

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO ADRIANO CORRÊA MACENO

RESÍDUO DE PALMA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DO
COMPLEXO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO – Subprojeto C1
Projeto BIOPAL – Vale S. A.

CURITIBA

2014

MARCELO ADRIANO CORRÊA MACENO

RESÍDUO DE PALMA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DO
COMPLEXO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO – Subprojeto C1
Projeto BIOPAL – Vale S. A.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora:

Profª Drª Michele Rigon Spier

Co-orientadores:

Profº Dr. Carlos Ricardo Soccol

Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe

CURITIBA

2014



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos quatorze dias do mês de maio de 2014, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Octuagésima Sexta Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Drª Cristine Rodrigues (UFPR), Profª Drª Giselle Maria Maciel (UTFPR), Prof Dr Carlos Ricardo Soccol (UFPR) e Profª Drª Michele Rigon Spier (UFPR – orientadora da dissertação).

Às 08h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Marcelo Adriano Correa Maceno**, a fazer a apresentação da dissertação intitulada: **“RESÍDUO DE PALMA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Drª Cristine Rodrigues, Profª Drª Giselle Maria Maciel, Prof Dr Carlos Ricardo Soccol e Profª Drª Michele Rigon Spier declarou o candidato aprovado (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 14 de Maio de 2014.

Profª Drª Luciana P S Vandenberghe

Profª Drª Giselle Maria Maciel

Drª Cristine Rodrigues

Profª Drª Michele Rigon Spier

Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por terem investido em mim durante esses anos todos, por todo o carinho e dedicação que sempre proporcionaram na minha vida.

Agradeço também à minha orientadora, Prof^a. Michele Rigon Spier, por ter me incentivado a entrar no mestrado, ainda quando estava na graduação em Engenharia Química, e por toda a dedicação que teve ao longo desses dois anos.

À professora Vânia Irene Stonoga, pela carta de recomendação para entrar no programa de mestrado, além de ter sido minha orientadora quando realizei meu estágio obrigatório.

Agradeço ao Professor Carlos Ricardo Soccol, por ter me selecionado para fazer parte do programa e também à Professora Luciana P.S. Vandenberghe, por sempre estar pronta a ajudar e pelos conselhos e opiniões, que muito enriqueceram este trabalho.

Além disso, agradeço à colega de mestrado Tania Sila Campioni, sempre estava pronta a ajudar, e nossas imensas discussões no campo de enzimas, que muito me ajudou.

E, obviamente, agradeço aos demais colegas e amigos do mestrado, Elisa Mara, Jason Furuie, Daniel Goyzueta, Juliana Oliveira, Ryu Masaki, Mario Bier, Valesca Weingartner, Giselli Torres, Francieli Goelzer, Otacílio Tomaz, Mitiyo Fukuda, Natália Meza, Suzan Rossi, Rodrigo Malanski, Evaldo Silva, Mara Matos, Denise Salmon e demais colegas que ingressaram comigo no curso de mestrado.

Também agradeço ao suporte financeiro concedido pela CAPES ao longo desses dois anos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	19
FIGURA 2 - FRUTO DA PALMA	21
FIGURA 3 – RESÍDUOS GERADOS PELA INDÚSTRIA DA PALMA.....	22
FIGURA 4 – CACHO VAZIO DO FRUTO DA PALMA.....	23
FIGURA 5 – ALGUNS PRODUTOS OBTIDOS COM O USO DAS HEMICELULOSES.....	26
FIGURA 6– AÇÃO DAS CELULASES NAS FIBRAS DE CELULOSES.....	28
FIGURA 7 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO <i>TRICHODERMA REESEI</i>	31
FIGURA 8 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO <i>A. NIGER</i>	33
FIGURA 9 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO MICÉLIO DO <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i> (40 MICRONS).....	34
FIGURA 10 – <i>GANODERMA LUCIDUM</i> CRESCENDO EM PLACA DE PETRI.....	35
FIGURA 11 – CRESCIMENTO DO <i>L. EDODES</i> EM PLACA DE PETRI.....	36
FIGURA 12 – SISTEMA HOLLOW FIBER QUIXSTAND (GE, SUÉCIA).....	41
FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	46
FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO	51
FIGURA 15 – ATIVIDADE DE FPase OBTIDAS NO ESTUDO DE SCREENING DE MICRORGANISMOS * Atividade sem diluição da enzima	52
FIGURA 16 – ATIVIDADE DE CMCCase OBTIDA NO ESTUDO DE SCREENING DE MICRORGANISMOS * Atividade sem diluição da enzima	52
FIGURA 17 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE FPASE DO ESTUDO DE SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO DO INÓCULO E SELEÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO * Atividade sem diluição da enzima.....	54
FIGURA 18 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE CMCASE DO ESTUDO DE SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO DO INÓCULO E SELEÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO * Atividade sem diluição da enzima.....	54
FIGURA 19 –SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS PARA A FPase GERADAS PELO SOFTWARE STATISTICA 7.0, FIXANDO A CONCENTRAÇÃO DE NaNO ₃ EM 3 g/L (PONTO CENTRAL).....	57

FIGURA 20 – DIAGRAMA DE PARETO GERADO USANDO O SOFTWARE STATISTICA v. 7.0. A – PARA A FPASE; B – PARA A CMCASE;	57
FIGURA 21 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE FPASE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO	59
FIGURA 22 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE CMCASE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO.....	59
FIGURA 23 – ATIVIDADE DE FPASE OBTIDAS NA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	69
FIGURA 24 – ATIVIDADE DE CMCASE OBTIDAS NA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	69
FIGURA 25 – ATIVIDADE DE FPASE OBTIDA EM DIFERENTES TESTES USANDO A UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO	71
FIGURA 26 – ATIVIDADE DE CMCASE OBTIDA EM DIFERENTES TESTES USANDO A UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO	71
FIGURA 27 – GRÁFICO DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN. (A) - PARA A ENZIMA FPASE. (B) – PARA A ENZIMA CMCASE ...	73
FIGURA 28 – CURVAS DE NÍVEL (SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS) GERADA PELO SOFTWARE STATISTICA 7.0, FIXANDO A CONCENTRAÇÃO DE KH ₂ PO ₄ EM 2 g/L (PONTO CENTRAL). A – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A FPASE. B – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A CMCASE	77
FIGURA 29 – CINÉTICA DE ATIVIDADE Fpase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS A 28 °C E 37 °C POR <i>PHANEROCHAETE sp.</i> (PH-HD).....	79
FIGURA 30 – CINÉTICA DE PRODUTIVIDADE (IU/L.min) DE Fpase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS INCUBADO A 28 °C E 37 °C POR <i>PHANEROCHAETE sp.</i> (PH-HD).....	79
FIGURA 31 – CINÉTICA DE ATIVIDADE DE CMCCase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS INCUBADO A 28 °C E 37 °C POR <i>PHANEROCHAETE sp.</i> (PH-HD).....	80
FIGURA 32 – CINÉTICA DE PRODUTIVIDADE (IU/L.min) DE CMCCase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS INCUBADO A 28 °C E 37 °C POR <i>PHANEROCHAETE sp.</i> (PH-HD).....	80
FIGURA 33 – (1) - BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS, UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES. (2) – BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO (STR).....	87
FIGURA 34 – ATIVIDADE DE FPase PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO INDUTOR (AVICEL) NA PRODUÇÃO DA ENZIMA. O CONTROLE CORRESPONDE À AUSÊNCIA DO INDUTOR	89

FIGURA 35 – ATIVIDADE DE CMC_{Case} PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO INDUTOR (AVICEL) NA PRODUÇÃO DA ENZIMA. O CONTROLE CORRESPONDE À AUSÊNCIA DO INDUTOR 89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DE DOS PRINCIPAIS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS JÁ CARACTERIZADOS.....	20
TABELA 2 – ALGUNS DADOS SOBRE A PALMA	21
TABELA 3 – TIPOS DE RESÍDUOS GERADOS A PARTIR DA PALMA	22
TABELA 4 – PROPRIEDADES, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E QUÍMICA DO RESÍDUO DE PALMA.....	24
TABELA 6 – COMPONENTES USADOS NA PREPARAÇÃO DO MEIO COM BASE EM MANDELS & WEBER (1969)	44
TABELA 7 – COMPONENTES USADOS NA PREPARAÇÃO DO MEIO DE ACORDO COM SARAVANAN (2012)	48
TABELA 8 – FATORES USADOS NO DCCR NO ESTUDO DO INÓCULO	49
TABELA 9 – TABELA DOS EXPERIMENTOS PREVISTOS NO DCCR E REALIZADOS EM ORDEM ALEATÓRIA, GERADA PELO SOFTWARE STATISTICA 7.0.....	50
TABELA 10 – TABELA DE RESPOSTAS (CMCases E PFases) NO ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO	55
TABELA 11 – ANOVA, PARA A ATIVIDADE DE FPASE, GERADA PELO DCCR DURANTE O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO	56
TABELA 12 – TABELA DE ANOVA PARA A ATIVIDADE DE CMCASE, GERADA PELO DCCR DURANTE O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO	56
TABELA 13 – NÍVEIS UTILIZADOS NA SELEÇÃO DE COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES.....	66
TABELA 14 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKET-BURMAN 11/12 NA SELEÇÃO DE COMPONENTES.....	66
TABELA 15 – NÍVEIS UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES APLICANDO O DCCR.....	67
TABELA 16 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO FINAL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	68
TABELA 17 – COTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO, AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO MEIO DE FERMENTAÇÃO E O CUSTO FINAL DOS COMPONENTES	70

TABELA 18 – TABELA DE RESPOSTAS DO PLACKETT-BURMAN, PARA A SELEÇÃO DE COMPONENTES SIGNIFICATIVOS, $p < 0.05$, DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	73
TABELA 19 – TABELA DE RESPOSTAS DO DCCR DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	75
TABELA 20 – TABELA DE ANOVA PARA A FPase.....	76
TABELA 21 – TABELA DE ANOVA PARA A CMCase.....	76
TABELA 22 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE FPases ETAPAS DE CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO.....	90
TABELA 23 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE CMCases ETAPAS DE CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO.....	90
TABELA 24 – PRODUÇÃO DO COMPLEXO CEULOLÍTICO USANDO O BIORREATOR DE BOLHAS.....	92

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

POME	-	Palm oil mill effluent
PKC	-	palm kernel cake
EFB	-	Cacho de fruto vazio
EC	-	Enzyme comission
EG	-	Endoglucanases
ExG	-	Exoglucanases
BG	-	β -glicosidases
CBH	-	Celobio-hidrolases
GH	-	Glucano-hidrolases
STR	-	Biorreator de tanque agitado
FSm	-	Fermentação submersa
FSS	-	Fermentação submersa com sólidos em suspensão
FPase	-	Atividade de celulase total (endoglucanase + exoglucanase)
CMCase	-	Atividade de endoglucanase
ANOVA	-	Análise de variância
DCCR	-	Delineamento composto central rotacional
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
NaNO ₃	-	Nitrato de sódio
K ₂ HPO ₄	-	Fosfato de potássio dibásico
MgSO ₄	-	Sulfato de magnésio
KCl	-	Cloreto de potássio
FeSO ₄	-	Sulfato de ferro
KH ₂ PO ₄	-	Fosfato de potássio monobásico
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	Sulfato de amônio
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	Cloreto de cálcio di-hidratado
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	Sulfato de ferro hepta-hidratado
MnSO ₄ .7H ₂ O	-	Sulfato de manganês hepta-hidratado
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	Sulfato de zinco hepta-hidratado
CoCl ₂	-	Cloreto de cobalto
LPB I	-	Laboratório de Processos Biotecnológicos I

- LPB 28 - *Aspergillus niger* LPB 28
- AN 326 - *Aspergillus niger* AN 326
- PH-HD - *Phanerochaete* sp. PH-HD
- Tric 193 - *Trichoderma* sp. Tric 193
- Tric 221 - *Trichoderma* sp. Tric 221
- Gan56 - *Ganoderma* sp. Gan 56
- L6646 - *Lentinus* sp. L6646
- L6121 - *Lentinus* sp. L6121
- PDA - *Potato Dextrose Agar*
- DNS - Ácido 3,5 dinitrossalicílico

