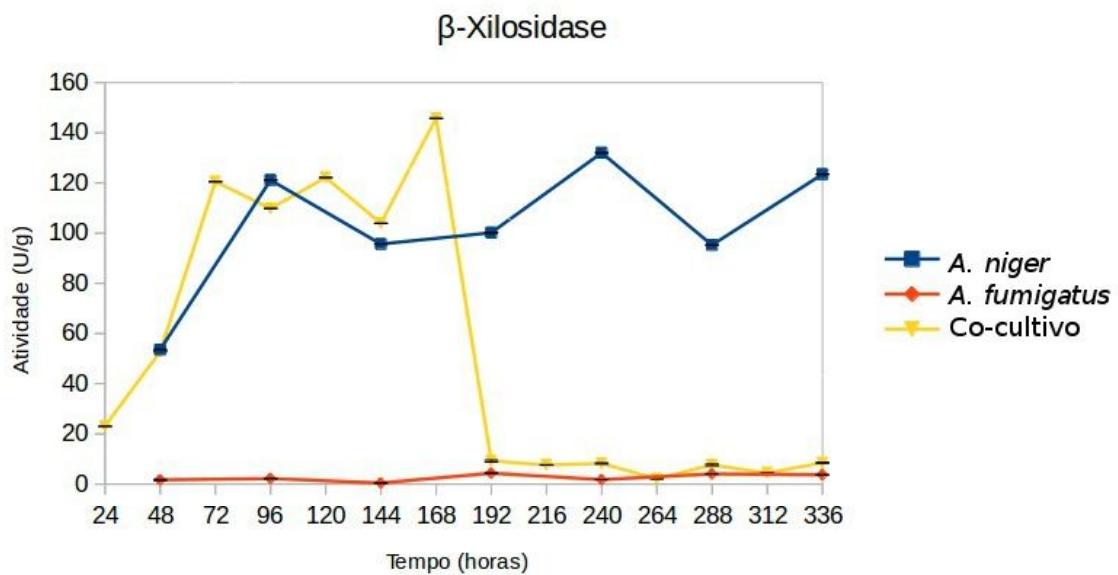
Foram realizadas dosagens enzimáticas para as celulases β -glicosidase, avicelase e carboximetilcelulase e para as hemicelulases β -xilosidase e xilanase. Para β -glicosidase, a maior produção foi observada na Fermentação 1, na qual *A. niger* SCBM1 foi utilizado como inóculo, com valores de atividades muito próximos entre 96 e 192 horas de fermentação e pico (50,06 U/g) em 192 horas de cultivo (Figura 14). Para β -xilosidase, observou-se maior produção enzimática (145,75 U/g) na fermentação em consórcio (fermentação 3), em 168 horas de cultivo (Figura 15). Níveis próximos dessa enzima (121,0 U/g) foram obtidos quando *A. niger* SCBM1 foi empregado como inóculo (fermentação 1), porém em um tempo mais curto de cultivo (96 horas de fermentação) (Figura 17). Para xilanase, o pico de produção (137,80 U/g) também foi observado na FES utilizando ambos os fungos consorciados em 312 horas de fermentação (Figura 16). Para avicelase (exoglucanase), a maior produção foi observada na Fermentação 2, na qual *A. fumigatus* SCBM6 foi utilizado como inóculo, com pico de produção (15,69 U/g) em 192 horas (Figura 17). Para CMCCase (endoglucanase), a produção máxima foi observada na FES em co-cultivo de ambas as linhagens (Fermentação 3), com 66,88 U/g em 312 horas de fermentação (Figura 18).

Figura 14 - Produção de β -glicosidase por *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



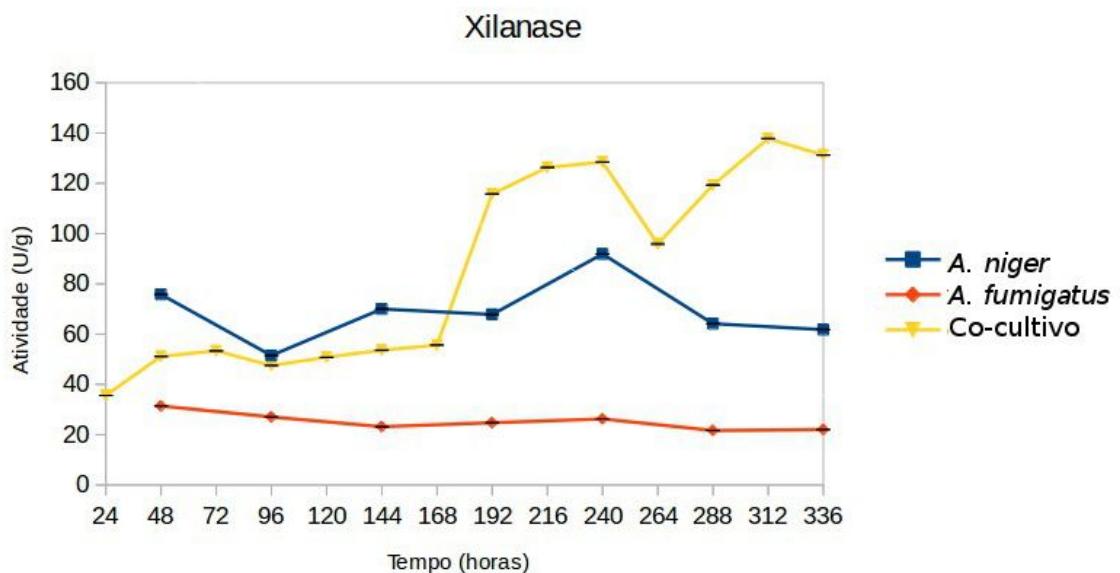
Fonte: a autora.

Figura 15 - Produção de β -xilosidase por *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



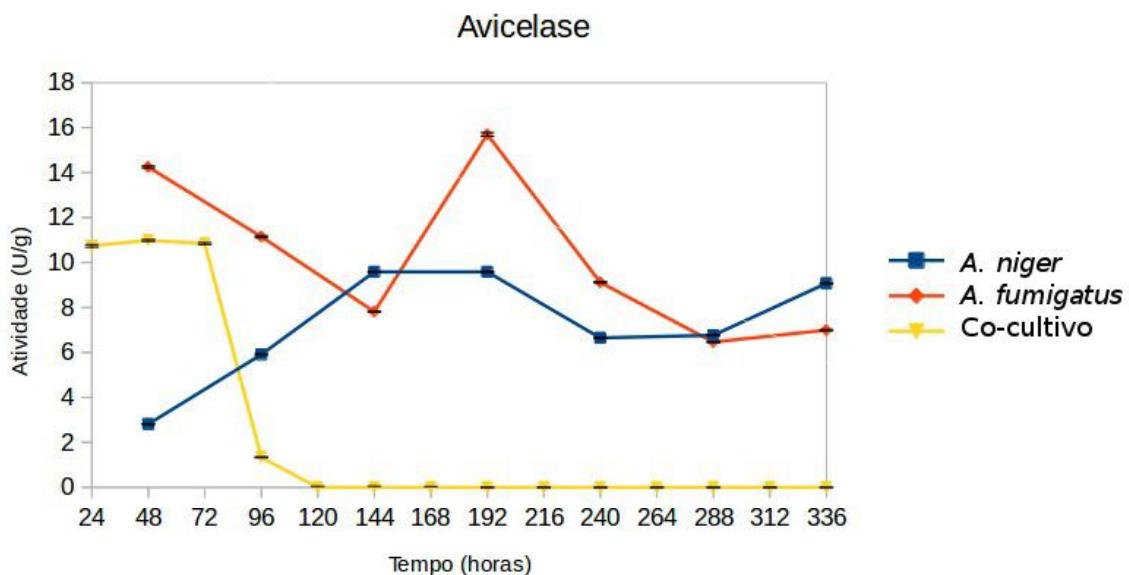
Fonte: a autora.

Figura 16 - Produção de xilanase por *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



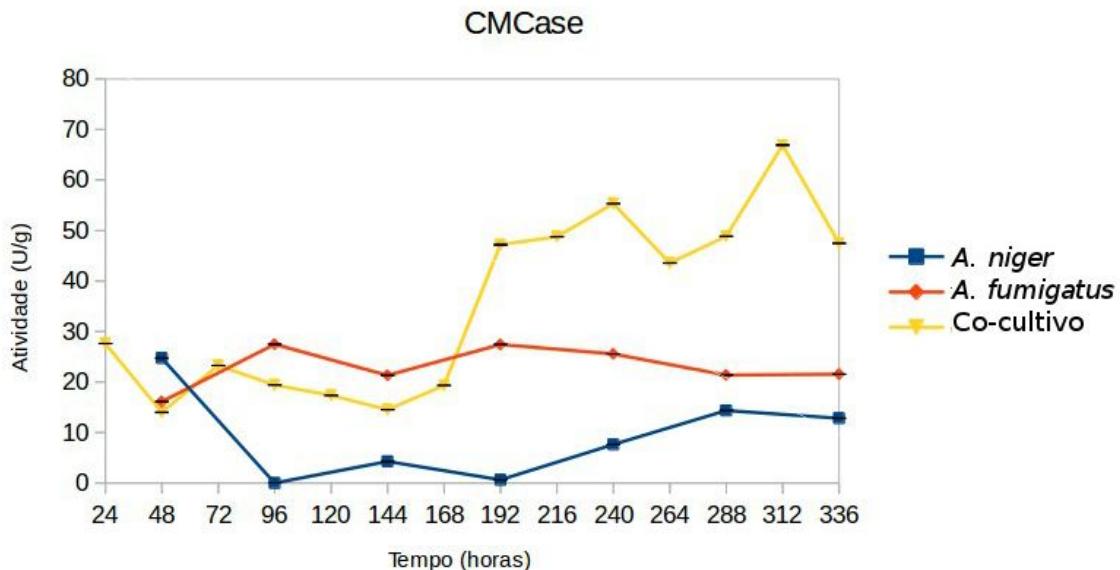
Fonte: a autora.

