



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA EMPREGANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Nattácia Rodrigues de Araújo Felipe Rocha

UBERLÂNDIA – MG
JULHO DE 2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EMPREGANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Nattácia Rodrigues de Araújo Felipe Rocha.

Orientadores: Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Ubirajara Coutinho Filho (UFU)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA – MG

JULHO DE 2011

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATTÁCIA RODRIGUES DE ARAÚJO
FELIPE ROCHA SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 20/07/2011.

BANCA EXAMINADORA:



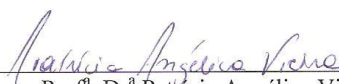
Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luiz Cardoso
(Orientadora - PPG-EQ/UFU)



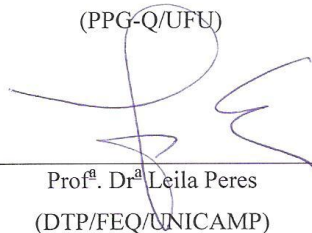
Prof.^o. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(Co-Orientador PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a Miriam Maria Resende
(PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a Patrícia Angélica Vieira
(PPG-Q/UFU)



Prof.^a. Dr.^a Leila Peres
(DTP/FEQ/UNICAMP)

"Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência."

(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu avô Joaquim, exemplo de homem, meu herói e amigo e à minha tia avó Aramides, exemplo de coragem, amor e fé. A vocês, que fizeram parte da minha criação ajudando a me tornar a pessoa que sou hoje, que adoçaram minha vida sem pedir nada em troca, que trouxeram o céu pra mais perto de mim.

Esta conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas alegrias proporcionadas, por iluminar o meu caminho e estender a mão nas horas de dificuldades.

À minha mãe Zolande, que sempre esteve ao meu lado abdicando dos seus sonhos em favor dos meus. Que me deu o amor e a paz necessários para o desenvolvimento de mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Ao meu pai José Donizeth, pelo apoio e por ter acreditado na minha capacidade.

Aos meus irmãos: Augusto, Eduardo e Gustavo que me fazem sentir o peso da responsabilidade de ser o exemplo e me impulsionam a seguir em frente mesmo quando a estrada parece intransponível.

À minha avó Neide, pelo amor a mim dedicado, pelas orações e por me mostrar todos os dias que a família é a base de tudo na vida.

Aos professores Vicelma Luiz Cardoso e Ubirajara Coutinho Filho pela orientação, por toda a dedicação, paciência e confiança, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada também, pelas palavras amigas, pelo sorriso e pelo carinho, professor Bira, você é iluminado!

Ao Prof. Eloízio Júlio Ribeiro, um agradecimento especial, pelos valiosos ensinamentos.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, ofertando informações valiosas para a realização deste estudo.

Aos colegas de laboratório do NUCBIO: Carla Zanela Guidini, Maurielem Guterres Dalcin, Janaína Fischer, Jéssica Dorneles Moura, Maria Aparecida Barros, Betânia Braz Romão, Francielle Batista da Silva, Alex Anderson Moura, Wilson Galvão de Moraes Júnior, Henrique Coutinho, Rafael Bruno Vieira, Wesley da Silva Borges, Diego, pela amizade, carinho, companheirismo, pelas horas de estudo, enfim apoio incondicional durante esse dois anos de mestrado.

Aos colegas do mestrado, pois juntos trilhamos uma etapa importante em nossas vidas: Curt Max de Ávila Panisset, Thiago Padovani Xavier, Rui Carlo, Jefferson Ivanue Moraes, Gustavo Ottero Prado, Deivid Marques. Obrigada pelos ensinamentos, ajuda, momentos compartilhados e amizade ímpar.

Aos meus amigos de Tupaciguara, pelo apoio, torcida e amizade!

Aos funcionários da FEQUI: Silvino, José Henrique, Cléo, Lúcia, Ione, Roberta e Cida pela colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Ao CNPQ pela confiança depositada e suporte financeiro.

Enfim, a todos, que com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – Biomassas	6
2.1.1 – Cana-de-açúcar.....	6
2.1.2- Arroz.....	9
2.1.3- Soro de Leite.....	11
2.2 – Fermentação no Estado Sólido	13
2.2.1- Definição e Histórico.....	13
2.2.2 – Aplicação da FES.....	14
2.2.3– Características da FES	15
2.2.4- Fatores que influenciam na FES.....	17
2.2.4.1 Temperatura e transferência de calor.....	17
2.2.4.2- pH	17
2.2.4.3- Atividade de água e umidade	18
2.2.4.4- Aeração e agitação	18
2.3 – Fungos	19
2.3.1- O gênero <i>Aspergillus</i>	21
2.4- Enzimas	23
2.4.1- Classificação e estrutura	25
2.4.2- Produção de enzimas: origem e aplicação.....	26
2.4.3- Celulases.....	26
2.4.4- Proteases.....	29
2.5- Hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	31
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 – Material.....	35
3.1.1 – Substrato.....	37
3.1.2 – Manutenção das cepas de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i> empregadas nos experimentos.....	38
3.1.3 – Preparo do inóculo.....	39
3.2 – Métodos.....	40
3.2.1 – Processo de FES para produção de complexo enzimático.....	41
3.2.2 – Extração de Enzimas.....	42
3.2.3 – Concentração Enzimática.....	43
3.2.4- Método AFEX de tratamento de resíduos lignocelulósicos.....	44
3.2.5 – Avaliação da produção de etanol utilizando complexo enzimático produzido e enzima celulase comercial.....	45
3.2.6 – Avaliação da temperatura da produção do complexo enzimático.....	45
3.2.7- Processo de fermentação submersa e hidrólise simultânea para produção de etanol.....	46
3.2.8- Processo de hidrólise separada da fermentação submersa.....	46
3.2.9- Planejamento experimental avaliado para atividade de celulase e protease.....	49
3.3 – Procedimentos analíticos	49
3.3.1- Determinação da atividade de celulase	49
3.3.2- Determinação da atividade de protease.....	49
3.3.3- Determinação de açúcares redutores.....	50
3.3.4- Determinação de etanol.....	50
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 – Testes preliminares.....	52
4.1.1 – Avaliação da atividade enzimática visando a influência do substrato na	

produção do complexo enzimático.....	52
4.1.2 – Atividade da celulase para diferentes concentrações salinas.....	54
4.1.3 – Estudos preliminares para seleção da cepa de <i>Aspergillus niger</i>	57
4.2 – Cinética da FES para produção do complexo enzimático.....	58
4.3 – Planejamento Composto Central.....	61
4.4 – Avaliação da produção de etanol utilizando complexo enzimático produzido e enzima celulase comercial.....	66
4.5 – Avaliação da influência do tempo de produção do complexo enzimático na fermentação de produção do bioetanol.....	67
4.6 – Avaliação da temperatura de produção do complexo enzimático.....	69
4.7 – Hidrólise Separada.....	70
4.7.1 – Variação do tempo de hidrólise.....	70
4.7.2 – Variação da temperatura de hidrólise.....	71
4.7.3- Variação de pH da hidrólise	71
4.7.4- Variação do volume de enzimas	72
4.7.5- Variação do substrato e do fungo utilizado na produção do complexo enzimático.....	73
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	76
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXO.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil.	5
Figura 2.2 – Morfologia da cana-de-açúcar.....	6
Figura 2.3 – Histórico da produção de cana no Brasil.....	6
Figura 2.4 – Esquema dos constituintes do arroz. (KAWABATA, 2008).....	9
Figura 2.5 – Distribuição dos estados produtores de leite no Brasil em milhões de litros por ano. (EMBRAPA,2008).....	10
Figura 2.6 – Microscopia de varredura de <i>Aspergillus sp</i>	20
Figura 2.7 – Representação esquemática da relação enzima-substrato	23
Figura 2.8 – Estrutura química da celulose (FRANCO, 2009).....	26
Figura 2.9 – Formas de integração das etapas de conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol (CASTRO et al., 2010).....	31
Figura 3.1 – RBA (resíduo do beneficiamento do arroz).....	35
Figura 3.2 – Soro de Leite em pó.....	35
Figura 3.3 – Cepas de fungos <i>Aspergillus niger</i>	36
Figura 3.4 – Cepas de fungos <i>Trichoderma reesei</i>	37
Figura 3.5 – Meio de cultura e cepas de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i> a serem manuseadas na capela de fluxo laminar.....	38
Figura 3.6 – Diagrama dos procedimentos realizados no desenvolvimento desta dissertação.....	39
Figura 3.7 – Reator tambor rotativo.....	40
Figura 3.8- Casca de arroz pré tratada.....	42
Figura 3.9 – Diagrama do método AFEX de tratamento de resíduo lignocelulósico.....	42
Figura 3.10 – Estrutura do material lignocelulósico.....	43
Figura 3.11- Erlenmeyer utilizado na fermentação submersa.....	45
Figura 4.1 – Avaliação da atividade enzimática em FPase na produção de complexo enzimático produzido em diferentes substratos.....	52
Figura 4.2 – Avaliação da atividade de celulase em diferentes substratos e em dias de fermentação diferentes.....	53
Figura 4.3 – Precipitação salina (<i>salting-out</i>) do complexo enzimático em relação a atividade da celulase para diferentes concentrações salinas.....	54
Figura 4.4 – Recuperação enzimática.....	55
Figura 4.5 –Atividade do complexo enzimático em FPase em função do pH da solução.....	55
Figura 4.6 – Atividade de celulase em função do substrato e da cepa de fungo a ser selecionada.....	56
Figura 4.7 – Atividade de celulase do complexo enzimático produzido a partir do substrato RBA+soro em função do tempo de fermentação.....	57
Figura 4.8 – Atividade proteolítica em função do tempo de fermentação.....	58
Figura 4.9 – Comparação das atividades em celulase e protease em função do tempo de fermentação.....	59
Figura 4.10 – Massa seca em função do tempo de secagem.....	59
Figura 4.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para atividade da celulase com 24 hrs de fermentação (micromol/min.g) em função da: (a) massa de arroz (g) e volume de soro de leite (%); (b) massa de arroz (g) e carbonato de cálcio (%) e (c) volume de soro de leite (%) e carbonato de cálcio (%).....	62
Figura 4.12 – Valores preditos em função dos observados relativos à atividade de celulase.....	63
Figura 4.13 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade de celulase.....	63
Figura 4.14 – Superfície de resposta e curva de contorno para atividade da protease com 24 hrs de fermentação (micromol/min.g) em função da: (a) RBA (g) e carbonato de cálcio (%); (b) soro de leite (%) e carbonato de cálcio (%) e (c) soro de leite (%) e RBA (g).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição química do arroz (KAWABATA, 2008).....	9
Tabela 2.2 – Apresentação de algumas aplicações da Fermentação em Estado Sólido (DALSENTER, 2005.).....	13
Tabela 2.3 – Aplicação e relevância comercial dos fungos <i>Aspergillus niger</i> (COURI, 1993.).....	20
Tabela 2.4 – Classificação e características dos fungos <i>Aspergillus niger</i> (COURI, 1993)..	21
Tabela 2.5 – Classificação das enzimas (União Internacional de Bioquímica).....	24
Tabela 2.6 – Origem e aplicação das enzimas na indústria de alimentos (União Internacional de Bioquímica).....	25
Tabela 3.1 – Componentes e devidas proporções do ágar batata glicose (PDA) (DSMZ, 2009).....	36
Tabela 3.2 – Matriz do PCC para influência conjunta das variáveis: massa do resíduo de arroz, volume de soro de leite e carbonato de cálcio.....	47
Tabela 4.1 – Matriz do PCC para influência conjunta das variáveis: massa do resíduo de arroz, volume de soro de leite e carbonato de cálcio na atividade da celulase e da protease.....	61
Tabela 4.2 – Avaliação da produção de etanol em diferentes substratos e enzimas variadas	65
Tabela 4.3 – Produção de etanol em função do tempo de produção do complexo enzimático, em horas com enzimas não concentradas.....	67
Tabela 4.4 – Produção de etanol em função do tempo de produção do complexo enzimático, em horas com enzimas concentradas.....	67
Tabela 4.5 – Produção de etanol em função da temperatura de produção do complexo enzimático.....	68
Tabela 4.6 – Avaliação do tempo de hidrólise em função do rendimento de etanol....	69
Tabela 4.7 – Avaliação da produção de etanol em função da temperatura de hidrólise....	70
Tabela 4.8 – Avaliação da produção de etanol em função do pH da hidrólise.....	70
Tabela 4.9 – Avaliação da produção de etanol em função do volume de enzimas utilizado no meio fermentativo.....	72
Tabela 4.10 – Avaliação da produção de etanol em função do substrato e do tipo de fungo utilizado para produção do complexo enzimático.....	73
Tabela 4.11- Comparação dos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho com dados da literatura.....	74

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a produção de um complexo enzimático gerado a partir de resíduos agroindustriais e *Aspergillus niger* e na sequência a produção de bioetanol utilizando o mesmo resíduo. Nos testes preliminares estudou-se o melhor substrato e escolheu-se a melhor cepa de micro-organismo capaz de gerar um complexo enzimático com boa atividade em termos de celulase (FPase). O complexo enzimático gerado foi submetido a um processo de precipitação salina com o intuito de concentrar o caldo enzimático e avaliar a influência do processo *salting-out* na melhora da produção de etanol. Depois de selecionado o substrato e a linhagem de *Aspergillus niger* para o desenvolvimento deste trabalho estudou-se as principais variáveis que influenciam na fermentação em estado sólido (FES) e consequentemente na produção do complexo enzimático. Nesta etapa do trabalho desenvolveu-se um planejamento composto central (PCC) com o intuito de verificar qual o melhor volume de enchimento do reator tambor rotativo usado na produção de enzimas. Em seguida, variou-se a temperatura e o tempo de FES, as respostas avaliadas foram as atividades proteolíticas e FPase. Selecionadas as condições da FES realizou-se testes de fermentação e hidrólise simultânea empregando a biomassa proveniente do resíduo do beneficiamento de arroz (RBA) e soro de leite na produção de etanol. Para a fermentação alcoólica, utilizou-se cepas de *Saccharomyces cerevisiae* Y904 como levedura no processo de fermentação submersa (FS). Além de adicionar ao meio fermentativo o complexo enzimático gerado na FES, as variáveis como tempo de fermentação submersa (FS), temperatura e pH foram fixadas conforme dados obtidos na literatura para a produção de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar. Em seguida, realizou-se testes com hidrólise separada para analisar o efeito da mesma na otimização da produção de etanol. Nesta etapa, variou-se o tempo de hidrólise, a temperatura, o pH e o volume de enzimas usadas na hidrólise e FS separadamente, analisando como resposta a produção de etanol em g/L. Após o estudo da hidrólise em separado, fixou-se as seguintes condições de trabalho como sendo as melhores: 10 horas de hidrólise, temperatura de hidrólise de 35°C, pH de hidrólise 4,5 e volume de enzimas adicionadas ao meio fermentativo de 24 mL, observando-se que o aumento do volume de enzimas não proporciona melhores resultados em termos de produção de etanol nas condições testadas. Vale ressaltar que a maior produção de etanol foi obtida empregando hidrólise separada. Por fim avaliou-se a produção do complexo enzimático gerado na FES por *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. Os ensaios foram realizados utilizando os complexos enzimáticos de forma separada e em conjunto e observou-se que as cepas de *A. niger*, nas condições testadas, foram capazes de produzir um complexo enzimático mais satisfatório avaliando como resposta a produção de etanol.

Palavras-chave: celulase, fermentação em estado sólido, resíduos agroindustriais, micro-organismos, etanol.

ABSTRACT

In this work we studied the production of an enzyme complex generated from agro waste and *Aspergillus niger* and following the production of bioethanol using the same residue. In preliminary tests we studied the best substrate and was chosen the best strain of micro-organism capable of generating an enzyme complex with good activity in terms of cellulase (FPase). The enzyme complex generated was subjected to a saline precipitation process in order to concentrate the enzyme broth and evaluate the influence of the salting-out process in improving ethanol production. After selecting the substrate and the strain of *Aspergillus niger* to develop this work we studied the main variables that influence the solid-state fermentation (SSF) and the consequent production of the enzyme complex. At this stage of the work has developed a central composite design (CCP) in order to determine what the best filling volume of the rotating drum reactor used in the production of enzymes. Then varied the temperature and time of FES, the responses were assessed around the proteolytic activities and FPase. Selected conditions of the FES was performed tests simultaneous hydrolysis and fermentation using biomass from the waste from milling rice (RBA) and whey in the production of ethanol. For the fermentation, we used strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast Y904 as the process of submerged fermentation (SF). Besides adding to the fermentation media, the enzyme complex generated in the FES, the variables such as length of submerged fermentation (SF), temperature and pH were determined according to data from the literature for the production of ethanol from sugar-cane-sugar. Then, we carried out tests with separate hydrolysis to analyze its effect on the optimization of ethanol production. At this stage, varying the hydrolysis time, temperature, pH and volume of enzymes used in hydrolysis and FS separately analyzing in response to ethanol production in g / L. After studying the hydrolysis separately, set the following conditions of employment as the best: 10 hours of hydrolysis, hydrolysis temperature of 35 ° C, pH 4.5 hydrolysis and enzyme volume added to 24 mL of fermentation media, noting that the increase in the volume of enzymes does not provide better results in terms of ethanol production under the conditions tested. It is noteworthy that the increased production of ethanol was obtained using separate hydrolysis. Finally we evaluated the production of the enzyme complex generated by FES in *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. The tests were performed using the enzyme complexes separately and together and found that strains of *A. niger* under the conditions tested, were able to produce a more satisfactory evaluating enzyme complex in response to ethanol production.

Keywords: cellulase, solid state fermentation, agro-industrial residues, micro-organisms, ethanol

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A preocupação com a crescente geração de resíduos nas atividades agroindustriais do país e do mundo levou a pesquisa brasileira à reflexão acerca de métodos que podem ser criados visando o aproveitamento desses resíduos de forma a diminuir o impacto ambiental causado pelas atividades industriais.

Diante desse cenário, um dos interesses da biotecnologia é a utilização de resíduos urbanos, industriais e agrícolas de forma que esta biomassa possa ser consumida reduzindo a poluição ao mesmo tempo em que amplia a matriz energética brasileira, por meio da produção de etanol de segunda geração (CARDOSO, 2010).

A maior parte dos resíduos agroindustriais gerados podem ser convertidos em celulase e etanol, tendo em vista que essa biomassa é composta em grande parte por lignina, celulose e hemicelulose (CARDOSO, 2010).

A celulose constitui a mais abundante molécula orgânica existente na natureza, e também uma importante fração dos subprodutos agroindustriais, bem como fonte de poluição urbana e industrial. A diversidade de micro-organismos na microbiota que são capazes de fermentar diretamente fontes de materiais celulósicos disponíveis a custo reduzido faz da fermentação sólida uma das alternativas viáveis para o futuro da ampliação da matriz energética com a produção de etanol de segunda geração, a partir do bagaço de cana e uma grande variedade de produtos como: folhas, pó do processamento da madeira, lodo do processamento do papel, lixo municipal e subprodutos agroindustriais como: farelo e casca de arroz, soro de leite, sorgo, trigo, entre outros (MAKI *et al.*, 2009; DASTBAN *et al.*, 2009).

A fermentação no estado sólido (FES) é um processo de cultura de micro-organismos realizado na superfície ou interior de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte) que pode ter sua composição modificada pela adição de conteúdo de líquido destinado a complementar a concentração de nutrientes necessários ou mesmo manter o nível de atividade de água necessário para o crescimento e metabolismo das células (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; SILVEIRA & FURLONG, 2007; ALEXANDRINO *et al.*, 2007).

A FES traz algumas vantagens comparativas em relação à fermentação submersa, como: menor tamanho de reator, maior produtividade, custos reduzidos de separação de produto, menor gasto energético, baixo capital de investimento, redução na quantidade de resíduos

gerados e simplicidade no processo (PENG & CHEN, 2008; DEL BIANCH *et al.*, 2001; SILVEIRA & FURLOG, 2007).

Os fungos representam, embora existam produtos gerados por algas e vários produtos de origem bacteriana, os micro-organismos mais promissores na fermentação em estado sólido, pois o desenvolvimento das hifas permite que os fungos colonizem e penetrem no substrato e na região porosa entre as partículas do substrato. Outra característica que faz os fungos se desenvolverem bem na FES é que muitos destes micro-organismos conseguem crescer sem maiores dificuldades em ambientes sólidos que apresentam uma pequena atividade de água (GRAMINHA *et al.*, 2007; PENG, CHEN, 2008).

Há uma grande variedade de enzimas hidrolíticas de origem vegetal, bacteriana e fúngica que atuam na hidrólise da biomassa rica em celulose. Na fermentação com micro-organismos, a abordagem tradicional de produção destas enzimas dá especial atenção para a ação catalítica conjunta de enzimas que hidrolisam a celulose cristalina gerando celulose solúvel, glicose, celobiose, polímeros de celobiose e enzimas que hidrolisam a celobiose e outras ligações glicosídicas β -1,4 (presentes, por exemplo, nas moléculas de trealose e gentiobiose). São razões que justificam o interesse específico por este tipo de estudo: a busca da compreensão, ainda não completa, do mecanismo hidrolítico como também, o interesse na produção de etanol a partir de matéria prima submetida a um pré-tratamento químico da biomassa. Neste tipo de pesquisas, enzimas de fungos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* estão entre as mais utilizadas (RAJOKA, 2004; NIDETZKY *et al.*, 1994; SELBY & MAITLAND 1967; DASHTBAN *et al.*, 2009).

A produção de um complexo enzimático capaz de gerar a hidrólise dos múltiplos constituintes da biomassa em proporções satisfatórias requer a combinação de enzimas geradas em condições operacionais distintas por diferentes micro-organismos que fermentam diferentes fontes de carbono. Fungos, como por exemplo do gênero *Aspergillus*, são excelentes produtores de celulasas extracelulares e bactérias produzem celulasas intracelulares. Um outro exemplo que ilustra este fato é a produção de celobioses, que é favorecida em meios sem glicose. Mínimas concentrações de glicose, que podem ser geradas pela hidrólise da própria celulose, são capazes de reduzir a síntese de celobioses (RAJOKA, 2004; MAKI *et al.*, 2009; CARDONA & SANCHEZ 2007).

Esta dissertação visa atender ao projeto “Produção de etanol pelo uso de complexo enzimático misto de *Aspergillus niger* e cepas selecionadas do ecossistema do cerrado” do Edital MCT/CNPq/FNDCT N^o 046/2009 - Formação de recursos humano em etanol e biodiesel. O estudo desenvolvido nesta dissertação teve como finalidade a produção de

complexos enzimáticos utilizando *Aspergillus niger* proveniente de coleção de cultura, visando atender uma etapa do projeto, mencionado anteriormente, que consiste em avaliar cepas provenientes de coleção de cultura com a finalidade de comparar a ação desse complexo em relação ao produzido por cepas coletas no cerrado. A segunda etapa do projeto que consiste na coleta dos fungos, seleção das cepas e no estudo das mesmas, está sendo desenvolvido por uma aluna de doutorado. A participação conjuntas das orientadas nesta linha de pesquisa pode ser confirmado pela publicação conjunta de artigos em congressos. Vale ressaltar que a resposta em relação ao potencial das cepas estudadas serão analisadas também em relação a produção de etanol e que nesta etapa foram fixadas metodologias analíticas que serão utilizadas no decorrer do projeto mencionado.

Diante do contexto apresentado, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar a atuação do complexo enzimático produzido em fermentação no meio sólido, constituído de resíduo do beneficiamento de arroz e soro de leite empregando *Aspergillus niger*, na produção de etanol. E como objetivos específicos pode-se destacar:

- ✓ Selecionar cepas de *Aspergillus niger* de linhagem conhecida em fermentação com composições variadas de soro de leite, resíduo do beneficiamento de arroz e bagaço de cana-de-açúcar;
- ✓ Selecionar entre os substratos utilizados, o que apresentar melhor resultado como fonte de carbono para o *Aspergillus niger*, visando a produção de celulase;
- ✓ Otimizar a produção de celulase em relação às concentrações de substrato, inóculo e carbonato de cálcio, empregando planejamento de experimentos e utilizando a técnica de superfície de resposta;
- ✓ Testar o complexo enzimático que proporciona os melhores resultados de produção de celulase na fermentação alcoólica de etanol de segunda geração.
- ✓ Avaliar o complexo enzimático produzido utilizando fermentação em estado sólido, em função do substrato, da temperatura e do tempo de processo em relação a resposta produção de etanol, empregando o processo de hidrólise simultaneamente ao processo de fermentação alcoólica;

- ✓ Avaliar o processo de hidrólise do complexo enzimático produzido em função das variáveis tempo, temperatura e pH de hidrólise em relação a resposta produção de etanol, empregando a hidrólise em separado ao processo de fermentação alcoólica;
- ✓ Avaliar a quantidade de enzima a ser adicionada no processo de fermentação alcoólica;
- ✓ Comparar o complexo enzimático produzido a partir de *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Trichoderma reesei* CCT 2768 no substrato e nas condições selecionadas em relação à produção de etanol.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados temas pertinentes a este trabalho, sendo os mais relevantes: as biomassas; a fermentação em estado sólido; enzimas como: protease e celulase, fungos utilizados na produção de complexos enzimáticos e hidrólise de materiais lignocelulósicos.

2.1-Biomassas

Os resíduos agro-industriais são os substratos mais pesquisados. Em geral são baratos e abundantes. Além do mais, têm estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Estes materiais orgânicos, em sua maioria insolúvel em água, são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de micro-organismos. Normalmente são materiais particulados, e a água presente no meio encontra-se complexada na matriz sólida, a qual pode ser aproveitada pela cultura microbiana. Bactérias e leveduras crescem na superfície, enquanto que a estrutura miceliar de fungos filamentosos penetra nas partículas do substrato (CORREIA, 2004).

Atualmente os esforços concentram-se no emprego de subprodutos agro-industriais como substrato, buscando obter produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção. Os grupos de pesquisa existentes ao redor do mundo tiram proveito de substratos naturalmente abundantes em sua região. Vários resíduos agro-industriais podem ser utilizados como substrato, como o bagaço de laranja, farelo de trigo e de arroz, farelo de soja, polpa de maçã, polpa de café, quirela do milho, bagaço de cana, casca de maracujá, bagaço de abacaxi, pedúnculo de caju, etc (CORREIA, 2004).