RESUMO

Complexos celulolíticos são compostos por três tipos de celulasas: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. Industrialmente os fungos mais utilizados para a produção de celulasas são o *Trichoderma reesei* e o *Aspergillus niger*, utilizando processo de fermentação submersa com sólido em suspensão (FSS), sendo que há poucas indústrias que utilizam resíduos para a produção desse complexo enzimático. As celulasas possuem aplicação na indústria de alimentos, têxtil, de papel e celulose, na produção de biocombustíveis, entre outras aplicações. Este trabalho, um subprojeto da Projeto BioPal (Vale S.A), teve como objetivo a seleção de microrganismos, otimização da produção, concentração do produto e aumento de escala, para produção de celulasas a partir de resíduo de palma. Neste trabalho foram testadas linhagens de *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete sp.*, *Ganoderma sp.* e *Lentinus sp.* para a produção de enzimas celulolíticas, usando resíduo de cacho de fruto vazio de palma como substrato em Fermentação submersa com sólidos suspensos. Com o fungo *Phanerochaete sp* obteve-se maior produção de celulasas, porém, este fungo é conhecido por ser um bom produtor de enzimas ligninolíticas. A máxima produção de celulasas foi alcançada no 4º dia de fermentação a 28 °C, pH 5.7, com o fungo *Phanerochaete sp.*, atingindo valores de atividade de FPase de 364 IU/L (aumento de 296 % em relação à atividade após a escolha da fonte de nitrogênio) e CMCase de 2864 IU/L (aumento de 180 % em relação à atividade após a escolha da fonte de nitrogênio), utilizando o resíduo sólido de palma (cachos de fruto vazio) como fonte de carbono. A granulometria do resíduo sólido de palma utilizado foi entre 0,35 mm e 0,85 mm e concentração de 15 g/L, ureia como fonte de nitrogênio (2 g/L), KH_2PO_4 (4 g/L), celulose microcristalina avicel como indutor (2 g/L) e utilizando a fermentação submersa com sólidos suspensos. Com esse trabalho pode-se verificar a produção do complexo celulolítico *Phanerochaete sp.* (PH-HD), abrindo espaço para novos estudos utilizando este fungo, para o qual não há muitos relatos na literatura, na produção do complexo celulolítico.

Palavras-chave: palma, celulase, *Phanerochaete*, fermentação submersa

ABSTRACT

Cellulolytic complex are enzymes that are composed of three cellulases: endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. Industrially, the most used fungi for the production of cellulases, are *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, using submerged fermentation, and there are just a few industries that use residues to the enzyme production. Cellulases are applicable in the food, textile, pulp and paper industries, biofuel, among other applications. This work, a subproject of the Project Biopal (Vale S.A) had, like objective, the screening of microorganisms, optimization of the production, product concentration and scale-up of the process, to production of cellulases using palm residue as substrate. In this work the strains *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete sp.*, *Ganoderma sp.* and *Lentinus sp.* were tested for cellulases complexes production under SFFs. *Phanerochaete sp.* (PH-HD) presented higher capacity of cellulases production, although this fungi is known to be a producer of lignolytic enzymes. The higher production of cellulases was achieved in the 4th day of fermentation, at 28 °C, pH 5.7, with the fungi *Phanerochaete sp.*, reaching values of FPase activity of 364 IU L⁻¹ (an increase of 296 % related to the activity after the choice of the nitrogen source) and CMCase of 2864 IU L⁻¹ (an increase of 180 % related to the activity after the choice of the nitrogen source), using palm residue (empty fruit bunch) as carbon source. The granulometry of the palm residue used was between 0,35 mm e 0,85 mm and 15 g/L of concentration, under SFFs using palm residue as carbon source, urea as nitrogen source (2 g/L), KH₂PO₄ (4 g/L), microcrystalline cellulose avicel as inducer (2 g/L) . With this work the cellulolytic complex production was verified with *Phanerochaete sp.*, opening new studies using this fungi, which is not a lot related in the literature.

Key words: palma, cellulase, *Phanerochaete*, Submerged fermentation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	18
2.2 PALMA	20
2.3 RESÍDUO DE PALMA	22
2.4 COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	24
2.4.1 Celulose	24
2.4.2 Hemicelulose.....	25
2.4.3 Lignina.....	26
2.5 ENZIMAS.....	26
2.5.1 Celulases.....	27
2.6 MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS.....	29
2.7 FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS	29
2.7.1 Fungos de Degradação Branca.....	30
2.7.2 Fungos de Degradação Marrom.....	30
2.8 FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES	31
2.8.1 <i>Trichoderma reesei</i>	31
2.8.2 <i>Aspergillus niger</i>	32
2.8.3 <i>Phanerochaete sp.</i>	33
2.8.4 <i>Ganoderma sp.</i>	34
2.8.5 <i>Lentinus sp.</i>	35
2.9 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO	36
2.10 BIORREATOR.....	37
2.10.1 Biorreator Coluna de Bolhas	37
2.10.2 Biorreator de tanque agitado (STR)	38
2.11 PRODUÇÃO DE CELULASES USANDO FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSM) E FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM SÓLIDOS EM SUSPENSÃO (FSS) 38	
2.12 CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS	39
2.12.1 Separação por membranas: ultrafiltração	40
CAP. I – ETAPA DE SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS E ESTUDO DO INÓCULO	42
1. INTRODUÇÃO	42
2. OBJETIVOS	42

3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MICRORGANISMOS.....	43
3.2 SUBSTRATO.....	43
3.3 MEIOS UTILIZADOS.....	43
3.4 PRÉ-INÓCULO.....	44
3.5 INÓCULO.....	45
3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	45
3.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE Fpase e CMCase 46	
3.8 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DO INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES POR FSS.....	47
3.9 OTIMIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE INÓCULO.....	48
3.10 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DO PRÉ- INÓCULO E DO INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 COMPARAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE Fpase UTILIZANDO O MÉTODO DE GHOSE ORIGINAL E O MODIFICADO.....	51
4.2 SCREENING DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES.....	52
4.3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DO INÓCULO E SELEÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DA ENZIMA.....	54
4.4 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO.....	55
4.5 ESTUDO DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E DO INÓCULO.....	58
5. CONCLUSÕES	60
CAP. II – OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES E CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	62
1. INTRODUÇÃO	62
2. OBJETIVOS	63
3. MATERIAL E MÉTODOS	64
3.1 MICRORGANISMOS.....	64
3.2 MEIOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM SÓLIDOS SUSPENSOS (FSS) 64	
3.3 SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	64
3.4 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES.....	65
3.5 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES USANDO A METODOLOGIA DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	67

3.6	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASE USANDO O FUNGO PH-HD (<i>PHANEROCHAETE sp.</i>) EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	68
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1	SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO.....	69
4.2	TESTES USANDO A UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES.....	71
4.3	SELEÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES.....	72
4.4	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS USANDO O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).....	74
4.5	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASE USANDO O FUNGO PH-HD (<i>PHANEROCHAETE sp.</i>) EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	78
5.	CONCLUSÕES.....	82
	CAP. III – AVALIAÇÃO DO AVICEL COMO INDUTOR, PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E AUMENTO DE ESCALA.	
	83
1.	INTRODUÇÃO.....	83
2.	OBJETIVOS.....	84
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
3.1	MICROORGANISMO.....	84
3.2	SUBSTRATO E MEIOS.....	85
3.3	ESTUDO DA PRESENÇA DO INDUTOR - AVICEL.....	85
3.4	ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO COMPLEXO CELULOLÍTICO.....	85
3.5	AUMENTO DE ESCALA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO UTILIZANDO BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS E BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO (STR).....	86
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.1	PRESENÇA DO INDUTOR AVICEL NA PRODUÇÃO DE CELULASES USANDO O FUNGO <i>PHANEROCHAETE sp.</i>	88
4.2	ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO COMPLEXO CELULOLÍTICO.....	90
4.3	AUMENTO DE ESCALA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO UTILIZANDO BIORREATOR DE BOLHAS E BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO (STR).....	91
5.	CONCLUSÕES.....	94
3.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
4.	REFERÊNCIAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o mundo está buscando alternativas para a produção de combustíveis e a diminuição da alta dependência do petróleo, que é um recurso não renovável. Assim, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas com o uso de resíduos lignocelulósicos, que são materiais renováveis, para a produção de bioetanol.

Um dos problemas encontrados na produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos é a viabilidade técnica do processo. Para a produção do bioetanol, são necessárias etapas de pré-tratamento físico-químico do resíduo, hidrólise enzimática para liberação de açúcares fermentescíveis e, finalmente, a produção do bioetanol e separação do mesmo.

Um dos grandes problemas nesse processo é o uso das enzimas, pois são insumos caros e que podem inviabilizar os projetos. Assim, há a necessidade de produção de enzimas com menor custo de produção e alta atividade enzimática visando tornar mais viável os projetos nessa área.

Assim, este trabalho trata da produção de celulasas usando resíduo de palma, otimização de processo, aumento de escala e concentração das enzimas,.

1.1 OBJETIVO GERAL

Produção do complexo celulolítico com fungos filamentosos pertencentes ao Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB I) usando resíduo sólido do processamento da palma como substrato.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleção de algumas cepas fúngicas produtoras de celulasas pertencentes ao Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB I):
 - Otimização dos componentes do meio de produção de celulasas e das condições físico-químicas do processo;
 - Cinética da produção de celulasas em diferentes temperaturas;
 - Efeito da presença do indutor avicel na produção de celulasas;

- Concentração do extrato bruto enzimático;
- Aumento de escala usando biorreatores de coluna de bolhas e

STR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A economia mundial é altamente dependente de várias fontes fósseis de energia, tais como óleo, carvão, gás natural, etc. O consumo excessivo de recursos fósseis, particularmente em áreas urbanas, tem resultado em geração de altos níveis de poluição nas últimas décadas (SARKAR et al., 2012).

Recursos alternativos de energia estão sendo explorados para reduzir a dependência do petróleo explorando a energia solar, eólica, hidráulica e outras. Além destas fontes de energia, a biomassa também é um alvo em potencial para a produção de combustíveis e energia, podendo eficientemente substituir os combustíveis derivados do petróleo (FERNANDES et al., 2010).

O recente interesse na bioconversão de resíduos industriais da agricultura à matéria-prima química levou a um estudo extensivo das enzimas celulolíticas produzidas por fungos e bactérias (BAIG, M.; YASMEEN, 2005).

Muita ênfase tem sido dada à seleção de resíduos agroindustriais para a liberação de açúcares produzidos pela hidrólise de lignocelulósicos. Sendo assim, os açúcares liberados na hidrólise dos resíduos agroindustriais podem ser usados para a produção de álcoois e outros químicos (BAIG, M.; YASMEEN, 2005).

2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os resíduos lignocelulósicos, por serem renováveis e abundantes, têm chamado atenção como um recurso para a produção de biocombustíveis (LEE; LIM; LEE, 2013). São os recurso mais abundantes na terra, compreendendo por volta de 50% da biomassa mundial. O conteúdo energético destes excede muitas vezes o requerimento básico mundial de energia. Estas características os tornam uma importante opção como matéria-prima de baixo custo para a produção de bioetanol, por exemplo, e para o desenvolvimento de outras bioindústrias em face à demanda internacional no mercado de biocombustíveis. Em 2008 foi estimado que 200×10^9 toneladas de biomassa foram produzidas mundialmente. (FERNANDES et al., 2010).

A lignocelulose é composta por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, que são fortemente unidos e quimicamente por forças não covalentes e ligações covalentes cruzadas (SÁNCHEZ, 2009). Na Figura 1 encontra-se a representação dos componentes da biomassa lignocelulósica.