Figura 17 - Produção de avicelase por *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



Fonte: a autora.

Figura 18 - Produção de CMCase por *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e co-cultivo por FES. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p < 0,05$.



Fonte: a autora.

Os resultados obtidos indicam que as fermentações utilizando *A. niger* SCBM1 e *A. fumigatus* SCBM6 em co-cultivo produziram níveis mais elevados da maioria das enzimas analisadas, porém, somente após 7 dias de fermentação (Tabela 4). O tempo de produção de enzimas é um fator de grande importância econômica quando se analisa sua produção em grande escala voltada para a comercialização das mesmas. Um maior tempo de produção de enzimas implica em maior gasto com energia para manter a fermentação, além do maior prazo necessário para disponibilizar o produto final para comercialização.

Dessa forma, analisando-se a produção de todas as enzimas nos tempos gastos para sua produção máxima, em cada microrganismo, observamos que *A. niger* SBCM1 produziu maiores níveis da maior parte das enzimas em um período de até 168 horas (7 dias de fermentação) (Tabela 5). Além disso, *A. niger* SCBM1 produziu maior quantidade de β -glicosidase em 144 e 192 horas de fermentação (49,06 e 50,06 U/g de atividade enzimática, respectivamente). A β -glicosidase é uma celulase que age hidrolisando a celobiose em glicose livre. Sua presença no meio é de grande importância para evitar o excesso de celobiose, que atua como inibidor competitivo de exoglucanases, limitando sua atividade na degradação de celulose. Dessa forma, *A. niger* SCBM1 foi o microrganismo escolhido para a etapa seguinte

para seleção da melhor fonte de nitrogênio e associações entre fontes de carbono na produção de enzimas, tanto pela elevada produção de β -glicosidase, bem como a boa produção das demais enzimas analisadas em um menor período de cultivo quando comparado às FES utilizando *A. fumigatus* ou co-cultivo de ambos como inóculos. Esta linhagem foi então submetida a novos experimentos de FES utilizando apenas sorgo biomassa (SB) como fonte de carbono e variando-se as fontes de nitrogênio.

Tabela 4 - Atividades máximas de celulases e hemicelulases encontradas (em U/g) no presente trabalho, pelo cultivo dos fungos em sorgo biomassa (SB) e farelo de trigo (FT) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, considerando o tempo total.

Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	β -glicosidase	β -xilosidase	Xilanase	CMCase	Avicelase
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	SB + FT (1:1)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50,06 192 h	132,02 240 h	91,89 240 h	24,73 48 h	9,58 144 h
<i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6	SB + FT (1:1)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	17,35 96 h	4,34 192 h	31,41 48 h	27,43 96 h	15,69 192 h
Co-cultivo	SB + FT (1:1)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31,54 168 h	145,75 168 h	137,80 312 h	66,88 312 h	10,98 48 h

Fonte: a autora.

Tabela 5 - Atividades máximas de celulases e hemicelulases encontradas (em U/g) em seus respectivos tempos de fermentação, até 168 horas (7 dias).

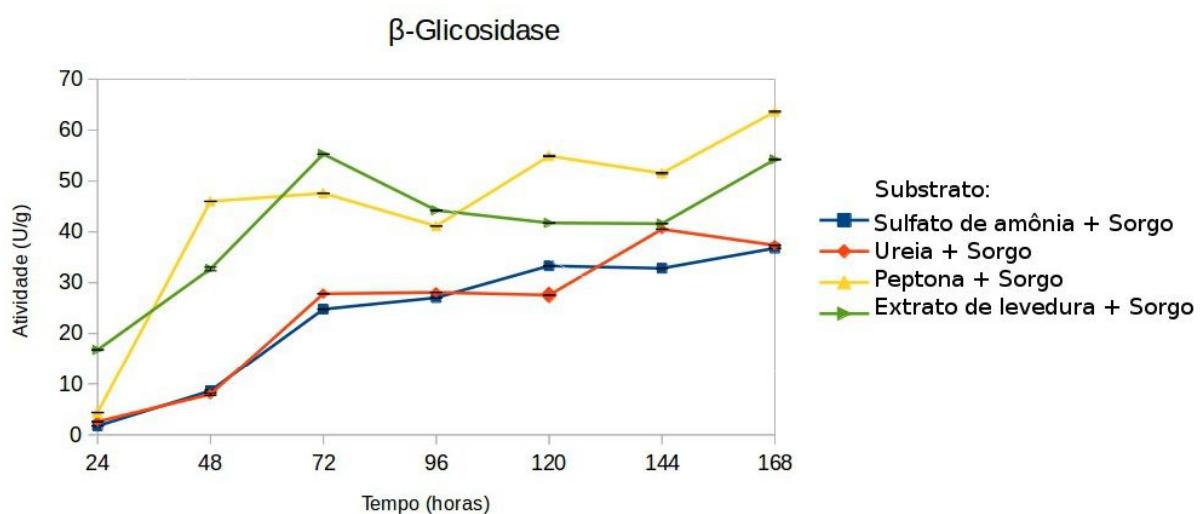
Microrganismo	β -glicosidase	β -xilosidase	Xilanase	CMCase	Avicelase
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	49,06 144 h	121,14 96 h	75,8 48 h	24,73 48 h	9,58 144 h
<i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6	17,35 96 h	2,20 96h	31,41 48 h	27,43 96 h	14,24 48 h
Co-cultivo	31,54 168 h	145,75 168 h	55,65 168 h	27,62 24 h	10,98 48 h

Fonte: a autora.

4.3.2 Seleção da fonte de nitrogênio

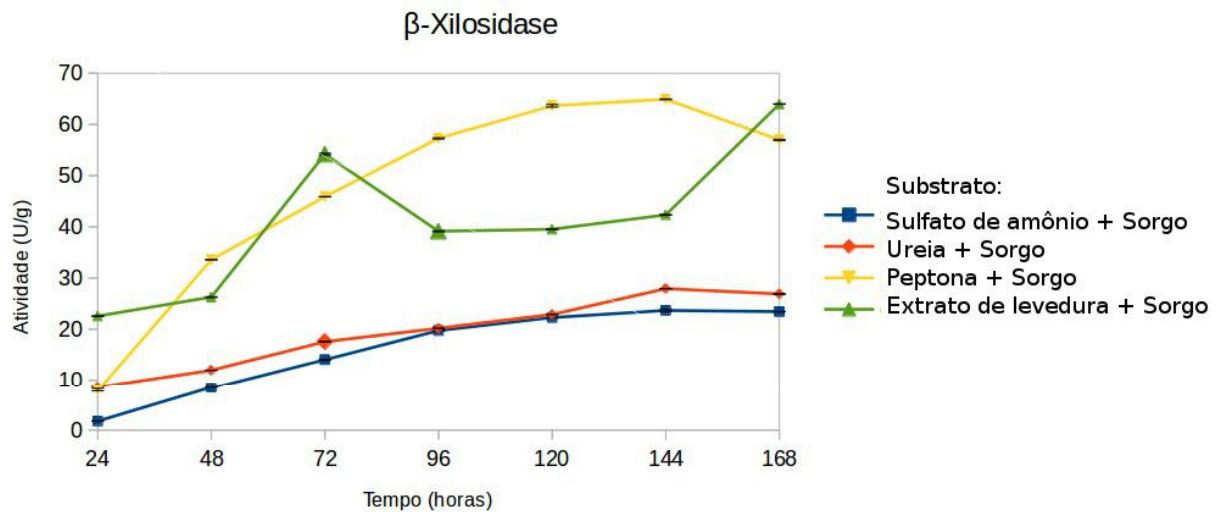
Nesta etapa, a maior produção de β -glicosidase por *A. niger* SCBM1 ocorreu quando peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio, com pico de atividade (63,61 U/g) em 168 horas de fermentação (Figura 19). No entanto, valores próximos de atividade foram também obtidos na FES utilizando extrato de levedura após 72 horas de cultivo (Figura 19). Para β -xilosidase, as melhores produções foram obtidas nas FES utilizando peptona e extrato de levedura, entre 120 – 144 e 168 horas de cultivo, (63,61, 64,88 e 63,95 U/g), respectivamente (Figura 20). As maiores taxas de atividade xilanásica também foram observadas em 72 horas na fermentação, utilizando peptona (300,07 U/g) e em 96 horas, na fermentação utilizando extrato de levedura, com pico de produção de 327,37 U/g (Figura 21). Porém, a produção de xilanase foi bastante similar entre 48 – 96 horas de cultivo em peptona (Figura 21). A produção de avicelase só foi observada na Fermentação 6 utilizando peptona como fonte de nitrogênio, com alta atividade mantendo-se em torno de 30 U/g entre 48 a 120 horas de fermentação (Figura 22). Para CMCcase, as fermentações utilizando peptona e extrato de levedura, mais uma vez apresentaram os melhores resultados, com atividades máximas (41,47 e 43,52 U/g) em 120 e em 168 horas, respectivamente (Figura 23).