Segundo Castro e colaboradores 2010, o Brasil possui uma vocação natural para a geração de resíduos. Sendo assim, a Figura 2.1 apresenta séries históricas de geração de materiais lignocelulósicos no Brasil, com as massas representadas em base úmida. O bagaço de cana-de-açúcar, dentre as biomassas consideradas, é a predominante, com uma geração em 2007 de 147 milhões de toneladas. Igualmente, é notória a quantidade gerada das demais biomassas lignocelulósicas: juntos, no ano de 2007, os materiais apresentados na Figura 2.1 somaram uma massa gerada no Brasil de 606 milhões de toneladas, das quais cerca de 105 milhões de toneladas correspondem à fração celulósica (CARVALHO, 1992)

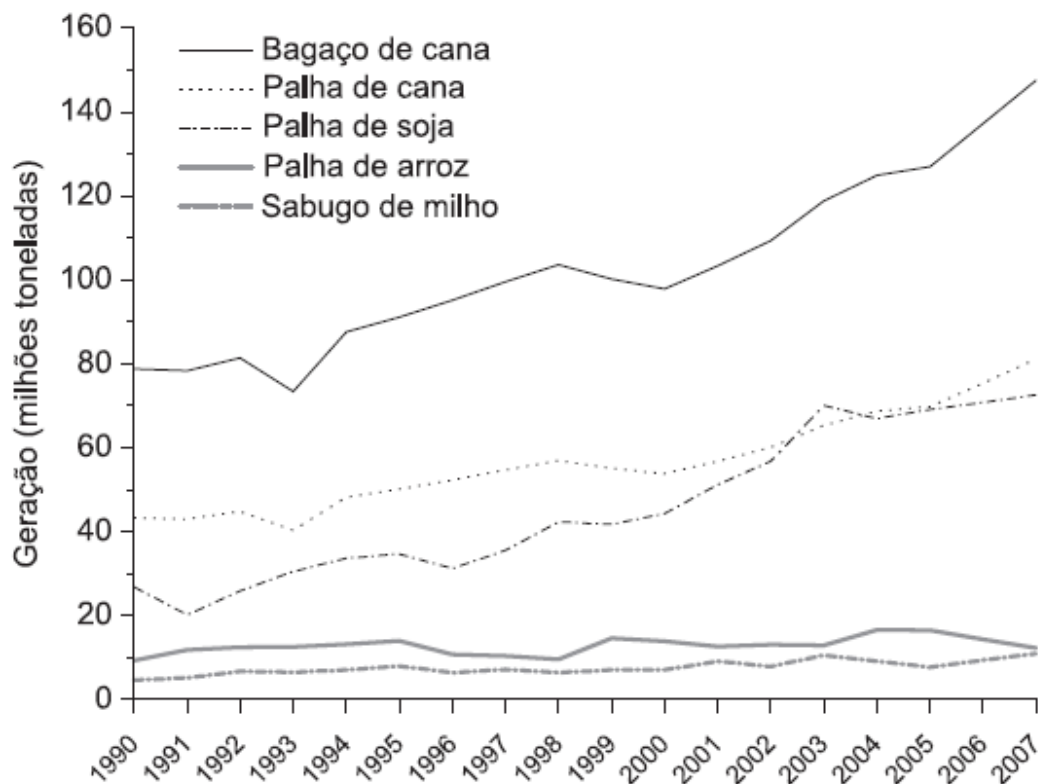


Figura 2.1- Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil. Fonte:

<http://www.sidra.ibge.gov.br>, acessada em Fevereiro 2009.

Os benefícios do desenvolvimento da tecnologia para a produção de etanol pelo do uso da biomassa são vários, como o aumento da energia nacional segura, redução da emissão de gases poluentes na atmosfera, uso dos recursos renováveis, elaboração de carboidratos utilizáveis nos processos industriais, benefícios macroeconômicos para as comunidades rurais e na sociedade em geral (CASTRO, 2010).

É importante resaltar que o uso de resíduos como fonte alternativa para a geração de energia torna-se viável, pois não compete com a indústria de alimentos, uma vez que não retira os alimentos do mercado, apenas usa o que seria descartado no processo final do beneficiamento dos mesmos. Como exemplo pode-se citar a cana na Brasil e o milho nos Estados Unidos.

2.1- Cana-de-açúcar

Cultivada desde os primórdios da colonização do Brasil em 1530, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), é uma planta semiperene da família das gramíneas originária da Índia, que permite cerca de cinco cortes por plantio. No Brasil, a agroindústria teve início

pouco antes da invasão holandesa, em 1630, na região Nordeste. E depois foi difundida por todo país onde houvesse as duas estações propícias para o seu desenvolvimento: uma fria e seca e outra quente e úmida (CTC, 2009).

A Figura 2.2 mostra a morfologia desta gramínea:

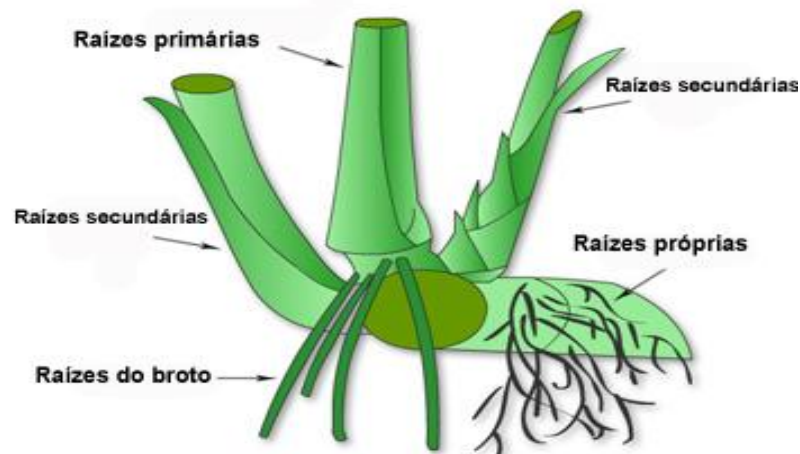
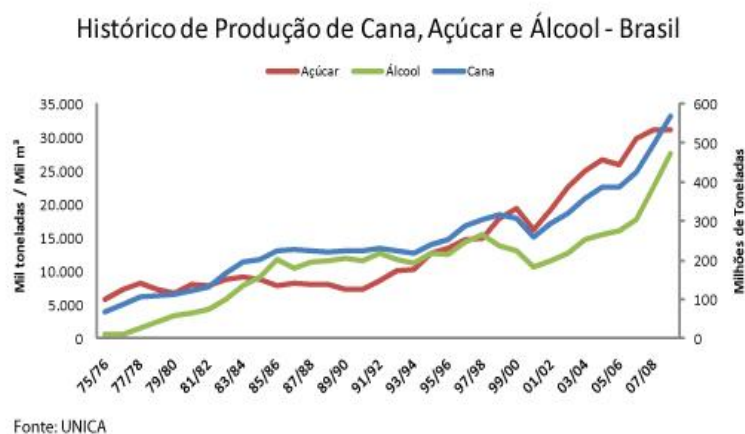


Figura 2.2: Morfologia da cana-de-açúcar. Fonte: www.sugarcane crops.com.br

A cana-de-açúcar está intimamente ligada ao desenvolvimento econômico do Brasil, destacando-se como uma das principais biomassas a serem utilizadas na produção de etanol de segunda geração. Ocupando cerca de 7 milhões de hectares de plantio no país, faz do Brasil seu maior produtor e detentor de técnicas mais avançadas no seu cultivo, plantio, colheita e beneficiamento (ÚNICA, 2009). A Figura 2.3 apresenta o histórico da produção de cana-de-açúcar no Brasil.



A produção brasileira de cana-de-açúcar está concentrada basicamente em duas regiões: a região centro-sul, que contribui com cerca de 88,0 % da produção e a região nordeste, com os restantes 12,0%.

Figura 2.3: Histórico da produção de cana no Brasil. Fonte: www.unica.com.br

Da cana tudo se aproveita, o bagaço pode ser utilizado tanto na produção de eletricidade (cogeração), quanto na fabricação de etanol de segunda geração, pois é rico em material lignocelulósico que pode ser hidrolisado para fabricação do álcool. A palha da lavoura também pode ser utilizada na produção de bioenergia, e ao ser retirado da lavoura diminui a incidência de pragas como a cigarrinha, que prejudicam o cultivo da planta. A vinhaça é reutilizada na ferti-irrigação da lavoura, devolvendo ao solo os nutrientes que são retirados pela planta durante o processo de desenvolvimento dessa gramínea.

Enquanto todas as nações continuarem buscando fontes renováveis de combustíveis, a demanda por biocombustíveis aumentará. E, enquanto o setor concentrar esforços em identificar novas biomassas, comercialmente viáveis e com processos mais eficientes, a produção dos biocombustíveis também crescerá significativamente. Espera-se que o etanol celulósico seja o insumo de maior contribuição para esta solução sustentável (JORNAL DA CANA, 2010).

Os resíduos de bagaço e palha estão entre os substratos mais promissores na produção de etanol celulósico, sendo compostos aproximadamente de dois terços de carboidratos que contém altos teores de açúcar residual de celulose. Essa biomassa propicia o melhor balanço energético em se tratando de produção de etanol celulósico. Um hectare de cana pode produzir de 6.000 a 7.000 litros de etanol; quando o bagaço é utilizado esse rendimento aumenta, chegando a 12.000-15.000 litros. (ibidem)

Contudo, esse substrato é complexo, difícil de ser separado, pois o material celulósico está dentro da estrutura da lignina da biomassa. A etapa de sacarificação e fermentação

simultânea (SSF) é o padrão da indústria para a produção do etanol derivado do amido, mas o seu desempenho deixa a desejar quando matérias-primas celulósicas são usadas. Por outro lado, a separação da hidrólise e da fermentação (SHF) resulta no maior rendimento do etanol em tempo menor, pois as enzimas e a levedura operam sob condições ideais. Por meio de pesquisas e testes industriais o Brasil vem adquirindo conhecimento nesta área, com o objetivo de tornar possível equilibrar com sucesso, as melhores condições operacionais e o menor custo de produção (JORNAL DA CANA, 2010).

Assim, faz-se necessário destacar a importância de pesquisas nessa área de conhecimento e a relevância da biotecnologia para o desenvolvimento econômico de forma sustentável no país.

2.1.2-Arroz

O arroz (*Oryza sativa L*) está incluído no gênero *Oryza*, importante família das gramíneas. O grão de arroz é a semente contida nos seus terminais, a planta pode ter entre 40 cm e 1 m de altura, e seu crescimento varia de 3 a 6 meses, dependendo da variedade e das condições de cultivo (ROCHA, 2010).

Segundo Valadares Filho e colaboradores (2006), o arroz possui a seguinte composição:

- Rico em carboidratos;
- Rico em proteínas;
- Com aminoácidos considerados indispensáveis, existentes nas proteínas e que lhe conferem um importante valor biológico;
- O amido do arroz é um dos mais fáceis de digerir;
- Vitamínico;
- Pobre em sódio, o que parecendo inconveniente, torna-se muitas vezes uma vantagem;
- Pobre em gorduras;
- Pobre em teor de celulose.

Um grão de arroz pode ser dividido em três partes principais: casca, película (farelo) e grão, conforme mostra a Figura 2.4. A composição química da casca de arroz é similar às

fibras orgânicas, mas varia conforme a espécie cultivada, tipo de solo, fatores climáticos e fertilizantes empregados (HWANG e CHANDRA, 1997).

Em termos mundiais, o Brasil está entre os 10 principais produtores de arroz, sendo superado por: China, Índia, Indonésia, Japão, entre outros. Aproximadamente 70% dessa produção, é proveniente das regiões centrais, envolvendo grande parte dos Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e região sul, destacando-se o Rio Grande do Sul (FAGUEIRA e BARBOSA FILHO, 1980).

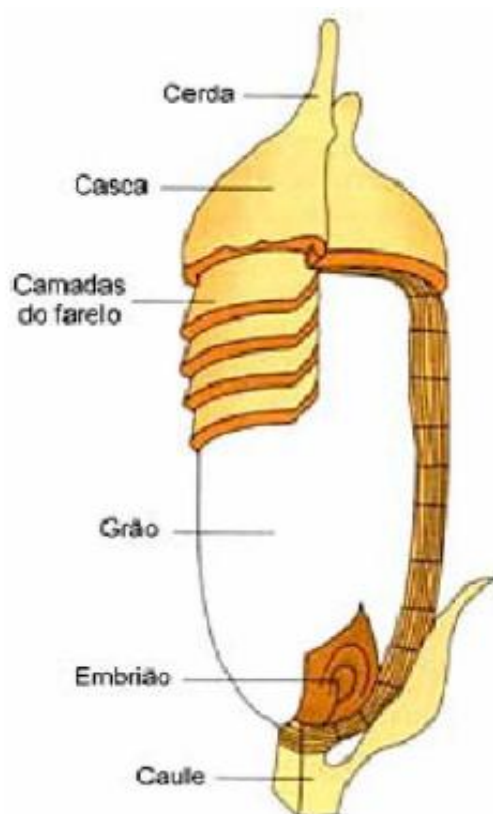


Figura 2.4: Esquema dos constituintes do arroz. Fonte: KAWABATA, 2008

A Tabela 2.1 mostra a composição química do arroz:

Tabela 2.1 – Composição química do arroz (KAWABATA, 2008).

Celulose	Lignina	Sílica
50%	30%	20%

Dois sistemas tradicionais de cultivo são adotados nas lavouras do Brasil: de sequeiro e irrigado. O arroz de sequeiro tem uma plantação anual, de acordo com o período chuvoso, já o

arroz irrigado, diferentemente do arroz de sequeiro, não sofre o problema de sazonalidade da cultura. Nos últimos cinco anos, Roraima tem apresentado um melhor desempenho, aumentando sua participação na produção da Região Norte. Esse aumento significativo coloca o Estado como terceiro maior produtor da Amazônia Ocidental (SEPLAN/RR, 2006).

A partir do beneficiamento de arroz, derivam, além do próprio arroz polido, três subprodutos: grãos quebrados, farelo e casca de arroz. A casca consiste no principal subproduto da indústria arroseira, responde por cerca de 20% do total de arroz. É um material abrasivo, de baixo valor nutritivo e dada a sua reduzida densidade, seu simples armazenamento e eliminação constituem um grave e dispendioso problema. Atualmente, as indústrias do beneficiamento de arroz empregam todo o montante de casca na cogeração de energia (DELLA *et al.*, 2001).

Portanto, acredita-se na importância dessa biomassa como forma de manter inovações industriais de forma a não prejudicar o meio ambiente e estando em conformidade com a sustentabilidade. Visto que essa matéria-prima é bastante consumida, não é necessário preocupação com a falta da mesma para a pesquisa.

2.1.3- Soro de Leite

A produção de leite registrou significativo crescimento nas últimas três décadas. O Brasil desponta como o sexto maior produtor de leite do mundo, produzindo mais de 23 bilhões de litros por ano. Cerca de 66% do volume total de leite produzido no Mercosul é brasileiro. A perspectiva de manter o índice de crescimento nos próximos anos cria condições para o país mudar o perfil de importador para exportador de produtos lácteos (EMBRAPA, 2008).

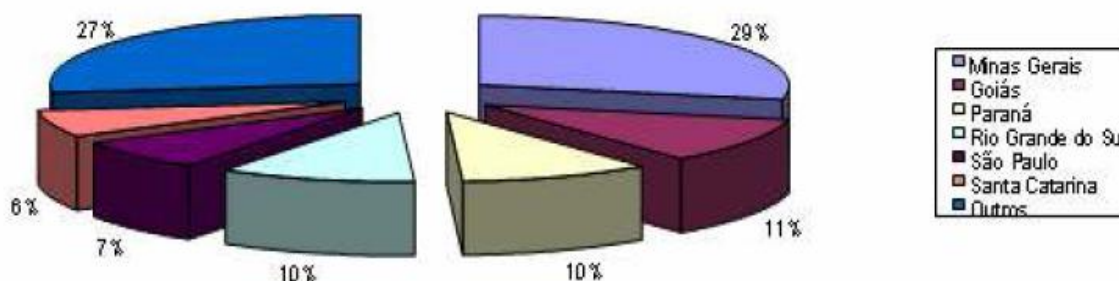


Figura 2.5: Distribuição dos estados produtores de leite no Brasil em milhões de litros por ano. Fonte: EMBRAPA, 2008

Como o leite é um produto perecível, existe uma tendência de concentrar as indústrias de laticínios em regiões onde há um maior contingente populacional e, conseqüentemente, uma maior produção e consumo de leite. Neste contexto, as regiões do Triângulo e Alto do Paranaíba (Minas Gerais) são potenciais candidatas a aumentar o número de laticínios instalados. Especificamente na cidade de Uberlândia, localizada na região do Triângulo Mineiro, onde predomina as atividades agropecuárias. Nesta cidade, a Cooperativa Agropecuária Ltda. de Uberlândia (CALU) é a maior produtora de leite da cidade e processa 200.000 litros de leite por dia, no período de safra, tendo como principais produtos finais: o leite dos tipos C e B (integral e desnatado); manteiga; queijo dos tipos mussarela, minas frescal, ricota, prato e parmesão (Jornal Correio de Uberlândia, 2009).

O soro de leite é um líquido opaco, amarelo-esverdeado, resultante da precipitação de gorduras e caseína do leite durante a fabricação de queijos. Contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original e representa cerca de 80% a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (ANDRADE e MARTINS, 2002). É o maior subproduto da indústria leiteira e é caracterizado por elevados valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), na faixa de 30-60 kg/m³. Seu descarte diretamente em rios ou esgotos públicos atualmente não é permitido, mas em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (HATZINIKOLAOU *et al*, 2005).

No Brasil o soro de leite ainda é considerado um produto de qualidade inferior e de pouca importância sob o ponto de vista nutritivo. O RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – Decreto 30.691/52) considera o soro de queijo como um produto para alimentação animal (CNPGL/EMBRAPA, 2002).

Os produtos obtidos a partir do soro de leite podem, de acordo com o tipo de processo a que são submetidos, ser designados como líquido, concentrado, seco (em pó) e modificado. O soro concentrado é a substância resultante obtida a partir da remoção total ou parcial da água. O soro modificado constitui uma classe de produtos obtidos a partir do soro, por meio de diferentes processos e procedimentos (SOUZA, 2007).

A utilização de proteínas do soro como ingredientes funcionais é um exemplo destas novas tecnologias que torna possível desenvolver produtos com características especiais e agregar valores a subprodutos que com frequência representam problema para as indústrias, como é o caso do soro de queijo. No Brasil, por exemplo, o soro resultante da indústria queijeira é, na maioria das vezes, simplesmente descartado nos esgotos ou mananciais, ou utilizado esporadicamente como alimento animal. Além de representar um problema em

termos de poluição ambiental, deixa-se de empregar um produto nobre em aplicações que lhe agregariam maior valor comercial (ANTUNES, 2003).

Pesquisas mostram a utilização de soro de leite como meio básico para vários processos fermentativos, como produção de etanol, metano e goma xantana (FU *et al.*, *apud* HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005).

Diante da observação sobre pesquisas relacionadas com este subproduto da agroindústria brasileira, nota-se a importância da utilização do soro de queijo na Fermentação em Estado Sólido viabilizando a produção de enzimas que posteriormente serão usadas na produção de etanol de segunda geração.

2.2 – Fermentação no Estado Sólido (FES)

2.2.1- Definição e Histórico

A fermentação no estado sólido (FES) é um processo que se refere ao cultivo de micro-organismos sobre partículas sólidas úmidas na ausência da água livre visível, sendo os espaços entre as partículas preenchidos com ar (MOO-YOUNG, MOREIRA & TENDERDY, 1983).

Os meios de cultivo utilizados em FES são, na sua maioria, produtos agrícolas ou subprodutos de agroindústrias tais como: farelo de arroz (PALMA, 2003), farelo de trigo (NANDAKUMAR *et al.*, 1999), Bagaço de mandioca (STERTZ *et al.*, 1999; DALSENTER, 2000), torta de babaçu (PALMA *et al.*, 2000), bagaço de cana-de-açúcar (SOCCOL *et al.*, 1994) e farinha de trigo (NAGEL *et al.*, 2001). Estes substratos contêm geralmente substâncias macromoleculares como fonte de nutrientes e as enzimas hidrolíticas, secretadas pelo micro-organismo, hidrolisam estas macromoléculas e liberam, assim, pequenas moléculas solúveis que podem ser utilizadas para o crescimento.

A técnica de FES tem sido utilizada desde os tempos em que o homem, apesar de fazer uso dos micro-organismos para seu benefício, não compreendia os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas transformações (DALSENTER, 2005).

Entretanto, foi o enriquecimento protéico de ração animal, a principal atividade que motivou a utilização da FES após 1940 nos países ocidentais, envolvendo o uso de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e minimizando, de alguma forma, a poluição causada por estes resíduos (PANDEY, 2003). Este último detalhe, típico de uma fermentação em estado sólido, desperta interesse mundial, o que impulsiona um contínuo avanço nos estudos referentes a este processo.

2.2.2-Aplicação da FES

A FES desenvolveu-se a partir da produção de alimentos tradicionais fermentados. Atualmente, sua aplicação é estendida às indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (PALMA, 2003). A Tabela 2.2, mostra algumas aplicações da FES (DALSENTER, 2005).

A Tabela 2.2- Apresentação de algumas aplicações da Fermentação em Estado Sólido (DALSENTER, 2005).

Produto	Micro-organismo	Referência
Ácido Gilberélico	<i>Gilberella fijiuroi</i>	KUMAR & LOSANE, 1983
Amilases e Proteases	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>brunneus</i>	NARAHARA <i>et al.</i> ,1982
Invertase	<i>Aspergillus niger</i>	MONTIEL-GONZÁLEZ <i>et al.</i> ,2003
Lacase	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	SOUZA, ZILLY & PERALTA, 2002
Xilanases	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	SOUZA, ROBERTO & MILAGRES, 1999
		PALMA,2003
		LU,LI & WU, 2003
Glucoamilase e Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	DALSENTER,2000
Penicilina	<i>Penicillium crysogenum</i>	DOMINGUEZ, MEIJA & BARRIOS-GONZALEZ, 2000
Lipase	<i>Penicillium restrictum</i>	PALMA <i>et al.</i> ,2000
Aromas	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	BRAMORSKI <i>et al.</i> ,1998
Alfa Amilase	<i>Aspergillus niger</i>	RAMACHANDRAN <i>et al.</i> ,2004
Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>	CASTILHO, MEDRONHO & ALVES, 2000
Endoglucanase	<i>Aspergillus niger</i>	JECU, 2000

Quitosana	<i>Gongronella butleri</i>	NWE <i>et al.</i> ,2001
-----------	----------------------------	-------------------------

Segundo Ramana-Murthy *et al.*, 1993, a aplicação da FES pode ser dividida em dois tipos:

- Aplicações sócio-econômicas como a compostagem de resíduos e aproveitamento de resíduos industriais;
- Aplicações economicamente lucrativas como a produção de enzimas e ácidos orgânicos.

Porém, segundo Dalsenter 2000, há aplicações que aproveitam resíduos e visam a produção de produtos rentáveis.

No âmbito da aplicação econômica, existe interesse em utilizar a FES para produzir uma variedade de enzimas, principalmente aquelas de origem fúngica, como mostra o crescente número de pesquisas executadas nesta área (PANDEY *et al.*, 1999).

2.2.3- Características da FES

A característica própria da FES é sua capacidade de proporcionar um ambiente seletivo com baixa umidade e apropriado para um organismo micelial que produz uma variedade de enzimas extracelulares e pode crescer em altas concentrações de nutrientes sobre a superfície sólida. Estes organismos incluem um grande número de fungos filamentosos e algumas bactérias, tais como os actinomicetos que podem crescer na forma filamentosa, sendo os fungos, particularmente empregados em fermentação sólida (SMITS *et al.*,1998).

Já os substratos sólidos, podem ser vistos como uma mistura gás-líquido-sólido, na qual a fase aquosa está intimamente associada com a superfície sólida que, por sua vez, está em contínuo contato com a fase gasosa do ambiente externo. A interface gás-líquido proporciona uma fronteira para a troca gasosa e transferência de calor. Já a fase sólida úmida proporciona uma fonte rica e complexa de nutrientes que pode ser completa ou incompleta no que diz respeito ao requerimento nutricional do micro-organismo a ser cultivado (MUDGETT, 1986).

Fungos filamentosos tais como: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* são importantes micro-organismos utilizados na FES, pois crescem naturalmente em frutas e grãos ou sobre resíduos agrícolas lignocelulósicos e amiláceos. Estes fungos crescem na superfície de substratos sólidos de um modo similar às raízes das plantas crescendo no solo (NIGAM & SINGH, 1995). Estes micro-organismos, quando em ambientes de FES, crescem

sob condições muito similares a de seus ambientes naturais e podem estar aptos a produzir certas enzimas e metabólitos que normalmente não seriam produzidos em fermentação submersa (RAMANA MURTHY, KARANTH & RAO, 1993).

Segundo Dalsenter 2005, um sistema de FES apresenta complexidades que contribuem para que seu estudo sobre bases teóricas seja mais trabalhoso do que um estudo executado sobre um sistema de fermentação submersa utilizando um micro-organismo unicelular. Entre estas, pode-se citar as seguintes:

- Fermentações tradicionais em substratos sólidos podem envolver culturas mistas com micro-organismos próprios do meio, inoculados ou com ambos;
- Meios de cultivo sólidos naturais proporcionam fontes de carbono mistas e uma diversificada e complexa fonte de nutrientes que pode ou não ser completa no que diz respeito às exigências nutricionais do micro-organismo a ser cultivado;
- Meios de cultivo tradicionais de fermentação submersa contém compostos de carbono prontamente metabolizáveis. Entretanto, os substratos utilizados em FES tipicamente são biopolímeros de alto peso molecular como amido, celulose, hemicelulose, pectina, proteína e lipídeos, os quais requerem hidrólise enzimática para sua assimilação no crescimento;
- A mistura de compostos de carbono de baixo e alto peso molar conduzem a um complexo padrão de indução, repressão e inibição na regulação do metabolismo microbiano;
- Os fungos comumente empregados em fermentações sólidas são obrigatoriamente aeróbios e necessitam obter oxigênio da fase gasosa, sendo que na FES as condições são relativamente estagnadas para a transferência gasosa;
- A densidade da biomassa na fase líquida da FES pode ser muito alta, levando a uma demanda extrema de oxigênio e aumentando a taxa de liberação de dióxido de carbono nos estágios tardios da fermentação. Sendo o processo metabólico exotérmico, a taxa de calor gerada na formação da biomassa microbiana pode ser grande e pode haver dificuldade na remoção de calor quando sob condições estagnadas;
- O crescimento do fungo em FES pode ser extremamente sensível ao cisalhamento; neste caso o sólido não pode ser agitado vigorosamente.

2.2.4- Fatores que Influenciam na FES:

2.2.4.1-Temperatura e Transferência de Calor

O crescimento microbiano é um processo exotérmico e o calor gerado deve ser dissipado, pois altas temperaturas não são favoráveis para o crescimento dos micro-organismos bem como para a formação do produto (MITCHELL & LONSANE, 1992; GHIDYAL *et al.*, 1993). Isto é, quando um processo de FES se inicia, a temperatura é a mesma em qualquer ponto do leito fermentativo. Porém, com o progresso da fermentação acontecem as reações metabólicas nas células microbianas, que por sua vez começam a liberar calor (DALSENTER, 2005)

Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente na germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (PINTO, 2003).