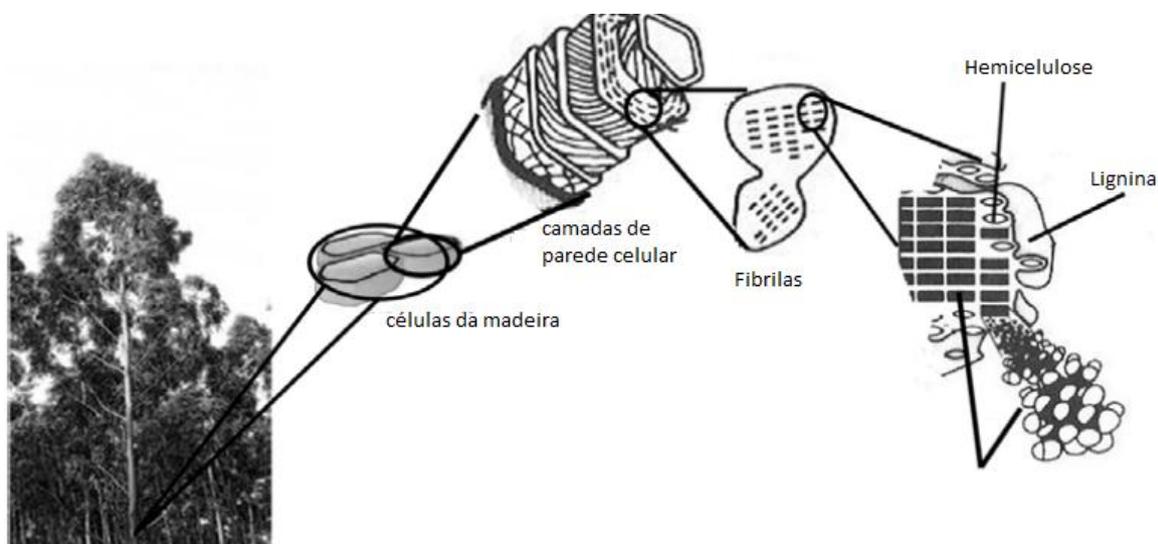


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. FONTE: ADAPTADO DE FERNANDES ET AL. (2010).

Dentre os resíduos lignocelulósicos de maior importância, pode-se destacar: bagaço de cana, farelo de milho, farelo de arroz, farelo de trigo, resíduos de madeira processados e resíduos municipais (PEREIRA; COLTO; ANNA, 2008).

As principais culturas no país são a cana de açúcar, a soja, o milho, a mandioca e o arroz, que ocupavam 50 milhões de hectares com uma produção total, em 2010, de 993 toneladas. Estima-se que aproximadamente 463 milhões de toneladas de resíduos de biomassa foram geradas nesse ano, no Brasil (ANDRÉ et al., 2012). Na Tabela 1 tem-se a composição dos principais resíduos lignocelulósicos.

Há um mercado formal para o uso de resíduos de biomassa no Brasil. A indústria de etanol é a mais desenvolvida para o uso de biomassa, no caso do Brasil, o bagaço de cana. O bagaço é usado como fonte suplementar de ração, para produzir eletricidade e como material para a indústria de papel e celulose (ANDRÉ et al., 2012).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DE DOS PRINCIPAIS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS JÁ CARACTERIZADOS

Material	Composição (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros
Bagaço de cana	36	28	20	-
Farelo de cana	36	21	16	27
Palha de milho	36	28	29	-
Sabugo de milho	36	28	-	-
Farelo de milho	39	36	10	-
Farelo de cevada	44	27	7	-
Farelo de arroz	33	26	7	-
Farelo de aveia	41	16	11	-
Casca de amendoim	38	36	16	-
Casca de arroz	36,1	19,7	19,4	20,1
Farelo de cevada	23	32,7	21,4	-
Pinheiro	44	26	29	-
Algodão	37	23	21	-
Gramma	32	20	9	39
Papel	43	13	6	-
Jornal	62	16	21	1

FONTE: PEREIRA JR, 2008

2.2 PALMA

Há duas famílias de palma, *Elaeis guineensis*, que é nativa da África do sul e *Elaeis oleifera*, que tem origem na América Central e do Sul. A *Elaeis guineensis* é um tronco vertical, na qual se desenvolvem cerca de 20 a 40 folhas, chamadas frondas, a cada ano. A primeira cultura pode ser colhida após 5 a 6 anos da plantação e pode gerar cachos de frutos frescos por 25 a 30 anos. Cada fruto é esférico sendo de cor roxa escura antes da poda, e após a poda, laranja avermelhado (Figura 2) (KERDSUWAN; LAOHALIDANOND; WASTE, 2010).

O fruto possui dois tipos de óleo: óleo de palma, extraído da parte externa do fruto, o mesocarpo; e o óleo de palmiste, extraído da semente, similar ao óleo de coco e de babaçu (ANACLETO, 2007).



FIGURA 2 - FRUTO DA PALMA
 FONTE: EDUARDO, 2008

A palma apresenta uma produtividade de óleo por área cultivada 10 vezes maior do que as outras oleaginosas, produzindo, em condições favoráveis, 8 toneladas de óleo por hectare por ano (ANACLETO, 2007).

Na Tabela 2 têm-se alguns dados sobre a palma.

TABELA 2 – ALGUNS DADOS SOBRE A PALMA

Item (Item)	Dado (Data)
Ciclo (<i>Cycle</i>)	25 anos (<i>years</i>)
Teor de óleo no cacho (<i>Bunch oil content</i>)	22%
Produtividade média de cacho (<i>Bunch average productivity</i>)	10.000 kg/ha (3.000 – 25.000)
Rendimento em óleo (<i>Oil yield</i>)	4.000 kg/ha/ano (2.000 – 8.000) 21 (<i>Elaeis guineensis Jacq</i>)
Cultivares Registrados no Mapa	2 (<i>Elaeis guineensis Jacq. x Elaeis oleifera</i>) 1 (<i>Elaeis oleifera</i>)
Defensivos registrados no Mapa	3
Poder calorífico do óleo in natura	8.946 kcal/kg
Poder calorífico do biocombustível	9.530 kcal/kg
Balanco energético do combustível	01:08,6

FONTE: MAPA, 2012.

Neste trabalho foi utilizado o resíduo sólido do processamento da palma, chamado de cacho de fruto vazio (EFB).

2.3 RESÍDUO DE PALMA

Com relação aos resíduos gerados pelo processamento da palma, os principais são o efluente líquido *palm oil mill* effluent (POME), que pode ser usado como meio de fermentação e fertilizante, e o *palm kernel cake* (PKC), que pode ser usado como ração animal devido ao seu alto conteúdo energético (SHAFAWATI; SIDDIQUEE, 2013), e o cacho de fruto vazio (EFB). Além destes têm-se outros que estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 – TIPOS DE RESÍDUOS GERADOS A PARTIR DA PALMA

Fonte do resíduo	Tipo de resíduo	Peso total da fonte (em %)
Cacho de fruto fresco (do <i>palm oil mill</i>)	Óleo da casca da palma	5,5
	Cacho do fruto vazio	22
	Fibra do mesocarpo	13,5
Palmeira de palma caída (da plantação)	Tronco	70
	Fronde	20,5
	Folha	6,53
	Outros	2,97
Palmeira de palma em poda	Fronde	27,03

Fonte: Adaptado de ABNISA et al., 2013

Na Figura 3 observam-se imagens de alguns resíduos gerados pela indústria da palma.



FIGURA 3 – RESÍDUOS GERADOS PELA INDÚSTRIA DA PALMA
FONTE: ADAPTADO DE ABNISA ET AL., 2013

O cacho de fruto vazio (EFB) é um resíduo que representa 20% da massa do fruto fresco, sendo uma das biomassas de palma produzida em abundância, após a extração do óleo de palma (CHANG, 2014).

O EFB era usado, no passado, como combustível para a geração de vapor por incineração nos moinhos, e a cinza gerada era usada como fertilizante. Porém, este processo de incineração foi se tornando desinteressante devido à grande quantidade de fumaça branca gerada. Atualmente, a maior parte do EFB é utilizada como material orgânico em plantações, ou utilizado como fertilizante, porém, ainda há uma grande quantidade do resíduo disponível para outros usos, como a produção de biocombustíveis (CHANG, 2014).

Na Figura 4 é possível observar o cacho vazio do fruto de palma.



FIGURA 4 – CACHO VAZIO DO FRUTO DA PALMA
FONTE: LAW, 2001

Em relação à composição do EFB, na Tabela 4 têm-se algumas propriedades, a composição centesimal e química do resíduo.

TABELA 4 – PROPRIEDADES, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E QUÍMICA DO RESÍDUO DE PALMA

Propriedades	Valores
Umidade (%)	2.40 - 14.28
Matéria volátil (%)	70.03 - 83.86
Carbono fixado (%)	8.97 - 18.30
Cinzas (%)	1.30 - 13.65
Análise centesimal (%)	
C	43.80 - 54.76
H	4.37 - 7.42
O	38.29 - 47.76
N	0.25 - 1.21
S	0.035 - 1.10
Composição química (%)	
Celulose	23.7 - 65.0
Hemicelulose	20.58 - 33.52
Lignina	14.1 - 30.45
Extrativo	3.21 - 3.7

FONTE: (CHANG, 2014)

2.4 COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

2.4.1 Celulose

A celulose é o componente mais abundante das plantas, sendo encontrada na natureza quase exclusivamente na parede celular das mesmas. Além disso, também é produzida por alguns animais e bactérias. Apesar de grandes diferenças na composição e na estrutura anatômica da parede celular, um alto conteúdo de celulose, tipicamente na faixa de 35 a 50 % do peso seco da planta, é uma característica universal. Em poucos casos, a celulose está presente em um estado praticamente puro (LYND et al., 2002).

Nas plantas, a celulose tem um papel fundamental, junto com a lignina e a hemicelulose. O conteúdo relativo de celulose e lignina na biomassa lignocelulósica varia entre as espécies (BRINCHI et al., 2013). A hemicelulose e lignina correspondem de 20 a 35% e 5 a 30% da massa seca da planta, respectivamente (LYND et al., 2002).

A celulose é um componente estrutural linear das células das plantas consistindo de uma cadeia longa de monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4, na qual pode-se encontrar, em comprimento, milhares de unidades de glicose. As ligações entre as moléculas levam à uma estrutura cristalina e forte (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Além da estrutura cristalina, os materiais celulósicos consistem de domínios amorfos, em proporções que variam, dependendo da fonte. As propriedades físicas da celulose, assim como o comportamento e reatividade, são fortemente influenciados pelo arranjo das moléculas componentes da celulose (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011).

Boa parte dos reagentes penetra apenas em regiões amorfas, e é apenas nessas regiões que ocorrem as reações, deixando as regiões cristalinas sem modificações (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011).

O tamanho das cadeias de celulose, medido como o grau de polimerização por uma variedade de métodos, é uma importante característica do material, que influencia na conversão do biopolímero a açúcares fermentescíveis via hidrólise enzimática (HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010).

2.4.2 Hemicelulose

As hemiceluloses constituem heteropolissacarídeos complexos, formado por pentoses (β -D-xiloses, α -L-arabinoses) e hexoses (β -D-manoses, β -D-glicose e α -D-galactose), além de desoxiaçúcares e ácidos urônicos. A cadeia é constituída principalmente por unidades de xilose, com ligações β -1,4, na qual os grupos hidroxil de açúcar podem ser substituídos parcialmente por arabinose, ácido urônico e/ou grupos acetil (EGÜÉS; ECEIZA; LABIDI, 2013).

As hemiceluloses mais relevantes são as xilanas e as glucomanas, com as xilanas sendo as mais abundantes. As xilanas são os principais componentes da hemicelulose da parede celular secundária constituindo por volta de 20 a 30% da biomassa da madeira e plantas herbáceas (GÍRIO et al., 2010).

Elas estão presentes, geralmente, em grande quantidade como subproduto nas florestas, agricultura, agroindústria, madeira e indústrias de papel e polpa (GÍRIO et al., 2010).

Na Figura 5 encontram-se alguns usos da hemicelulose.

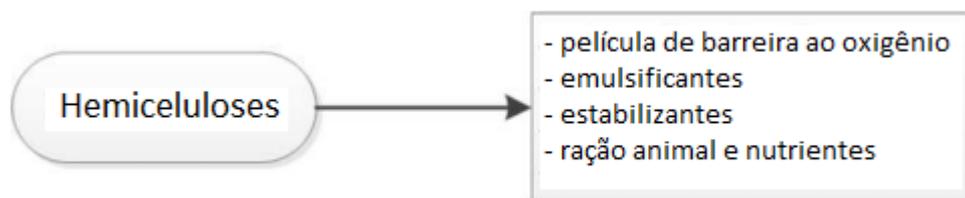


FIGURA 5 – ALGUNS PRODUTOS OBTIDOS COM O USO DAS HEMICELULOSES
 FONTE: ADAPTADO DE FERNANDES ET AL., 2010

2.4.3 Lignina

A lignina, intrinsecamente exibe muitas especificidades que fazem deste polímero único na natureza. Em geral, este componente amorfo composto por um complexo fenólico está em segundo lugar na composição da biomassa, depois da celulose, e corresponde a aproximadamente 30 % do carbono orgânico na biomassa (BOUDET, 2000).