Figura 19 - Produção de β -glicosidase por *A. niger* SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e $p<0,05$.



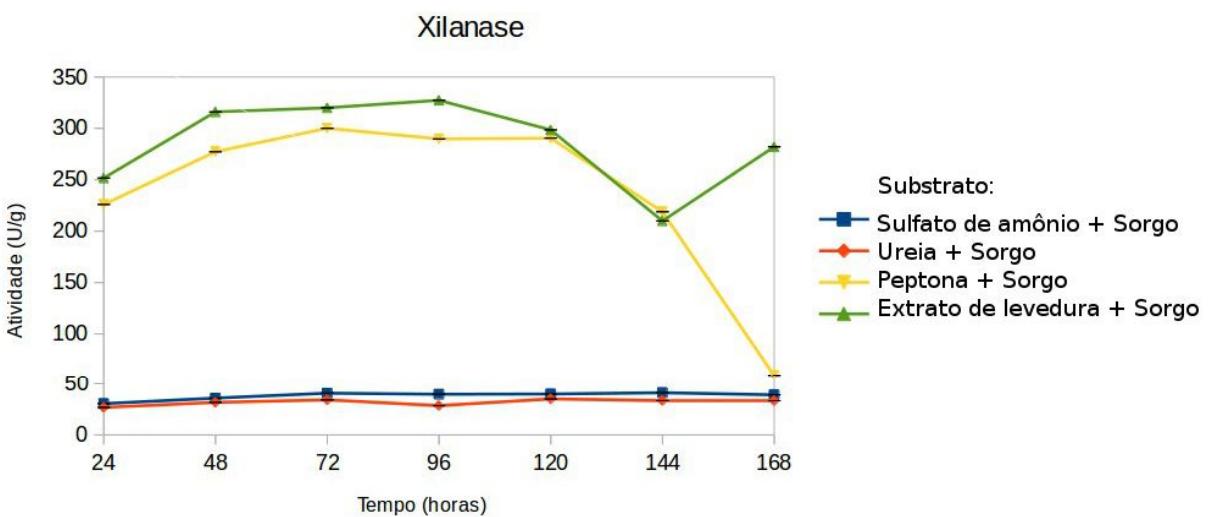
Fonte: a autora.

Figura 20 - Produção de β -xilosidase por *A. niger* SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



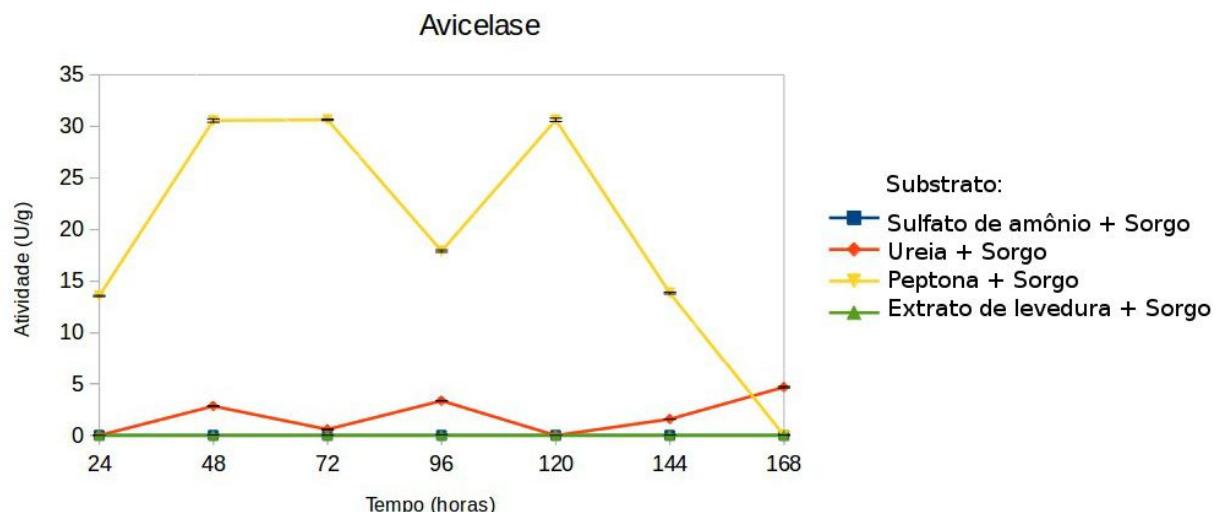
Fonte: a autora.

Figura 21 - Produção de xilanase por *A. niger* SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



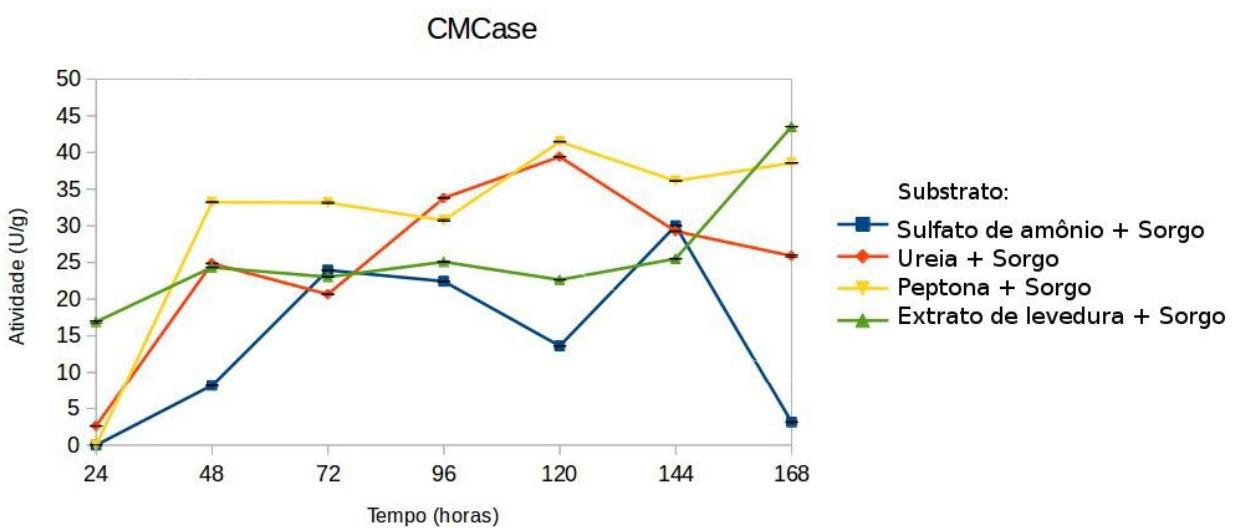
Fonte: a autora.

Figura 22 - Produção de avicelase por *A. niger* SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



Fonte: a autora.

Figura 23 - Produção de CMCase por *A. niger* SCBM1, por FES em sorgo biomassa como fonte de carbono e em variáveis fontes de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



Fonte: a autora.

Os resultados obtidos mostraram que ensaios utilizando peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio foram os que mais induziram a produção de todas as enzimas analisadas. Porém, somente na fermentação utilizando peptona houve produção significativa de avicelase (30,64 U/g), o que justificou a escolha dessa fonte de nitrogênio para a etapa posterior (escolha da melhor fonte de carbono).

Até o momento, não existem estudos na literatura utilizando sorgo biomassa como fonte de carbono para a produção de enzimas. Porém, existem autores pesquisando a influência das diferentes fontes de nitrogênio na produção de enzimas, com outras fontes de carbono como substratos. Sharma et al. (2015) estudaram a produção de enzimas por *A. niger* HN-1 por FES, usando resíduos de ervilha como fonte de carbono. Em seu trabalho, esses autores avaliaram três diferentes soluções na produção de enzimas: água destilada, solução mineral (na qual continha ureia como fonte de nitrogênio) e meio Mandel Weber, que continha sulfato de amônia e peptona como fontes de nitrogênio. Os resultados demonstraram que o meio Mandel Weber foi o que melhor induziu a produção de β -glicosidase, com cerca de 270 U/g de atividade enzimática. Pandey et al. (2016) avaliaram a produção de celulases e xilanase por *Rhizopus oryzae* SN5 por FES variando parâmetros como substrato, tamanho do inóculo, fonte de nitrogênio, pH e temperatura. Em seus resultados, utilizando palha de sorgo como fonte de carbono e cloreto de amônio (NH_4Cl) como fonte de nitrogênio, esses autores relataram uma produção máxima de xilanase de 226,2 U/g. No presente trabalho, o pico de produção para β -glicosidase foi 63,61 U/g, em meio suplementado com peptona. Para xilanase, as melhores atividades alcançadas foram em meio suplementado com peptona (300,07 U/g) e com extrato de levedura (327,37 U/g). Esses resultados indicaram que o sorgo biomassa associado à peptona como fonte de nitrogênio induziu melhor a produção de xilanase do que a palha de sorgo.