Del Bianchi e colaboradores (2001) apresentam a taxa de produção de proteínas por *Aspergillus niger* em relação à temperatura empregada no processo. Estes autores observaram que a temperatura de 40°C apresentou menor tempo na fase lag, mas à 35°C obteve-se maiores valores de produção de proteína. Para a temperatura equivalente a 45°C houve uma perda sensível na eficiência do processo.

2.2.4.2- pH

Em fermentações sólidas é muito difícil o controle do pH. Consequentemente é desejável que o micro-organismo tenha certa tolerância às alterações na concentração de prótons. Nota-se que o intervalo de pH ideal para o crescimento microbiano é aquele para a formação do produto podem diferir consideravelmente (PRIOR, PEEZ & REIN, 1992).

A medida desta variável também é difícil, visto que o pH da fase líquida contida dentro das partículas, aquele que se obtém pela suspensão do meio sólido em água destilada, pode ser consideravelmente diferente daquele na superfície do sólido, próximo de onde ocorre a maior parte das reações biológicas (MUDGETT, 1986). No entanto, muitos meios de cultivo utilizados em FES apresentam uma boa capacidade tamponante, diminuindo a necessidade de controle desta variável (PALMA, 2003)

2.2.4.3- Atividade de água e Umidade

A água apresenta um papel primordial na FES, pois é a responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY, 2003).

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do micro-organismo. Um nível de umidade muito alto resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE *et al.*, 1985).

A disponibilidade de água ao micro-organismo pode ser definida em termos de atividade de água (a_w) do ambiente, ao contrário do teor de umidade do substrato sólido. A atividade da água é definida como sendo a razão entre a pressão de vapor da água no substrato (p) e a pressão de vapor da água pura (p_0). Grande parte das bactérias crescem em alta a_w (acima de 0,98) enquanto que muitos fungos podem crescer em valores mais baixos (0,90-0,95). Os micro-organismos que são capazes de executar suas atividades metabólicas em a_w inferiores, tais como os fungos filamentosos, são os mais apropriados para os processos de fermentação em estado sólido (NIGAM & SINGH, 1994).

De acordo com Correia (2004), o preparo e a seleção do substrato devem levar em conta os níveis de atividade de água e umidade ideais. A adição de água ou solução de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo.

2.2.4.4- Aeração e Agitação

A aeração e a agitação são operações críticas para prover um suprimento de oxigênio adequado para manutenção das condições aeróbicas e dissipar o excesso de dióxido de carbono liberado durante a fermentação (DALENTER, 2005).

Entretanto, segundo Mudgett 1986, muitas fermentações não podem ser agitadas vigorosamente, uma vez que uma forte agitação pode danificar o micélio. Por outro lado, a agitação tem seus efeitos benéficos como proporcionar uma homogeneidade durante todo o período da fermentação, promover o crescimento sobre partículas individuais do substrato,

expor as partículas do substrato à atmosfera do biorreator, promover a transferência de gás e de calor e promover uma efetiva distribuição do inoculo no início do processo (LOSANE *et al.*, 1985).

A aeração implica não somente na transferência de gás, mas também na transferência de umidade e calor entre o sólido fermentado e o ambiente gasoso (MUDGETT, 1986). Devido à importância da aeração na remoção de calor, muitas vezes a vazão da entrada do ar é determinada pelas necessidades de remoção de calor, e as vazões utilizadas para a remoção deste calor são mais do que suficientes para manter altas as concentrações de oxigênio nos poros do leito fermentativo (DALSENTER, 2005).

2.3- Fungos

A seleção adequada do micro-organismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES (PANDEY, 1992). Eles devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e permitir sua rápida liberação para o meio. Não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto e apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico, ser patogênicos, exigir condições de processo muito complexas, exigir meios de cultura dispendiosos (SCHMIDELL, 2001).

Os principais micro-organismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento desses seres vivos, suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (PUTZKE & PUTZKE, 2004). A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em uma solução. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em meios com teor de umidade da ordem de 15 % e com atividade de água (a_w) de aproximadamente 0,7 (LOSANE *et al.*, 1985).

Os fungos são organismos heterótrofos, eucarióticos, geralmente filamentosos e multicelulares (PELCZAR, 1998; PAMBOUKIAN, 1997). O talo dos fungos, em geral, é formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (PUTZKE & PUTZKE, 2004).

O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem a outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado (PUTZKE & PUTZKE, 2004; PAMBOUKIAN, 1997). O crescimento pode ocorrer na forma de *pellets*, com as hifas emaranhadas formando pequenas esferas, ou na forma filamentosa,

com as hifas dispersas pelo meio de cultura (WHITAKER & LONG, 1973). A reprodução normalmente ocorre por meio de esporos, podendo ser sexuada ou assexuada (PAMBOUKIAN, 1997).

A germinação de esporos é um estágio inicial dos processos de fermentação e sua descrição qualitativa e quantitativa é muito importante devido ao fato de que a produtividade final dos metabólitos primários e secundários está fortemente influenciada pela qualidade dos esporos e cinéticas de sua germinação. Este estágio de desenvolvimento marca determinadas propriedades morfológicas do micro-organismo em seu futuro crescimento, existindo uma alta relação entre a morfologia e a excreção de metabólitos (PAUL & THOMAS, 1998; OSHEROV & MAY, 2001).

Como são organismos heterotróficos, os fungos necessitam retirar do meio ambiente os nutrientes necessários ao seu crescimento. Moléculas simples terão preferência na utilização, sendo então, reprimidas as formações de enzimas para moléculas mais complexas. Por exemplo, se houver glucose no meio, a qual é preferida pelo fungo, não serão formadas as enzimas para degradar polímeros, como amido e celulose e enzimas para outros açúcares como galactose, maltose e sacarose (PUTZKE & PUTZKE, 2004; BERTOLIN *et al.*, 1996; MACEDO & FACCIOTTI & SCHMIDELL, 1999).

A temperatura para o crescimento dos fungos situa-se entre 0 °C e 35 °C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 °C e 30 °C. O *pH* em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies e a *a_w* ideal é próxima a 1,0 (PUTZKE & PUTZKE, 2004).

Conhecidos vulgarmente como bolores ou mofos, os fungos filamentosos elaboram numerosos produtos metabólicos, alguns de grande interesse industrial, tais como: enzimas, alcoóis, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas (penicilina, notatina, flavicina) e algumas bastantes complexas como a ergotina (CARVALHO, 1999).

O Brasil é o país mais rico em biodiversidade de todo o planeta. Em seu território encontram-se 20% do conjunto de plantas, animais e micro-organismos existentes na face da Terra. A enorme e variada biodiversidade brasileira, dividida em seus principais biomas (Amazônia, Pantanal, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Campos e Florestas Meridionais), acolhe a maior riqueza do planeta em genes tropicais (DINIZ & FERREIRA, 2000).

2.3.1- O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* possui hifas ramificadas, septadas, incolores e refringentes. Conidióforo com hastes simples, saindo de uma célula-base, com extremidade globosa ou clavada (vesícula). Da superfície da vesícula saem fiálides (ou esterigmas) com aspecto de garrafas e disposição radiada no seu conjunto. Na extremidade de cada uma forma-se uma cadeia de esporos basipeta: (conídio ou filósporo), globosos, secos e de cor variável, como podem ser visto na Figura 2.6 (MINAMI, 2003).

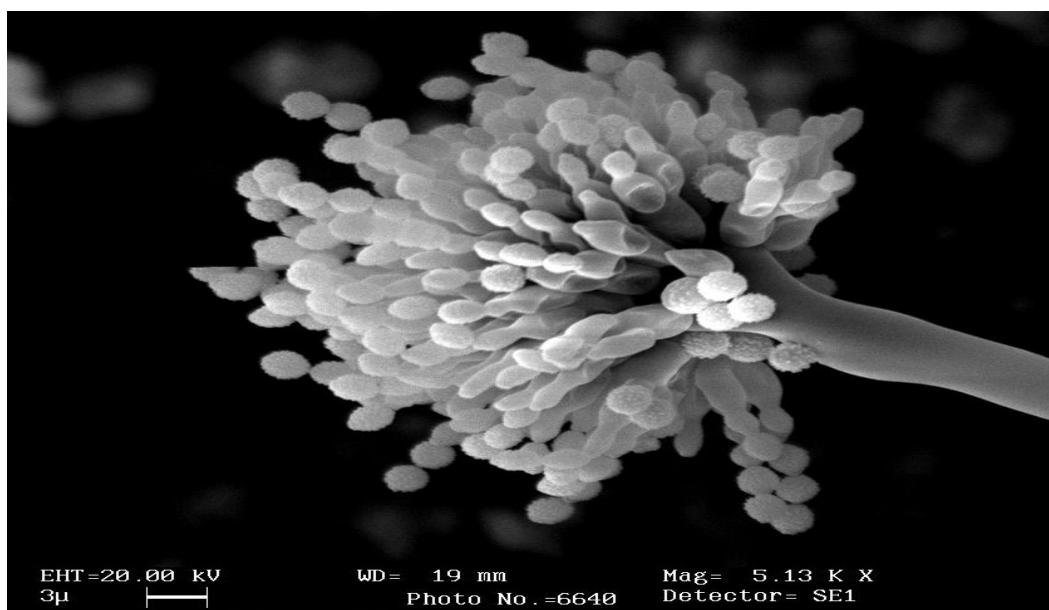


Figura 2.6- Microscopia de varredura de *Aspergillus* sp. Fonte- <http://schimmelpilze.de/presse-download.html>

O *Aspergillus niger* cresce rapidamente em meios de cultura com diversos substratos, produzindo colônias que consistem em um feltro basal branco ou amarelo compacto coberto por uma camada densa de escuro-marrom devido a formação dos conídios (TZEAN *et al.*, 1990).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são excelentes na produção de enzimas, algumas delas podem ser vistas na Tabela 2.3 onde pode ser observada a sua relevância comercial e suas aplicações:

Tabela 2.3- Aplicação e relevância comercial dos fungos *Aspergillus niger* (COURI, 1993.)

<i>Classe da enzima</i>	<i>Setor da indústria</i>	<i>Aplicação</i>	<i>Referência</i>
Poligalacturonase	Alimentação	Clarificação de sucos de fruta	Santos e Macedo,

Celulase	Alimentação	Extração de óleo de azeitona	2008.
	Detergentes	Limpeza e clarificação	Cardoso <i>et al.</i> , 2008.
	Têxtil	Amaciamento de tecidos de algodão	
Celulase	Detergentes	Limpeza e descoloração	Aguiar <i>et al.</i> , 2008.
	Têxtil	Amaciamento de tecidos de algodão	
	Papel e celulose	Remoção de tinta e modificação das fibras	
Lactase	<i>Farmacêutica</i>	Fabricação de capsulas de lactase	Cardoso <i>et al.</i> , 2008.
Invertase	<i>Bebidas</i>	Deslactosação do leite, produção de doces.	
	<i>Panificação</i>	Produção de açúcar invertido	Cardoso <i>et al.</i> , 2008.
Pectinases	<i>Saúde</i>	Higiene Bucal	
	<i>Papel</i>	Degomagem de fibras	Patil e Dayanand, 2006.
Naringinase	<i>Alimentação</i>	Clarificação e redução da viscosidade em sucos de frutas	
	<i>Bebidas</i>	Remoção do amargor do suco cítrico	Bram e Solomons, 1965.
Protease	<i>Detergentes</i>	Remoção das manchas de proteínas	Paranthaman <i>et al.</i> , 2009.
	<i>Papel e Celulose</i>	Remoção de biofilmes	
Amilase	<i>Couro</i>	Purga do couro	
	<i>Detergentes</i>	Remoção de machas de amido	Gupta <i>et al.</i> , 2008.
	<i>Panificação</i>	Aumenta maciez e volume do pão	
	<i>Bebidas</i>	Tratamento de suvoas, cerveja light	

A classificação e as principais características do fungo do gênero *Aspergillus* podem ser observadas na Tabela 2.4:

Tabela 2.4- Classificação e características dos fungos *Aspergillus niger* (COURI, 1993).

Classificação	Principais características	
Reino	<i>Fungi</i>	
Divisão	<i>Eumycota</i>	Tipicamente micelial, algumas vezes unicelular.
Subdivisão	<i>Deuteromycotina</i>	Talo micelial e septado ou unicelular; reprodução sexual ausente, mas a parasexual

Classe	Hyphomicetes	pode ocorrer. Formas miceliais estéreis ou produzindo conídios em hifas separadas ou agregadas na ausência de conidiomata.
Ordem	Moniliales	Micélio hialino, contendo conidióforos livres, que se projetam do micélio de forma irregular.
Família	Moniliaceae	Os conidiófilos são solitários livres, que se projetam do micélio de forma irregular.
Gênero	<i>Aspergillus</i>	Micélio septado. Conidiófor erecto com terminais globosos dos quais emergem fiálides com conídios arredondados unicelulares e de coloração negra, esverdeada ou amarela.
Espécie	<i>Níger</i>	Conídios globulosos de aspecto rugoso, com equinulações verdadeiras, coloração negra medindo em torno de 4 a 5 de diâmetro.

Diante do que foi descrito anteriormente fica nítido a importância dos fungos *Aspergillus niger* para a fermentação em estado sólido.

2.4- Enzimas

A denominação enzima, palavra que vem do grego significa “em leveduras”, foi dada por Khune em 1878, época em que se acreditava que enzimas só eram ativas nas células vivas o que permaneceu até 1897, quando Buchner observou que o extrato obtido por prensagem de células de leveduras ainda possuía a propriedade de fermentar sacarose (BOBBIO, 1992).

Quimicamente as enzimas são proteínas com uma estrutura química especial, contendo um centro ativo denominado *apoenzima* e algumas vezes um grupo não proteico, denominado *coenzima*. À molécula toda é dado o nome de *haloenzima*. Dependendo do tipo de ligação, grupo prostético pode ser separado da proteína por métodos brandos, como por exemplo diálise. Em alguns casos as enzimas podem estar ligadas a moléculas orgânicas de baixo peso molecular, ou íons metálicos cuja função é ativar as enzimas a eles ligadas e que são denominados *cofatores* (BOBBIO, 1992).

As enzimas são substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido à complexidade de suas estruturas químicas. Com algumas exceções, são solúveis em água e álcool diluído, e quando em solução são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta, talvez, seja a propriedade mais importante desses compostos em relação à tecnologia de alimentos (BOBBIO, 1992).

As enzimas convertem uma substância, chamada de substrato, em outra denominada produto, e são extremamente específicas para a reação que catalisam. Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reação química. Consequentemente, o tipo de enzima encontrado em uma célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua, como pode ser observado na Figura 2.7

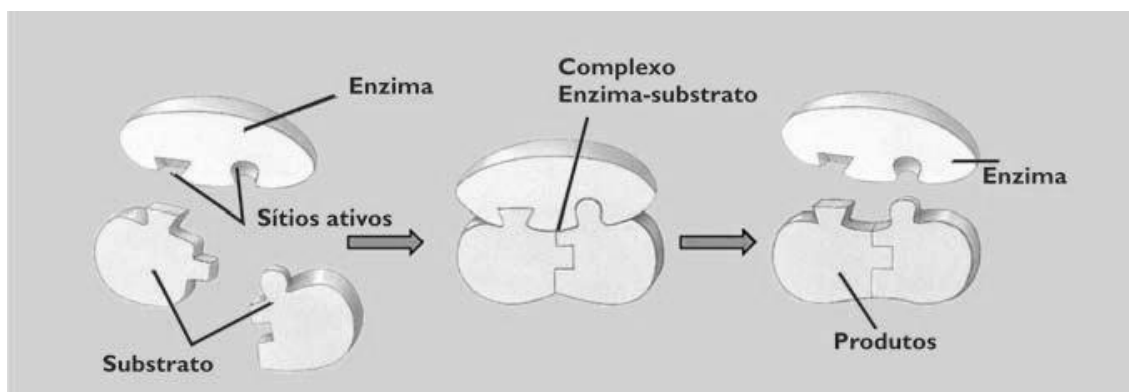


Figura 2.7- Representação esquemática da relação enzima-substrato.

As enzimas são utilizadas em ampla variedade de aplicações, nas indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas. Também são muito utilizadas para fins analíticos. A tecnologia enzimática teve grande impulso como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 1991).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação em processos industriais de grande escala são limitados pelo seu alto custo de estabilização em relação ao armazenamento. Durante a utilização, a estabilidade diminui devido a alterações no pH, temperatura, atrito, pressão osmótica e um efeito cumulativo de todos esses fatores em função da duração da sua utilização (ALEKSANYAN & MARKOSYAN, 1986).

Atualmente, o uso de complexos enzimáticos produzidos naturalmente pelo processo de FES está revolucionando o aproveitamento e disponibilidade do alimento balanceado na indústria de alimentação animal. Cada vez mais fica comprovado que o uso desses complexos é fundamental para seguir o conceito evolutivo da indústria, que envolve a redução de custo e a melhora dos parâmetros produtivos dos animais (SANTOS, 2007).

A tecnologia enzimática é hoje, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais

biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente e provocam o desgaste de materiais. Muitos tratamentos químicos são realizados em altas temperaturas e pressões, utilizando ácidos fortes ou álcalis que significam perigo ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente (BON, 2002; MITIDIERI *et al.*, 2002).

2.4.1-Classificação e estrutura

As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e estabelece seis classes, que podem ser observadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5- Classificação das enzimas (União Internacional de Bioquímica).

Classe	Enzima	Função
Classe 1	Oxirredutases	Catalisam reações de oxirredução, transferindo elétrons, hidretos (H-) ou prótons (H+)
Classe 2	Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas.
Classe 3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas.
Classe 4	Liasas	Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente, retirando ou adicionando grupos funcionais.
Classe 5	Isomerasas	Transformam uma molécula em seu isômero.
Classe 6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP.

2.4.2-Produção de enzimas: origem e aplicação

A Tabela 2.6 descreve a origem e a aplicação das enzimas na indústria de alimentos.

Tabela 2.6-Origem e aplicação das enzimas na indústria de alimentos (União Internacional de Bioquímica).

Enzimas	Origem	Indústria	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Rhizophus spp</i> , <i>Mucor rouxii</i>	Panificação	Suplemento de farinha, preparação de massa, alimentos pré-cozidos, elaboração de xaropes.
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Cerveja	Preparação de concentrados líquidos de café, clarificação de sucos.
Dextrano-sacarose	<i>Leuconostoc mens.</i>	Alimentar	Dextrano para diversos usos.
Glucosioxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Alimentar	Eliminação da glicose dos sólidos do ovo.
Invertase	<i>Sacharomyces cereviase</i>	Alimentar	Mel artificial.
Lactase	<i>Sacharomyces fragilis</i>	Láctea	Hidrólise da lactose.
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizophus spp</i> , <i>Mucor spp</i>	Láctea	Sabor ao queijo.
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizophus spp</i> , <i>Penicillium</i>	Alimentar	Clarificação de vinhos e de sucos de frutas.
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Panificação, cerveja e alimentar.	Impede que a cerveja se enturpe ao esfriar, abranda as carnes.
Enzimas parecidas à renina	<i>Mucor</i>	Alimentar	Coalhada do leite para fabricação do queijo.

2.4.3- Celulases

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante do globo terrestre, é formada por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β – 1,4 detendo importância mundial como

matéria-prima industrial e fonte de energia renovável (TEERI, 1997; JOSHI & MANSFIELD, 2007).

Como pode ser observado na Figura 2.8, as cadeias de celulose se encontram organizadas em arranjos ordenados, formando microfibrilas insolúveis, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre as cadeias (IGARASHI *et al.*, 2007).

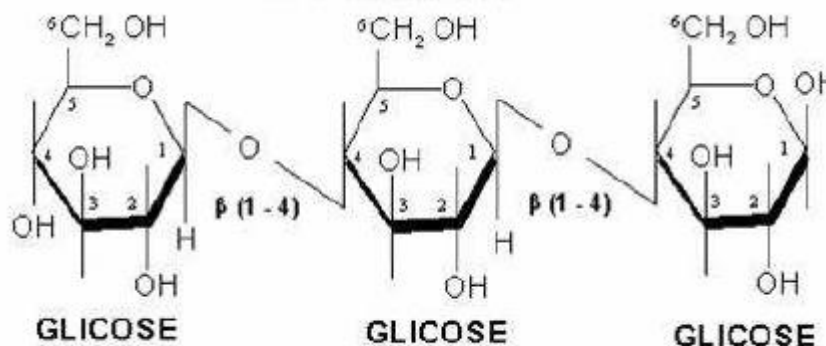


Figura 2.8 – Estrutura química da celulose (FRANCO, 2009).

As microfibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, apresentando cadeias de glicana fortemente ligadas em paralelo. Estas regiões são denominadas regiões cristalinas. A celulose apresenta também regiões com menor grau de ordenação, denominadas regiões amorfas. Essas propriedades estruturais resultam em uma elevada resistência à hidrólise ácida ou enzimática (BON *et al.*, 2008).

O complexo enzimático celulolítico consiste de três classes de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose: endoglucanases (1,4 β -D-glucanglucanohidrolase), exoglucanases (exo 1,4- β -D-glucan-celobiohidrolase) e β -Dglucosidases ou celobiasas (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações β – 1,4 na região central da molécula, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização como produto (DIENES *et al.*, 2004).

A carboximetilcelulose é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas (CAO & TAN, 2002).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO & TAN, 2002).

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisam terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição

pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as β – glucosidases (BON *et al.*, 2008).

As β – glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA *et al.*, 2002).

O uso de resíduos e biomassa celulósica de baixo custo na produção de celulasas, além de reduzir bastante o valor gasto com a produção dessas enzimas, pode também resultar em uma produtividade equivalente àquela obtida usando outras fontes de carbono como a lactose (ADSUL *et al.*, 2004).

Carboidratos ou seus derivados são indutores de grande parte das enzimas celulolíticas, por isso, a fonte de carbono utilizada é de grande importância na produção de enzimas. Altos rendimentos de celulasas têm sido obtidos pela utilização de fontes de carbono contendo celulose (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

Muitos micro-organismos podem ser cultivados em bagaço de cana-de-açúcar para a produção de celulasas. O cultivo pode ser realizado por processos de fermentação líquida ou fermentação sólida. Outro exemplo de resíduo que tem sido utilizado na produção de celulasas por micro-organismos é o farelo de trigo. Este resíduo é constituído principalmente de amido, glucuronoarabinoxilanas, celulosas, β -glucanas, proteína e lignina (PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005).

As celulasas possuem ainda grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, de ração animal, têxtil, de detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (BHAT & BHAT, 1997).

As celulasas podem ser utilizadas nas indústrias alimentícias em conjunto com as hemicelulasas e pectinases, na extração e clarificação de sucos de frutas. Após o esmagamento das frutas, essas enzimas são utilizadas para aumentar a liquefação por meio da degradação da fase sólida. As celulasas têm sido utilizadas também no processamento de ração animal. O tratamento de silagem com essas enzimas é benéfico, pois aumenta a sua digestibilidade (BÉGUIN & AUBERT, 1994).

A utilização de celulasas na ração animal melhora a sua qualidade nutricional e favorece a digestão de ruminantes e monogástricos (BHAT, 2000).

A utilização de celulasas na indústria têxtil vem aumentando nos últimos anos e atualmente estas enzimas correspondem ao terceiro grupo mais utilizado. A principal

vantagem do seu uso é a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de forma controlada, resultando em um produto de melhor qualidade (FRANCO, 2009).

As celulasas têm sido utilizadas também na fabricação de detergentes, pois são capazes de alterar a estrutura das fibras de celulose. A adição dessas enzimas nos detergentes facilita a remoção da sujeira e contribui para a manutenção da maciez, brilho e cor dos tecidos (BHAT, 2000).

2.4.4- Proteases

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A sequência é determinada pelo genoma da célula, podendo conferir às proteínas atividades metabólicas específicas. Segundo Campbell (2000), quanto maiores forem as forças que mantêm a estrutura tridimensional das proteínas, mais difícil será a ação das proteases.

As proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas (RAO *et al.*, 1998), tendo um importante papel em todos os processos fisiológicos, indo da quebra geral de proteína para nutriente à regulação da morte celular programada (POZA *et al.*, 2001).

Podem ser encontradas em todos os organismos vivos, uma vez que conduzem funções metabólicas e essenciais. De maneira geral, as proteases extracelulares catalisam a hidrólise de várias proteínas para moléculas menores e serão subsequentemente absorvidas pelas células, enquanto as proteases intracelulares têm importante papel na regulação do metabolismo (RAO *et al.*, 1998).

A maior aplicação de proteases ocorre na indústria de detergentes, processamento de carne e queijo, recuperação de prata em filme fotográfico, produção de medicamentos, processamento de resíduos proteináceos, síntese de peptídeos (ANDRADE *et al.*, 2002; BARTHIAR *et al.*, 2002; GERMANO *et al.*, 2003; GHORBEL *et al.*, 2003; LONGO *et al.*, 1999).

As proteases estão divididas em: microbianas, animais e vegetais, sendo que no terceiro grupo as mais conhecidas são a papaína e a bromelina. A performance da enzima depende da fonte da planta, das condições climáticas para o crescimento e dos métodos usados para sua extração e purificação (RAO *et al.*, 1998).

As proteases de origem animal podem ser utilizadas na indústria farmacêutica, as mais empregadas são a tripsina e a quimotripsina (NETO, 2001; SAID, 2002) e também na indústria alimentícia (RAO *et al.*, 1998).

As de origem microbiana são preferidas às de origem animal ou de plantas por possuir todas as características desejadas para aplicação em biotecnologia (RAO *et al.*, 1998).

Dividem-se em três grupos: proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas possuem atividade em pH 2, 0 a 5,0 e as neutras possuem atividade em pH 6,0 a 9,0. O terceiro grupo, é formado pelas proteases alcalinas que tem atividade em pH 9,0 a 11,0 (GUERRA, 1991).

A nomenclatura das peptidases é difícil, sua especificidade dificulta a definição, que é dependente da natureza de vários resíduos de aminoácidos ao redor da ligação peptídica serem hidrolisados e também da conformação da cadeia polipeptídica do substrato. Em consequência disso, a classificação envolvendo critérios adicionais do mecanismo de catálise é utilizada. Os termos protease e proteinase ainda são empregados para a capacidade da enzima hidrolisar peptídeos, mas sugere-se que sejam substituídos, respectivamente, por exopeptidases e endopeptidases, ou simplesmente peptidases (NC-IUBMB, 2005).

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir proteases por processos de fermentação devido ao seu crescimento rápido. Micro-organismos também são preferidos em relação a plantas e animais, devido à sua facilidade de manipulação genética, gerando novas enzimas com uma característica específica ou simplesmente para superprodução da enzima (LUNA *et al.*, 2002; POZA *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 1998).

As enzimas proteases podem ser empregadas em vários ramos industriais, dentre eles pode-se citar: panificação, para hidrolisar o glúten; indústria de carne, no processo de amaciamento; indústria de queijos, no desenvolvimento de sabor, aroma e textura dos mesmos; em formulações para uso hospitalar, para digerir e dissolver resíduos orgânicos; entre outras.

As proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de micro-organismos patogênicos. Esses fatores tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (CAMPBELL, 2000; KOELSCH *et al.*, 2000; VERMELHO *et al.*, 1996; VERMELHO *et al.*, 2002). Como exemplo pode ser citado a pesquisa de inibidores da protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV), uma vez que esta enzima é essencial para a produção de novas partículas virais nas células infectadas (CAMPBELL, 2000).

2.5- Hidrólise de materiais lignocelulósicos

Uma das mais emergentes aplicações das enzimas do complexo celulolítico atualmente é a hidrólise de biomassas. As matérias-primas de origem lignocelulósica, contêm de 20 a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado como bloco de construção para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse. Tais tecnologias se enquadram no conceito de biorrefinarias celulósicas, as quais visam o aproveitamento integral e integrado dos resíduos agroindustriais gerados em uma determinada cadeia produtiva, de modo a agregar valor à mesma (<http://www.eere.energy.gov/biomass/docs/esppp.ppt>).

A sacarificação da celulose pode ser conduzida de duas formas principais: por tratamento químico (utilizando-se ácido diluído ou concentrado) ou por rota enzimática, utilizando-se as celulasas (OLOFSSON *et al.*, 2008).

A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que nos processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado. Na rota enzimática, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, como metalúrgico, visto que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres (BADGER, 2002).

A hidrólise enzimática da celulose e conversão dos açúcares liberados em moléculas de interesse, tal como o etanol, podem ser conduzidas de forma sequencial (processo HSF, hidrólise separada da fermentação) ou simultânea (SSF, sacarificação simultânea à fermentação) (OLOFSSON *et al.*, 2008).

O processo SSF contribui com menor custo de investimento à planta, visto que nele são agrupadas duas etapas em um mesmo vaso reacional. Nessa forma de condução, as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos de hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada. A manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio também favorece o equilíbrio das demais reações de hidrólise, no sentido de formação de mais produto, além de reduzir riscos de contaminação no sistema (OLOFSSON *et al.*, 2008).

Já o processo HSF apresenta como uma das principais vantagens frente ao SSF, a possibilidade de ambas as etapas, de hidrólise e de fermentação, serem conduzidas em suas

condições ótimas. Conforme discutido, as celulasas comumente apresentam melhor atividade catalítica em temperaturas acima de 50 °C, bem acima da temperatura ideal para a etapa fermentativa. Nesse caso, como não há matéria-prima em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas ao sistema. No entanto, essa estratégia apresenta como desvantagens: o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, causando inibição às enzimas; e redução na conversão final de glicose, devido à adsorção de parte do açúcar no sólido residual da hidrólise (OLOFSSON *et al.*, 2008).

Considerando-se globalmente a conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol, a seção de conversão da planta pode ainda ser constituída por uma etapa para fermentação de pentoses, majoritariamente xilose, provenientes da fração hemicelulósica das matérias-primas. À realização da fermentação de pentoses e hexoses (glicose) em apenas um vaso reacional dá-se o nome de cofermentação (CF). A condução da cofermentação concomitantemente à hidrólise das frações celulósica e/ou hemicelulósica compreende o processo SSCF (sacarificação simultânea à cofermentação). Por fim, na forma mais integrada de condução das etapas de conversão, nomeada Bioprocesso Consolidado (BPC), a produção enzimática, hidrólise da celulose e hemicelulose e a fermentação da glicose e xilose, acontecem em um mesmo equipamento (LINDY *et al.*, 2002 e CARDONA & SANCHEZ, 2007).

As formas de condução integrada dos processos de hidrólise e fermentação, visando-se a obtenção de etanol, encontram-se ilustradas na Figura 2.9.

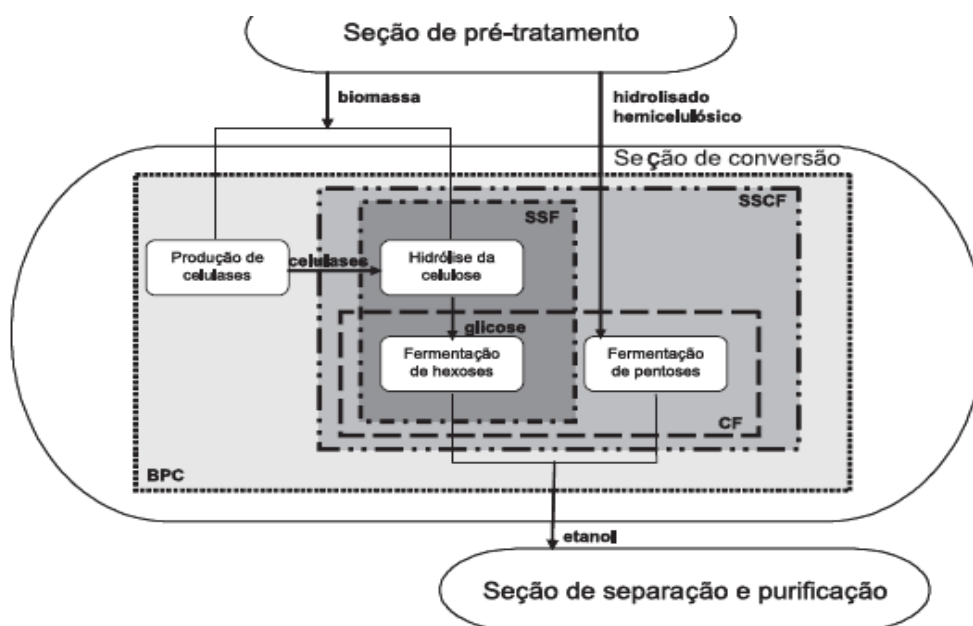


Figura 2.9- Formas de integração das etapas de conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol (CASTRO *et al.*, 2010).

É notória a imprescindibilidade de pré-tratamento aos materiais utilizados para os processos de hidrólise. Segundo Van Wyk, a adsorção das celulasas em substratos celulósicos insolúveis é facilitada quando estes são submetidos previamente a tratamentos, sejam eles químicos ou termopressurizados, que promovem, pela remoção de frações indesejáveis nesse processo (lignina e hemicelulose), um aumento na área superficial exposta à ação enzimática e a redução da cristalinidade deste glicopolissacarídeo (VAN WYK, 1997).

Um recurso para o aumento da eficiência de hidrólise que vem sendo reportado é a adição de surfactantes ao meio reacional, cujo intuito é promover maior adsorção das celulasas ao polímero celulósico (CASTRO *et al.*, 2010). Alkasrawi verificou que a suplementação do meio hidrolítico com 2,5 g L⁻¹ de tween-20 proporcionou um aumento de 10% na conversão de celulose em glicose. Embora a exata ação do surfactante no sistema ainda não esteja completamente elucidada, os autores levantaram a hipótese de que esta molécula se liga à lignina, prevenindo a indesejável adsorção das celulasas a essa fração e acarretando, conseqüentemente, maior disponibilidade das enzimas para se ligarem à celulose (ALKASRAWI, 2003).

A hidrólise enzimática da celulose, via de regra, tem seu rendimento aumentado com incrementos na carga enzimática, até uma concentração limite, a partir da qual não é compensatório continuar adicionando enzimas ao processo, pois os sítios da matriz do substrato já se encontram saturados pelos biocatalisadores (CASTRO *et al.*, 2010).

Wilkins e colaboradores avaliaram o efeito da concentração de celulasas sobre a hidrólise do bagaço de frutas cítricas, pela utilização dos produtos comerciais Celuclast 1.5L e Novozym 188, da empresa Novozymes, em um processo do tipo SSF, e verificaram que em concentrações a partir de 13 UI g⁻¹ e 0,02 FPU g⁻¹, respectivamente, o rendimento final no produto de interesse, etanol, não era mais incrementado (WILKINS *et al.*, 2007).

Em muitos casos, ainda, é necessária a suplementação dos preparados adicionados no meio reacional, utilizando-se β -glicosidase, com o intuito de promover a redução na inibição de endo- e exoglucanase por seus produtos de hidrólise (especialmente celobiose) e aumentar a conversão final do substrato em glicose (SENDELIUS, 2005).

Segundo Castro e colaboradores 2010, a produção de celulasas e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são tecnologias em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas e estratégias podem ser aplicadas visando seu aumento de produtividade e economicidade.

O conceito de engenharia de produto pode ser aplicado em processos de produção de celulasas, visando a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as

diversas enzimas do complexo celulolítico, em particular EnG e BG. O formulado ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulasas (WEN *et al.*, 2005); pela produção em separado das celulasas e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas (IMAI *et al.*, 2004); ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulasas em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (SRIVASTAVA, 1999).

No âmbito da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, as celulasas são insumos que impactam significativamente o processo, podendo representar até 18% do custo operacional de uma planta (WINGREN *et al.*, 2003). Dessa forma, torna-se necessário o estudo de operações unitárias que permitam o aproveitamento e reciclo desses biocatalisadores ao reator de hidrólise, tais como processos de separação por membranas (CASTRO *et al.*, 2010).

Mores e colaboradores 2001 estudaram o uso de módulos de microfiltração e ultrafiltração, respectivamente, para a separação da biomassa residual da hidrólise e a recuperação de celulasas de *Trichoderma reesei*. Os autores apresentaram um estudo preliminar de impactos econômicos no uso de membranas para o reciclo de celulasas, em processo para produção de etanol, e verificaram que com um fluxo de 50 L m⁻² h⁻¹, a redução no custo de produção do produto final é de 0,048 USD L⁻¹ (MORES *et al.*, 2001). Entende-se, portanto, que o reciclo de celulasas é uma estratégia que deve ser investigada mais profundamente, por ser uma provável alternativa para a viabilidade econômica de processos de segunda geração para produção de etanol (CASTRO *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

3.1 – Material

3.1.1 – Substrato

Nesta dissertação, nos teste iniciais, utilizou-se como substrato na fermentação em estado sólido (FES) para produção do complexo enzimático os seguintes substratos: RBA-resíduo do beneficiamento de arroz (mistura de casca e farelo); bagaço de cana-de-açúcar; sorgo e soro de leite em pó.

Posteriormente foi adotado como substrato para a produção de enzimas na FES, a mistura RBA, na proporção 1/1 em v/v/ e soro de leite em pó reconstituído na proporção 60 g/L. A casca de arroz foi previamente triturada em liquidificador com o intuito de diminuir o tamanho do grão, aumentando assim a superfície de contato e proporcionando uma melhor atuação dos micro-organismos no meio.

O RBA foi adquirido na cidade de Tupaciguara - MG, o soro de leite em pó foi cedido pela empresa Cargil (Anexo B), estas biomassas foram usadas para todos os experimentos. As biomassas foram armazenadas em embalagens apropriadas conforme indicado pelos fornecedores. As Figuras 3.1 e 3.2 mostram os substratos utilizados no desenvolvimento desse trabalho.



Figura 3.1- RBA (resíduo do beneficiamento do arroz)



Figura 3.2- Soro de leite em pó

3.1.2 – Manutenção das cepas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* empregadas nos experimentos

Nesta etapa da pesquisa utilizou-se cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404, 1057 e 9029 adquiridas da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello – Brasil. Os esporos das linhagens foram preservados em tubos de ensaio com tampas de algodão envoltos em gazes, tampados com papel grosso (Figura 3.3). Estas linhagens foram mantidas por renovação do meio a cada 15 dias em ágar batata glicose (PDA) formado por ágar, glicose e batata nas proporções indicadas na Tabela 3.1. A infusão de batata destinada ao meio foi gerada pela fervura de 200 g de batata fatiada em um litro de água destilada por uma hora. Estas proporções e forma de preparo são indicações correspondentes ao meio 129 do Centro de Pesquisas de Material Biológico da Alemanha (DSMZ) que é um banco de micro-organismos (DSMZ, 2009). Este meio foi conservado sob refrigeração a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tabela 3.1 – Componentes e devidas proporções do ágar batata glicose (PDA). (DSMZ, 2009)

Infusão de batatas	1000 mL
Glicose	20 g
Agar bacteriológico	15 g



Figura 3.3-Cepas de fungos *Aspergillus niger*

Utilizou-se ainda cepa CCT 2768 de *Trichoderma reesei* adquiridas da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello – Brasil. Esta linhagem foi renovada por cultivo a cada 15 dias no mesmo meio de manutenção indicado anteriormente e mantida em placas petri a uma temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A Figura 3.4 ilustra a cepa citada.



Figura 3.4- Cepa de *Trichoderma reesei*

3.1.3 – Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foram utilizados como meio de cultura uma solução de água de batata e glicose a 20 g/L. A batata foi cozida por uma hora e descartada, à água do cozimento foi adicionado glicose e homogeneizado, o pH foi ajustado para 5 com tampão acetato. O meio foi colocado em erlenmeyers de 250 mL de volume (Figura 3.5). Estes foram tampados com tampão de algodão envolto em gaze e autoclavados a 1,0 atm durante 20 min. Esporos de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, obtidos por raspagem do meio de manutenção foram inoculados, com todo manuseio executado em capela de fluxo laminar. O meio inoculado foi deixado em mesa agitadora a 120 rpm, por 48 h em temperatura ambiente de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida o meio inoculado foi centrifugado a 12500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspensionado em 10 mL água destilada, este era colocado no meio fermentativo.



Figura 3.5 – Meio de cultura e cepas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* a serem manuseados na capela de fluxo laminar.

3.2 – Métodos

Este estudo foi desenvolvido em 3 etapas. A primeira consistiu na fermentação em estado sólido para a produção do complexo enzimático. A seguir foram realizados testes com a enzima concentrada (precipitação salina) e não concentrada, avaliando como resposta a atividade em Fpase e protease. A segunda etapa consistiu na produção do complexo enzimático e a avaliação da produção de etanol empregando a hidrólise enzimática simultaneamente a fermentação alcoólica. A terceira etapa consistiu na avaliação da produção de etanol empregando as enzimas produzidas em FES e a hidrólise do substrato selecionado em separado da etapa de fermentação alcoólica.

Para facilitar a compreensão das etapas desenvolvidas neste trabalho, fez-se um diagrama que mostra todos os procedimentos realizados bem como as respostas obtidas em cada procedimento (Figura 3.6).

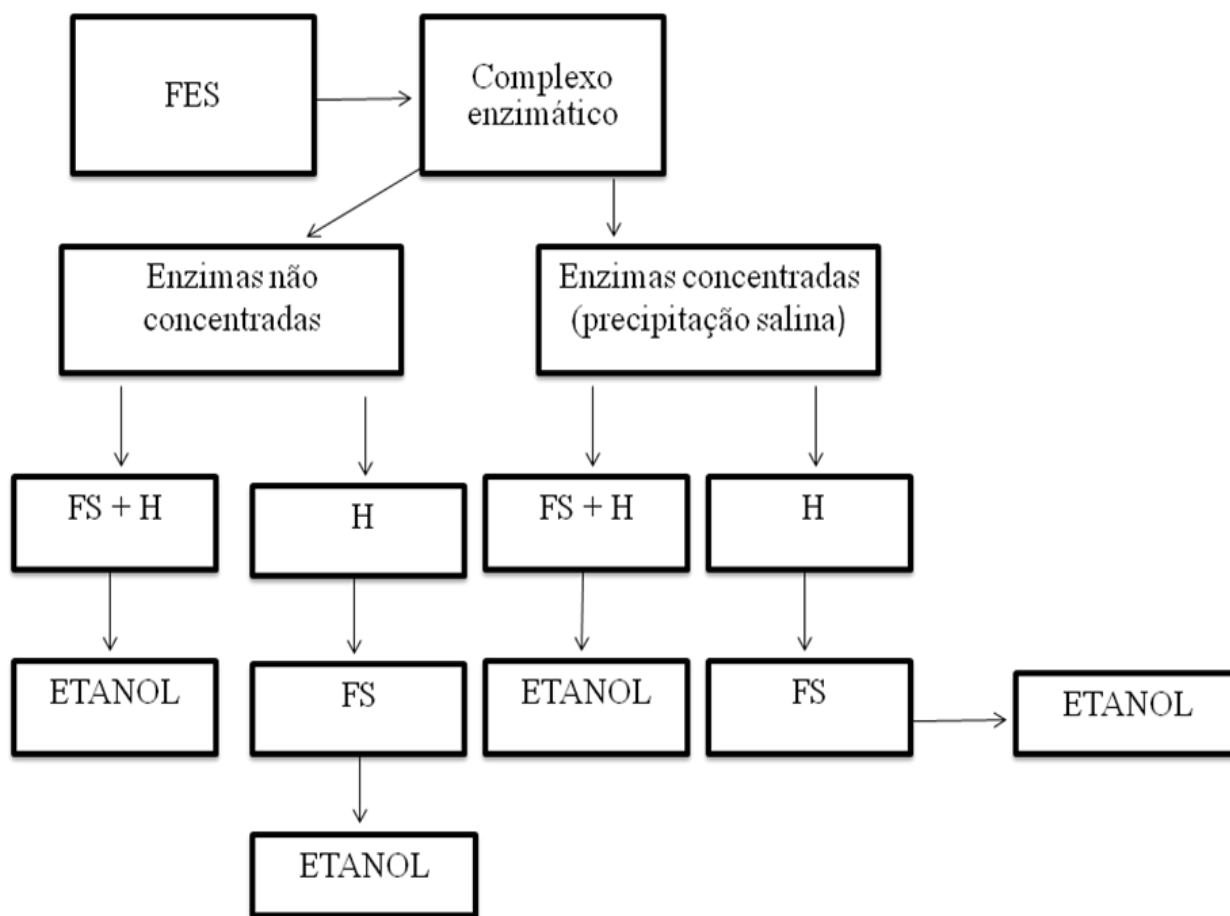


Figura 3.6- Diagrama dos procedimentos realizados no desenvolvimento desta dissertação.

FES: Fermentação em estado sólido

FS+ H: Fermentação submersa e Hidrólise simultânea

H: Hidrólise separada

FS: Fermentação submersa

3.2.1-Processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) para Produção do complexo enzimático

Para produção de enzimas, foram feitas fermentações em estado sólido em um reator do tipo tambor rotativo. O equipamento utilizado pode ser visto na Figura 3.7, o mesmo consiste de um conjunto de dez reatores de plástico com diâmetro de 66 mm e comprimento de 132 mm, com movimentação gerada por um motor de alta rotação com potência de 1 HP ligado a um controlador de velocidade de rotação capaz de gerar velocidades fixas para movimentar o conjunto a 3 rpm, que é um valor usual para este tipo de reator (COUTO, 2006).

A biomassa de RBA foi misturada na proporção de 50%, com soro de leite e carbonato de cálcio. O cálcio tem a capacidade de estabilizar atividade de varias enzimas (Min Hu *et al.* 2010, Tanaka, Hoshino, 2003) . O cálcio também atua na hidrólise sendo capaz de aumentar a

área específica disponível para hidrólise de celulose (Tokuyasu *et al.*, 2008). Diante da atuação do cálcio na atividade de enzimas geradas conjuntamente com a celulase na fase do crescimento de fungos e pela atuação do mesmo na hidrólise da celulose decidiu-se estudar o efeito do mesmo como variável de processo. Neste estudo as concentrações escolhidas foram determinadas a partir de ensaios preliminares.

O tempo de condução da fermentação foi de 24 horas. Utilizou-se temperatura ambiente nos ensaios preliminares e o volume do reator utilizado foi de dois terços do total, sendo o total 453 mL.



Figura 3.7-Reator tambor rotativo.

3.2.2- Extração de enzimas

A extração do complexo enzimático foi realizada com solução de Tween 2% e água destilada na proporção de 100 mL de água e 2 mL de Tween para cada 100 g de substrato. Em seguida o meio fermentado foi centrifugado a 18900 g por 20 minutos. Ao sedimentado era adicionado o meio czapeck modificado que consiste em: sulfato de magnésio 0,5 g/L; cloreto de cálcio 1,0 g/L; nitrato de sódio 2,0 g/L (fonte de nitrogênio); fosfato dibásico de potássio 1,0 g/L; sulfato ferroso 0,01 g/L extrato de levedura 3,0 g/L (fonte de carbono), para cada tubo de centrifugado eram adicionados 6 mL do meio para ressuspender as enzimas.

3.2.3-Concentração enzimática

A separação enzimática foi realizada por *salting-out* (precipitação salina) utilizando sulfato de amônio nas concentrações de 0,10, 0,20, 0,30 e 0,40 g/g da mistura sal e extrato enzimático bruto. Com ajuste de pH para 6,5 e manutenção da mistura salina a 4°C por um período de 12h (*overnight*) seguido de centrifugação a 18900 g e solubilização do precipitado em água em um volume correspondente a 1/3 do volume inicial. A avaliação da eficiência da separação foi realizada pela quantificação da atividade total recuperada definida como a razão entre o produto da atividade pelo volume do extrato purificado dividido pelo mesmo produto para o extrato purificado com o valor final expresso na forma de percentagem.

3.2.4- Método AFEX de tratamento de resíduos lignocelulósicos

Para a fermentação alcoólica foi utilizado o mesmo substrato da FES (RBA+soro), entretanto, neste caso a casca de arroz utilizada foi previamente tratada, pelo método AFEX citado pelos autores DALE *et al.*, 1996 e GAO *et al.*, 2010. A mesma pode ser observada na Figura 3.8 .

Neste processo à casca de arroz, foi adicionado amônia na proporção 1/1 em v/v/, em seguida a mistura foi levada à autoclave por 1 h, a pressão de 1 atm e 121° C $\pm$ 1 °C. Posteriormente, separava-se a lignina presente na casca da celulose e hemicelulose, a casca tratada era levada a estufa para secagem por 24 h. O diagrama representado na Figura 3.9 ilustra o método AFEX de tratamento da casca e a Figura 3.10 mostra a estrutura das fibras do material lignocelulósico.



Figura 3.8- Casca de arroz pré-tratada.

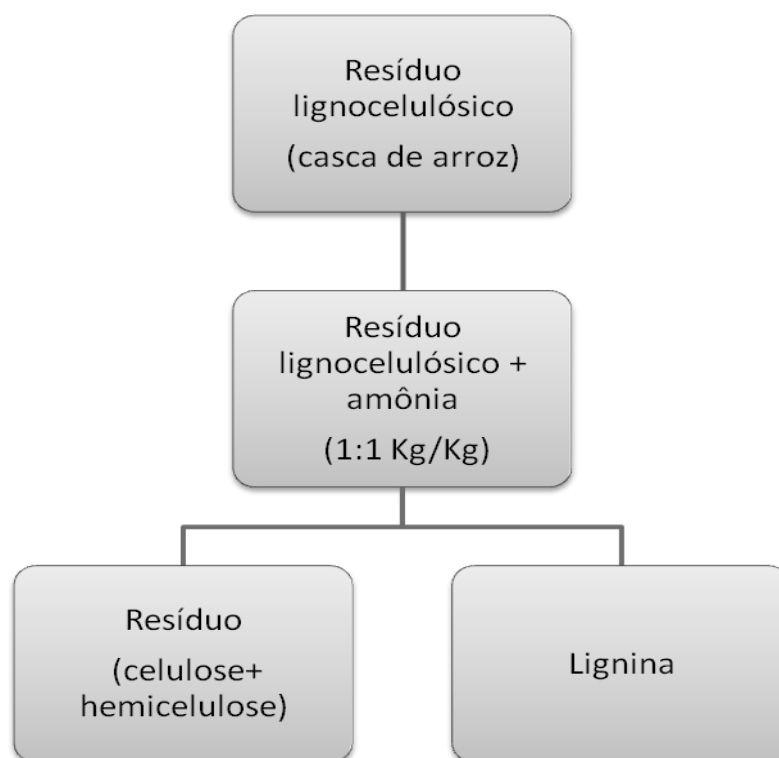


Figura 3.9- Diagrama do método AFEX de tratamento de resíduo lignocelulósico

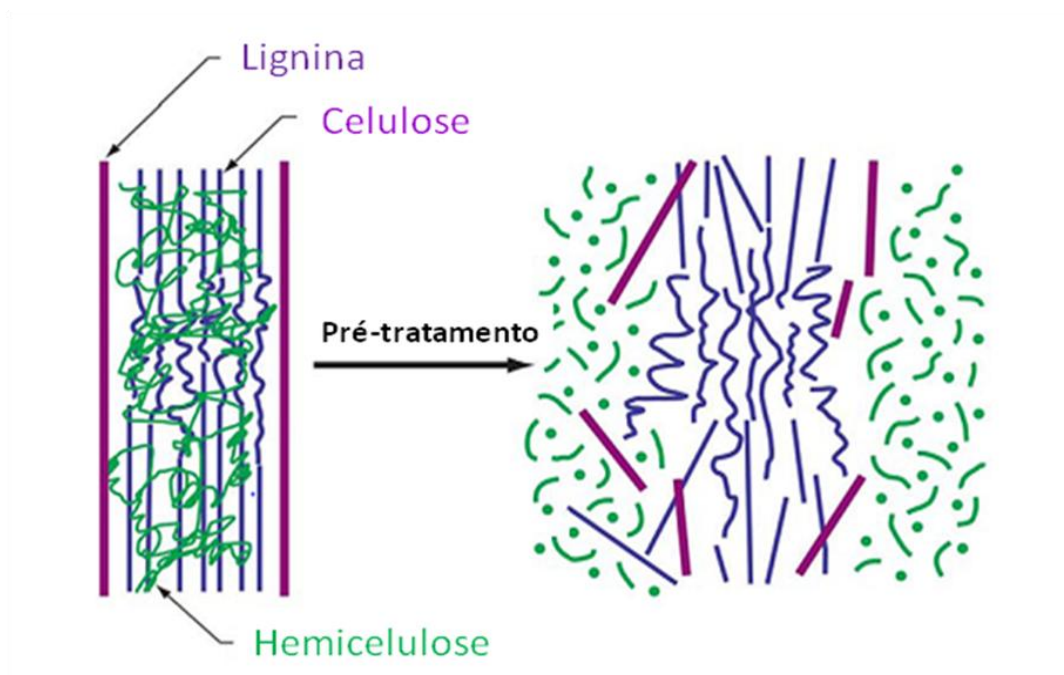


Figura 3.10- Estrutura do material lignocelulósico.

Fonte: www.genomicsgtl.energy.gov/biofuels

3.2.5- Avaliação da produção de etanol utilizando complexo enzimático produzido e enzima celulase comercial

Para o desenvolvimento do processo os reatores tambor rotativo utilizados neste teste foram conduzidos com as condições do ponto central do PCC que será descrito posteriormente. Foi empregado 70 g de RBA, 8,8 mL de soro de leite em pó (sendo soro reconstituído em 60g/L) e 2,8 g de carbonato de cálcio (utilizado como meio que favorece a produção do complexo enzimático) no tempo de condução de fermentação em meio sólido de 24 horas.