A síntese da lignina é resultado de uma reação com cadeias longas, e é parcialmente conhecida. Representa um dos processos com maior consumo de energia para as plantas (BOUDET, 2000).

A lignina é derivada da polimerização de três cinamil alcoóis (chamados alcoóis p-cumaril, coniferil e sinapil), que diferem em seus graus de metoxilação e formam as unidades de p-hidroxifenil, guaiacil monometilado e siringil dimetilado, respectivamente (VERMA; DWIVEDI, 2014).

2.5 ENZIMAS

Não há uma definição clara para as enzimas, porém, pode-se utilizar a definição de que enzimas são proteínas com propriedades catalíticas, com a capacidade de associação específica. É claro agora que nem todas as biomoléculas capazes de promover reações catalíticas são proteínas (TUCKER, WOODS, 1995).

As enzimas são responsáveis por catalisar reações em uma variedade de processos biológicos em todas as células vivas. É bem conhecido que as

enzimas são catalisadores altamente eficientes já que podem acelerar reações em até 17 vezes, em ordem de magnitude. Os fatores que tornam capazes as enzimas de fornecer um grande aumento nas taxas de reação ainda estão sendo bastante discutidos. Dentre os fatores, cita-se a especificidade pelo substrato, pH, temperatura, presença de ativadores, ausência de inibidores, entre outros (AGARWAL, 2006).

A classificação de cada enzima é descrita pelo número EC (*Enzyme Commission*), que consiste em quatro dígitos e identifica a molécula pela reação que a mesma catalisa (BOYCE; COLLEGE, 2001).

No caso das celulases, que são as biomoléculas de interesse deste trabalho, o número EC é 3.2.1.x, onde x varia com a celulase avaliada (CASTRO; PEREIRA, 2010). O primeiro número refere-se à classe da enzima, que se refere às hidrolases.

As hidrolases catalisam a clivagem de certas ligações químicas de um substrato pela adição de moléculas de água ao produto (HOAGLAND; ZABLOTOWICZ, 2001).

2.5.1 Celulases

As celulases são enzimas de importância industrial, sendo comercializadas em grandes volumes para uso em diferentes aplicações industriais. Como exemplos de aplicação, as celulases podem ser usadas na produção de ração animal, fermentação alcoólica de grãos, extração de polpa de frutas e sucos vegetais, indústria de papel e celulose, indústria têxtil, agricultura, indústria alimentícia, em detergentes, etc. Há mercados crescentes para celulases no campo da indústria de detergente e sacarificação de resíduos agroindustriais na indústria do bioetanol (HAMMAD et al., 2010; KUHAD, 2011).

O complexo celulolítico é composto por três classes principais: as endoglucanases (EG), exoglucanases (ExG) e β -glicosidases (BG) (JUTURU; WU, 2014).

As endoglucanases (ou CMCases) hidrolisam ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, gerando longas cadeias, além de oligômeros, na qual as exoglucanases atuam (JUTURU; WU, 2014). Em relação às exoglucanases, essas agem de uma maneira prioritária nos terminais redutores

ou não redutores das cadeias de polissacarídeos da celulose, liberando tanto glicose ou celobiose, como produtos principais. Já as β -glicosidases hidrolisam as celobioses à glicose (SADHU; MAITI, 2013).

As exoglucanases são subdivididas em celobio-hidrolases (CBH) e glucano-hidrolases (GH).

A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve a ruptura física da fibra, pelo aumento de regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, tornando a celulose mais amorfa e deixando-a mais exposta às celulases. A CBH é dividida em tipo I e tipo II, sendo que do tipo I hidrolisa terminais redutores e a do tipo II não redutores (gerados pelas endoglucanases). Estas enzimas sofrem inibição pelo produto gerado, as celobioses. Já as GHs são pouco reportadas, porém, possuem importância por hidrolisar a fibra celulósica gerando glicose (CASTRO; PEREIRA, 2010). Todo este processo da atuação das celulases está resumido na Figura 6.

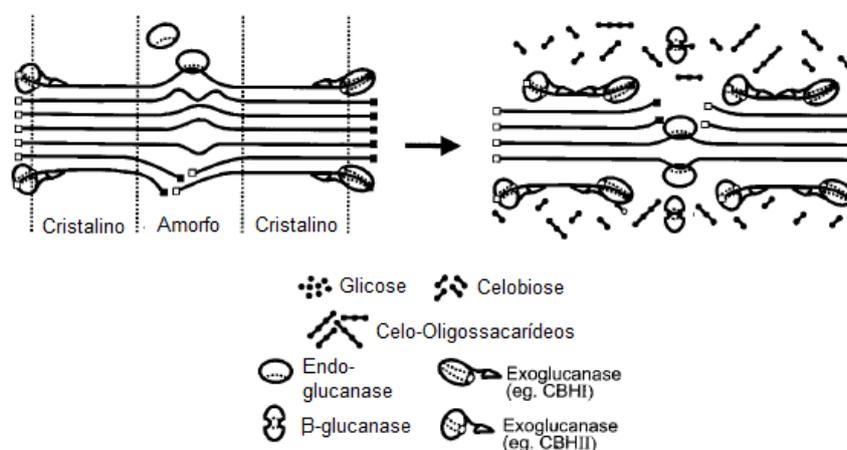


FIGURA 6– AÇÃO DAS CELULASES NAS FIBRAS DE CELULOSES
 FONTE: AGUIAR, 2010

Para medir a atividade das celulases, determinam-se as atividades de FPase, de CMCase e da β -glicosidase.

A atividade de FPase, ou seja, a atividade de papel de filtro, abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases, determinada a partir da

degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 x 6,0 cm. (GHOSE, 1987)

Já no caso da CMCCase utiliza-se o carboximetilcelulose, que é um derivado solúvel da celulose. Verificou-se que exoglucanases purificadas não possuem especificidade a esse substrato, sendo que, nesse caso, não há sinergismo aparente entre as exoglucanases e endoglucanases (BHAT; MAHALINGESHWARA, 1988).

Um grande número de microrganismos, tais como bactérias, actinomicetos e fungos, são conhecidos por degradar a celulose. (RAGHUWANSHI et al., 2014).

2.6 MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Embora um grande número de microrganismos sejam capazes de degradar a celulose, apenas poucos produzem quantidades significativas de celulasas para conseguir hidrolisar eficientemente o biopolímero. Os fungos são os microrganismos principais na produção de celulasas, sendo que há relatos de bactérias e actinomicetos que produzem a enzima. Gêneros como *Trichoderma* e *Aspergillus* são bastante conhecidos como produtores da enzima (MIYAMOTO, 1997).

Bactérias como *Cellulomonas* e *Cytophagas*, e a maior parte dos fungos, podem utilizar uma variedade de outros carboidratos além da celulose, enquanto as espécies celulolíticas anaeróbias possuem um espectro restrito de uso de carboidratos, limitada à celulose ou a produtos hidrolisados (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

2.7 FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Fungos são os principais degradadores de lignoceluloses. Além da secreção de enzimas, que são críticas à decomposição da celulose, o crescimento fúngico é realizado pela formação de micélio (MAHAJAN, 2011).

Muitos fungos são mais resistentes aos biocidas presentes nas madeiras, que limitam o crescimento bacteriano. Estes compostos incluem taninos e vários

compostos fenólicos (terpenos, estilbenos, flavonoides e tropolones) que são particularmente abundantes nas árvores caídas (MAHAJAN, 2011).

2.7.1 Fungos de Degradação Branca

Os fungos de degradação branca decompõem todos os polímeros de madeira, incluindo a lignina. Nesta degradação a madeira fica com um aspecto branco e fibroso. Esses fungos habitam o lúmen celular das madeiras (LEE et al., 2014).

Eles degradam a lignina graças à habilidade lignocelulolítica conferida por enzimas extracelulares contendo a lignina peroxidase. Estas enzimas estão envolvidas na oxidação da lignina presente nas madeiras (LEE et al., 2014).

Muitos pesquisadores relataram que a deslignificação biológica usando fungos de degradação branca é útil para o pré-tratamento antes da sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica (KAMEI; HIROTA; MEGURO, 2012)

Dentre os fungos de degradação branca temos: *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sapidus*, *Phanerochaete carnosus*, *Ganoderma lucidum* e outros.

2.7.2 Fungos de Degradação Marrom

Os fungos de degradação marrom degradam preferencialmente polissacarídeos da madeira e parcialmente oxidam a lignina. Eles degradam a celulose causando um rápido decréscimo no grau de polimerização (MONRROY et al., 2011).

Como um resultado do ataque inicial pelo fungo de degradação marrom provocado pela despolimerização da celulase a rigidez da madeira decai rapidamente (MONRROY et al., 2010). Além de secretar pouca quantidade de enzimas que degradam a lignina, muitos fungos de degradação marrom também não secretam β -glicosidases, sendo que muitos deles têm dificuldade em degradar eficientemente substratos de celulose puros, como o papel de filtro ou madeira deslignificada (SCHILLING et al., 2012). Dentre os fungos de

degradação marrom mais citados na produção de celulase estão *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*.

2.8 FUNGOS PRODUTORES DE CELULASES

2.8.1 *Trichoderma reesei*

O gênero *Trichoderma* possui espécies capazes de produzir enzimas e/ou atacar e inibir outros fungos, atraindo grande atenção em diversas áreas de pesquisa. Dentre elas, temos o controle biológico de doenças de plantas, produção de enzimas, assim como estudos genéticos e manipulação em fungos filamentosos (SAMUELS, 1996).

Trichoderma é um gênero de fungos filamentosos deuteromicetos. Seus membros são geralmente encontrados em solos, incluindo camadas de húmus de florestas, assim como em solos da agricultura (SAMUELS, 1996).

Os fungos deste gênero habitam os solos e as madeiras em decomposição. Muitas espécies deste gênero são micoparasitas. *Trichoderma sp.* tem se tornado componente predominante da microbiota do solo de diferentes ecossistemas, como os campos, pastos, florestas e até desertos, vivendo em várias zonas climáticas (KUBICEK et al., 2009). Na Figura 7 tem-se uma micrografia eletrônica das hifas miceliais do fungo *Trichoderma reesei* (*T. reesei*).

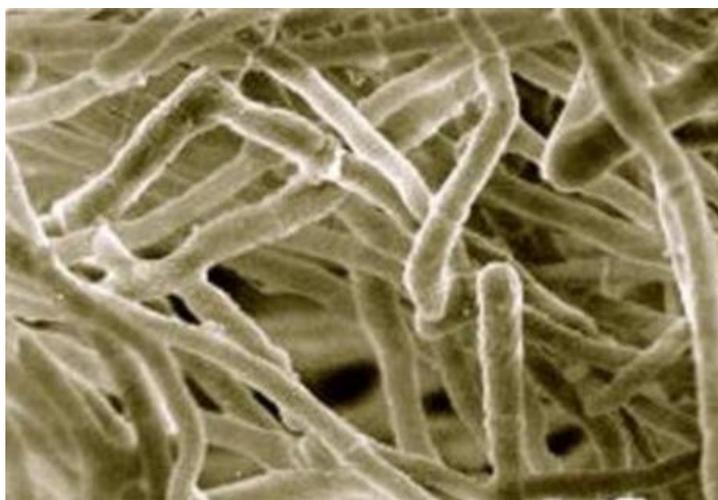


FIGURA 7 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO *TRICHODERMA REESEI*.
FONTE: <http://www.20minutes.fr/sciences/231265-champignon-sauver-4x4>

Trichoderma reesei tem uma longa história na produção de enzimas hidrolíticas. Entre as hidrolases produzidas pelo *T. reesei* encontram-se um conjunto completo de enzimas celulolíticas (NAKARI-SETÄLÄ; PENTTILÄ, 1995). O sistema celulolítico do *T. reesei* é composto por duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e, pelo menos, cinco endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV e EGV) (AL, 2001).

2.8.2 *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* compreende várias centenas de espécies, e são encontrados em todo o mundo. São altamente aeróbicos e são fungos haploides (GUPTA; MANISHA; GROVER, 2012).