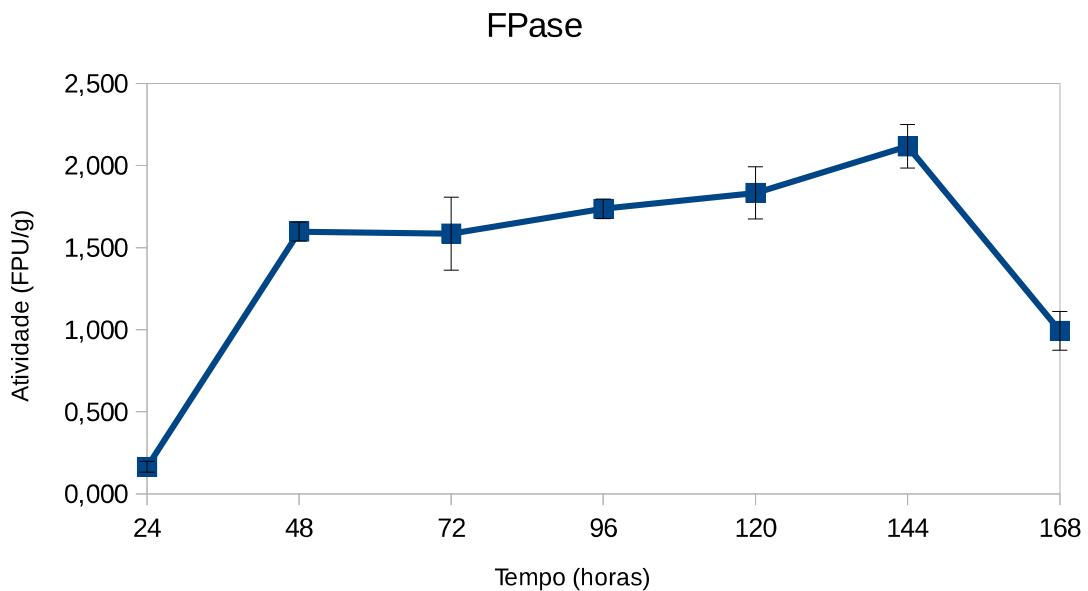
De acordo com os resultados obtidos na caracterização das fontes de nitrogênio (Tabela 3), pode-se notar que as fontes de nitrogênio orgânicas apresentam em sua composição menor teor de nitrogênio, porém, foram as que mais induziram produção de celulases e hemicelulases. Conforme citado anteriormente, isso se deve à presença de sais minerais, vitaminas e hidrolisados de proteínas em suas composições, o que favorece o crescimento celular e a maior indução na produção de enzimas nas fermentações conduzidas com peptona e extrato de levedura (ALTERTHUMM, 2001).

Kachlishvili et al. (2006) avaliaram o efeito das fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas em espécies de fungos de podridão branca e seus resultados mostraram que a

adição de peptona no meio estimulou o crescimento dos fungos e a produção de enzimas. Segundo esses autores, o efeito estimulante da peptona adicional sobre a indução de enzimas pode ser devido à produção de biomassa. Ilmén et al. (1997) também avaliaram a produção de celulases por *Trichoderma reesei* em meio suplementado com peptona e também sugeriram que seu efeito positivo no aumento da produção pode estar associado ao melhor crescimento do fungo com subsequente aumento nos níveis de celulases.

Após a escolha da melhor fonte de nitrogênio, a atividade de celulase total, medida em atividade de papel de filtro (FPase) também foi determinada na fermentação onde se utilizou apenas SB e peptona como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. A atividade de celulase total foi quantificada somente nesta fermentação, pois esta foi considerada a melhor condição de produção de celulases e hemicelulases como um todo e por isso foi a condição escolhida para estudos futuros de hidrólise enzimática, onde é necessário o conhecimento da medida em termos de FPase (PEREIRA et al., 2016). Nessa análise, obteve-se atividade máxima em 144 horas de fermentação, com 2,11 FPU/g (Figura 24).

Figura 24 - Atividade de FPase por FES por *A. niger* SCBM1 utilizando sorgo biomassa como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicatas e $p<0,05$.



Fonte: a autora.

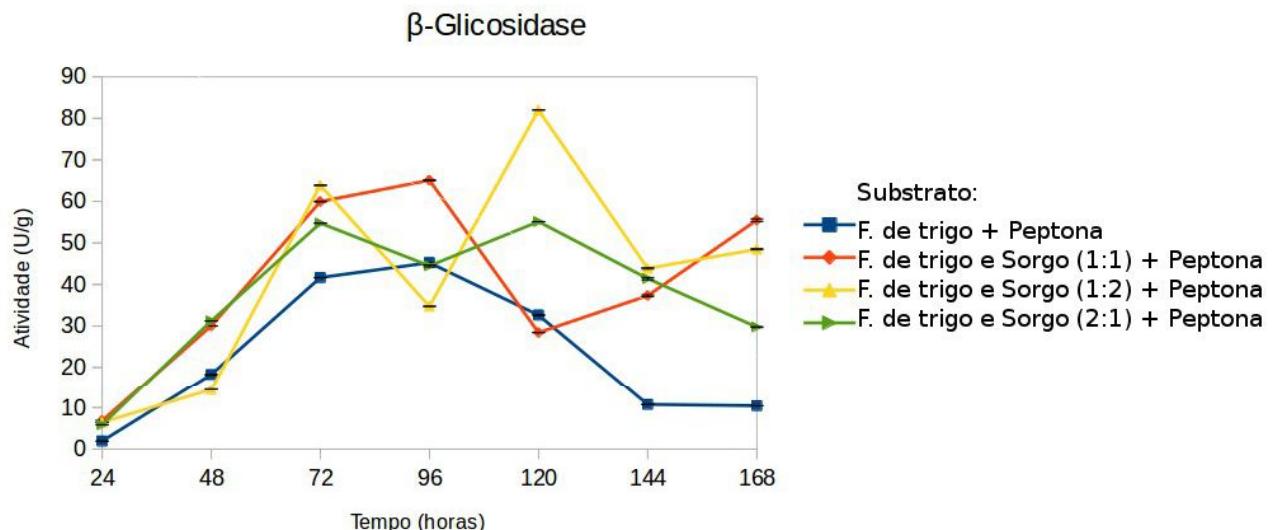
Em comparação com outros estudos utilizando outras fontes de carbono, a produção de FPase neste trabalho utilizando SB não foi muito significativa. Bansal et al. (2012) realizaram experimentos de FES com vários tipos de resíduos agrícolas e domésticos,

utilizando a linhagem *A. niger* NS – 2, sem suplementação com fonte de nitrogênio e obtiveram máxima produção de FPase em FES conduzida com farelo de trigo como fonte de carbono (16,8 U/g). Ang et al. (2013) em seu trabalho em que a linhagem *A. fumigatus* SK1 foi cultivada em dendezeiro para a produção de enzimas, encontraram máxima atividade de FPase de 3,36 U/g. Sharma et al. (2015) realizaram FES cultivando *A. niger* HN – 1 em resíduos de ervilha em variáveis fontes de nitrogênio e encontrou atividade máxima de FPase de 34,67 FPU/g, em substrato suplementado com sulfato de amônia e peptona.

4.3.3 Seleção da fonte de carbono

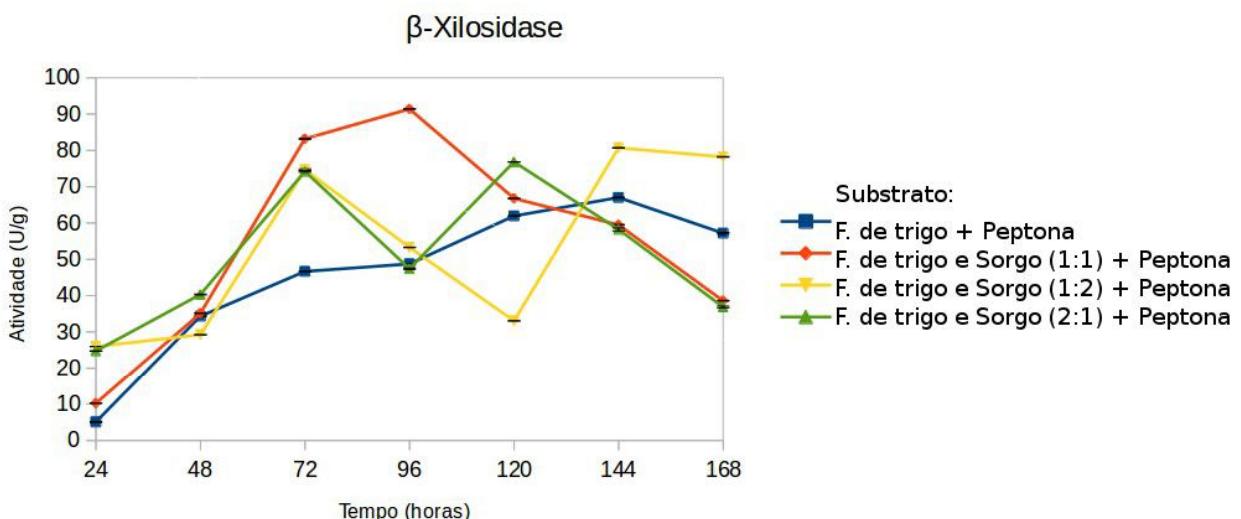
Nesta etapa, a melhor produção de β -glicosidase ocorreu em 120 horas, na fermentação utilizando FT e SB na proporção de 1:2 (Fermentação 10), com atividade de 82,01 U/g (Figura 25). A melhor produção de β -xilosidase ocorreu em 96 horas (91,40 U/g) na Fermentação 9, em que se utilizou FT e SB na proporção de 1:1 (Figura 26). A produção de xilanase ocorreu de forma semelhante nas quatro fermentações e as melhores produções foram observadas entre 72 e 96 horas de FES (59,23 e 59,35 U/g) utilizando-se somente FT ou FT/SB 1:1 (Fermentações 8 e 9), respectivamente (Figura 27). Neste estudo, nenhuma fonte de carbono estudada induziu a produção de avicelase (exoglucanase). Para a produção de CMCCase (endoglucanase), o melhor resultado (29,89 U/g) foi observado na Fermentação 9, com FT e SB (1:1) como fontes de carbono, em 72 horas de fermentação (Figura 28).