O pH utilizado na fermentação submersa (FS) para produção de etanol foi de 4,5 considerado ótimo para esse tipo de fermentação conforme encontrado na literatura (PACHECO, 2010). A temperatura da FS de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo fermentação submersa e hidrólise simultânea. Vale ressaltar que a casca de arroz utilizada neste processo passou pelo pré-tratamento. De acordo com Baudel 2006 e Rabelo 2007, os processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e da hemicelulose, aumentando a disponibilidade da celulose às enzimas. Pode ocorrer também a diminuição do grau de cristalinidade da celulose presente no material, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma.

Segundo Huber & Daler 2009, para serem comercialmente viáveis, os pré-tratamentos precisam gerar açúcares facilmente fermentescíveis em grande concentração, partindo de investimentos de capital modestos. Eles não podem usar produtos tóxicos nem depender de muita energia para funcionar. Além disso, precisam ser capazes de produzir os biocombustíveis a um preço competitivo com a gasolina tradicional.

Para a fermentação submersa (FS) de produção de etanol, variou-se o substrato e as enzimas, com o intuito de avaliar qual a melhor mistura para a fermentação de produção de etanol e se o complexo enzimático produzido consegue bons resultados em relação à enzima comercial utilizada (celulase). Vale ressaltar, que o complexo enzimático produzido utilizado nesse experimento não passou pelo processo de concentração salina (*salting-out*).

3.2.6- Avaliação da temperatura da produção do complexo enzimático

Com o intuito de aperfeiçoar a produção do complexo enzimático, realizou-se um experimento variando a temperatura de produção das enzimas na FES. A temperatura foi variada de 30 à 45 °C $\pm$ 1°C, para tal utilizou-se dois aquecedores de ambiente que foram colocados ao lado do reator tambor rotativo, descrito anteriormente, e com o auxílio de um termômetro fixou-se as temperaturas desejadas em cada processo de FES.

3.2.7-Processo de Fermentação Submersa e Hidrólise Simultânea para Produção de etanol

Na primeira etapa de produção de etanol, a hidrólise e a fermentação submersa foram realizadas de forma simultânea. Desenvolvidas em reator batelada agitado, com temperatura fixa de 35°C $\pm$ 1 °C, por 12 horas. O substrato utilizado na produção de etanol foi o mesmo da produção de enzimas, nas proporções de 6 g de soro de leite e 10 g de RBA (50% v/v) para 100 mL de meio. À biomassa foi adicionado um meio de fermentação que auxiliou a levedura a se alimentar do meio fornecido para produção de etanol. Este meio consiste em: fosfato de potássio monobásico 5,0 g/L; sulfato de magnésio 1,0 g/L; cloreto de amônio 1,0 g/L; cloreto de potássio 5,0 g/L; extrato de levedura 6,0 g/L. A levedura utilizada na fermentação alcoólica foi a *Saccharomyces cerevisiae* Y904, adquirida da empresa Mauri do Brasil, sendo o volume de levedura utilizado na fermentação submersa de 30 mL. Os reatores de fermentação alcoólica e hidrólise simultânea eram erlenmeyer em mesa agitadora, com um volume total de 250 mL e volume útil de 100 mL, os mesmos podem ser observados na Figura 3.11.



Figura 3.11- Erlenmeyer utilizado na fermentação submersa

3.2.8 – Processo de Hidrólise Separada da Fermentação Submersa (FS)

A hidrólise separada consiste em adicionar o complexo enzimático produzido em FES à mistura de 10 g RBA (50% v/v/) e 6 g de soro de leite em pó reconstituído na proporção 60 g/L. A casca utilizada nesta etapa também era pré-tratada, visando uma melhor atuação do complexo enzimático no meio fermentativo. Os tempos de hidrólise bem como outras variáveis como: temperatura, pH e volume de enzimas foram variadas ao longo dos experimentos com o intuito de buscar a melhor maneira de hidrolisar a biomassa lignocelulósica para a posterior fermentação submersa (FS) e produção de etanol.

3.2.9 – Planejamento experimental Avaliado para Atividade de celulase e protease

Para a realização de experimentos significativos e confiáveis, utilizou-se um método científico de planejamento. Além disso, quando o problema envolve dados que podem conter erros experimentais, um modo adequado de análise é por métodos estatísticos. Em qualquer análise experimental devem-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise

estatística dos dados, esta última depende do tipo de planejamento realizado (OLIVEIRA, 2004).

As vantagens do uso do planejamento experimental são (BARROS NETO *et al.*, 1995 *apud* OLIVEIRA, 2004):

- Reduzir o tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- Redução dos custos relativos à execução dos ensaios, fato que está relacionado à redução da quantidade de experimentos;
- Permitir a avaliação e a minimização do erro experimental;
- Permitir uma otimização multivariada;
- Permite a verificação conjunta da influência das variáveis estudadas.

Neste trabalho foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC), utilizando o *software Statistic*®7.0, com intuito de avaliar a influência conjunta das variáveis: massa de RBA, volume de soro de leite e carbonato de cálcio nas atividades das enzimas celulase e protease. A matriz do planejamento composto central a dois níveis com três variáveis foi acrescido de três réplicas no ponto central, 2^3 ensaios para investigação de um modelo linear e ainda 6 experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 17 experimentos.

Os experimentos foram realizados na faixa de 29,4 g ($-\alpha$) a 110,6 g (α) para a concentração de RBA, de 2,4% ($-\alpha$) a 22,6% (α) para o volume de soro de leite e 0,3% ($-\alpha$) a 5,7% (α) para a massa do carbonato de cálcio em (%). Estas faixas foram selecionadas visando o preenchimento de um volume inferior a 60 % do volume útil. Este volume foi escolhido com base no fato que a literatura cita volumes inferiores a este valor como sendo o ideal para FES. Couto & Sandromán 2006 citam, por exemplo 30% do volume útil.

O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de 1,35313 de modo a se obter um planejamento, no qual a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX *et al.*, 1978). Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a equação geral de codificação (Equação 3.2):

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.2)$$

Sendo:

X_n é o valor da variável no experimento na forma codificada; X é o valor real da variável a ser calculado; X_0 é o valor real da variável no ponto central; X_{+1} é o valor real da variável no nível superior; X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

As equações codificadas para quantidade de RBA em g (X_1), volume soro de leite em mL (X_2) e quantidade de carbonato de cálcio em g (X_3) são demonstradas pelas Equações 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente:

$$X_1 = \frac{\text{massa de RBA} - 70}{30} \quad (3.3)$$

$$X_2 = \frac{\text{volume de soro} - 12,5}{7,5} \quad (3.4)$$

$$X_3 = \frac{\text{carbonato} - 3}{2} \quad (3.5)$$

A Tabela 3.2 mostra os valores reais e codificados da biomassa de RBA e soro de leite em concentrações variadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Como resposta para os experimentos do planejamento foi avaliada a atividade em FPase e a atividade proteolítica.

Tabela 3.2- Matriz do PCC para influência conjunta das variáveis: massa do resíduo de arroz, volume de soro de leite e carbonato de cálcio.

Experimentos	RBA (g)	Soro de leite (% - v/p)	Massa de carbonato de cálcio (% - p/p)
1	40 (-1)	5 (-1)	1 (-1)
2	40 (-1)	5 (-1)	5 (1)
3	40 (-1)	20 (1)	1 (-1)
4	40 (-1)	20 (1)	5 (1)
5	100 (+1)	5 (-1)	1 (-1)
6	100 (+1)	5 (-1)	5 (1)
7	100 (+1)	20 (1)	1 (-1)
8	100 (+1)	20 (1)	5 (1)
9	29,4 (-1,35313)	12,5 (0)	3 (0)
10	110,6 (1,35313)	12,5 (0)	3 (0)
11	70 (0)	22,6 (1,35313)	3 (0)
12	70 (0)	2,4 (-1,35313)	3 (0)
13	70 (0)	12,5 (0)	0,3 (-1,35313)
14	70 (0)	12,5 (0)	5,7 (1,35313)
15	70 (0)	12,5 (0)	3 (0)
16	70 (0)	12,5 (0)	3 (0)
17	70 (0)	12,5 (0)	3 (0)

RBA: biomassa residual do beneficiamento do arroz.
v/p: porcentagem volume de soro de leite por massa de RBA.
p/p: porcentagem massa de carbonato de cálcio/massa de RBA.

3.3–Procedimentos Analíticos

3.3.1 – Determinação da atividade de celulase

Atividade enzimática de celulase foi determinada em FPase expressa em U/g sendo que uma unidade foi definida como a geração de um μmol de glicose por minuto. Neste método, a atividade foi avaliada como a velocidade de quebra da celulase proveniente de papel de filtro. Foi utilizado 50 mg de papel de filtro whatman nº1 como substrato e a concentração de celulase foi quantificada pela hidrólise do papel de filtro em solução tampão de acetado 0,2 mol/L e pH 5,5, temperatura e 45°C pelo uso de 1 mL de extrato enzimático, 2 mL de tampão para um tempo de uma hora. Vale ressaltar que as análises foram feitas em duplicata.

Uma unidade de atividade (U) foi definida pela hidrólise de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de substrato. A atividade específica foi expressa em U /g, determinada pela Equação (3.1).

$$A = \left(\frac{\text{Coef. angular} * 1 * 10^6}{MM} \right) * Volr * \frac{Ext * Dil}{Vext} * \left(\frac{100}{Ms} \right) \quad (3.1)$$

Em que:

A - atividade em U/g;

Coef. angular - coeficiente angular da reta de DNS

MM - Massa molecular do açúcar em g/L

Volr - volume no reator em mL

Vext - volume de extrato fermentativo diluído colocado no reator em mL

Dil - diluição do extrato bruto

Ext - volume de extrato do fermentado em mL

Ms - Massa total de substrato em g

3.3.2 – Determinação da atividade de protease

A atividade proteolítica foi avaliada espectrofotometricamente (400 nm) como sendo a velocidade de hidrólise de azocaseína em solução tampão citrato fosfato pH 5,0 com 1% de substrato. Neste método foi utilizado a proporção de 1,5 mL de substrato para 0,5 mL de extrato fermentativo a 37 °C e 2 horas de tempo de reação. A finalização da reação foi realizada com a adição de 0,7 mL de ácido tricloroacético a 10%. (SINGH *et al.*, 2004), A

atividade em protease foi expressa em U/g de sólidos, sendo U definido pela hidrólise associada à geração de 1 unidade de absorbância na hidrólise do reativo cromogênico, azocaseína, por minuto. Mais uma vez as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.3-Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). O método de DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, ao mesmo tempo, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom intenso.

O método de DNS utiliza os reagentes ácido dinitrosalicílico, sal de Rochelle e hidróxido de sódio, cada uma com uma função específica.

A determinação da concentração de açúcares redutores foi feita adicionando 1 mL da amostra diluída a 2 mL do reagente DNS em Tubos de Folin-Wu e levada para um banho em água fervente por 5 minutos. Após este tempo, resfriava-se os tubos em banho com água em temperatura ambiente e completava-se o volume a 25 mL com água destilada, os quais eram homogeneizados e a seguir realizada a leitura da absorbância.

A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, em que 1 mL de água destilada substituía a amostra, seguindo o mesmo procedimento.

O método foi previamente padronizado por uma curva de calibração de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL com intervalos de 0,1 g/L). As leituras foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro Thermo Spectronic modelo Genesys 10 UV, utilizando cubetas de vidro.

3.3.4-Determinação de etanol

A análise do etanol foi realizada utilizando-se o método espectrofotométrico baseado na oxidação do etanol a ácido acético pela reação com dicromato de potássio em meio ácido (STECKELBERG, 2001).

Para a utilização desse método, é necessário que o álcool produzido, esteja destilado. Para isto, centrifugou-se o meio fermentado a 18900 g por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e mensurado até a marca de 25 mL, em seguida colocou-se os 25 mL de sobrenadante em um balão volumétrico de destilação com 50 mL de água destilada e 5 bolinhas de vidro. O processo de destilação foi interrompido quando recolheu-se os primeiros 50 mL de destilado. Retirou-se então 1 mL e diluiu na proporção 1:25, recolheu-se 5 mL dessa amostra e

transferiu-se para um tubo de ensaio juntamente com 2 mL de água destilada e 2 mL de dicromato (reagente de cor). O tubo foi tampado e colocado por 30 minutos em banho-maria a $60 \pm 1^\circ\text{C}$, resfriado à temperatura ambiente, e em seguida, o valor da absorbância foi lido em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores obtidos foram comparados a uma curva padrão (Anexo C). Utilizou-se água destilada ao invés de solução destilada para fazer o branco. Estas análises foram feitas em duplicata.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados preliminares realizados em laboratório para a escolha de cepas de *Aspergillus niger* e substrato apropriados para a produção do complexo enzimático capaz de hidrolisar biomassa visando a obtenção de etanol. Em seguida, serão apresentados e discutidos os resultados da cinética de fermentação, o planejamento composto central, os testes para avaliação da produção de etanol variando temperatura, pH, tempo de hidrólise, volume de enzimas e tipos de cepas de fungo utilizado na produção do complexo enzimático.

4.1 – Testes Preliminares

4.1.1-Avaliação da atividade enzimática visando analisar a influência do substrato na produção do complexo enzimático.

A influência da atividade enzimática foi estudada por meio de testes de FPase após a produção do complexo enzimático. Variou-se o substrato utilizado em: resíduo do beneficiamento do arroz (RBA), bagaço de cana-de-açúcar, sorgo, e a mistura bagaço+ RBA, ao longo de 24 horas, e em seguida avaliou-se a atividade de celulase ao longo de 5 dias de processo. A temperatura utilizada foi de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 4.1 e 4.2.

Os resultados observados na Figura 4.1, mostraram que dentre os substratos testados, o RBA foi o melhor substrato para a produção de um complexo enzimático em relação à atividade FPase durante o tempo de condução de fermentação em estado sólido (FES) de 24 h.

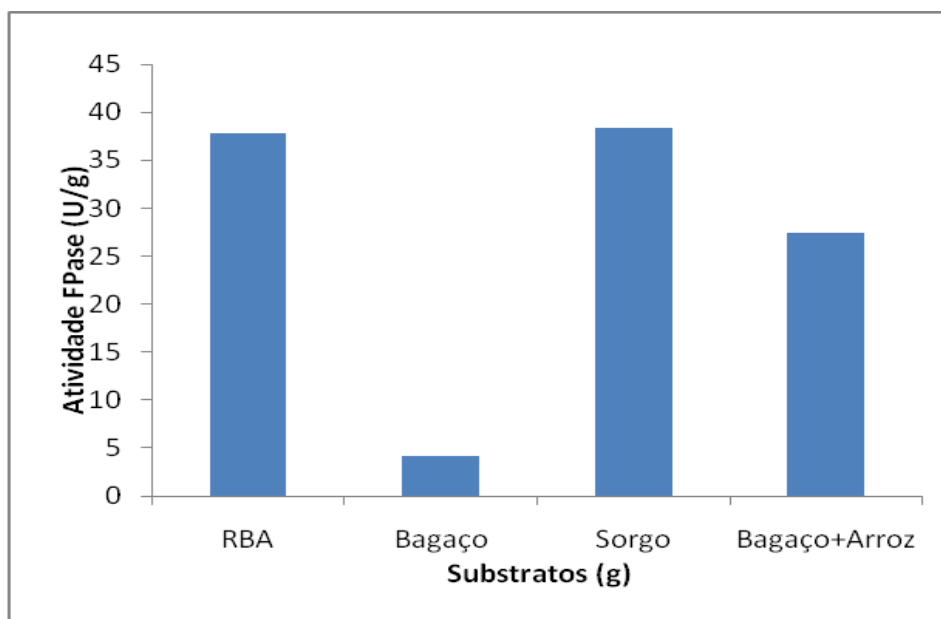


Figura 4 .1– Avaliação da atividade enzimática em FPase na produção de complexo enzimático produzido em diferentes substratos.

A Figura 4.2 mostra que apesar do sorgo ter apresentado atividade em FPase semelhante ao RBA no tempo de FES de 24 h, ao longo do tempo de processo a atividade foi mais estável para o RBA, concluindo que esse substrato é o melhor para a produção do complexo enzimático nas condições testadas neste trabalho. Neste meio observou-se a atividade, 37,8 U/g em 24 horas de fermentação em estado sólido e o decaimento da atividade ao longo do tempo de FES foi menor que o decaimento observado para o sorgo.

Para efeito de comparação, Aguiar & Menezes 2000 em estudo de produção de celulasas de *Aspergillus niger* empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% como fonte de carbono, obtiveram valores de atividade enzimática de aproximadamente 0,25 U/mL para 10g/L de bagaço de cana.

De forma geral, na maior parte dos trabalhos reportados na literatura, os materiais utilizados para a produção de celulasas são de origem lignocelulósica ou celulósica pura. Entretanto, o efeito indutor de espécies de menores massas moleculares tem sido rastreado há muito tempo (CASTRO *et al.*, 2010).

Mandels e colaboradores 1969 compararam o efeito de diversos oligo e polissacarídeos na indução de celulasas de *T. viride*, expressas por suas atividades, obtendo como os de maior potencial: lactose, nigerose, lichenana, glucana de cevada, e principalmente soforose, que apresentou um poder indutor cerca de 2500 vezes maior que o observado utilizando-se celobiose.

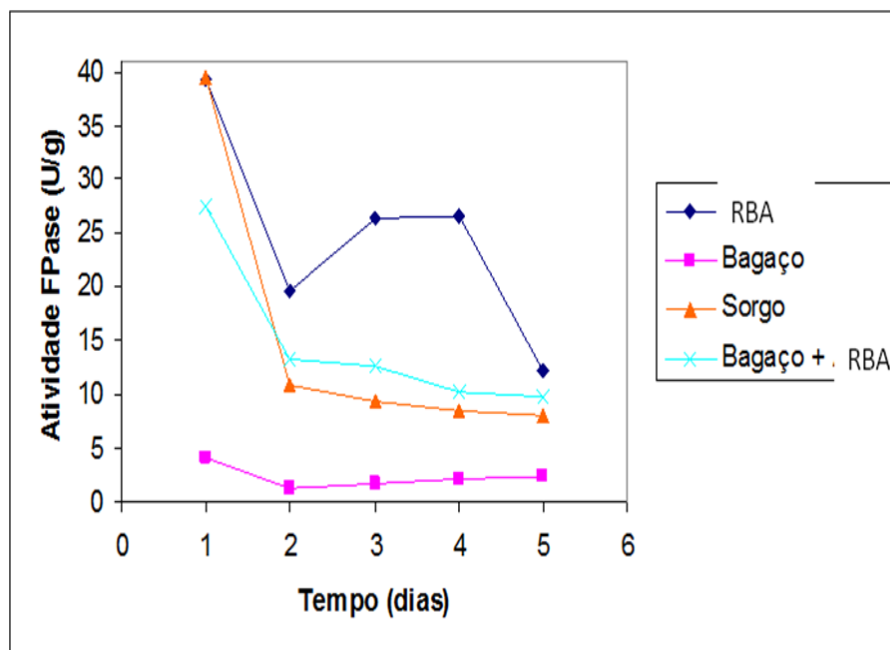


Figura 4.2- Avaliação da atividade de celulase em diferentes substratos e em dias de fermentação diferentes.

Rocha e colaboradores 2010 estudaram o tempo de FES na produção de enzimas utilizando como substrato casca de maracujá e farelo de arroz e observaram que o melhor tempo para a FES para esse substrato está em 4 dias de fermentação no qual obtiveram os resultados mais altos em termos de atividade para enzimas como celulase, amilase e pectinase entre 0,59, 43 e 41 U/g respectivamente.

4.1.2-Atividade da celulase para diferentes concentrações salinas

Foi estudado o comportamento do complexo enzimático, em relação à atividade FPase, utilizando sulfato de amônio em diferentes concentrações. As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam a atividade enzimática em FPase em função da concentração de sulfato de amônio, visando a concentração do extrato enzimático bruto e a recuperação da enzima para diferentes concentrações salinas.

Pela Figura 4.3 é possível observar que o uso de sulfato de amônio em concentrações próximas da saturação (próxima de 40%) é mais indicado na precipitação da referida enzima. Lima e colaboradores 2001, em estudos realizados acerca da precipitação de proteínas pelo

método *salting-out* notaram que a maior quantidade de proteínas precipitadas foi verificada no intervalo de saturação com sulfato de amônio de 40-60%, os resultados dos autores estão na faixa utilizada para este trabalho mostrando uma semelhança nos resultados pois o processo de precipitação salina usado em ambos foi o mesmo. Neste sentido, a precipitação de proteínas e enzimas com sulfato de amônio é uma alternativa de baixo custo e amplamente empregada para a purificação de um tipo de enzimas e proteínas de interesse (BACILA, 2003; FENGXIA *et al.*, 2008).

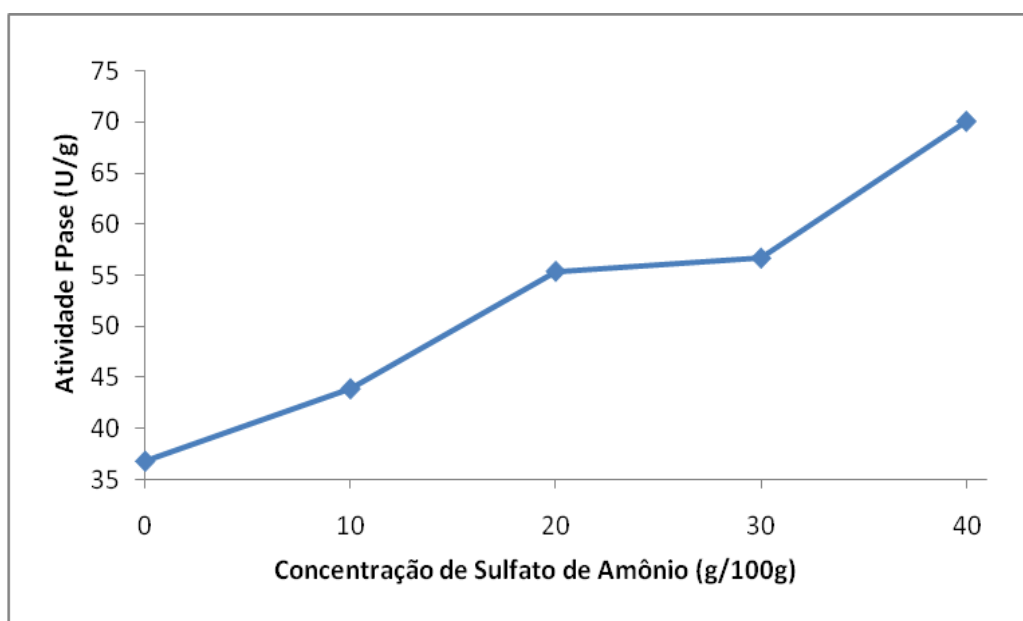


Figura 4.3- Precipitação salina (*salting-out*) do complexo enzimático em relação a atividade da celulase para diferentes concentrações salinas.

Pela Figura 4.4 é possível observar que mesmo na melhor situação ainda há uma perda considerável de enzima (33% da atividade total). Isso pode ser justificado pelo fato de o complexo enzimático não sofrer uma precipitação de 100%, ou seja, há um restante de enzimas “ativas” que ficam ressuspensas na mistura.

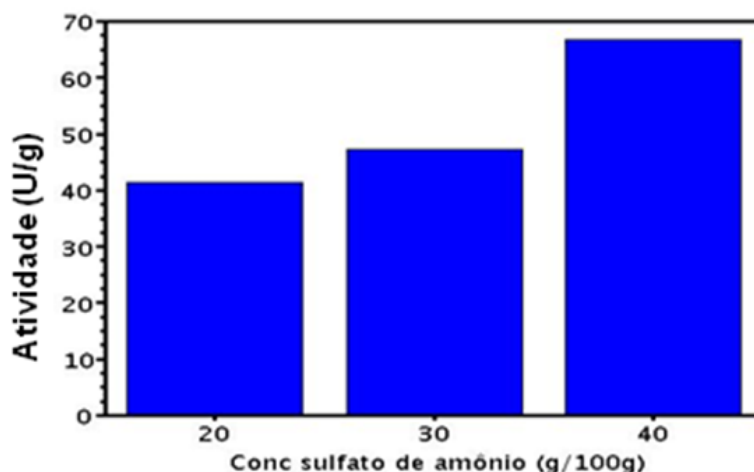


Figura 4.4 - Recuperação enzimática

A Figura 4.5 apresenta o estudo da separação enzimática por precipitação salina (*salting-out*), de uma solução de preparado enzimático bruto para diferentes concentrações iniciais de ácido no meio, no qual a enzima é precipitada e a atividade final em FPase desta enzima precipitada foi avaliada. Na Figura 4.5 é possível observar que a condição mais satisfatória para o *salting-out* corresponde ao pH inicial do meio de 6,5, sendo este valor selecionado para os testes realizados neste trabalho.

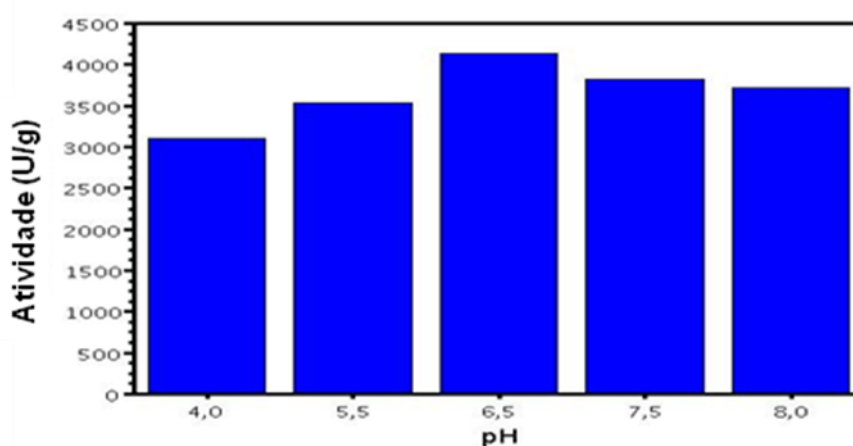


Figura 4.5 – Atividade do complexo enzimático em FPase em função do pH da solução.

A partir dos resultados obtidos no teste preliminar citado anteriormente, selecionou-se o substrato RBA como sendo o melhor para a produção do complexo enzimático no tempo de condução de fermentação de 24 horas. E ainda foi selecionado o volume de 40 g/L de sulfato

de amônio para a realização do processo de concentração do complexo enzimático em questão nas condições estudadas.

4.1.3-Estudos preliminares para seleção da cepa de *Aspergillus niger*

A segunda etapa do trabalho refere-se à realização de experimentos para avaliar as cepas de *Aspergillus niger* ATCC 16404, 1057 e 9029 com base na capacidade de produção das enzimas e o melhor tempo de fermentação em termos de atividade enzimática em FPase. Analisando o gráfico da Figura 4.6 foi possível observar que todos os substratos empregados apresentam atividade em FPase. Porém, dos substratos utilizados para a produção do complexo enzimático o que apresentou melhores resultados em termos de atividade em FPase foi a mistura RBA+soro de leite e com relação às cepas de fungos utilizadas na FES para produção das enzimas a que apresentou melhor resultado em atividade em FPase foi a cepa *Aspergillus niger* ATCC 16404, sendo esta cepa a selecionada para o desenvolvimento das etapas posteriores deste trabalho.