Em relação à influência da temperatura e atividade de água, eles são capazes de crescer em uma faixa grande de temperatura, de 6 a 47°C, com uma temperatura ótima entre 35-37°C (SCHUSTER et al., 2002).

Aspergillus niger é um fungo muito usado na produção de ácido cítrico, e também na produção de enzimas. A habilidade destes fungos na produção de enzimas é relacionada à capacidade de utilizar variedades de substratos graças ao seu sistema enzimático bem desenvolvido. São fungos de cor negra que produzem hifas septadas brancas, as quais possuem muitas ramificações (SHAHLAEI et al., 2013).

Eles secreta grandes quantidades de enzimas celulolíticas e junto com o *T. reesei* têm sido extensivamente estudado para a produção industrial destas enzimas (SALIU; SANI, 2012). Dentre as celulasas que *Aspergillus niger* produz estão as β -glicosidases, que são produzidas em pequena quantidade pelo *Trichoderma reesei* (BANSAL et al., 2012).

Na Figura 8 pode-se observar uma micrografia eletrônica do *A. niger*.



FIGURA 8 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO *A. NIGER*
FONTE: <http://genome.jgi-psf.org/aspni5/aspni5.home.html>

2.8.3 *Phanerochaete* sp.

O gênero *Phanerochaete* pertence aos basidiomicetos, tendo sido tradicionalmente inseridos na família *Corticaceae* Herter. Os basidiocarpos da *Phanerochaete* são tipicamente membranosos. Eles são caracterizados microscopicamente por ter um sistema de hifas mais ou menos monomíticas, hifas com septos simples, basídios ovalados e basidiósporos de paredes finas. Por volta de cem espécies de *Phanerochaete* têm sido descritas (WU et al., 2010).

O *Phanerochaete chrysosporium* tem sido o fungo de degradação branca mais estudado. Ele secreta um conjunto de peroxidases e oxidases que agem não especificamente, via geração de radicais livres a partir da lignina, que se quebra através de reações espontâneas. (Joint Genome Institute, 2014).

A maior parte dos estudos tem interesse na habilidade deste fungo de degradar lignina, porém, sabe-se que este fungo tem uma maquinaria celulolítica similar e igualmente avançada ao do microrganismo *Trichoderma reesei*. Esforços extensivos e sucessivos têm sido feitos para aumentar o rendimento de diferentes cepas deste microrganismo (SZAB, 1996).

Na Figura 9 pode-se observar uma micrografia do micélio do *Phanerochaete chrysosporium*.

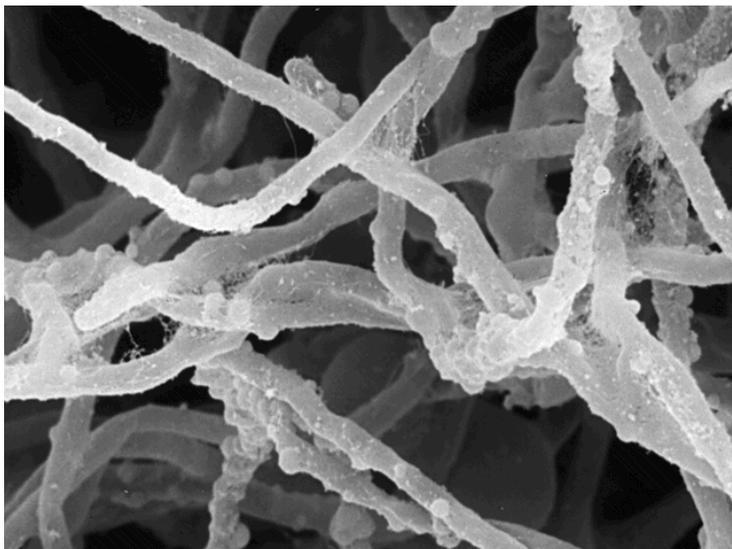


FIGURA 9 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO MICÉLIO DO *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* (40 MICRONS)

FONTE: http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/microbes/p_chryso.html

2.8.4 *Ganoderma* sp.

Ganoderma é um fungo produtor de mico-químicos. A quantidade de informação sobre este tema é notável, utilizando este fungo. O microrganismo é um fungo de degradação branca que está envolvido no processo fundamental da degradação da lignocelulose na natureza (RUSSEL; PATERSON, 2006).

É um fungo que está presente em habitats naturais em todo o mundo. Mais de 250 espécies já foram relatadas. Morfologicamente, é o gênero mais complexo dos poliporos e está virtualmente situado em um caos taxonômico. A discordância prevalente na classificação do polyporacea é resultado da multiplicidade de critérios no qual os sistemas de classificação são baseados. As características morfológicas do basidiocarpo foram usados como base principal para distinguir gêneros e espécies na sub-família *Ganodermoideae* (SMITH, 2008).

Com relação à produção de enzimas lignocelulolíticas, Manavalan et al., 2012, verificaram as proteínas produzidas pelo fungo *Ganoderma lucidum* (*G. lucidum*), sendo que 24% correspondia a celulasas e 5% a hemicelulasas, além de 24 % de enzimas degradadoras de lignina, confirmando esse fungo como produtor de enzimas lignocelulolíticas. Além disso, eles verificaram que o *Ganoderma lucidum* produz o conjunto completo de celulasas.

Na Figura 10 podem ser vistas colônias de *G. lucidum* em crescimento na superfície da placa de Petri contendo meio de cultura sólido



FIGURA 10 – *GANODERMA LUCIDUM* CRESCENDO EM PLACA DE PETRI.

FONTE: http://adaptogens.com/images/fungi/400x300-ganoderma_lucidum_mycelium.jpg

2.8.5 *Lentinus* sp.

Dentre as espécies de *Lentinus* tem-se o *Lentinus edodes* (*L. edodes*), basidiomiceto que habita madeiras apodrecidas de uma grande variedade de árvores decíduas, especialmente o shii, carvalho, castanheiro, faia, etc. (BISEN et al., 2010).

O *L. edodes* produz vários compostos bioativos. O corpo de frutificação deste fungo contém de 88 a 92% de água, proteína, lipídeos, carboidratos, assim como vitaminas e minerais. O fungo é uma boa fonte de vitaminas, especialmente a provitamina D2 (BISEN et al., 2010).

Além disso, o *L. edodes* é capaz de produzir celulasas e hemicelulasas, além de enzimas degradadoras de lignina, assim como o *Lentinus levis* e *Lentinus tigrinus* (*L. tigrinus*) ((ELISASHVILI et al., 2008; LECHNER; PAPINUTTI, 2006).

Lechner e Papinutti (2006), verificaram que o *L. tigrinus* produziu endoglucanases e β -glicosidases, após 90 dias de fermentação, usando a fermentação em estado sólido de farelo de trigo, a 20°C.

A imagem do crescimento de *L. edodes* em placa de petri é apresentada na Figura 11.

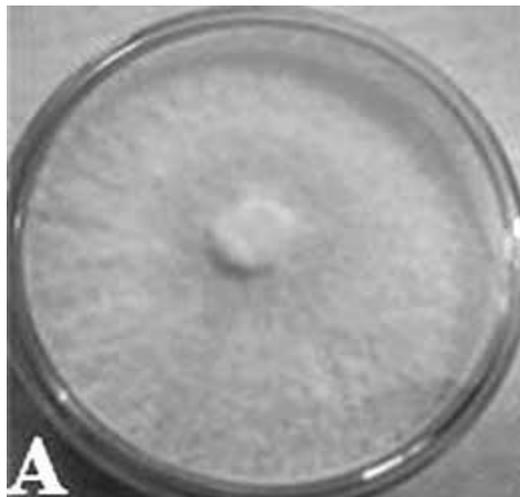


FIGURA 11 – CRESCIMENTO DO *L. EDODES* EM PLACA DE PETRI.
FONTE: BISEN et al., 2010

2.9 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO

A fermentação submersa (FSm) é definida como uma fermentação em excesso de água. Quase todos os processos de produção de enzimas usam esta tecnologia, devido ao melhor monitoramento e facilidade de manuseio (SINGHANIA et al., 2010).

Com relação à fermentação em estado sólido (FES), a FSm tem a vantagem de ser capaz de ter melhor racionalização e padronização do processo, que é crucial para a indústria, e permitir o sistema homogêneo de cultura. As principais vantagens da FSm é a facilidade de controle do processo físico-químico, maior eficiência da absorção de nutrientes e excreção de metabólitos através das células, levando ao menor tempo de processo e, conseqüentemente, ao ganho de produtividade (ZOPPAS; MENEGUZZI; TRAMONTINA, 2013).

A produção de celulases neste processo é altamente influenciada por vários parâmetros, incluindo a natureza do substrato celulósico, pH do meio, disponibilidade dos nutrientes, suplementação com indutores, temperatura de fermentação, etc (SINGHANIA et al., 2010).

Além da fermentação submersa (FSm), tem-se a fermentação submersa com sólidos em suspensão (FSS), a qual assemelha-se à fermentação submersa por utilizar um alto conteúdo de líquido, porém, os sólidos ficam em suspensão. Devido ao alto conteúdo de líquido, a disponibilidade de nutrientes

para o microrganismo e o controle de fermentação são facilitados (MACHADO; TEIXEIRA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2013).

2.10 BIORREATOR

Por definição, um biorreator é um sistema no qual um processo biológico é efetuado, sendo que esta definição pode ser aplicada para a produção de enzimas, microrganismos e células vegetais e animais. Ao contrário dos reatores químicos, nos biorreatores deve-se tomar muito cuidado com relação a contaminações (WILLIAMS, 2002).

Industrialmente um biorreator é referido como um vaso mecânico, no qual organismos são cultivados de forma controlada e materiais são convertidos por reações específicas (WILLIAMS, 2002).

Embora se fale globalmente de reatores com microrganismos é muito importante destacar que, do ponto de vista de engenharia, dependendo do tipo de microrganismo utilizado, tais reatores podem ter características bastante distintas no que se refere aos fenômenos de transporte que ocorrem no biorreator (calor, massa e quantidade de movimento). Assim, por exemplo, reatores que operam com organismos unicelulares como bactérias e leveduras possuem, em geral, um comportamento reológico bastante distinto daqueles que empregam fungos filamentosos (bolors) (BORZANI *et al*, 2001).

Têm-se diversos tipos de biorreatores, sendo que os biorreatores utilizados neste trabalho foram os do tipo colunas de bolhas e os biorreatores do tipo tanque agitado.

2.10.1 Biorreator Coluna de Bolhas

Biorreatores colunas de bolhas são vasos cilíndricos com um distribuidor de gás no fundo do reator. O gás é distribuído pela coluna, na forma de bolhas, tanto em meio líquido quanto com sólidos em suspensão. A introdução do gás causa um fluxo turbulento facilitando as trocas gasosas (KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005)

Uma importante área de aplicação dos reatores de colunas de bolhas é o uso como biorreatores nos quais microrganismos são utilizados para produzir produtos valiosos industrialmente, tais como enzimas, proteínas, antibióticos, etc (KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005).

Além disso, contrariamente aos biorreatores tipo tanques agitados, as colunas de bolhas são utilizadas usualmente para meios com baixa viscosidade e processamento de grandes volumes. São também adequadas para organismos que são sensíveis ao cisalhamento devido à ausência de um agitador mecânico (HEINEMANN, 2000).

2.10.2 Biorreator de tanque agitado (STR)

O biorreator de tanque agitado (STR) é um dos reatores mais convencionais. Entre os componentes encontrados neste reator têm-se os agitadores, que executam a tarefa de transferência de massa e energia, mistura e homogeneização (YANG, 2007).

A principal razão para o grande uso dos STRs é que os microrganismos que crescem em frascos Erlenmeyer possuem deficiência em transferência de oxigênio (ASENJO; MERCHUK, 1995), o que é minimizado no STR, porém, outros problemas tais como tensão de cisalhamento pode ocorrer. No STR a agitação é forçada, enquanto que a agitação em frascos Erlenmeyer ocorre por difusão.

2.11 PRODUÇÃO DE CELULASES USANDO FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSM) E FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM SÓLIDOS EM SUSPENSÃO (FSS)

Bactérias e actinomicetos têm sido relatados como produtores de celulasas, porém, os níveis de produção são muito baixos para tornar a tecnologia economicamente viável. A maior parte das celulasas comerciais é produzida por fungos filamentosos – *T. reesei* ou *A. niger* usando fermentação submersa (SINGHANIA et al., 2010).