Figura 25 - Produção de β -glicosidase por *A. niger* SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e $p<0,05$.



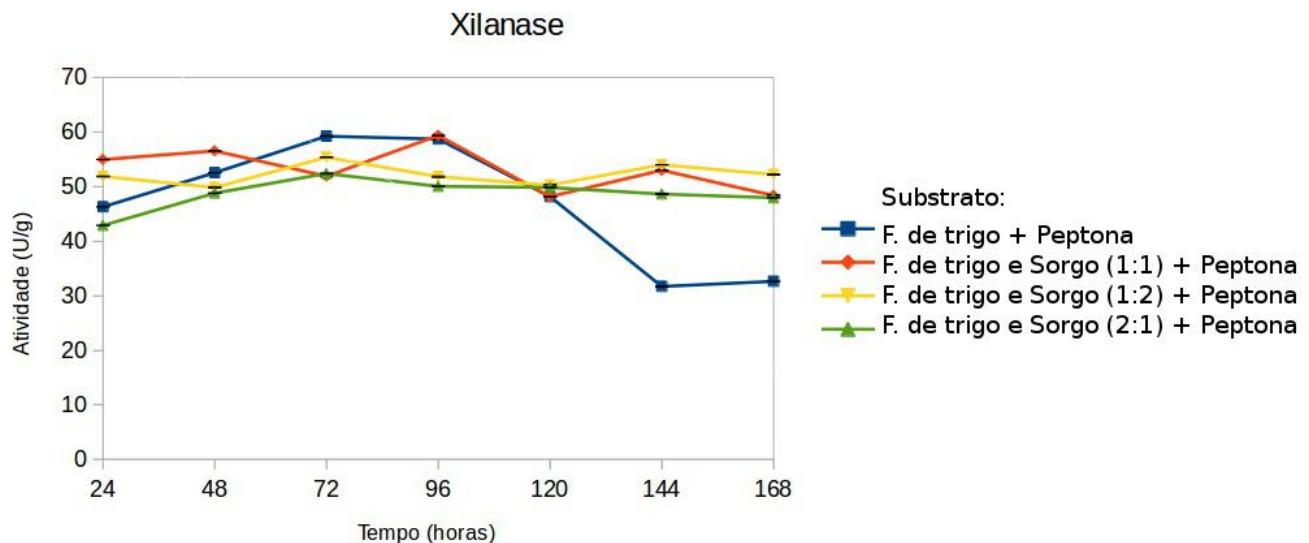
Fonte: a autora.

Figura 26 - Produção de β -xilosidase por *A. niger* SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e $p<0,05$.



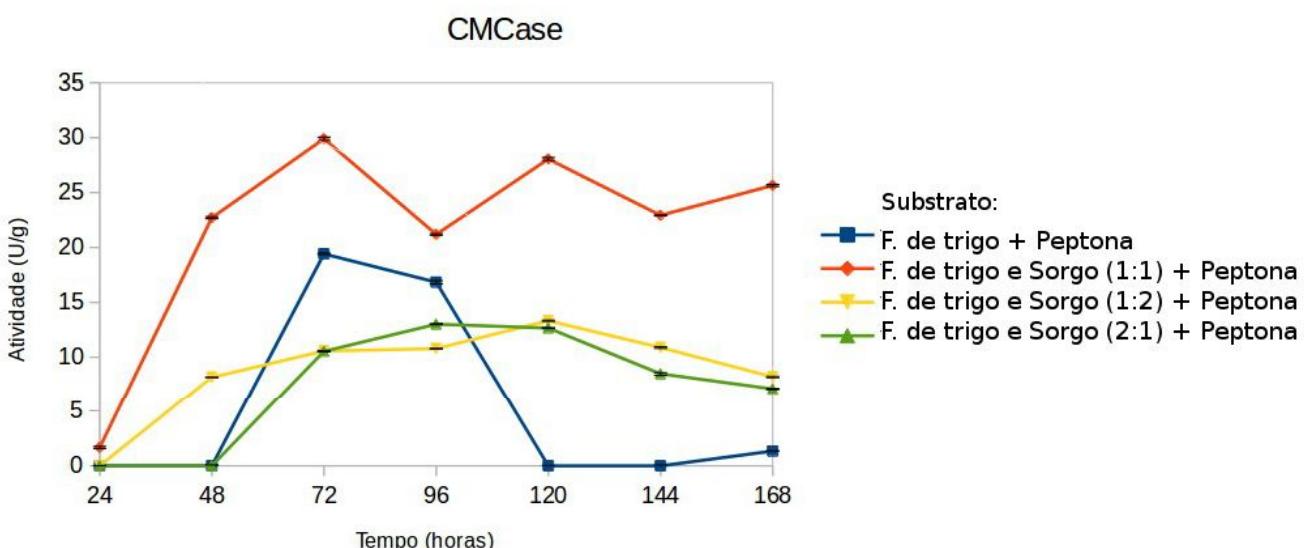
Fonte: a autora.

Figura 27 - Produção de xilanase por *A. niger* SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e $p<0,05$.



Fonte: a autora.

Figura 28 - Produção de CMCase por *A. niger* SCBM1, por FES em variáveis fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados são valores médios de experimentos realizados em duplicas e $p<0,05$.



Fonte: a autora.

De forma geral, nesta etapa de experimentos, a melhor condição testada na produção enzimática foi observada quando SB e FT foram utilizados como substratos na proporção de 1:1 (Fermentação 9). Nesta condição, a produção da maior parte das enzimas foi superior em comparação às demais, exceto para β -glicosidase, cuja produção máxima foi obtida quando SB e FT foram utilizados na proporção de 2:1 (Fermentação 10), sugerindo ainda que o sorgo biomassa possui efeito positivo e indutor na produção de β -glicosidase (Tabela 6).

Tabela 6 - Máximas produções enzimáticas (em U/g) encontradas nas fermentações em que as proporções entre as fontes de carbono foram testadas (SB: sorgo biomassa; FT: farelo de trigo). *A. niger* SCBM1 foi utilizado como inóculo e peptona 0,5% como fonte de nitrogênio em todas as fermentações.

Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	β -glicosidase	β -xilosidase	Xilanase	CMCase
<i>A. niger</i> SCBM1	FT	Peptona 0,5%	45,23	67,03	59,23	19,42
<i>A. niger</i> SCBM1	SB e FT (1:1)	Peptona 0,5%	65,09	91,40	59,35	29,89
<i>A. niger</i> SCBM1	SB e FT (2:1)	Peptona 0,5%	82,01	80,71	55,71	13,35
<i>A. niger</i> SCBM1	SB e FT (1:2)	Peptona 0,5%	55,13	76,83	52,39	13,01

Fonte: a autora.

Bansal et al. (2011) avaliaram a produção de enzimas por *A. niger* NS-2 por FES utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, sem suplementação do meio com fonte de nitrogênio e obtiveram 30,0 U/g de atividade de β -glicosidase, 333,0 U/g de CMCase (endoglucanase), e 1679 U/g de xilanase. Bansal et al. (2012) também realizam produção de celulases por *A. niger* NS-2 em FES utilizando vários resíduos agrícolas e domésticos como fontes de carbono, porém, sem a suplementação exógena com fontes de nitrogênio. Para β -glicosidase, a melhor produção foi em FT, com 33,0 U/g, em comparação com os 45,23 U/g obtidos neste estudo, com o mesmo substrato suplementado com peptona como fonte de nitrogênio. Para CMCase (endoglucanase), esses autores obtiveram 310,6 U/g, em contraste com 19,42 U/g obtidos neste estudo utilizando FT como substrato para produção de enzimas.