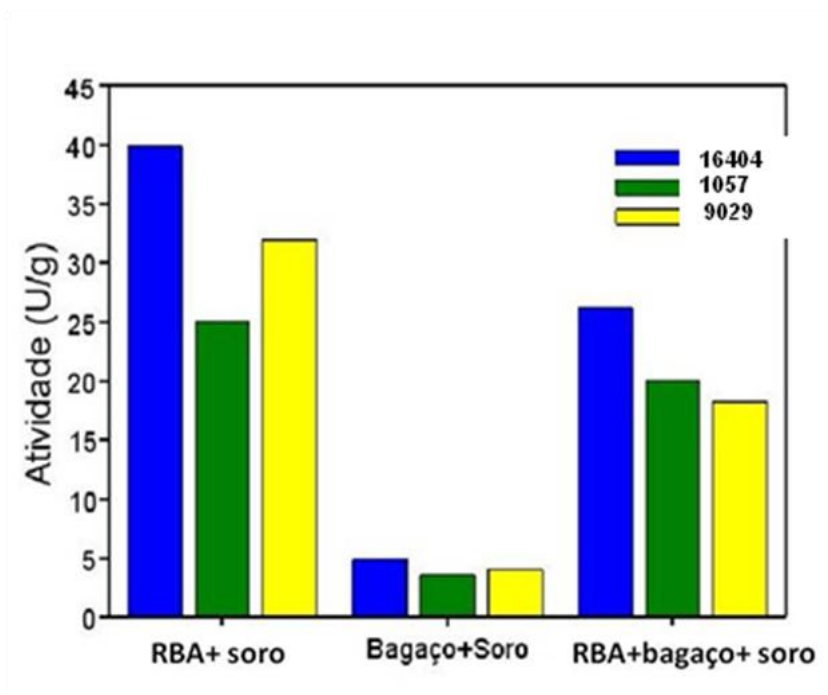


Figura 4.6- Atividade de celulase em função do substrato e da cepa de fungo a ser selecionada.

Em estudos realizados por Ruegger & Tauk 2002, nota-se que todos os fungos filamentosos apresentam atividade em farelo de trigo, cujos valores variam de 207,6 U/g a 320,8 U/g em termos de atividade para o fungo *Aspergillus niger*.

As principais conclusões acerca da diferença de valores em termos de atividade encontrados neste trabalho para o citado anteriormente deve-se principalmente ao substrato utilizado como indutor para a produção de enzimas, que no segundo caso foi o farelo de trigo, e a metodologia de análise para quantificação enzimática visto que neste trabalho avaliou-se a atividade em termos de FPase e Rugger & Tauk 2002 avaliam a atividade em termos de produção de xilanase. Entretanto é possível concluir também que o fungo do gênero *Aspergillus niger* é considerado um coringa na produção de enzimas em substratos variados na fermentação em estado sólido (FES).

4.2-Cinética da Fermentação em Estado Sólido (FES) para a Produção do complexo enzimático

Neste teste, utilizou-se reator do tipo tambor rotativo trabalhando com 4 réplicas, como substrato utilizou-se a mistura RBA+soro selecionado anteriormente (mistura de farelo e casca na proporção de 50% cada em v/v e soro de leite em pó reconstituído na proporção 60 g/L), a temperatura empregada na FES foi de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Variou-se o tempo de produção do complexo enzimático para escolher o melhor tempo de produção das enzimas.

Analisando a Figura 4.7 observa-se que o melhor tempo para a produção do complexo enzimático foi de 24 horas. Neste tempo nota-se os maiores valores de atividade medida em celulase (FPase).

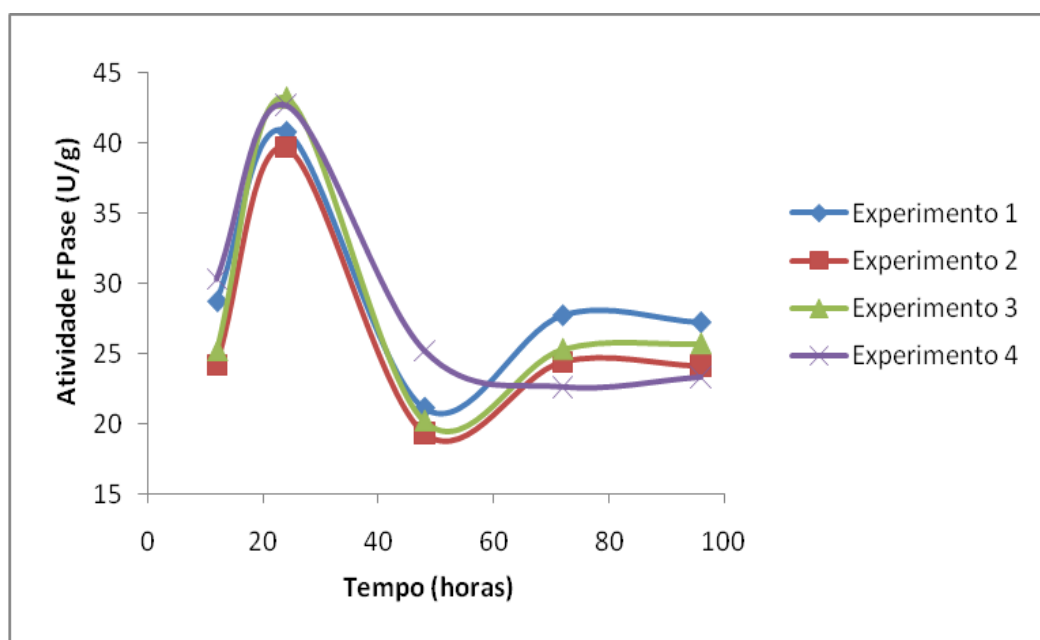


Figura 4.7- Atividade de celulase do complexo enzimático produzido a partir do substrato RBA+soro em função do tempo de fermentação.

Com a finalidade de avaliar a atividade proteolítica do complexo enzimático a Figura 4.8 mostra a cinética desta atividade. Nesta figura observa-se os maiores valores de atividade foram encontrados em 48 horas de fermentação, entretanto em 24 horas verifica-se uma boa atividade da enzima protease, porém menor que o valor encontrado no tempo de 48 horas.

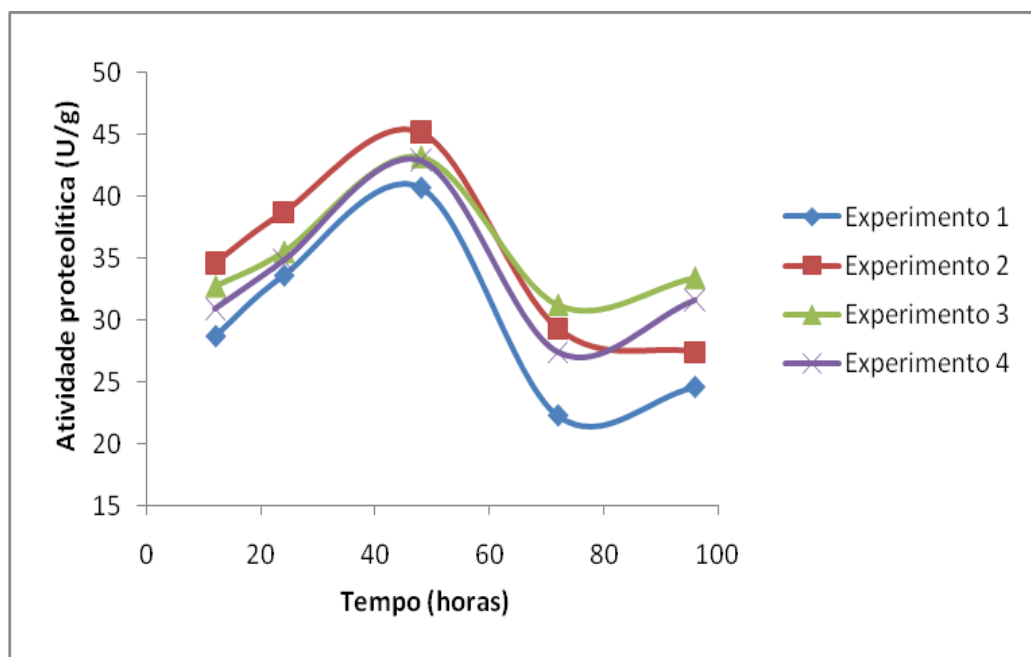


Figura 4.8- Atividade proteolítica em função do tempo de fermentação.

A Figura 4.9 mostra a comparação entre as atividades do complexo enzimático em relação à FPase e a protease, nota-se que em 24 horas a atividade proteolítica esta em fase crescente e a FPase foi máxima, pode-se dizer que há uma relação entre o aumento da atividade proteolítica e a diminuição da atividade de celulase pois esta é uma proteína e pode estar sendo degradada pela ação da protease ou pode estar havendo uma competição entre as rotas. Desta forma, selecionou-se o tempo de 24 horas de fermentação em meio sólido (FES) como sendo o melhor para a resposta em termos de FPase para produção do complexo enzimático.

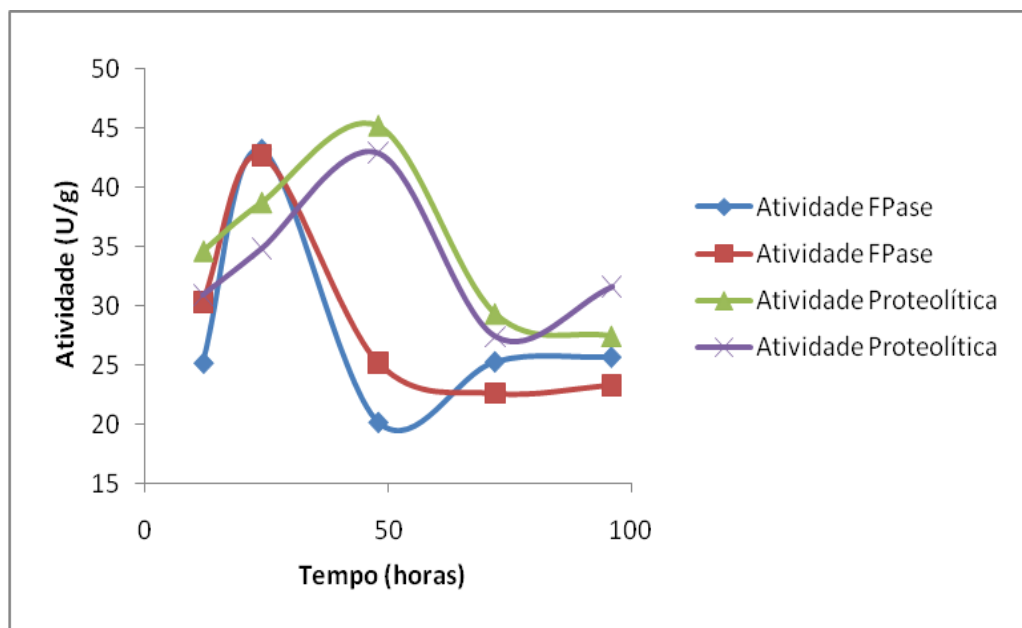


Figura 4.9- Comparação das atividades em celulase e protease em função do tempo de fermentação.

A Figura 4.10 mostra o crescimento celular em função do tempo de produção do complexo enzimático produzido em FES, utilizando reator rotativo. Analisando o gráfico é possível verificar que a maior atividade FPase ocorre antes do maior tempo do crescimento de células. O crescimento celular ocorre em torno de 70 horas de fermentação, enquanto que o melhor tempo para a atividade FPase foi de 24 horas de condução de fermentação. Este fato mostra que durante a produção do complexo enzimático houve crescimento do fungo.

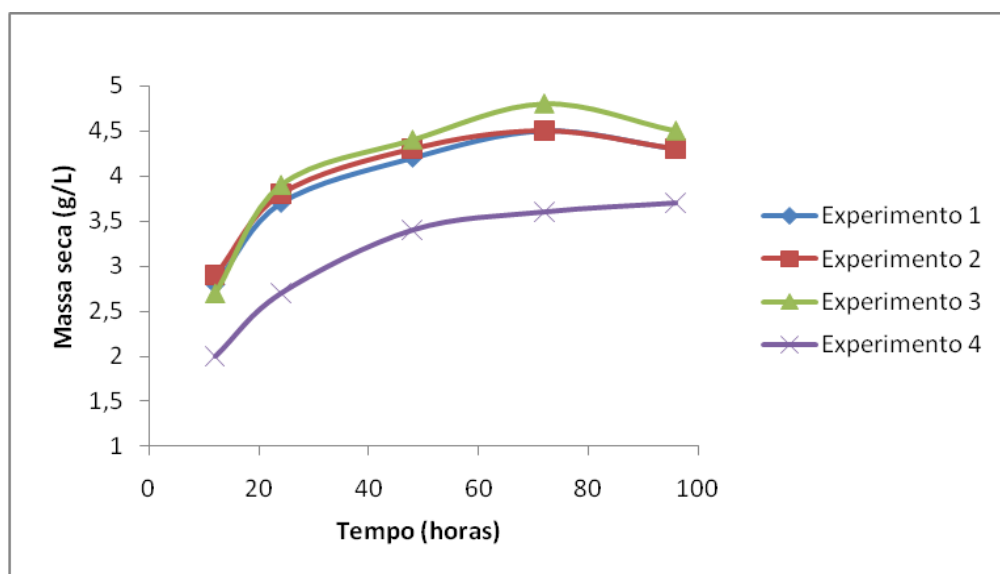


Figura 4.10- Massa seca em função do tempo de secagem.

4.3-Planejamento Composto Central

A Tabela 4.1 mostra os valores reais, codificados e os resultados para a atividade das enzimas celulase e protease na biomassa de RBA e soro de leite em concentrações variadas das variáveis estudadas. Pode-se notar que os valores encontrados para a celulase variaram entre 63,3 e 15,4 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ e que no ponto central os valores de atividade de celulase foram máximos. Observa-se também que o aumento da biomassa RBA diminui a atividade em termos de FPase, isso pode ser verificado analisando os experimentos 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8 e 9 e 10 e confirmado através da equação empírica ajustada para essa resposta (4.1), que mostra o sinal de negativo da variável X_1 (RBA). Além disso, observa-se por esta equação a importância da variável biomassa de RBA por ser a única variável isolada significativa para a resposta atividade de celulase. Vale ressaltar que nesta equação estão presentes somente os termos significativos com nível de significância $< 0,05$. Esta equação foi obtida com os resultados experimentais de atividade enzimática em função da massa de RBA (X_1), porcentagem do soro de leite (X_2) e porcentagem de carbonato de cálcio (X_3) realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de p encontrados pelo teste *t- Student*. A Equação (4.1) apresenta os parâmetros significativos para a resposta atividade de celulase, com nível de significância (p) inferior a 5% e o coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,91 indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 91% da variabilidade dos dados. Pelo sinal negativo que antecede o coeficiente X_1 percebe-se que o aumento de RBA diminui a atividade em FPase.

$$\text{Atividade celulase} = 62,517 - 5,339X_1 - 14,828X_1^2 - 8,045X_2^2 - 7,116X_3^2 + 12,750X_2X_3 \quad (4.1)$$

Para a resposta atividade de protease nota-se, que os valores de atividade encontrados variam de 82,37 a 28,56 $\mu\text{mol}/\text{min.g}$ e que no ponto central encontram-se as maiores valores de atividade para a enzima protease. Com os resultados experimentais de atividade enzimática em função da massa de RBA (X_1), porcentagem do soro de leite (X_2) e porcentagem de carbonato de cálcio (X_3) realizou-se uma regressão múltipla e analisou os valores de p encontrados pelo teste *t- Student*. A Equação (4.2) apresenta os parâmetros significativos para a resposta atividade de protease, com nível de significância (p) inferior a 5% e o coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,91 indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 91% da variabilidade dos dados.

Avaliando a equação empírica ajustada para esta resposta observa-se que não houve nenhuma variável isolada que influenciou essa resposta, somente as interações quadráticas.

$$\text{Atividade protease} = 77,798 - 21,304x_1^2 - 16,787x_2^2 - 10,913x_3^2 \quad (4.2)$$

Tabela 4.1- Matriz do PCC para influência conjunta das variáveis: massa do resíduo de arroz, volume de soro de leite e carbonato de cálcio na atividade da celulase e da protease.

Exp	RBA (g)	Volume do soro de leite (%)	Massa de carbonato de cálcio (%)	Atividade de celulase (μ/min.g)	Atividade de protease (μ/min.g)
1	40 (-1)	5 (-1)	1 (-1)	49,6	28,56
2	40 (-1)	5 (-1)	5 (1)	22,3	32,8
3	40 (-1)	20 (1)	1 (-1)	20,8	30,7
4	40 (-1)	20 (1)	5 (1)	50,9	30,2
5	100 (+1)	5 (-1)	1 (-1)	44,8	32,1
6	100 (+1)	5 (-1)	5 (1)	15,4	31,65
7	100 (+1)	20 (1)	1 (-1)	18,3	32,2
8	100 (+1)	20 (1)	5 (1)	33,5	29,5
9	29,4 (α)	12,5 (0)	3 (0)	47,96	30,4
10	110,6 (α)	12,5 (0)	3 (0)	25,3	37,7
11	70 (0)	22,6 (α)	3 (0)	55,2	46,2
12	70 (0)	2,4 (-α)	3 (0)	42,9	38,44
13	70 (0)	12,5 (0)	0,3 (-α)	42,3	43,9
14	70 (0)	12,5 (0)	5,7 (α)	59,2	62,25
15	70 (0)	12,5 (0)	3 (0)	63,3	82,37
16	70 (0)	12,5 (0)	3 (0)	61,1	80,91
17	70 (0)	12,5 (0)	3 (0)	60,2	81,2

RBA: biomassa residual do beneficiamento do arroz.

v/p: porcentagem volume de soro de leite por massa de RBA.

p/p: porcentagem massa de carbonato de cálcio/massa de RBA.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade de celulase, são apresentadas as curvas de contorno na Figura 4.11 (a, b e c). Esta figura mostra a região de otimização das variáveis na forma real, em relação à resposta atividade de celulase. Por meio dos gráficos é possível notar que os melhores valores de atividade FPase encontrados estão na faixa de 5 a 16% de soro e 55 a 75 g de RBA e entre 2 a 4% de carbonato de cálcio o que mostra que quando os valores da biomassa são aumentados a atividade de celulase não é satisfatória.

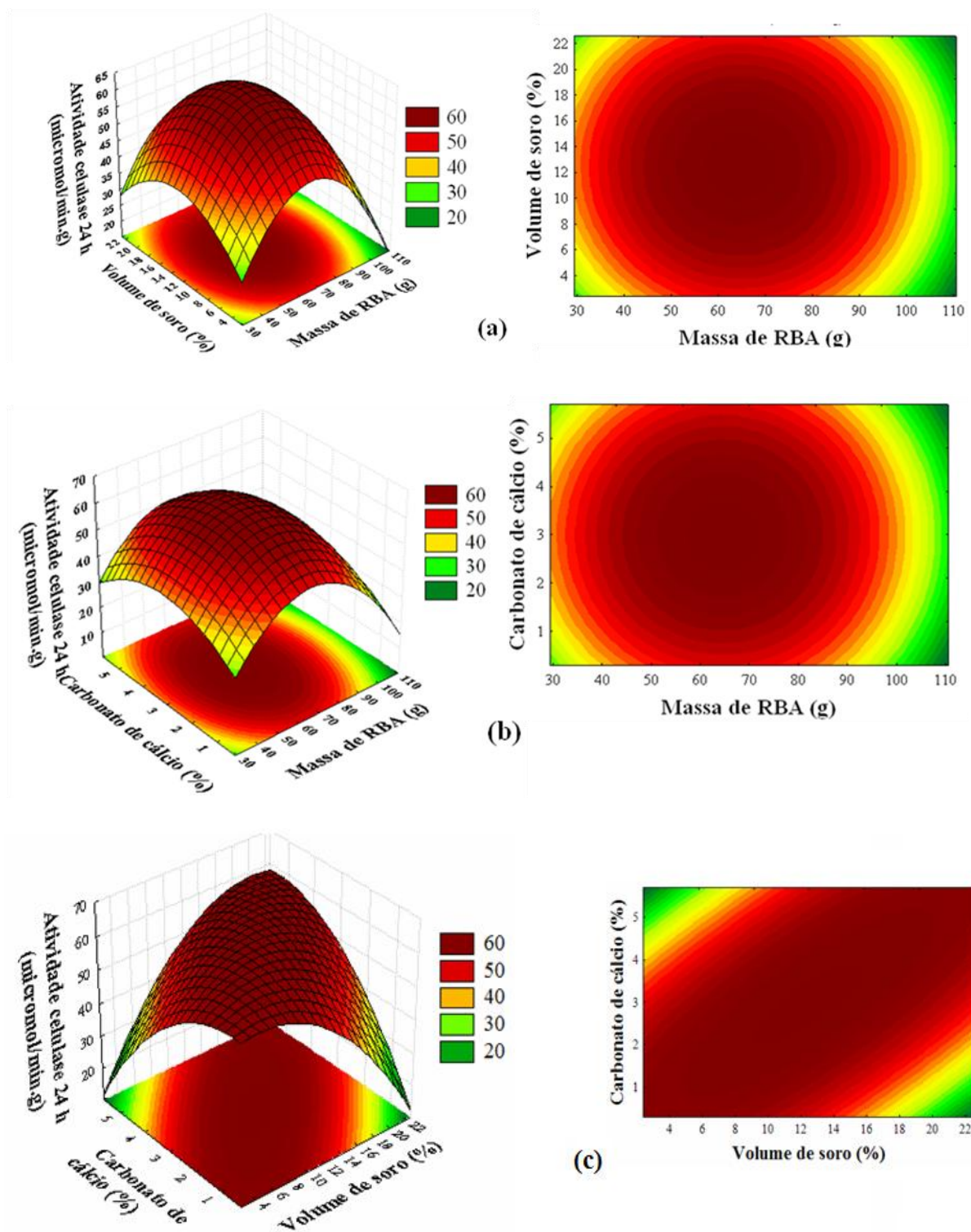


Figura 4.11 – Superfície de resposta e curva de contorno para atividade da celulase com 24 hrs de fermentação (micromol/min.g) em função da: (a) massa de RBA (g) e volume de soro de leite (%); (b) massa de RBA (g) e carbonato de cálcio (%) e (c) volume de soro de leite (%) e carbonato de cálcio (%)

Com os resultados obtidos foi possível verificar os comportamentos dos resíduos e dos valores preditos em função dos observados graficamente, de acordo com as Figura 4.12. e 4.13. Observando a Figura 4.13, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência. E a Figura 4.12 mostra que os valores dos resultados experimentais para atividade de celulase apresentaram bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica.

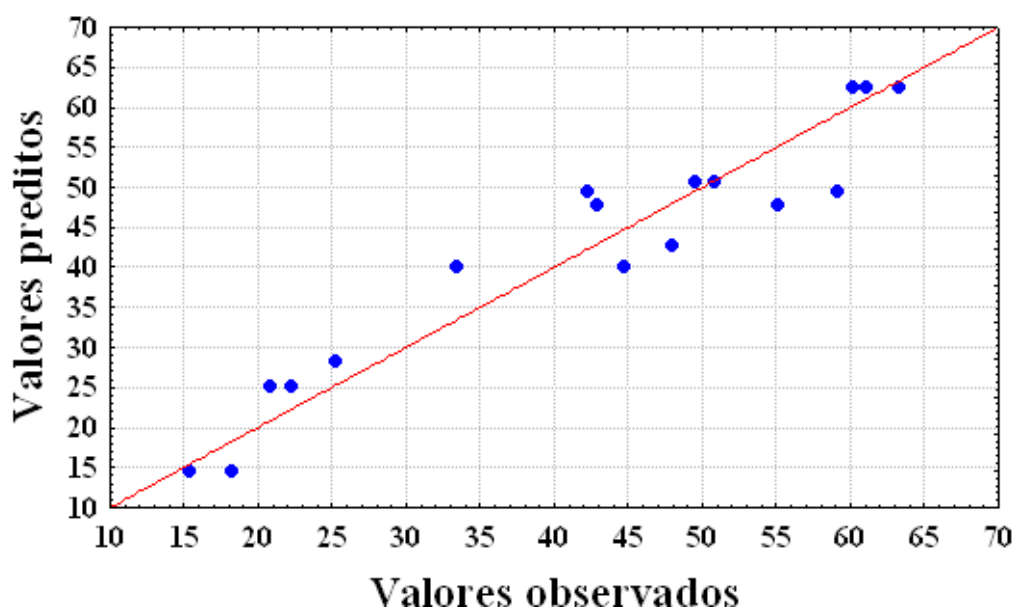


Figura 4.12- Valores preditos em função dos observados relativos à atividade de celulase

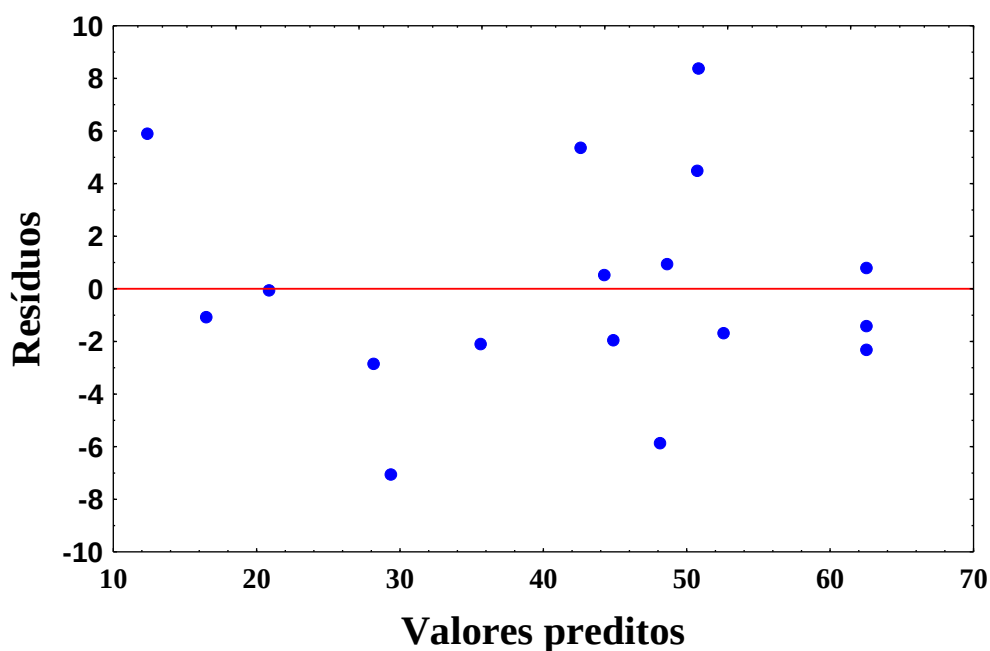


Figura 4.13 – Distribuição dos resíduos relativa à atividade de celulase.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade de protease, são apresentadas as curvas de contorno na Figura 4.14 (a, b e c). Esta figura mostra a região de otimização das variáveis na forma real, em relação à resposta atividade de protease. Por meio dos gráficos é possível notar que os melhores valores de atividade encontrados estão na faixa de 10 a 14% de soro e 60 a 80 g de RBA e entre 2,5 a 3,5% de carbonato de cálcio.