O meio de cultivo para produção de celulases varia dependendo do microrganismo que se trabalhe. Para o *T. reesei*, um meio basal como o Mandels & Weber (1969) tem sido o mais utilizado, com ou sem modificações. Porém, muitos desses meios diferem em sua composição, afetando, conseqüentemente a produtividade das celulases (SINGHANIA et al., 2010).

Matkar et al (2013) encontrou uma atividade de FPase de 1,33 IU/mL e 1,32 IU/mL de CMCase usando celulose como substrato e o microrganismo *Aspergillus sydowii*, no sexto dia de produção. Já Khalil (2002), usando bagaço de cana como substrato, fermentação semi-sólida e o microrganismo *Phanerochaete chrysosporium*, obteve uma atividade de CMCase de 0,5 IU/mL após 12 dias de fermentação.

Já com relação à produção em biorreatores, Ritter et al (2013) obteve atividade de FPase de 1,0 IU/mL e de CMCase de 6,4 IU/mL usando celulose e sorbitol como fontes de carbono, após 100 horas de fermentação submersa em biorreator *air-lift*.

Utilizando batelada alimentada, vários autores obtiveram produções elevadas de celulases, como Hendy et al (1976) que obteve atividade de FPase de 4,2 FPU/mL usando um biorreator de 14 L e o microrganismo *T. reesei* RUT C30. Já Watson (1984) obteve atividade de FPase de 57 IU/mL usando celulose como substrato e *T. reesei* RUT C30 também, após aproximadamente 275 horas.

2.12 CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS

Processos de *downstream* são importantes na indústria de enzimas e à melhoria da estabilidade destes produtos biológicos. Neste sentido a seleção da estratégia de separação e recuperação é essencial para diminuir as perdas da atividade da enzima (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Dentre os processos para concentrar enzimas utiliza-se, primeiramente, uma microfiltração de fluxo cruzado, na qual se remove microrganismos e debris celulares. Após, realiza-se uma ultrafiltração, na qual as enzimas são concentradas, pela passagem pelos poros das membranas (AEHLE, 2007). Porém, deve-se tomar o cuidado para evitar a escolha de materiais das

membranas contendo celulose, pois as enzimas poderão degradar o próprio material de construção desses dispositivos de filtração.

O número de estudos de concentração e processos parciais de purificação de proteínas empregando membranas aumentou durante as últimas décadas. Atualmente, a ultrafiltração é uma das técnicas mais usadas para a concentração de proteínas e pode ser usada como um passo primário de purificação (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

2.12.1 Separação por membranas: ultrafiltração

Na ultrafiltração passa-se o extrato enzimático microfiltrado por uma membrana semipermeável, na qual realiza-se a separação de solutos com base no tamanho molecular das enzimas (AEHLE, 2007).

Na indústria, a maior parte dos módulos de ultrafiltração são desenhados para o tipo de separação tangencial. Devido à natureza macromolecular da maior parte dos produtos biotecnológicos, a ultrafiltração tem um papel fundamental no processo. Nos reatores enzimáticos contínuos e em batelada, a separação das enzimas para o reuso, após o ciclo de produção, é impossível. Assim, as membranas de ultrafiltração têm um papel fundamental na separação das enzimas dos produtos (PRASAD, 2010).

Sob condições ótimas, membranas de ultrafiltração efetivamente retêm as enzimas do reator, sem perda da atividade enzimática (PRASAD, 2010).

A ultrafiltração tem sido usada em diferentes processos biotecnológicos e é aplicada com sucesso devido ao baixo consumo energético e à eficiente separação de moléculas proteicas. Porém, a perda de atividade enzimática tem sido observada em muitos casos, principalmente devido à força de cisalhamento gerada no sistema e à remoção de íons (cofatores) que possuem efeito positivo na atividade enzimática (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

Na Figura 12 tem-se um módulo de ultrafiltração, sistema *Hollow Fiber Quixstand* (GE, Suécia).



FIGURA 12 – SISTEMA HOLLOW FIBER QUIXSTAND (GE, SUÉCIA).
FONTE: O AUTOR, 2014

CAP. I – ETAPA DE SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS E ESTUDO DO INÓCULO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são os microrganismos mais importantes para a decomposição da matéria orgânica devido à habilidade que possuem de degradação. Quando grandes quantidades de enzimas extracelulares são produzidas para a degradação dos substratos, ocorre a decomposição desta matéria orgânica (CARAMEZ et al., 2012).

Para o aumento da produtividade na produção de enzimas microbianas os controles do processo precisam ser aperfeiçoados. O rendimento de celulasas varia de acordo com os fatores do processo de produção, tais como: a quantidade de inóculo, pH, temperatura, presença de indutores, nutrientes no meio, aeração e tempo de crescimento (SHANMUGAPRIYA; SARAVANA; MANOHARAN, 2012).

Na indústria, estas enzimas têm novas aplicações na produção de açúcares fermentescíveis e etanol, ácidos orgânicos, detergentes e outros químicos. Eles são utilizados na indústria de polpa e papel, despigmentação de superfícies de fibras na indústria têxtil, na indústria de alimentos, para o processamento de papel e celulose, assim como a biotransformação de resíduos de celulose a açúcares fermentescíveis. (SHAHRIARIN et al., 2011)

2. OBJETIVOS

- Identificação e seleção quantitativa de fungos produtores de enzimas celulolíticas;
- Efeito da fonte de carbono, no meio de inóculo, na produção das enzimas celulolíticas;
- Estudo do inóculo (otimização dos componentes do meio e tempo de crescimento do pré-inóculo e do inóculo).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 8 cepas da coleção de cultura do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, localizado na Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR: *Aspergillus niger* (LPB 28 e AN 326), *Phanerochaete* sp. (PH-HD), *Trichoderma* sp. (Tric 193 e Tric 221) *Ganoderma* sp. (Gan56) e *Lentinus* sp. (L6121 e L6646).

3.2 SUBSTRATO

Como substrato para a produção das enzimas celulolíticas utilizou-se o resíduo de processamento de palma. Este resíduo foi secado em estufa (marca Labstore) a 45 °C *overnight*, posteriormente foi moído, peneirado e separado em três frações: menor que 0,35 mm; entre 0,35 mm e 0,85 mm e maior que 0,85 mm. A fração utilizada nos experimentos foi a fração intermediária (entre 0,35 mm e 0,85 mm), conforme previamente selecionada de acordo com estudos anteriores.

3.3 MEIOS UTILIZADOS

O meio usado para a produção do inóculo foi o Czapeck-Dox e o meio de fermentação utilizado foi o Mandels & Weber modificado (1969), com a palma moída como fonte de carbono. As composições seguem nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5 – COMPONENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO MEIO CZAPECK-DOX

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	30
NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄	1,0
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01

TABELA 6 – COMPONENTES USADOS NA PREPARAÇÃO DO MEIO COM BASE EM MANDELS & WEBER (1969)

Componente	Concentração (g/L)
*Palma	10
KH₂PO₄	2
(NH₄)₂SO₄	1,4
CaCl₂	0,3
MgSO₄.7H₂O	0,3
FeSO₄.7H₂O	0,005
MnSO₄.H₂O	0,0016
ZnSO₄.7H₂O	0,0014
CoCl₂	0,002
Tween – 80	1,0 mL/L
Peptona	1,0

* Concentração definida conforme estudos de Gustinelli, 2011.

* único componente do meio Mandels & Weber que pode ser alterado.

3.4 PRÉ-INÓCULO

Para a produção do pré-inóculo utilizou-se o meio PDA (*Potato Dextrose Agar*). Preparou-se 50 mL de meio PDA em frascos Erlenmeyer de 250 mL, os quais foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave. Após o resfriamento foram realizadas repicagens de cada microrganismo nos frascos Erlenmeyer, e incubados em estufa (marca Orion® da Fanen) a 30 °C por 10 dias para fungos não esporulados e 7 dias para os esporulados.

Suspensão de Fragmentos de Micélio: Para os microrganismos não esporulados (PH-HD, Gan56, L6121 e L6646), após 10 dias de incubação uma suspensão de fragmentos do micélio foi preparada. Para isso, foram adicionados a cada Erlenmeyer 30 mL de água esterilizada contendo 0,1 % v/v de Tween-80, e, após, feita a raspagem para a obtenção da suspensão de fragmentos do micélio fúngico desenvolvido na superfície do meio PDA.

Suspensão de Esporos: Para microrganismos esporulados (Tric 193, Tric 221, LPB 28 e AN 326) uma suspensão dos esporos foi obtida pela adição de 30 mL de água esterilizada contendo 0,1 % v/v de Tween-80, além de uma barra magnética, seguida por agitação em agitador magnético por 15 minutos.

3.5 INÓCULO

O inóculo foi preparado utilizando o meio de cultivo para fungos Czapeck-Dox (100 mL), pH 7.3, o qual foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, em frascos Erlenmeyer.

Para fungos não esporulados foi utilizada a suspensão de fragmentos de micélio preparada anteriormente (pré-inóculo, conforme subitem 3.4) transferindo-se 3 mL (10 % v/v de 30 mL) do pré-inóculo para o meio Czapeck-Dox para a obtenção do inóculo.

Para fungos esporulados foi transferida uma alíquota da suspensão de esporos do pré-inóculo para o meio Czapeck-Dox, com uma taxa de transferência de 10^6 esporos/mL do meio de inóculo, conforme estudos realizados previamente.

Os frascos Erlenmeyer contendo os inóculos foram incubados a 28°C em agitador do tipo *shaker* (marca Tecnal, TE-420) a 120 rpm por 7 dias.

3.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Para a produção das celulases foi utilizado o meio Mandels & Weber adaptado, segundo a composição descrita no subitem 3.3. Adicionou-se 90 mL de meio Mandels & Weber modificado em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foi realizada a inoculação utilizando taxa de inóculo de 10 % v/v (10 mL), com um tempo de fermentação de 10 dias, 28 °C e pH em torno de 5,0. Para medir a atividade enzimática de FPase e CMCCase, foram retiradas alíquotas de 2,5 mL, centrifugadas a 4000 rpm (2060 g) por 15 minutos, e o sobrenadante utilizado para a determinação das atividades enzimáticas de CMCCase e PFase.

As etapas para a produção das enzimas celulolíticas seguem na Figura 13.



FIGURA 13 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS.
FONTE: O AUTOR, 2014

Na Figura 13 tem-se o fluxograma de produção das enzimas celulolíticas utilizando o fungo *Aspergillus niger*. Porém, ela se aplica a todos os fungos utilizados no trabalho. A produção do pré-inóculo e do inóculo estão descritos na sub-seção 3.5.

3.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE FPase e CMCase

Para a determinação da atividade de celulase foi seguido o procedimento descrito por Ghose (1987), porém, com modificações. Neste trabalho a reação enzimática ocorreu em microtubos mantendo-se a mesma proporção original dos reagentes. Para o ensaio de FPase utilizou-se 125 μ L de enzima, 250 μ L de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e papel de filtro Whatman n° 1 de 150 mm² de área adicionados em microtubos de 2,0 mL de capacidade. Os tubos então foram incubados em banho-maria a 50°C por 1 hora para que ocorresse a reação enzimática. Após a incubação de 60 minutos adicionou-se 750 μ L de ácido-dinitrosalicílico (DNS) para interromper a reação. As amostras foram colocadas em banho em ebulição por 5 minutos e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Esse 3, SP-2000) a 540 nm. Foram preparados três brancos, um para o substrato, um para o espectro e outro para cada amostra (branco da enzima).

Para o ensaio de CMC_{case} o procedimento foi similar, porém, utilizou-se 100 µL de enzima, 100 µL de substrato (CMC 2%) e incubação a 50°C por 30 minutos (banho-maria). Posteriormente foram adicionados 600 µL de DNS e os tubos foram incubados por 5 minutos em banho em ebulição. Os tubos foram então resfriados à temperatura ambiente e adicionou-se 200 µL de água deionizada. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Esse 3, SP-2000) a 540 nm.