Comparando-se todos os resultados obtidos pelo cultivo de *A. niger* SCBM1, variando as fontes de carbono e nitrogênio, fez-se a análise da melhor condição de substrato para produção de cada enzima. Para β -glicosidase, a melhor condição de produção foi em substrato de FT e SB na proporção de 1:2 suplementado com peptona, na qual obteve um pico máximo de produção de 82,01 U/g em 120 horas. Para β -xilosidase, os melhores substratos foram FT e SB na proporção de 1:1 suplementado com peptona, com atividade

máxima de 91,40 U/g em 120 horas. Para xilanase, as melhores condições para produção enzimática foram SB com peptona ou extrato de levedura como fonte de nitrogênio (300,07 e 327,37 U/g em 72 e 96 horas, respectivamente). Para avicelase (exoglucanase), a melhor condição de produção foi em FES conduzida com SB suplementado com peptona, com atividade mantendo-se em torno de 30 U/g. Para CMCase (endoglucanase), o meio contendo SB suplementado com extrato de levedura ou peptona foi mais eficiente na indução da produção desta enzima (Tabela 7).

Comparando-se ainda esses resultados com os dados obtidos na primeira etapa de experimentos, foi possível concluir que as fermentações empregando-se *A. niger* SCBM1 ou em co-cultivo dessa linhagem com *A. fumigatus* SCBM6 foram mais favoráveis para a produção das hemicelulases β -xilosidase e xilanase em FT associado a SB na proporção 1:1, em meio suplementado com sulfato de amônia do que no mesmo substrato suplementado com peptona. Porém, para as celulases β -glicosidase e carboximetilcelulase, a FES contendo SB e FT (1:1) suplementados com peptona induziu mais a produção dessas enzimas do que no mesmo substrato suplementado com sulfato de amônia (Tabela 7).

Tabela 7- Síntese de todas as atividades enzimáticas máximas encontradas (em U/g) no presente estudo. Destaque em negrito: maiores valores de atividades enzimáticas encontrados. Linha destacada: condição de fermentação selecionada.

Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	β -glicosidase	β -xilosidase	Xilanase	CMCase	Avicelase
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo + farelo de trigo 1:1	Sulfato de amônia 0,5%	50,06	132,02	91,89	24,73	9,58
<i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6	Sorgo + farelo de trigo 1:1	Sulfato de amônia 0,5%	17,35	3,71	31,41	27,46	15,69
Co-cultivo	Sorgo + farelo de trigo 1:1	Sulfato de amônia 0,5%	31,54	145,75	137,80	66,88	10,98
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo biomassa	Sulfato de amônia 0,5%	36,77	23,66	41,02	30,0	-
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo biomassa	Ureia 0,5%	40,51	27,91	34,97	39,41	4,67
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo biomassa	Peptona 0,5%	63,61	64,88	300,07	41,47	30,64
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo biomassa	Extrato de levedura 0,5%	55,26	63,95	327,37	43,52	-
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Farelo de trigo	Peptona 0,5%	45,23	67,03	59,23	19,42	-
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo + farelo de trigo 1:1	Peptona 0,5%	65,09	91,40	59,35	29,89	-
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo + farelo de trigo 2:1	Peptona 0,5%	82,01	80,71	55,38	13,35	-
<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo + farelo de trigo 1:2	Peptona 0,5%	55,13	76,83	52,39	13,01	-

Fonte: a autora.

Kachlishvili et al. (2005) também obtiveram perfis diferentes de produção de CMCase em diferentes combinações de fontes de carbono e nitrogênio. Em seu trabalho, a peptona foi a fonte de nitrogênio mais adequada para produção de CMCase quando *Pleurotus dryinus* foi cultivado em folhas de faia, enquanto sulfato de amônia foi a melhor fonte de nitrogênio quando foi aplicada palha de trigo como substrato. Isso sugere que determinadas fontes de nitrogênio podem ter efeitos interativos com certos substratos lignocelulósicos, podendo estimular a produção de celulases e hemicelulases de formas diferentes (YOON et al., 2014). Dessa forma, é fundamental se avaliar a combinação entre espécie de fungo, a fonte de nitrogênio e a fonte de carbono para a produção dessas enzimas.

4.3.4 Condição ótima para produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus niger* SCBM1

Após a análise das fermentações realizadas, a melhor condição de fermentação selecionada para a produção de todas as enzimas avaliadas, foi a FES em que utilizou-se *A. niger* SCBM1 como inóculo e sorgo biomassa (SB) suplementado com peptona como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Apesar da melhor produção de β-glicosidase ter sido observada na FES utilizando SB associado a farelo de trigo (FT) na produção 1:2 (82,01 U/g), nessa condição de fermentação, as outras enzimas apresentaram sua produção reduzida. Além disso, em tal condição não foi possível produzir avicelase (exoglucanase) (Tabela 7).

Analizando-se os resultados da caracterização de SB e FT, foi possível observar que SB apresentou em sua estrutura celular, maior concentração de celulose (39,8%) do que hemiceluloses (24,94%) e lignina (21,72%), assemelhando-se em composição ao bagaço de cana (CANILHA et al., 2012) (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparaçao da composição química de sorgo biomassa (SB) e bagaço de cana-de-açúcar (BCC).

Componentes	Composição %	
	SB	BCC (CANILHA et al., 2012)
Celulose	39,80	38,4–45,5
Hemiceluloses	24,94	22,7–27,0
Lignina Klason	21,72	19,1–32,4

Fonte: a autora.

Rodrigues (2016) também realizou a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar em seu trabalho e obteve 54,36% de celulose, 13,52% de hemiceluloses e 26,14% de lignina neste substrato (Tabela 9). Essa autora também avaliou a produção enzimática por FES pela linhagem *A. niger* SCBM1, porém, utilizando bagaço de cana e farelo de trigo (1:1), suplementados com sulfato de amônio. Apesar da porcentagem de celulose encontrada no bagaço de cana-de-açúcar (54,36%) ser superior à encontrada no sorgo biomassa (39,80%), nossos resultados indicam que SB foi um melhor indutor de β-glicosidase, além de também ter induzido a produção de endo e exoglucanases, enzimas não produzidas no trabalho de

Rodrigues (2016). Uma explicação pode estar no fato de o bagaço de cana apresentar maior teor de lignina (26,14%) que o sorgo biomassa (21,72%), o que pode ter interferido negativamente na indução de celulases.

Santos et al. (2015), que também investigaram a produção de enzimas por *A. niger* SBCM3 nas mesmas condições de Rodrigues (2016), obtiveram menores produções de β -glicosidase (43,02 U/g e 54 U/g respectivamente) quando comparado aos experimentos com SB associado à peptona e SB e FT (2:1) associado a peptona (63,61 U/g e 82,01 U/g respectivamente) realizados no presente trabalho (Tabela 9). Além disso, notou-se ainda que na FES com sulfato de amônio e SB obteve-se uma menor produção de β -glicosidase (36,77 U/g) (Tabela 7), sugerindo que a fonte de nitrogênio peptona em associação à fonte de carbono, neste caso, potencializou a produção desta enzima.

Para a β -xilosidase, dos Santos et al. (2015) e Rodrigues (2016) obtiveram produções superiores desta enzima (73 U/g e 78 U/g respectivamente) às encontradas nos experimentos utilizando somente SB e fontes orgânicas de nitrogênio e somente FT e peptona (64,88 U/g para SB e peptona, 63,95 U/g para SB e extrato de levedura e 67,03 U/g para FT e peptona) realizados no presente trabalho (Tabelas 7 e 9). Porém, quando *A. niger* SCBM1 foi cultivado em SB associado a FT, nas várias proporções testadas, uma maior produção desta enzima foi observada em relação à observada por dos Santos et al. (2015) e Rodrigues (2016). Este resultado pode ser explicado pelo fato de o FT apresentar em sua composição maior teor de hemiceluloses (26,95%) do que os demais componentes e, quando associado ao SB, que contém 24,94% deste componente, pode ter induzido ainda mais a produção dessa enzima, visto que o teor de hemiceluloses no meio foi aumentado. Além disso, o fato de SB e FT em associação terem induzido mais a produção de β -xilosidase do que em fermentações com bagaço de cana-de-açúcar (BCC) associado a farelo de trigo pode ser devido à menor composição de hemiceluloses (13,52%) encontrada no bagaço por Rodrigues (2016).

Adicionalmente, neste trabalho, quando utilizou-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e sorgo associado a farelo de trigo (1:1) (Tabela 9), a produção desta enzima praticamente dobrou em relação ao valor encontrado por dos Santos et al. (2015) e Rodrigues (2016), sugerindo que a associação entre sorgo biomassa, farelo de trigo e sulfato de amônio neste caso, potencializou a produção desta enzima (132,02 U/g), sendo a condição ótima para sua produção no presente trabalho.

Para xilanase, a associação entre sorgo biomassa e fontes orgânicas de nitrogênio potencializou a sua produção quando comparado a todas as outras condições de fermentação

realizadas no presente trabalho. Esta produção foi ainda maior que a encontrada por dos Santos et al. (2015), porém, menor que a obtida por Rodrigues (2016) (Tabela 9).