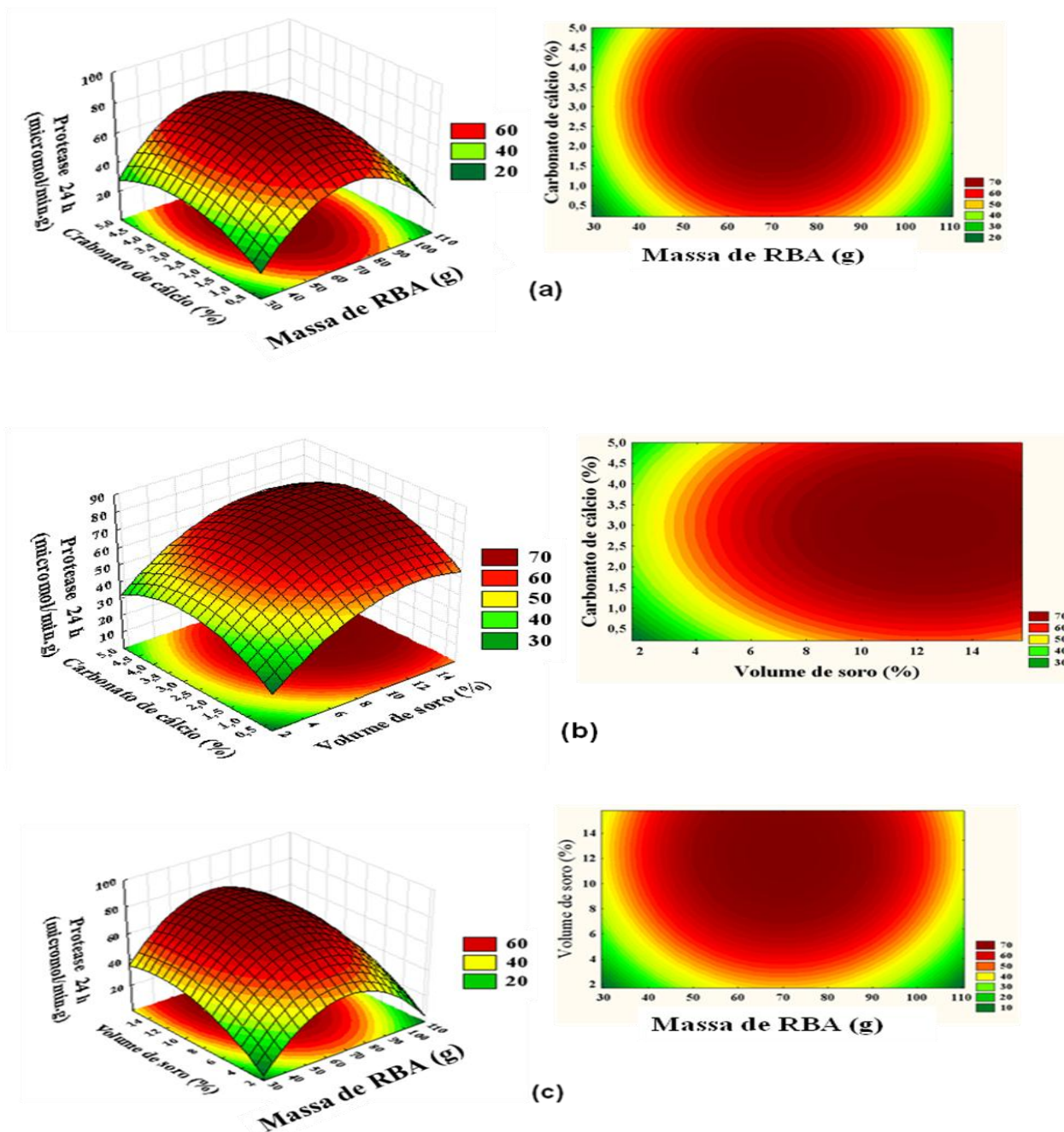


Figura 4.14 – Superfície de resposta e curva de contorno para atividade da protease com 24 hrs de fermentação (micromol/min.g) em função da: (a) RBA (g) e carbonato de cálcio (%); (b) soro de leite (%) e carbonato de cálcio (%) e (c) soro de leite (%) e RBA (g)

Visando obter um ponto em que a atividade da enzima celulase fosse mais próxima da atividade da protease, selecionou-se a condição do ponto central para a concentração de RBA e de soro de leite e 4% para a concentração de carbonato de cálcio. Nesta condição o valor experimental da atividade da celulase foi de 62,4 U/g e da protease foi de 69,9 U/g e os valores obtidos a partir das Equações 4.1 e 4.2 foram respectivamente 60,7 U/g e 75,0 U/g.

4.4-Avaliação da produção de etanol utilizando complexo enzimático produzido e enzima celulase comercial

A Tabela 4.2 mostra os valores de etanol encontrados nas diferentes misturas de substratos e com enzimas variadas. Nota-se que a mistura RBA+soro mostrou-se a melhor na produção de etanol para o complexo enzimático produzido e que os resultados de etanol obtidos com a celulase comercial são baixos devido ao tipo de substrato utilizado, sendo rico em amido, lactose, proteínas entre outros. Na mistura RBA os valores de ART inicial foram baixos, o que não proporcionou uma boa produtividade do etanol.

Tabela 4.2-Avaliação da produção de etanol em diferentes substratos e enzimas variadas

Substrato	Etanol (g/L)	ART inicial (g/L)	ART final (g/L)
RBA+soro	7,3	28,7	42,2
RBA+soro	7,1	29,2	43,6
RBA+soro *	3,2	29,1	46,6
RBA+soro*	3,6	27,3	44,9
S	1,5	26,4	20,6
S	1,8	25,3	19,6
RBA	4,2	17,1	21,3
RBA	4,5	15,4	25,4
RBA*	1,9	18,6	23,6
RBA*	2,4	16,2	26,7

RBA+Soro= caracteriza a mistura de casca de arroz+ farelo de arroz+ soro de leite, para as misturas que contém asterisco (*) foram adicionados enzimas comerciais, as que não tem foram adicionados o complexo enzimático produzido.

RBA= caracteriza a mistura de casca de arroz+ farelo de arroz para as misturas que contém asterisco (*) foram adicionados enzimas comerciais, as que não o tem foram adicionados o complexo enzimático produzido.

S= caracteriza o branco, feito com soro de leite em pó.

Wilkins e colaboradores avaliaram o efeito da concentração de celulasas sobre a hidrólise do bagaço de frutas cítricas, pela utilização de enzimas comerciais Celuclast 1.5L e Novozym 188, da empresa Novozymes, em um processo do tipo SSF (fermentação estado sólido), e verificaram que em concentrações a partir de 13 UI g⁻¹ e 0,02 FPU g⁻¹, respectivamente, o rendimento final no produto de interesse, etanol, não era mais incrementado. Em muitos casos, ainda, é necessária a suplementação dos preparados adicionados no meio reacional, utilizando-se β -glicosidase, com o intuito de promover a redução na inibição de endo- e exoglucanase por seus produtos de hidrólise (especialmente celobiose) e aumentar a conversão final do substrato em glicose.

4.5-Avaliação da influência do tempo de produção do complexo enzimático (FES) na fermentação de produção do bioetanol (FS)

Neste experimento, avaliou-se o melhor tempo de produção do complexo enzimático produzido em fermentação em estado sólido (FES) posteriormente utilizado na fermentação submersa (FS) para produção de bioetanol. As variáveis volume do reator tambor rotativo, tempo de FES foram mantidas conforme os resultados obtidos nos experimentos descritos anteriormente. O pH da FS foi de 4,5 conforme indicado por Pacheco 2010, e a temperatura de fermentação submersa de 30°C $\pm$ 1 °C, sendo fermentação submersa e hidrólise simultânea.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de produção de etanol e de consumo de açúcar redutor total em função do tempo de produção de enzima em reator rotativo. Na resposta obtida, em forma de produção de etanol, nota-se que os melhores valores encontrados foram 9 e 12 horas de fermentação. Observa-se ainda, que a concentração de ART inicial era muito baixa o que não favoreceu a produção de bioetanol. Visando melhorar os resultados obtidos foi realizado outro conjunto de experimentos com os tempos de produção de enzima selecionados (9 e 12 horas) variando o tempo de hidrólise e o volume de enzimas no meio fermentado tendo em vista melhorar a produção de bioetanol.

Tabela 4.3-Produção de etanol em função do tempo de produção do complexo enzimático, em horas com enzimas não concentradas.

Tempo de produção de enzimas (horas)	ART inicial (g/L)	ART final (g/L)	Etanol (g/L)
3	25,2	34,6	3,7
6	27,3	39,4	4,3
9	32,4	40,1	7,1
12	30,4	37,8	8,4
18	32,8	40,8	7,6
24	33,4	39,3	7,1
48	23,9	43,3	4,1
72	29,6	45,2	3,4

Entre os tempos de FES para produção do complexo enzimático, selecionou-se os que tiveram melhores resultados e repetiu-se o teste. Entretanto, desta vez foi utilizado um complexo enzimático concentrado, ou seja, que foi submetido ao processo de precipitação salina.

A Tabela 4.4 mostra que o melhor rendimento na produção de bioetanol foi encontrado com 12 horas de fermentação do complexo enzimático e que os valores de etanol encontrados foram semelhantes aos observados no experimento anterior, feito com enzimas não concentradas, o que mostra que o processo *salting-out* de precipitação salina do complexo enzimático não aumentam o rendimento de bioetanol nas condições testadas neste trabalho. Logo, optou-se por utilizar enzimas não concentradas nos experimentos posteriores visando reduzir o tempo dos experimentos em 12 horas, que era o tempo gasto no processo *salting-out* e reduzir os custos do processo. Este fato pode ser devido a baixa concentração de ART inicial do substrato empregado e a perda de atividade enzimática já verificada em testes preliminares. Para assegurar que este processo não apresenta a eficiência esperada são necessários novos experimentos exploratórios.

Tabela 4.4- Produção de etanol em função do tempo de produção do complexo enzimático, em horas com enzimas concentradas.

Tempo de produção de enzimas (horas)	ART inicial (g/L)	ART final (g/L)	Etanol (g/L)
6	27,8	40,3	4,6
9	28,9	40,8	7,0
12	30,6	38,3	8,0
18	29,4	41,8	7,4
24	31,2	39,6	6,6

4.6-Avaliação da temperatura de produção do complexo enzimático

Com o intuito de aperfeiçoar a produção do complexo enzimático, realizou-se um experimento variando a temperatura de produção das enzimas, de 30 à 45° C $\pm$ 1 °C. As outras variáveis utilizadas foram fixadas conforme descrito em procedimentos anteriores.

A Tabela 4.5 mostra que os melhores resultados de produção de bioetanol foram com complexo enzimático produzido em 40°C $\pm$ 1 °C de FES, alcançando a produção de etanol de 10,3 g/L. Com isso fixou-se mais uma variável ao processo, a temperatura de produção do complexo enzimático.

Tabela 4.5-Produção de etanol em função da temperatura de produção do complexo enzimático.

Temperatura (°C)	Etanol (g/L)	ART inicial (g/L)	ART final (g/L)
30	8,4	30,7	33,6
35	8,3	29,9	39,6
40	10,3	31,2	41,4
45	6,1	30,6	37,8

Segundo estudos realizados por Spier 2005 acerca da FES utilizando como substratos o bagaço de cana-de-açúcar e fécula de mandioca, em relação à temperatura de fermentação, observou-se que a melhor temperatura de fermentação foi em torno de 30-32°C, sendo considerada a mais adequada para a produção de α -amilase. De acordo com Bhumibhamon (1983) citado por Pandey *et al.*, 2005 obteve maior produção de α -amilase por *A. niger* à temperatura de 30°C. De acordo com Ueno *et al.*, 1987 e Kundu *et al.*, (1973) citados por PANDEY *et al.*, 2005, foram alcançados ótimos rendimentos de α -amilase em temperaturas entre 30 e 37°C.

As respostas que os autores citados avaliaram são com relação à atividade enzimática e não em relação a produção de etanol como foi o caso deste trabalho, entretanto é possível observar que as temperaturas de FES mais indicadas na literatura condizem com os resultados encontrados neste trabalho, ou seja, entre 30 e 40°C.

4.7-Hidrólise separada

Em todas as etapas descritas anteriormente, a hidrólise e a fermentação (FS) para produção de etanol eram realizadas simultaneamente. Com o desejo de otimizar a produção de etanol, foram realizados ensaios com hidrólise separada, no primeiro ensaio verificou-se o tempo de hidrólise do meio fermentado.

4.7.1-Variação do tempo de hidrólise

Neste ensaio foram utilizados como substrato a mistura RBA (50% em v/v de casca tratada e farelo de arroz) e soro de leite nas proporções 10 g e 6 g respectivamente. O pH da hidrólise foi 4,5, mantendo-se a mesma condição da fermentação e hidrólise simultânea, o reator utilizado foi do tipo batelada agitada, sendo erlenmyer com volume total de 250 mL e volume útil de 100 mL colocados em mesas agitadoras com temperatura controlada de 35° C mantendo a mesma condição da FS simultânea.

Na Tabela 4.6 nota-se que houve um aumento no rendimento de bioetanol em cerca de 2 g/L ao fazer-se a hidrólise separadamente da fermentação submersa, sendo o melhor resultado observado em 10 horas de hidrólise separada. Logo, fixou-se o tempo de 10 h como sendo o melhor tempo para a hidrólise do meio fermentado nas condições estudadas. Este fato deve estar relacionado ao aumento da quantidade de açúcar redutor quando foi feito a hidrólise separada do substrato, conforme mostra a Tabela 4.6.

Tabela 4.6-Avaliação do tempo de hidrólise em função do rendimento de etanol.

Tempo (horas)	Etanol (g/L)	ART i (g/L)	ART h (g/L)	ART f (g/L)
5	6,9	30,8	63,8	40,2
10	11,5	31,4	85,3	45,2
12	8,8	29,6	81,4	51,8
24	6,2	28,9	83,9	59,3
48	3,9	30,6	82,3	61,9
72	3,2	31,6	85,6	66,6

4.7.2-Variação da temperatura de hidrólise

Neste experimento variou-se a temperatura de hidrólise de 30 a 45° C $\pm$ 1 °C visando aprimorar a produção de bioetanol. O tempo de hidrólise utilizado foi de 10 horas, fixado anteriormente, e as outras variáveis do processo mantiveram-se as mesmas.

Na Tabela 4.7 nota-se que em 35° C atingiu-se a melhor produção de etanol. Krishna (2000), em estudos de produção e aplicação de celulasas de *T. reesei* QM-9414, realizou sacarificação de resíduos lignocelulósicos e a temperatura ideal para a condução da hidrólise enzimática foi 50°C. Temperatura superior a obtida neste estudo. Nota-se, que este estudo não aumentou significativamente a produção de etanol.

Tabela 4.7-Avaliação da produção de etanol em função da temperatura de hidrólise.

Temperatura (°C)	Etanol (g/L)	ART i (g/L)	ART h (g/L)	ART f (g/L)
30	9,3	30,6	70,6	41,4
35	11,9	30,7	87,1	50,2
40	8,9	31,1	80,2	50,4
45	7,2	29,4	78,6	52,1

4.7.3-Variação de pH de hidrólise

Depois de fixar a temperatura de hidrólise realizou-se um experimento variando o pH do meio fermentado utilizado na produção de bioetanol, visando avaliar a produção do etanol. A Tabela 4.8 mostra que os melhores resultados foram obtidos com pH 4,5, confirmando o que descreve Pacheco 2010, assim fixou-se mais uma variável ao experimento.

Tabela 4.8-Avaliação da produção de etanol em função do pH da hidrólise.

pH	Etanol (g/L)	ART i (g/L)	ART h (g/L)	ART f (g/L)
3,5	4,5	30,7	70,1	50,6
4,0	7,7	31,6	80,2	52,8
4,5	11,5	30,4	86,4	50,4
5,0	10,9	31,2	85,3	50,7
5,5	6,1	29,1	75,2	51,7

Os grupos ionizáveis presentes na estrutura das enzimas fazem parte, geralmente, do sítio ativo. Assim, a enzima atua cataliticamente somente em um estado de ionização definido (BAILEY & OLLIS, 1986). Variações no pH do meio resultam em mudanças na forma iônica do sítio ativo e mudanças na atividade das enzimas. Mudanças no pH podem também alterar a forma tridimensional da enzima (SHULER, 1992). Portanto o pH ideal do complexo produzido foi de 4,5, nas condições estudadas.

Singh 2009, em estudo de otimização das condições de sacarificação de palha de trigo com celulases produzidas por *Aspergillus heteromorphus*, obteve maiores resultados de ART a pH 5,0. Krishna 1997 realizou hidrólise de folhas de *Antigonum leptopus* e palha de cana-de-açúcar a pH 4,5. Chen *et al.*, 2007 trabalhou com condições de pH 4,8 na hidrólise enzimática de sabugo de milho, obtendo 79% de rendimento.

Então, para fins de comparação, os resultados encontrados neste trabalho condizem com os reportados na literatura.

4.7.4-Variação do volume de enzimas

Para a realização deste experimento fixaram-se as seguintes condições de trabalho: 12 horas de fermentação para produção do complexo enzimático (FES), temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, reator tambor rotativo, hidrólise do meio fermentado para produção de etanol de 10 horas, temperatura de hidrólise $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e pH 4,5. O complexo enzimático utilizado foi do tipo não concentrado variando apenas o volume do mesmo no meio fermentado.

A Tabela 4.9 mostra que o volume de enzimas no meio não interfere no rendimento da produção de etanol, uma vez que os valores encontrados foram muito próximos. Com isso, optou-se por utilizar os 24 mL de enzima, pois é possível fazer mais experimentos utilizando o volume menor, aproveitando assim o complexo enzimático gerado para diversificar outras variáveis que possivelmente possam interferir no rendimento de etanol. Embora os resultados tenham se mantido na média nos ensaios anteriores, faz-se necessário ressaltar que as enzimas presentes no complexo enzimático não foram eficientes para hidrolisar o meio fermentativo, o que não favoreceu a produção de bioetanol. Outra hipótese dos resultados apresentados terem valores baixos de etanol consiste na baixa eficiência do tratamento da casca de arroz. Por outro lado, nota-se que com a quantidade de açúcar no final das fermentações era possível produzir maiores concentrações de etanol, esse fato indica que a levedura utilizada pode não ter mostrado eficiência para a produção de etanol com os açúcares presentes no meio fermentativo.

Tabela 4.9-Avaliação da produção de etanol em função do volume de enzimas utilizado no meio fermentativo.

Volume de enzimas (mL)	Etanol (g/L)	ART i (g/L)	ART h (g/L)	ART f (g/L)
24	11,6	30,9	90,3	53,5
54	11,3	31,6	87,6	51,1

Segundo Castro e colaboradores 2010, a hidrólise enzimática da celulose, via de regra, tem seu rendimento aumentado com incrementos na carga enzimática, até uma concentração limite, a partir da qual não é compensatório continuar adicionando enzimas ao processo, pois os sítios da matriz do substrato já se encontram saturados pelos biocatalisadores. O que pode ser verificado nos resultados apresentados anteriormente, mostrando que o aumento do volume de enzimas adicionadas ao meio fermentativo não contribuiu para um aumento efetivo da produção de etanol nas condições testadas.

4.7.5-Variação do substrato e do fungo utilizado na produção do complexo enzimático

Com o intuito de melhorar a produção de bioetanol foi realizado um ensaio em que se alterou as concentrações de RBA e soro de leite ao meio fermentado e também mudou-se a linhagem de fungo usado na produção do complexo enzimático (FES). A Tabela 4.10 mostra os resultados do teste. Observando os valores da produção de bioetanol em g/L é possível afirmar, que o meio que contém maior quantidade de soro de leite foi mais propício para a produção do etanol, sendo o fungo *Aspergillus niger* utilizado na produção do complexo enzimático (FES). Na mistura que foi adicionado o fungo *Trichoderma reesei* a produção de etanol não teve um aumento significativo, o que não quer dizer necessariamente que o fungo não seja bom para o desenvolvimento de complexos enzimáticos, entretanto para o substrato utilizado nesse ensaio o complexo enzimático gerado por meio deste fungo não foi satisfatório. Vale ressaltar, que as condições utilizadas foram desenvolvidas para o *Aspergillus niger*, o que pode ter comprometido a produção de enzima pelo *Trichoderma reesei*. Na biomassa na qual foi adicionado as duas linhagens de fungos a produção de etanol também não foi satisfatória, o que pode ser explicado pelo fato de um tipo de complexo enzimático inibir a ação do outro produzido com uma linhagem de fungo diferente. Assim acredita-se que estudos mais detalhados devem ser realizados para verificar a eficiência da utilização de complexo enzimáticos provenientes de cepas diferentes de fungos.

Tabela 4.10-Avaliação da produção de etanol em função do substrato e do tipo de fungo utilizado para produção do complexo enzimático.

Substrato (g)	Linhagem de Fungo	Etanol (g/L)	ART i (g/L)	ART h (g/L)	ART f (g/L)
Casca 10g Farelo 10g Soro 12g	<i>Aspergillus niger</i> + <i>Trichoderma</i>	5,2	30,6	85,3	62,1
Casca 10g Farelo 10g Soro 12g	<i>Trichoderma</i>	6,3	30,9	99,4	70,5
Casca 5g Farelo 5g Soro 20g	<i>Aspergillus niger</i>	11,7	31,8	106,4	67,1

No processo de hidrólise enzimática, o custo das enzimas não favorece a de produção de etanol a partir de material lignocelulósico. Outro fator limitante é a quantidade de enzima necessária para provocar o desdobramento da celulose em glicose, em termos de produção fora da escala laboratorial. Assim, um dos desafios da pesquisa é encontrar micro-organismos capazes de produzir enzimas mais produtivas (MARQUES, 2009).

Segundo Marques 2009, a Petrobrás investe em hidrólise enzimática, que utiliza, no lugar de ácidos, enzimas produzidas por micro-organismos capazes de quebrar o açúcar da celulose, transformado em álcool combustível após o processo de fermentação. A intenção da empresa é alcançar o domínio da tecnologia e exportar etanol de celulose na próxima década. Isso mostra a relevância dos estudos realizados neste trabalho que visa aumentar o rendimento da produção de etanol de segunda geração.

Fez-se comparações dos resultados obtidos neste trabalho com a literatura, com o intuito de mostrar que os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho não fogem dos encontrados nos trabalhos já existentes nesta área de pesquisa. A Tabela 4.11 mostra a biomassa utilizada nas FES e FS e o resultado obtido da produção de etanol em g/L.

Tabela 4.11- Comparação dos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho com dados da literatura.

Biomassa (FES)	Biomassa (FS)	Produção etanol (g/L)	Referências
Amido	Amido solúvel	5,5	VERMA <i>et al.</i> , 2000
Palha de trigo com 10% de algas e sais	10g palha de trigo+ 75 mL extrato enzimático	5,0	LEVER <i>et al.</i> , 2010
Soro de leite	Soro de leite	42	OZMIHCI & KARGI, 2007
Casca e farelo de arroz e soro de leite	Casca e farelo de arroz e soro de leite	11,5	Este trabalho

Observando a tabela, nota-se que os valores encontrados na literatura em termos de produção de etanol em g/L, em geral são os mesmos obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Mostrando assim que a metodologia empregada para a produção de etanol desenvolvida neste trabalho foi satisfatória, apesar de ter-se a consciência de que pode haver uma melhora significativa nos resultados se conseguir-se aumentar os valores de ART inicial na biomassa aqui testada, nas condições empregadas neste trabalho.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

Referente à FES em relação à resposta em atividade de FPase:

Entre os substratos testados como fonte de carbono para produção de celulase, os meios mais satisfatórios foram: o resíduo do beneficiamento do arroz (RBA), isto é casca e farelo de arroz na relação de 50%.

- A produção de celulase é favorecida para tempos de fermentação em estado sólido de 24 h;
- Há associação entre a redução da atividade de celulase e o aumento da atividade da protease;
- Dentre as linhagens de fungo *Aspergillus niger* testadas a ATCC 16404 foi a mais adequada;
- O melhor volume útil do reator tambor rotativo utilizado para a fermentação em estado sólido foi de 20% do volume total do reator e a composição do meio fermentativo utilizado foi de 70 g de RBA; 12,5 mL de soro de leite e 2,8 g de carbonato de cálcio.

Referente à FS e a hidrólise enzimática de forma simultânea ou em separado com a fermentação alcoólica como resposta a produção de etanol:

- Para as condições adotadas, o uso do complexo enzimático obtido proporcionou melhores resultados em relação à enzima celulase comercial utilizada;
- Na FES 12 h para a produção do complexo enzimático é o tempo mais favorável para produção de etanol;
- A técnica de *salting-out* nas condições testadas para a concentração do complexo enzimático não proporcionou melhora nos resultados de produção de etanol;
- Os resultados obtidos por hidrólise separada foram mais satisfatórios que os gerados pela hidrólise simultânea;
- As condições ótimas para a produção de etanol foram: hidrólise separada com tempo de 10 h; temperatura de 35°C; pH 4,5 e volume de enzimas de 24 mL.

➤ Nas condições de processo avaliado o complexo enzimático obtido a partir de *Aspergillus niger* apresentou melhores resultados do que o produzido pelo *Trichoderma reesei* em relação à resposta de produção de etanol.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produzir um complexo enzimático utilizando outras espécies de fungos;
- Testar os meios mais satisfatórios para a produção de etanol com o complexo enzimático gerado;
- Realizar testes de atividade e de produção de etanol com enzimas comerciais;
- Verificar as melhores condições de hidrólise empregando complexo enzimático obtido com diferentes fontes de micro-organismos.
- Avaliar a produção de enzimas empregando fermentação submersa;

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. e VARMA, A. J. **Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production**. Carbohydr. Polymer., 57, 67-72, 2004.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. **Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**. B. CEPPA, v. 18, n.1, p. 57-70, jan/jun 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1125>>. Acessado em 25 jun. 2009.

ALEKSANYAN, E.R, MARKOSYAN, L.S. **Microbial β -fructofuranosidase (survey)**. Appl Biochem Microbiol 1986; 22 : 133–45.

ANDRADE, R.L.P de; MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, 22:3, 2002

ANTUNES, A.J. 2003; Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino. São Paulo: Manole Ltda .

ALEXANDRINO, A. M. ; FARIA, H. G. ; SOUZA, C. G M de ; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulosícas por *Pleurotus ostreatus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 787-792, 2007.

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BORJESSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 33, 71.