Foi realizado um teste para comparar a atividade de FPase usando o método modificado (descrito acima) e o método original (Ghose, 1987). Foram utilizados os preparados enzimáticos comerciais Cellic Ctec 2 e Celluclast 1.5 L, ambas cedidas pela empresa Novozymes S/A. Para calcular a atividade enzimática de FPase foram feitas três diluições para os dois concentrados enzimáticos, e calculada a atividade enzimática na diluição que liberou 2 mg de glicose, no método original e 0,5 mg de glicose, no método modificado, com isto calculou-se a atividade enzimática em FPU/mL (sendo FPU, *Filter Paper Unit*).

3.8 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DO INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES POR FSS

Após a escolha do melhor microrganismo produtor de celulasas foi feito o primeiro estudo do inóculo. Neste estudo a fonte de carbono do inóculo (sacarose 30 g/L – meio Czapeck-Dox) foi substituída por resíduo de palma (10 g/L). Para avaliar o efeito dessa substituição de fontes de carbono, foi medida a atividade enzimática no meio de produção do complexo celulolítico.

Foram utilizados dois meios de produção do complexo celulolítico, o meio Mandels & Weber (1969, conforme descrito no subitem 3.3) e um segundo meio, Saravanan (SARAVANAN et al., 2012), cujos componentes estão na Tabela 7.

Os procedimentos para cultivo em pré-inóculo, inóculo e meio de fermentação, estão descritos nos subitens 3.5 a 3.7. E as atividades enzimáticas foram medidas no 5^o dia de cultivo.

TABELA 7 – COMPONENTES USADOS NA PREPARAÇÃO DO MEIO DE ACORDO COM SARAVANAN (2012)

Componente	Concentração (g/L)
Palma	10
KH₂PO₄	10
(NH₄)₂SO₄	7
CaCl₂	1,5
MgSO₄.7H₂O	0,3
FeSO₄.7H₂O	0,005
MnSO₄.H₂O	0,00156
ZnSO₄.7H₂O	0,0014
CoCl₂	0,00366
Tween - 80	1,0 mL/L
Peptona	1,0
Uréia	1,5

Fonte: SARAVANAN et al., 2012

3.9 OTIMIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE INÓCULO

Após a escolha da fonte de carbono utilizada no meio do inóculo fez-se um delineamento central composto rotacional (DCCR), utilizando como fatores a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio (NaNO₃) e a taxa de transferência da suspensão de micélio do *Phanerochaete sp.* PH-HD (% em volume/volume) (do pré-inóculo para o inóculo). Os outros componentes do meio Czapeck-Dox foram mantidos.

A fonte de carbono é essencial para o crescimento dos microrganismos, sendo que o carbono é o principal constituinte do material celular. Já a fonte de nitrogênio também é essencial para os microrganismos, pois o nitrogênio é constituinte das proteínas, do material genético, e, no caso deste estudo, das enzimas que serão produzidas. A taxa de transferência é importante pois há uma taxa mínima de microrganismo a ser transferida para que o mesmo possa se adaptar ao meio de crescimento, e trabalhando-se com altas taxas de transferência diminui-se o volume de meio para o crescimento do microrganismo, assim, deve-se trabalhar com uma taxa adequada de transferência.

Os níveis decodificados, bem como os fatores utilizados nesta etapa do processo de otimização dos componentes do inóculo encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8 – FATORES USADOS NO DCCR NO ESTUDO DO INÓCULO

Fatores / Nível	-1,68	-1	0	1	+1,68
Concentração de palma (g/L)	3,18	10	20	30	36,82
Concentração de NaNO₃ (g/L)	0,48	1,5	3	4,5	5,52
Taxa de transferência (%*)	3,2	10	20	30	36,8

* A % se refere ao volume transferido do pré-inóculo (após crescimento) para o inóculo

A concentração do resíduo sólido de palma moído utilizada nos estudos prévios, no meio de inóculo, foi de 10 g/L. Assim, utilizou-se uma faixa de concentração de resíduo sólido de palma moído, entre 3,18 g/L e 36,82 g/L. Para a fonte de nitrogênio também utilizou-se uma faixa, entre 0,48 g/L e 5,52 g/L. E a taxa de transferência também variou entre 3,2 % a 36,8 %. Para medir o efeito das variáveis, mediu-se a atividade enzimática no meio de produção das enzimas, após 5 dias de fermentação.

Neste estudo foi utilizado o fungo *Phanerochaete sp.* PH-HD, com meio de fermentação o Mandels & Weber modificado, cuja composição está no sub-item 3.4, seguindo os procedimentos descritos nos sub-itens 3.5 a 3.7 para a produção das celulases.

A matriz gerada utilizando o software Statística 7.0 segue na Tabela 9.

TABELA 9 – TABELA DOS EXPERIMENTOS PREVISTOS NO DCCR E REALIZADOS EM ORDEM ALEATÓRIA, GERADA PELO SOFTWARE STATISTICA 7.0

Ensaio	Palma (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	Taxa de transf. (% v/v*)
13	20	3	3,2
7	30	4,5	10
17	20	3	20
15	20	3	20
4	10	4,5	30
14	20	3	36,8
5	30	1,5	10
3	10	4,5	10
11	20	0,48	20
9	3,182	3	20
16	20	3	20
6	30	1,5	30
12	20	5,52	20
10	36,818	3	20
1	10	1,5	10
2	10	1,5	30
19	20	3	20
18	20	3	20
8	30	4,5	30

* A % se refere ao volume transferido do pré-inóculo (após crescimento) para o inóculo

3.10 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E DO INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES

Este estudo teve como objetivo a verificação da influência do tempo de crescimento do pré-inóculo e do inóculo na produção das celulases (no meio de fermentação). Assim, utilizando *Phanerochaete sp.*, o tempo de crescimento do pré-inóculo era de 10 dias, e do inóculo de 7 dias, totalizando 17 dias. Então, variaram-se os tempos de crescimento deste fungo no pré-inóculo (5, 7 e 9 dias) e no inóculo (3, 5, 7 e 9 dias), e, foram feitas combinações desses tempos de crescimento. Por exemplo, em um dos ensaios o pré-inóculo teve um tempo de cultivo de 5 dias e inóculo de 3 dias, totalizando 8 dias. Na Figura 14 tem-se o fluxograma dos ensaios realizados. Após, o microrganismo foi inoculado no meio de fermentação (com taxa de inoculação de 10 % v/v) e medida a atividade enzimática após 5 dias de fermentação. Assim, com a combinação de todos os

tempos de pré-inóculo e inóculo, totalizaram 10 experimentos, que foram realizados em duplicata. Os meios de pré-inóculo, inóculo e fermentação foram preparados conforme subitens 3.3 a 3.5.

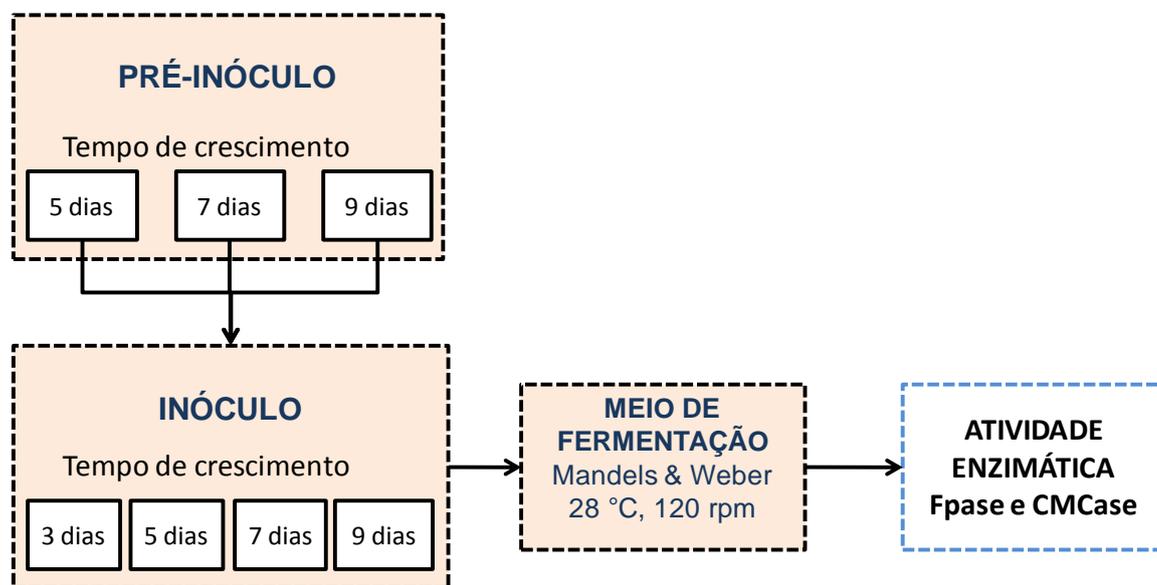


FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO
 FONTE: O AUTOR, 2014

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPARAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE Fpase UTILIZANDO O MÉTODO DE GHOSE ORIGINAL E O MODIFICADO

O método original de Ghose (1987) para obter a atividade de FPase e CMCase utiliza grande quantidade de DNS (3 mL para cada ensaio). Assim, foi realizada uma redução proporcional destes ensaios enzimáticos, utilizando uma menor quantidade de DNS, além de amostras. Além disso, os ensaios em microescala foram realizados em microtubos de 2 mL. O ensaio em microescala está descrito na sub-seção 3.7.

Usando o método original a atividade enzimática de FPase encontrada para a Celluclast 1.5 L foi de 49 FPU/mL e para a Cellic Ctec 2 de 183 FPU/mL, enquanto para o método modificado para a Celluclast 1.5 L foi de 43 FPU/mL e

Cellic Ctec 2 de 156 FPU/mL. Com isso verifica-se que o método modificado subestima a atividade enzimática de FPase, porém, para atividades mais baixas, como da Celluclast 1.5 L, conseguiu reproduzir bem o método original.

4.2 SCREENING DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

Após 5 e 10 dias de fermentação, foram determinadas as atividades enzimáticas das CMCase e PFases, produzidas em fermentação submersa com sólidos suspensos (FSS) do resíduo de processamento da palma por diferentes cepas. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

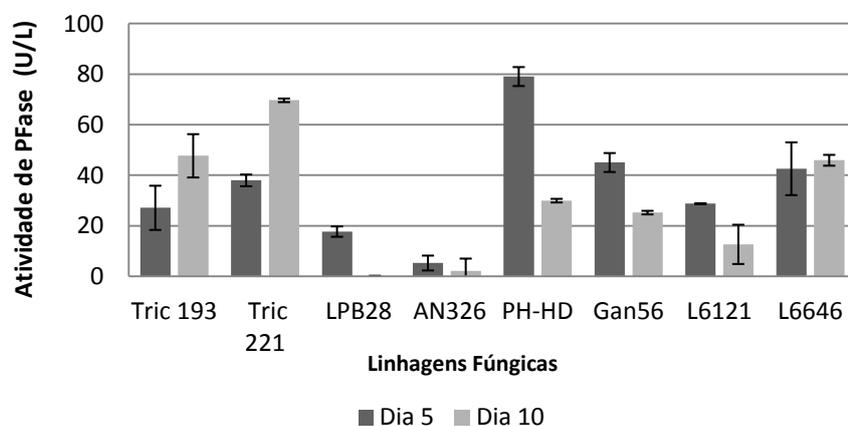


FIGURA 15 – ATIVIDADE DE FPase OBTIDAS NO ESTUDO DE SCREENING DE MICRORGANISMOS

* Atividade sem diluição da enzima

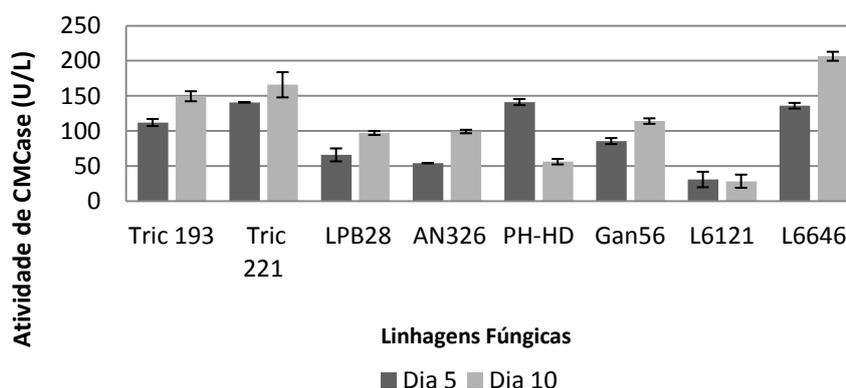


FIGURA 16 – ATIVIDADE DE CMCase OBTIDA NO ESTUDO DE SCREENING DE MICRORGANISMOS

* Atividade sem diluição da enzima

Conforme pode ser observado nas Figuras 15 e 16, o fungo PH-HD (*Phanerochaete sp.*) apresentou maior atividade no 5º dia de fermentação

tanto para FPase (79 IU/L) quanto para CMCCase (141 IU/L). Porém, no 10º dia de fermentação a linhagem Tric 221 (*Trichoderma sp.*) apresentou maior atividade de FPase (70 IU/L) e a linhagem L6646 (*Lentinus sp.*) de CMCCase (206 IU/L). No 5º dia o PH-HD apresentou maior atividade de Fpase (79 IU/L) que o Tric 221 no 10º dia (69,98 IU/L), apresentando um aumento de 12 %. E apresentou uma atividade de CMCCase no 5º dia (141 IU/L) menor que o L6646 no 10º dia (206,50 IU/L) (decréscimo de 46 %). Assim, o PH-HD foi escolhido como melhor microrganismo produtor de celulases para as próximas etapas.