Tabela 9 - Atividades máximas de celulases e hemicelulases encontrados em outros trabalhos e respectivas caracterizações de seus substratos (SB: sorgo biomassa, BCC: bagaço de cana-de-açúcar e FT: farelo de trigo).

Microrganismo	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	β -glicosidase	β -xilosidase	Xilanase	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)	Autor
<i>A. niger SCBM3</i>	FT + BCC (1:1)	Sulfato de amônia	54 U/g	73 U/g	39 U/g	-	-	-	Santos et al. (2015)
<i>A. niger SCBM1</i>	FT + BCC (1:1)	Sulfato de amônia	43,02 U/g	78,00 U/g	3289,58 U/g	54,36 (BCC)	13,52 (BCC)	26,14 (BCC)	Rodrigues (2016)
<i>A. niger SCBM1</i>	SB + FT (1:1)	Sulfato de amônia	50,06 U/g	132,02 U/g	91,89 U/g	39,80 (SB)	24,94 (SB)	21,72 (SB)	Este trabalho
<i>A. niger SCBM1</i>	SB + FT (1:1)	Peptona	65,09 U/g	91,40 U/g	59,35 U/g	25,41 (FT)	26,95 (FT)	25,77 (FT)	
<i>A. niger SCBM1</i>	SB	Peptona	63,61 U/g	64,88 U/g	300,07 U/g				
<i>A. niger SCBM1</i>	SB + FT (2:1)	Peptona	82,01 U/g	80,71 U/g	55,38 U/g				

Fonte: a autora.

De forma geral, os dados obtidos sugeriram que o sorgo biomassa (SB) é uma biomassa altamente promissora para a utilização como substrato na produção de enzimas, sendo capaz de induzir tanto enzimas hemi- como celulolíticas. No caso da produção de celulases, a produção dessas enzimas foi obtida em níveis maiores que os encontrados em alguns estudos anteriores realizados com o tradicional bagaço de cana-de-açúcar (dos SANTOS et al., 2015; RODRIGUES, 2016). Neste trabalho, foi ainda possível afirmar que a associação do sorgo biomassa e peptona foi considerada a condição ótima de produção de hemicelulases e celulases, com melhor indução de β -glicosidase, endo e exoglucanase, principalmente.

5 Conclusões

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que nenhuma das combinações de fontes de carbono e nitrogênio estudadas atuou na potencialização da produção de todas as enzimas avaliadas de forma simultânea. Os resultados indicaram ainda que existe um efeito interativo entre a fonte de carbono e de nitrogênio capaz de estimular a produção de determinadas enzimas de formas diferentes, sendo necessária a avaliação da melhor interação capaz de induzir a produção de cada enzima individualmente.

O presente trabalho mostrou-se inovador e promissor para a produção enzimática pois apresentou o sorgo biomassa (SB), um substrato nunca utilizado, como capaz de induzir tanto enzimas hemi- como celulolíticas, principalmente celulases, em níveis superiores aos encontrados em alguns estudos de FES utilizando o convencional bagaço de cana-de-açúcar, além de ter sido capaz de induzir a produção de enzimas por fungos mesofílicos em um curto período de tempo, o que não é comumente observado.

Assim, objetivando a produção de um bom extrato enzimático por *A. niger* SCBM1 para aplicação em futuros experimentos de hidrólise de biomassas lignocelulósicas, contendo atividades mistas de celulases e hemicelulases, concluiu-se que a melhor condição encontrada foi a FES utilizando SB como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Esta condição de fermentação foi capaz de induzir produções máximas de xilanase, avicelase e CMCCase por *A. niger* SCBM1 em comparação a todas as fermentações realizadas no presente trabalho, além de apresentar boa indução de β -glicosidase e β -xilosidase.

6 Referências Bibliográficas

- ABUBAKAR, F. A.; OLOYEDE, O. B. Production and activity of cellulase from *Aspergillus niger* using rice bran and orange peel as substrates. **International Journal of scientific research and management**, v. 1, n. 5, p. 285 – 291, 2013.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675 – 685, 2011.
- AKHILESH, T.; PAHWA, R.; SINGH, S.; GUPTA, R. Pruduction, purification and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1 – 7, 2010.
- ALFERORE, S.; MOLINA-JOUVEA, C. Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. **Bioprocess Biochemistry**, v. 51 (11), p. 1747–1756, 2016.
- ALTERTHUMM, F. Elementos de microbiologia. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Vol 1. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1 – 32.
- ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Progress on Enzymatic Saccharification Technologies for Biofuels Production. In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. **Biofuel Technologies - Recent Developments**. 1. ed. Berlin: Springer, 2013. p. 397 – 441.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293–1302, 2013.
- BABU, K. R.; SATYANARAYANA, T. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55, p. 464 – 467, 1996.
- BAÊTA, B. E. L. **Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria**, 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60 – 88, 2015.
- BAFFI, M. A.; TOBAL, T.; LAGO, J. H. G.; LEITE, R. S. R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. A Novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking. **Journal of Food Science**, v. 76 (7), 2011.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; GUPTA, J. K.; SONI, R.; SONI, S. K. A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of hydrolytic depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. **BioResources**, v. 6 (1), p. 552-569, 2011.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341 – 1346, 2012.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 326–338, 2001.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Vol 2. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 247 – 276.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583 – 620, 1997.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Vol 1. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 254 p.

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

BROWNING, B. L. Methods of wood chemistry. New York: **Interscience Publishers**, v.2. p. 561-587, 1967.

CABRAL, P. H. R.; JAKELAITIS, A.; CARDOSO, I. S.; ARAÚJO, V. T. de; PEDRINI, E. C. F. Interferência de plantas daninhas na cultura do sorgo cultivado em safrinha. **Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia**, v. 43, n. 3, p. 308-314, 2013.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2196 – 2204, 2007.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1 – 15, 2012.

CARLE-URIOSTE, J. C.; ESCOBAR-VERA, J.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F.; TORIGOI, E.; CRIVELLARO, O.; HERRERA-ESTRELLA, A.; EL-DORRY, H. Cellulase Induction in *Trichoderma reesei* by Cellulose Requires Its Own Basal Expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 10169 –10174, 1997.

CHEN, H; FU, X.; Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 468 – 478, 2016.

CHEN, H.; ZHOU, D.; ZHANG, S.; CHEN, J. Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 427 – 437, 2015.

CHINEDU, N. S.; NWINYI, O. C.; OKOCHI, V. I. Growth and cellulase activity of wild-type *Aspergillus niger* ANL301 in different carbon sources. **Canadian Journal of pure & applied sciences**, v. 2, n. 2, p. 357 – 362, 2008.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 3. ed., Ed. UNICAMP: São Paulo, 1988, p 179 – 243.

DAMASCENO, C. M. B.; SOUSA, S. M.; NODA, R. W.; PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHÃES, J. V. A importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração. **EMBRAPA Documento 108**, p.23, 2010.

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

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578 – 595, 2009.

de ALMEIDA, E. V. R. **Valorização da celulose de sisal: uso na preparação de acetatos e de filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose**. 2009. 158p. Tese (Doutorado em Ciências - Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

DEMIRBAS, A. Biofuels securing the planet's future energy needs. **Energy Conversion Management**, v. 50, p. 2239 – 2249, 2009.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2106–2116, 2008.

DEMIRBAS, A. Relationships between lignin contents and fixed carbon contents of biomass samples. **Energy Conversion and Management**, v. 44, p. 1481–1486, 2003.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K. Verma M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6 – 13, 2012.

DONG, J. L.; ZHANG, Y. W.; ZHANG, R. H.; HUANG, W. Z.; ZHANG, Y.Z. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 190- 198, 2005.

DU, R.; HUANG, R.; SU, R.; ZHANG, M.; WANG, M.; YANG, J.; QI, W.; HE, Z. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: SEC-MALLS analysis and reaction mechanism. **The Royal Society of Chemistry**, v. 3, p. 1871–1877, 2013.

EMBRAPA MILHO E SORGO. (2008). Sistemas de Produção, 2. Cultivo do sorgo – Plantio. ISSN 1679-012X. Versão Eletrônica - 4º edição. Set. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpmes.embrapa.br/publicacoes/sorgo/plantio.htm>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2004. 638 p.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **EMBRAPA, Documentos54**, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1 – 13, 2007.

FLODMAN, H. R.; NOUREDDINI, H. Effects of intermittent mechanical mixing on solid-state fermentation of wet corn distillers grain with *Trichoderma reesei*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 24 – 28, 2013.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 53 – 60, 2016.

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

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

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GODDEN, B.; LEGON, T.; HELVENSTEIN, P.; PENNINCKX, M. Regulation of the Production of Hemicellulolytic and Cellulolytic Enzymes by a *Streptomyces* sp. Growing on Lignocellulose. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 285-292, 1989.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72 – 78, 2010.

GOMES, A. F. S.; SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. A. Substract and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 915 – 921, 2016.

GRASSICK, A.; MURRAY, P. G.; THOMPSON, R.; COLLINS, C. M.; BYRNES, L.; BIRRANE, G.; HIGGINS, T. M.; TUOHY, M. G. Three-dimensional structure of a thermostable native cellobiohydrolase, CBH IB, and molecular characterization of the cel7 gene from the filamentous fungus, *Talaromyces emersonii*. **European Journal Biochemistry**, v. 271, p. 4495–4506, 2004.