BACILA, M. A Presença da galactoquinase em tecidos animais. **Braz. Arch. Biol. Technol.** p. 293-297. 2003.

BADGER, P. C. Em *Trends in New Crops and New Uses*; Janick, J.; Whipkey, A., eds.; ASHS Press: Alexandria, 2002.

BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Mc Graw- Hill Intl Editions, 2 Ed., 1986, 928 p.

BARROS NETO, B. SCARMINIO, I.S., RUNS, R.E., Como fazer experimentos. 2º edição. Unicamp, 2002, p.412.

BARTHIAR, S.; ANDERSSON, A. G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. **Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia* sp.** Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 5, p. 525-531, Apr. 2002.

BAUDEL, H. M. **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para Produção de Etanol (Pré-Tratamento e Hidrólise)**. 2006. Disponível em:

<<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Pr%E9%20Tratamento%20e%20Hidr%F3lise.pdf>>. Acessado em 16 jul. 2009.

BÉGUIN, P. e AUBERT, J. **The biological degradation of cellulose**. FEMS Microbiol. Rev., 13, 25-58, 1994.

BERTOLIN, T. E.; CASARA, J.C.; MAIORANO, A.E.; SCHMIDELL, W. Estudo da indução da síntese de glicoamilase por fermentação semi-sólida. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Mariangá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996.

BHAT, M. K. e BHAT, S. **Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications**. Biotechnol. Adv., 15 (3/4), p. 583-620, 1997.

BHAT, M. K. **Cellulases and related enzymes in biotechnology**. Biotechnology Advances, v.18, n. 5, p. 355–383, 2000.

BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1992

BON, E. P. S. **Enzimas industriais: política e gestão**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5. , 2002, Brasília. Anais. Brasília, DF, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F. e PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol**. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S.; Corvo, M. L.; Vermelho, A. B.; Paiva, C. L. A; Ferrara, M. A. e Coelho, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. and HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters – an introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley e Sons, 1978.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 752, 2000.

CAO, Y. e TAN, H. **Effects of cellulase on the modification of cellulose**. Carbohydr. Res., 337, p. 1291–1296, 2002.

CARDONA, C.A., SANCHEZ, O .J. Fuel ethanol production: Process design trends Bioresour. Technol. (2007), doi:10.1016/j.biortech.2007.01.002, 2007.

CARDOSO, V.L. (2010) Produção de etanol pelo uso de complexo enzimático misto de *Aspergillus niger* e cepas selecionadas do ecossistema do cerrado. **Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 046/2009** . Formação de recursos humanos em etanol e biodiesel. Universidade Federal de Uberlândia, Janeiro 2010.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J.; *Bioresour. Technol.* **2007**, 98, 2415.

CARVALHO, S.M.S. **Análise das Enzimas Amiolíticas Produzidas por Microrganismos Isolados do Tarubá**. Manaus: UFAM, Dissertação em Ciência de Alimentos. Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, 1999.

CASTRO, A.M. PEREIRA JUNIOR, N. Produção, Propriedades e aplicações na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. **Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, p. 85–89, 2007. Disponível em: <<http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/seminar/2007seminar691/article53.pdf>>. Acessado em 15 jul. 2009.

CORREIA, R.T.P.. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***.. Tese-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8**. 198f. Tese (Doutorado em Ciências). Pós-graduação em Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 1993.

COUTO, S.R., SANROMÁN, M.A., **Application of solid-state fermentation to food industry—A review**. *Journal of Food Engineering* 76 (2006) 291–302.

CORREIO DE UBERLÂNDIA. Disponível em http://www.correiodeuberlandia.com.br/texto/2008/07/15/30574/producao_de_leite_est_a_44_mais_cra_neste_ano.html. Acesso em 23 de setembro de 2009.

CNPGL – Centro Nacional de Pesquisa em Gado Leiteiro – EMBRAPA: MG. 2002

Dale, V. H., L. A. Joyce, S. McNulty, and R. P. Neilson. **The interplay between climate change, forests, and disturbances**. *Science of the Total Environment* 262:201–204, 1996.

DALSENTER, F.D.H. **Contribuição ao Estudo da proposta ZERI para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico**. Dissertação de Mestrado, FURB, Blumenau, SC, 2000.

DALSENTER, F.D.H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido**. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

DALSENTER, F.D.H., VICCINI, G., BARGA, M., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N. **A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture**. *Process Biochemistry*. V. 40, p. 801-807, 2005.

DASHTBAN, M., SCHRAFT, H. QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives *Int. J. Biol. Sci.*, 6, p 578-595, 2009.

DEL BIANCHI, V.L.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. Fermentação em estado sólido. In: **Biotecnologia Industrial**, Coord. Schmidell, W. et al., v. 2, p.247-276, 2001.

DELLA, V.P., KUHN, I., HOTZA, D. **Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica**. Química Nova, v.24, n.6, p.778-782, 2001.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A. e RÉCZEY, K. **Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases***. Ind. Crop. Prod., 20, p. 11-21, 2004.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. **Bancos Genéticos de Plantas, Animais e Microrganismos**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, n. 13 p. 34-37, 2000.

DSMZ: Centro de Pesquisas de material biológico da Alemanha: Disponível na internet http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium129.pdf, acessado em 10 de dezembro de 2009.

EMBRAPA AGROINDUSTRIAL TROPICAL, 2004. Disponível na internet: www.embrapa.br, acessado em outubro de 2008.

FAGUERIA, N.K., BARBOSA FILHO, M.P. **Recomendações para uso de fertilizantes fosfato para a cultura de arroz cequeiro**. Circular Técnica, nº 03, p.15, EMBRAPA – CNPAF, Goiânia, 1980.

FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. **Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98**. Bioresource Technology, v. 99, p. 5938–5941. 2008.

FRANCO, M.N. **Produção de Celulases por Actinomicetos em Resíduos Agro-Industriais, visando a Obtenção de Bioetanol**. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Rio de Janeiro-RJ, 2009.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. **Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation**, Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, Feb. 2003.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. **Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1**. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 5, p. 513-518, Apr. 2003.

GUERRA, J. B. **Melhoramento de *Bacillus* produtores de alfa-amilases, por fusão de protoplastos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p.68, 1991.

GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B.K.; KARANTH, N.G.; KRISHNAIAH, M.M. **Temperature Variations and Amyloglucosidade Levels at Different Bed Depths in a Solid State Fermentation Systems**. Chemical Engineering Journal: 51, 17-23, 1993.

GRAMINHA, E. B. N. ; GONÇALVES, A. Z. L. ; PIROTA, R. D. P. B. ; BALSALOBRE, M. A. A. ; SILVA, R ; GOMES, E. . Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition, **Anim. Feed Sci. Technol**, (2007) doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029

HATZINIKOLAOU, D.G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.. Modeling of the simultaneous hydrolysisultrafiltration of whey permeate by a thermostable b-galactosidase from *Aspergillus niger*, v.24, p.161-172, 2005

<http://www1.eere.energy.gov/biomass/docs/esppp.ppt>, acessada em Maio 2009.

HUBER, G.W, DALE, B.E. 2009. Grassoline at the Pump. Scientific American 301:52-59.

HWANG, C.L., CHANDRA, S. **Waste materials used in concrete manufacturing, Chapter 4: The use of rice husk ash in concrete**. William Andrew Publishing/Noyes, 1997.

IGARASHI, K.; WADA, M.; e SAMEJIMA, M. **Activation of crystalline cellulose to cellulose III results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase**. FEBS J., 274, p. 1785–1792, 2007.

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I.; *Biochem. Eng. J.* **2004**, 17, 79.

JORNAL DA CANA. **No caminho para a produção e exportação do etanol celulósico**. p.65, Novozymes. Série 2, nº 93. Janeiro, 2010.

JOSHI, C. P. e MANSFIELD, S. D. **The cellulose paradox - simple molecule, complex biosynthesis**. Curr. Opin. Plant Biol., v. 10, p. 220–226, 2007.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M. e VIKARI, L. **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources**. Process Biochem, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KAWABATA, C.Y. **Aproveitamento de Cinzas da queima de resíduos agroindustriais na produção de compósitos fibrosos e concreto leve para a construção rural**. Tese – Programa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2008.

KOELSCH, G.; TANG, J.; LOY, J. A.; MONOD, M.; JACKSON, K.; FOUNDLING, X. L. **Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans***. *Biochimica et Biophysica Acta*, Paris, v. 1480, n. 1/2, p. 117-131, July 2000.

KRAJEWSKA, B.. *“Chitin and its derivatives as supports for immobilization of enzymes”*. *Acta Biotechnol.*, v.11, p.269-277, 1991.

KRISHNA S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J. **Saccharification studies of lignocellulosic biomass from *Antigonium leptopus* Linn.** Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 59 (1), p. 39-42, 1997.

KRISHNA S. H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. **Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414.** Bioprocess Engineering, 22, p. 467-470, 2000.

LIMA, U.A. BASSO, L.C. AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A. et al. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Edgard Blücher, v.3, 2001. p.1 – 43.

LONGO, M. A.; NOVELLA, I. S.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. **Comparison of *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* as proteases producer under operating conditions.** Journal of Bioscience and Bioengineering, Osk, v. 88, n. 1, p. 35- 40, July 1999.

LONSANE, B.K., GHIDYAL, N.P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V.. **Engineering aspects of solid state fermentation.** *Enz. And Microbial Technol.*, v. 7, p. 258-265, 1985.

LYND L. R.; ZHANG Y. H. **Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach.** *Biotechnology and Bioengineering* 77: p. 467-475, 2002.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALVES DA SILVA, C. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. **Deteção do potencial biotecnológico em bactérias e leveduras isoladas de sedimentos de mangue.** In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos, Brasília, DF, 2002.

MACEDO, G. R.; FACCIOTTI, M. C. R. ; SCHMIDELL, Willibaldo . Aspectos da inibição do crescimento e repressão pela glicose, no cultivo da *Aspergillus awamori* para a produção de glicoamilase. In: VI SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (VI SHEB), 1999, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1999.

MANDELS, M., WEBER, J. **The production of cellulases.** *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414, 1969.

MAKI, M.; LEUNG,K. T.; QIN ,W. **The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass.** *Int. J. Biol. Sci.*, 5, p 500-516, 2009.

MARQUES, F. **O alvo é o bagaço.** Pesquisa FAPESP, setembro 2009.

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

MINAMI, P. S. **Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico de Micoses.** Barueri, SP: Manole, 2003, 199 p.

MIN HU, DECKER, E.A., MCCLEMENTES, D.J., **Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model.** Food Hydrocolloids 24 (2010) 719 e 725.

MITCHELL, D.A ., LONSANE, B.K.. **Definition, characterization and economic evaluation.** In: *Solid Substrate Cultivation*, Elsevier, London, 1992.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis.** In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF, 2002.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TERGERDY, R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: **The filamentous fungi**: Fungal biotechnology, v. 4. London: Smith Berry & Kristiansen Ed, 1983. p. 117-144.

MORES, W. D.; KNUTSEN, J. S.; Davis, R. H.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, 91-93, 297.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation In: DEMAINE A. L., SOLOMON N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 66-84.

NAGEL, F.J.I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M.S.N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**: 72 (2), 219-230, 2001.

NANDAKUMAR, M.P.; THAKUR, M.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.; GHILDYAL, N.P. Studies on Catabolite Repression in Solid State Fermentation for Biosynthesis of Fungal Amylases. **Letters in Applied Microbiology**, 29:380- 384, 1999.

NC – IUBMB Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Recommendations of the nomenclature comitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of Enzymecatalysed reactions.** Disponível em: <<http://www.chem.qmw.ac.uk/iumb/enzyme/>>. Acesso em: jan. 2005.

NETO, J. A. **Algumas aplicações de enzimas**,.In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords). Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Edigard Blucher, v. 3, cap. 14. (Série Biotecnologia Industrial), 2001.

NIDETZKY,B; STEINER,W ;HAYN, M.;CLAEYSSSENS, M. **Cellulose hydrolysis by the cellulases from Trichoderma reesei: a new model for synergistic interaction.** Biochem. J., 298, 705-71, 1994.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**: 34 (6), 405-423, 1994.

NIGAM, P., SINGH, D. **Enzyme and microbial systems involved in starch processing.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p.770-778, 1995.

OLIVEIRA, M. M. **Enriquecimento nutricional por bioconversão de resíduos agroindustriais para utilização na alimentação animal**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2004.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G.; *Biotechnol. Biofuels*. **2008**, 1, 7.

OSHEROV, N.; MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS. Microbiology Letters**, v. 199, p. 153-160, 2001.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITIZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. **Lipase Production by *Penicillium restrictum* Using Solid Waste of Industrial Babassu Oil Production as Substrate**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: 84-86, 1137-1145, 2000.

PALMA, M.B..**Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, A.; GALBE, M. ZACCHI, G. **Ethanol Production from non-starch carbohydrates of wheat bran**. *Bioresource Technol.*, 96, p. 843–850, 2005.

PAMBOUKIAN, C.R.D. **Influência das condições de preparo do inoculo na morfologia do micorganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori***. 1997 189 p. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes**. *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A., WEBB, C., SOCCOL, C.R., LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., p. 760, 2005.

PAUL, G.C.; THOMAS, C.R. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. **Advance of Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v. 60, p. 1-59, 1998.

PELCZAR, **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998. cap. 10. p. 258-271.

PENG, X. W.; CHEN, H. z. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microspheeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran **Bioresource Technology**, n.99, p.3885-3889, 2008

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G. e KOLEV, D. N. **Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7**. Biotechnol. Lett., v. 24, p. 2107- 2111, 2002.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. **Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica***. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 91, n. 5, p. 916- 921, Nov. 2001.

PRIOR, B.A., PREEZ, J.C.D., REIN, P.W. Environmental Parameters. In: ed: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Applied Science, London. p. 65-85, 1992.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed., v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605 p.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acessado em 18 ago. 2009.

RAJOKA, M. I. **Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena***. Electronic Journal of Biotechnology Vol.7, No.3, 756-763, 2004.

RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAGHAVA RAO, K.S.M.S. **Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation**. Advances in Applied Microbiology, v.38, p.99-147, 1993.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira de Botânica, vol.27, n.2. São Paulo, 2002. Disponível em: <http://200.189.113.123/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/veiculos_de_comunicacao/RB/B/VOL27N2/V27N2A01.PDF>. Acessado em 21 ago. 2009.

SAID, S. **Aplicação de enzimas em medicamentos e análises clínicas**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos... Brasília, DF, 2002.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL W.; BORZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 2. p. 5-18.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. 1. ed. V. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap 8. p. 179-192.

SELBY, K.; MAITLAND, C.C. **The Cellulase of *Trichoderma viride* separation of the components involved in the solubilization of cotton**. Biochem. J. 104, 716-724, 1967.

SENDELIUS, J.; *Dissertação de Mestrado*, Lund University, Suécia, 2005.

SEPLAN-RR. Disponível em <http://www.rr.gov.br/investidor.php>. Acessado em abril de 2006.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SILVEIRA, Cristina Moreira da ; FURLONG, Eliana Badiale (2007) . Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 805-811, 2007.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. **Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation**. International Journal of Environmental Science and Engineering, 1:1, 2009. Disponível em: <<http://www.waset.org/journals/ijese/v1/v1-1-4.pdf>>. Acessado em 13 jul. 2009.

SINGH D, NAIK SR, NAIK S. **Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death**. *Parasitol* 129: 1-9, 2004.

SMITS, J.P., RINZEMA, A. TRAMPER, J., VAN SONSBECK, H.M., HAGE, J.C., OKAYNAK, A., KNOL, W. **The Influence of Temperature on Kinetics in Solid-State Fermentation**. *Enzyme and Microbial Technology*: 22, 50-57, 1998.

SOUZA, J. **Estudo da durabilidade de argamassas utilizando cinzas e casca de arroz**. 2008. Tese – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande UFCG, Campina Grande-PB, 2007.

SOCCOL, C.R., ROJAN, P.J., PATEL, A.K., WOICIECHOWSKI, A.L., VANDENBERGHE, L.P.S., PANDEY, A. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc. p. 221-230, 1994.

SPIER, M. R., **PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS FÚNGICAS α -AMILASE e AMIOLOGUCOSIDASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO** 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SRIVASTA, K. K.; VERMA, P. K.; SRIVASTA, R.; *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 293.

STERTZ, S.C., SOCCOL, C.R., RAIMBAULT, M., PANDEY, A., RODRIGUEZLEON, J.A. Growth Kinetics of *Rhizopus formosa* MUCL 28422 on Raw Cassava Flour in Solid State Fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**: **74**, 580-586, 1999.

TANAKA, A., HOSHINO, E., **Secondary Calcium-Binding Parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase Obtained from Inhibition Kinetics**. Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 96, No. 3, 262-267. 2003

TEERI, T. T. **Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases**. Tibtech May. , v. 15, p.160 – 167, 1997.

TOKUYASU, K., TABUSE, M., MIYAMOTO, M., MATSUKI, J., YOZA, K. Pretreatment of microcrystalline cellulose flakes with CaCl₂ increases the surface area, and thus improves enzymatic saccharification. Carbohydrate Research 343 (2008) 1232–1236

TZEAN, S. S., CHEN, J.L., LIOU, G.Y., CHEN, C.C., HSU, W.H. ***Aspergillus* and related teleomorphs of Taiwan**. Mycological Monograph, Culture Collection and Research Center, Taiwan, n. 1, 1990.

ÚNICA. Disponível em: <http://www.unica.com.br/> acessado em janeiro de 2010.

VALADARES FILHO, S.C., MAGALHÃES, K.A., ROCHA JUNIOR, V.R., CAPELLE, E.R. **Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos**. Viçosa: UFV, p.288, 2006.

VAN Wyk, J. P. H.; *Biotechnol. Tech.* **1997**, 11, 443.

VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. p. 221-230.

VERMELHO, A. B. , MELO, A. C. N.; SALVADOR, V. R. O.; SIMONE, G.; BRANQUINHA, M. H. **Purificação de uma metaloproteínase extracelular de *Crithidia guilhermei***. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumos... Brasília, DF, 2002.

VERMELHO, A. B.; MEIRELLES, M. N. L.; LOPES, A.; PETINATE, S. D. G.; CHAIA, A. A.; BRANQUINHA, M. H. **Detection of extracellular proteases from microorganisms on**

Agar plates. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, Nov./Dec. 1996.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, 121-124, 93.

WHITAKER, A.; LONG, P.A. Fungal pelleting. **Process Biochemistry**, v. 8, p. 27-31, 1973.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K.; *Proc. Biochem.* **2007**, 42, 1614.

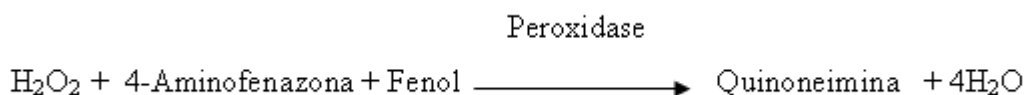
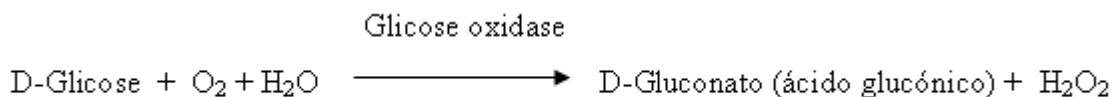
WINGREN, A.; GALBE, M.; Zacchi, G.; *Biotechnol. Prog.* **2003**, 19, 1109

ANEXO

ANEXO A

DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose em ácido glucónico, com formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Este reage com o fenol e 4-aminofenazona, na presença da peroxidase, com formação de um composto vermelho-violeta, a quinoneimina, que apresenta máxima absorção de luz a um comprimento de onda de 505nm:



A intensidade da coloração é proporcional à quantidade de glicose contida na solução.

É um método sensível e específico para a dosagem da glicose.

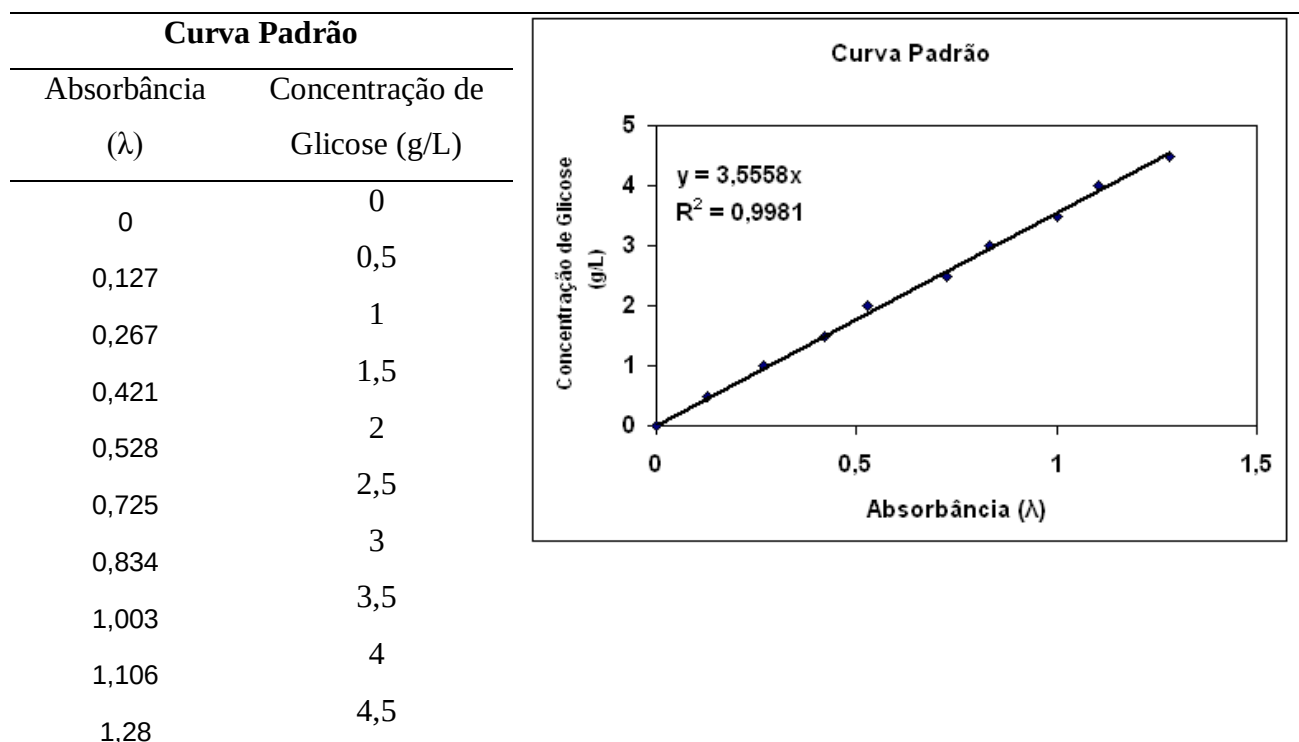
Procedimento descrito por TOMÁS (1998):

O Kit de glicose-oxidase contém: o Reativo Enzimático (glicose oxidase e Peroxidase, 3 mL); Reativo de cor 1 (4-Aminofenazona e tampão tris, 50 mL); Reativo de cor 2 (Fenol, 50 mL). Estes três reagentes foram diluídos a 900 mL com água destilada e acondicionado em frasco âmbar. Essa solução mantém-se estável por um mês, refrigerado e protegido da luz.

Para determinação de teor de glicose em uma amostra, o primeiro passo foi à determinação da curva padrão, de absorbância em função das concentrações de glicose. Para

isso foram utilizados tubos de ensaios contendo 2 mL da solução de glicose-oxidase (kit) preparada anteriormente, aos quais foram adicionados 20 µL de solução de glicose, na faixa de concentração de 0,0 a 4,5 g/L, com intervalos de 0,5 g/L, incubando em banho maria por 10 minutos a 37 +/- 2°C. Após esse tempo, eram lidas as absorbâncias a 505 nm em espectrofotômetro, considerando como branco a solução de glicose-oxidase. Com os valores de absorbância em função das concentrações de glicose foram construídas equações lineares e determinadas as equações das mesmas, considerando o intervalo de concentração adotado.

Para uma amostra de concentração desconhecida de glicose seguia-se o mesmo procedimento anterior, determinando-se a sua absorbância, e a partir da curva padrão, a concentração de glicose.



ANEXO B

FICHA TÉCNICA DO SORO DE LEITE

Ficha Técnica

Soro de Leite em Pó Integral

Descrição

Produto obtido pela pulverização do soro resultante do processo da coagulação do leite, que contém, aproximadamente, metade dos sólidos presentes no leite, incluindo proteínas, lactose, sais minerais, vitaminas hidrossolúveis e gordura.

Aplicação

Biscositos, embutidos, alimentação animal.

Especificações

Umidade (%) máx. 4,5
p.H. (1:9) mín. 6,0
Cinzas (%) máx. 10,0

Bactérias mesófilas (UFC/g) máx. 30.000
Coliformes fecais (UFC/g) máx. 10
Salmonella sp (/25g) ausente
Staphylococcus aureus (/g) máx. 100

Informações sensoriais

Aspecto pó levemente amarelado.
Sabor característico.

Embalagens/peso líquido

Sacos de papel multifolhados revestidos internamente com polietileno com capacidade de 25 e 30 kg.

Validade

12 meses a partir da data de produção, desde que estocado sob condições adequadas.

Condições de armazenamento

Armazenar em local seco e ventilado, ao abrigo do sol e umidade, na embalagem original fechada e protegida do contato direto com o solo.

Transporte

Veículos fechados, livres de materiais e odores estranhos.

Alergênicos

Sim	Não	Alergênicos
	X	Cereais que contêm glúten e seus derivados
	X	Crustáceos e seus derivados
	X	Ovos e seus derivados
	X	Peixes e seus derivados
	X	Amendoim e seus derivados
	X	Soja e seus derivados
X		Leite e seus derivados (incluindo lactose)
	X	Frutos de casca rijá
	X	Aipo e seus derivados
	X	Mostarda e seus derivados
	X	Gergelim e seus derivados
	X	Dióxido de enxofre

Informação nutricional

Porção de 100g	
Valor Nutricional	
Valor Energético	380 kcal (1590 kJ)
Carboidratos	73,9 g
Proteínas	12,5 g
Gorduras totais	3,8 g
Gorduras Saturadas	2,3 g
Gorduras Trans	0,1 g
Fibra Alimentar	<0,5 g
Sódio	1205,0 mg

Cargill Agrícola S/A

Fev./2008

As informações contidas neste documento foram compiladas de nossa experiência e de várias publicações técnicas tidas como verdadeiras. O único propósito deste documento é ser um guia para o manuseio apropriado do material. É de responsabilidade do usuário determinar a adequação destas informações para o seu uso particular.

Vendas e Informações Técnicas: Telefones: (11) 5099 3709 / 3398 / 3487 Fax: (11) 5099 3933
Av. Morumbi, 8234 São Paulo – SP

www.cargill.com.br

Cargill

ANEXO C

CURVA DE CALIBRAÇÃO ETANOL