GUIMARÃES, C. C.; SIMEONE, M. L. F.; PARRELA, R. A. C.; SENA, M. M. Use of NIRS to predict composition and bioethanol yield from cell wall structural components of sweet sorghum biomass. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 194 – 201, 2014.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633 – 645, 2016.

GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. **Biofuel Technologies - Recent Developments**. 1. ed. Springer, 2013. 533 p.

HAHN – HÄGERDAL, B.; GLABE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDE, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549 – 556, 2006.

HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**, 2013. 103 f. Tese (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa.

ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M. L.; PENTTILÄ, M. E. Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1298 – 1306, 1997.

JIANG, Y.; DUARTE, A. V.; BRINK, J.; WIEBENGA, A.; WANG, C.; VRIES, R. P.; ZHOU, Z.; BENOIT, I. Enhancing saccharification of wheat straw by mixing enzymes from genetically-modified *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 1, p. 65 – 70, 2016.

JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 191 – 201, 2013.

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

JUWON, A. D.; EMMANUEL, O. F. Experimental Investigations on the Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Concomitant Amylase and Polygalacturonase Production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in Submerged Fermentation. **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 1 – 8, 2012.

- KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. J.; TSIKLAURI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 391–397, 2005.
- KHOO, H. H.; Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 100 – 119, 2015.
- KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42 – 48, 2015.
- KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. **Liste Chemischer Fachzeitschriften**, v. 22, p. 366 – 383, 1883.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- KORADIYA, M.; DUGGIRALA, S.; TIPRE, D.; DAVE, S. Pretreatment optimization of Sorghum pioneer biomass for bioethanol production and its scale-up. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 142 – 147, 2016.
- KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VELUW, G. J.; WANG, F.; MÜLLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H. A. B. Development in Aspergillus. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1 – 29, 2013.
- KUBICEK, C. P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocreja jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 19, n. 2, p. 1 – 14, 2009.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1 – 10, 2011.
- KUMAR, S.; SHARMA, H.; SARKAR, B. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SMF) and solid state fermentation (SSF). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 89 – 98, 2011.
- LI, Z.; WANG, D.; SHI, Y. C. Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 229–235, 2017.
- LIEW, W.H.; HASSIM, M.H., Ng, D.K.S. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 71, p. 11 – 29, 2014.
- LUQUE, R.; LIN, C. S. K.; WILSON, K.; CLARK, J. **Handbook of Biofuels Production**. 2. ed. Elsevier, 2016. 770 p.

MARQUES, S. **Energias Fósseis versus Energias Renováveis: proposta de intervenção de Educação Ambiental no 1º Ciclo do Ensino Básico**, 2007. 241 f. Tese (Mestrado em Estudos da Criança) – Programa de pós-graduação em Estudos da Criança do Instituto de Estudos da Criança. Universidade do Minho, Braga.

MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. **Biochemical Journal**, v. 35, n. 12, p. 1358 – 1368, 1941.

MATHEW, G. M.; SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 898-907, 2008.

MATSAKAS, L.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fermentation of liquefacted hydrothermally pretreated sweet sorghum bagasse to ethanol at high-solids content. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 202 – 208, 2013.

MAY, A.; PARRELLA, R. A. C.; DAMASCENO, C. M. B.; SIMEONE, M. L. F. Sorgo como matéria-prima para produção de bioenergia: etanol e cogeração. **Sorgo: inovações tecnológicas**, v. 35, n. 278, p. 73 – 81, 2014.

MESQUITA, J. P. **Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais**, 2012. 189 f. Tese (Doutorado em ciências) – Programa de pós-graduação em Química do Instituto de Ciências. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

MOHTASHAM, J. Review Article-Renewable Energies. **Energy Procedia**, v. 74, p. 1289 – 1297, 2015.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em solos preservados do Cerrado**, 2012. 77 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D. TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p.113-119, 1998.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. Documento 236 - Procedimentos para Análise Lignocelulósica. **EMBRAPA**, Campina Grande, PB, 2010.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da Madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.29, n.3, p.461-470, 2005.

MORETTI, M. S.; BOCCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RORIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of

cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673 – 686, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Artmed, 2011. 1274 p.

OKAFOR, U. A.; OKOCHI, V. I.; ONYEGBEME-OKERENTA; NWODO-CHINEDU, S. B. M. Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro – wastes. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1710 – 1714, 2007.

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

PANDEY, A. K.; EDGARD, G.; NEGI, S. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP-factorial design technique and application in Sorghum Stover based bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 98, p. 51 – 56, 2016.

PARRELA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E.; MAY, A.; EMYGDIO, B.; PORTUGAL, A. F.; DAMASCENO, C. M. B. Desempenho agronômico de híbridos de sorgo biomassa. **EMBRAPA Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 41, p. 21, 2011.

PEREIRA, J. C.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; BRITO DE OLIVEIRA, T.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PEREIRA, J. C.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122–129, 2016.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

POTUMARTHI, R.; BAADHE, R. R.; BHATTACHARYA, S. Fermentable Sugars from Lignocellulosic Biomass: Technical Challenges. In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G. **Biofuel Technologies - Recent Developments**. 1. ed. Berlin: Springer, 2013. p. 397 – 441.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83 – 91, 2015.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 385-405, 2011.

RAY, R. R. Microbial Avicelase: an Overview. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 03 – 13, 2015.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, p. 91 – 102, 1980.

RODRIGUES, P. O. **Ação sinergística de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**, 2016. 76 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis) – Programa de pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal Uberlândia / Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri do Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RODRIGUES, P. O.; dos SANTOS, B. V.; COSTA, L.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 453 – 459, 2017.

SALADINI, F.; PATRIZI, N.; PULSELLI, F. M.; MARCCHETTINI, S. B. Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 221 – 227, 2016.

SANTOS, B. S. L.; GOMES, A. F. S.; FRANCISCON, E. G.; OLIVEIRA, J. M.; BAFFI, M. A. Thermotolerant and mesophytic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903-910, 2015.

SASI, A; KANI, M.; PANNEERSELVAM, A.; JEGADEESH, G.; MUTHU, K.; KUMAR, R. M. Optimizing the conditions of α -amilase by an Esturian strain of *Aspergillus spp*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 8, p. 581 – 586, 2010.

SHARMA, R.; RAWAT, R.; BHOGAL, R. S.; OBEROI, H. S. Multi-component thermostable cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger* HN-1 using pea pod waste: Appraisal of hydrolytic potential with lignocellulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 696–704, 2015.

SHARMA, R. K.; W, J. B.; BALIGA, V. L.; LIN, X.; CHAN, W. G.; HAJALIGOL, M. R. Characterization of chars from pyrolysis of lignin. **Fuel**, v. 83, p. 1469–1482, 2004. SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 1570-1580, 2010.

SILVA, I. S. V.; NETO, W. P. F.; SILVÉRIO, H. A.; PASQUINI, D.; ANDRADE. M. Z.; OTAGURO, H. Mechanical, thermal and barrier properties of pectin/cellulose nanocrystal nanocomposite films and their effect on the storability of strawberries (*Fragaria ananassa*). **Polymers Advanced Technologies**, 2015.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and

submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541 – 549, 2010.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SMITH, W. **Literature review: state of the art in biorefinery development**. National Non Food Crops Centre. 2007.

STRICKER, A. R.; MACH, R. L.; GRAAFF, L. H. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 78, p. 211 – 220, 2008.

SØRENSEN, A.; ANDERSEN, J. J.; AHRING, B. K.; TELLER, P. J.; LÜBECK, M. Screening of carbon sources for beta-glucosidase production by *Aspergillus saccharolyticus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 93, p. 78 – 83, 2014.

THANGAVELU, S. K.; AHMED, A. S.; ANI, F. N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 820 – 835, 2016.

TIWARI, R.; NAIN, P. K. S.; SINGH, S.; ADAK, A.; SARITHA, M.; RANA, S.; SHARMA, A.; NAIN, L. Cold active holocellulase cocktail from *Aspergillus niger* SH3: process optimization for production and biomass hydrolysis. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 56, p. 57 – 66, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Artmed, 2012. 934 p.

VAHIDI, H.; KOBARFARD, F.; NAMJOYAN, F. Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptocephala*. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 606 – 609, 2004.

VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA INTROGRESSÃO DA CARACTERÍSTICA NERVURA MARROM (BMR6) EM LINHAGENS DE SORGO BIOMASSA UTILIZANDO RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO. **Damasceno, C. M. B.; Parrela, R. A. C.; Rodrigues, J. A. S.; Schaffert, R. E**, Sete Lagoas, n. 184, dez, 2012. Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, p.7.

VÁRNAI, A.; MÄKELÄ, M. R.; DJAJADI, D. T.; RAHIKAINEN, J.; HATAKKA, A.; VIIKARI, L. Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases: Occurrence in Nature, Function, and Relevance in Industrial Biomass Conversion. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. **Advances in Applied Microbiology**. vol. 88. Burlington: Academic Press, 2014. p. 103 – 165.

VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

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

WATANABE, H.; TOGUTA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 609 – 632, 2010.