Conforme foi verificado, o PH-HD foi o microrganismo que apresentou maior atividade de Fpase (79 IU/L). A atividade de FPase mede a associação sinérgica das enzimas EGs e ExGs, assim, com relação à hidrólise do resíduo lignocelulósico, é interessante que se tenha uma boa sinergia entre essas enzimas, para melhorar o rendimento da hidrólise. Já a CMCCase mede apenas a atividade das EGs, sendo que o fungo que apresentou maior atividade de CMCCase foi o L6646 (206,50 IU/L). Então, a atividade maior de FPase é mais interessante do que a de CMCCase, já que o interesse do trabalho é utilizar as enzimas celulolíticas em materiais lignocelulósicos. E esse também foi um critério para a escolha do PH-HD como melhor microrganismo produtor de celulases, dentre os fungos usados nesta etapa.

Dentre os resultados obtidos por outros autores, Umikalsen (1997) obteve atividade de Fpase de 950 IU/L em 4 dias de fermentação, usando resíduo de palma como substrato, tratado com HNO₃, e usando o fungo *Chaetomium globosum*. Já Gustinelli (2011) obteve uma atividade de FPase de 250 IU/L e de CMCCase de aproximadamente 500 IU/L, ambos após 7 dias, com o fungo *Penicillium sp.* e utilizando como substrato bagaço de cana. Khalil (2002) conseguiu obter uma atividade de CMCCase de 576 IU/L após 6 dias de cultivo usando *Phanerochaete chrysosporum* usando como substrato o bagaço de cana.

4.3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DO INÓCULO E SELEÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DA ENZIMA

Os resultados das atividades de CMCases e FPases das enzimas utilizando sacarose e palma nos meios de cultivo do inóculo de *Phanerochaete* sp. PH-HD encontram-se nas Figuras 17 e 18.

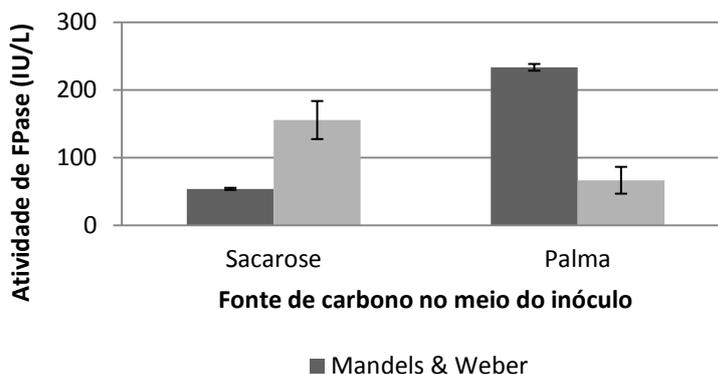


FIGURA 17 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE FPASE DO ESTUDO DE SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO DO INÓCULO E SELEÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO
* Atividade sem diluição da enzima

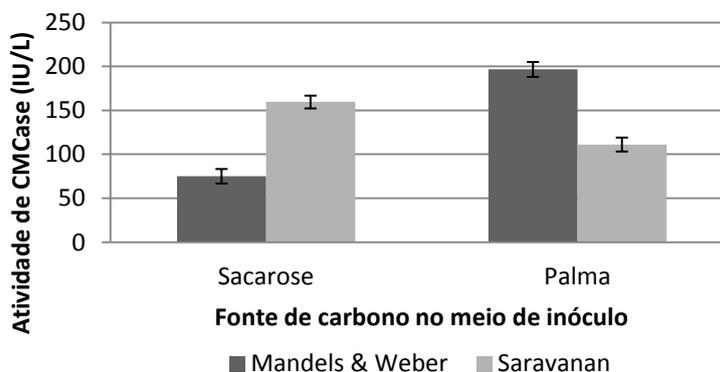


FIGURA 18 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE CMCASE DO ESTUDO DE SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO DO INÓCULO E SELEÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO
* Atividade sem diluição da enzima

Conforme pode ser observado nas Figuras 17 e 18, a atividade enzimática aumentou quando foi utilizado o resíduo sólido da palma (233 IU/L para a FPase e 197 IU/L para a CMCCase) em substituição à sacarose como fonte de carbono no meio de cultivo do inóculo (54 IU/L para a FPase e 75 IU/L para a CMCCase), e usando o meio Mandels & Weber como meio de produção das enzimas.

Porém, com o meio Saravanan (2012) como meio de produção das enzimas, usando sacarose como fonte de carbono no meio de inóculo, obteve-se um aumento na atividade enzimática de 57 % para FPase (113 IU/L), e 30 % para CMCase (160 IU/L), quando comparado com o uso do resíduo de palma (55 IU/L para FPase e 111 IU/L para CMCase).

Dentre os resultados obtidos, verifica-se que a substituição da sacarose pela palma, e usando o meio Mandels & Weber, propiciou uma maior atividade enzimática, tanto em relação à FPase (194 %) quanto à CMCase (31 %), se comparadas às atividades obtidas durante o estudo de *screening*. Assim, esse foi o meio de fermentação selecionado para a produção da enzima por FSS.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

Na Tabela 10, abaixo, tem-se os resultados das respostas de atividades de CMCases e FPases para o planejamento fatorial DCCR, durante 5 dias de fermentação a 28 °C, 120 rpm e utilizando o meio Mandels & Weber modificado como meio de fermentação.

TABELA 10 – TABELA DE RESPOSTAS (CMCases E PFases) NO ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

Ensaio	Palma (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	Taxa de transf. (mL / % v/v *)	FPase (IU/L)	CMCase (IU/L)
1	10	1,5	3,00 (10 %)	87,77	138,17
2	10	1,5	9,00 (30 %)	97,46	135,36
3	10	4,5	3,00 (10 %)	108,60	141,18
4	10	4,5	9,00 (30 %)	105,67	105,21
5	30	1,5	3,00 (10 %)	48,73	107,25
6	30	1,5	9,00 (30 %)	14,67	0
7	30	4,5	3,00 (10 %)	46,99	121,1
8	30	4,5	9,00 (30 %)	75,09	132,48
9	3,18	3	6,00 (20 %)	120,34	122,81
10	36,82	3	6,00 (20 %)	81,8	92,37
11	20	0,48	6,00 (20 %)	102,68	117,47
12	20	5,52	6,00 (20 %)	80,81	113,33
13	20	3	0,95 (3,2%)	63,4	135,59
14	20	3	11,05 (36,8 %)	79,56	130,15
15	20	3	6,00 (20 %)	116,11	143,09
16	20	3	6,00 (20 %)	97,96	164,31
17	20	3	6,00 (20 %)	118,35	146,87

* A % se refere ao volume transferido do pré-inóculo (após crescimento) para o inóculo

** Atividade sem diluição da enzima

Usando o software Statistica 7.0 gerou-se a tabela de ANOVA, Tabelas 11 e 12, e superfícies de resposta, Figura 18.

TABELA 11 – ANOVA, PARA A ATIVIDADE DE FPase, GERADA PELO DCCR DURANTE O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

Fatores	SQ	GL	QM	F	p
palma (L)	5692,83	1	5692,83	11,725	0,011
palma (Q)	470,91	1	470,91	0,970	0,358
NaNO ₃ (L)	190,46	1	190,46	0,392	0,551
NaNO ₃ (Q)	1076,07	1	1076,07	2,216	0,180
Taxa de transf. (L)	57,37	1	57,37	0,118	0,741
Taxa de transf. (Q)	3225,86	1	3225,86	6,644	0,037
palma (L) x NaNO ₃ (L)	109,82	1	109,82	0,226	0,649
palma (L) x Taxa de transf. (L)	20,22	1	20,22	0,042	0,844
NaNO ₃ (L) x Taxa de transf. (L)	306,78	1	306,78	0,632	0,453
Erro	3398,72	7	485,53		
Total SQ	13285,33	16			

TABELA 12 – TABELA DE ANOVA PARA A ATIVIDADE DE CMCase, GERADA PELO DCCR DURANTE O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DO INÓCULO

Fatores	SQ	GL	QM	F	p
palma (L)	3237,74	1	3237,74	4,284	0,077
palma (Q)	3237,01	1	3237,01	4,283	0,077
NaNO ₃ (L)	923,18	1	923,18	1,222	0,306
NaNO ₃ (Q)	2270,72	1	2270,72	3,005	0,127
Inóculo (L)	1513,15	1	1513,15	2,002	0,200
Inóculo (Q)	722,14	1	722,14	0,956	0,361
palma (L) x NaNO ₃ (L)	3761,48	1	3761,48	4,977	0,061
palma (L) x Inóculo (L)	407,41	1	407,41	0,539	0,487
NaNO ₃ (L) x Inóculo (L)	913,14	1	913,14	1,208	0,308
Erro	5290,37	7	755,77		
Total SQ	20337,06	16			

O R² obtido para a FPase foi de 74,4%, enquanto para a CMCase foi de 74,0%, mostrando que os dados experimentais obtidos se ajustam bem ao modelo gerado pelo DCCR. Verifica-se na Tabela 11 que os únicos componentes significativos foram a concentração de palma (L), e a taxa de

transferência (Q), para a atividade de FPase. Porém, para a atividade de CMCase, Tabela 11, não houve fatores significativos, com 95 % de confiança.

Na Figura 19 verifica-se que para a atividade de FPase a faixa ótima da atividade enzimática se encontra para menores concentrações de resíduo de palma, sendo que para os demais fatores o ponto central é o melhor para a atividade de FPase.

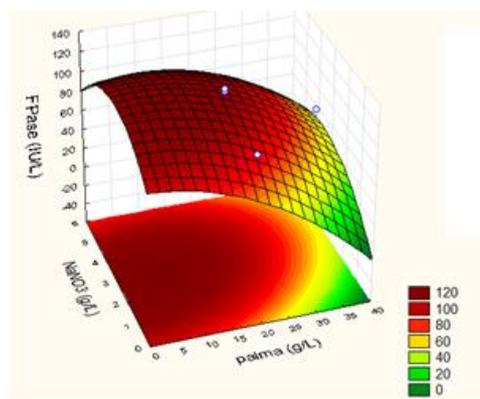


FIGURA 19 –SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS PARA A FPase GERADAS PELO SOFTWARE STATISTICA 7.0, FIXANDO A CONCENTRAÇÃO DE NaNO_3 EM 3 g/L (PONTO CENTRAL).

Segue a equação do modelo gerado pelo DCCR (Equação 1).

$$\text{Atividade FPase} \left(\frac{\text{IU}}{\text{L}} \right) = 41,62 - 0,12 * [\text{palma}] - 0,06 * [\text{palma}]^2 + 15,39 * [\text{NaNO}_3] - 4,35 * [\text{NaNO}_3]^2 + 20,13 * [\text{taxa de transf. (mL)}] - 1,88 * [\text{taxa de transf. (mL)}]^2 + 0,25 * [\text{palma}] * [\text{NaNO}_3] - 0,05 * [\text{palma}] * [\text{taxa de transf. (mL)}] + 1,38 * [\text{NaNO}_3][\text{taxa de transf. (mL)}]$$

(Equação 1)

Na Figura 20 tem-se o diagrama de pareto para a FPase e CMCCase.

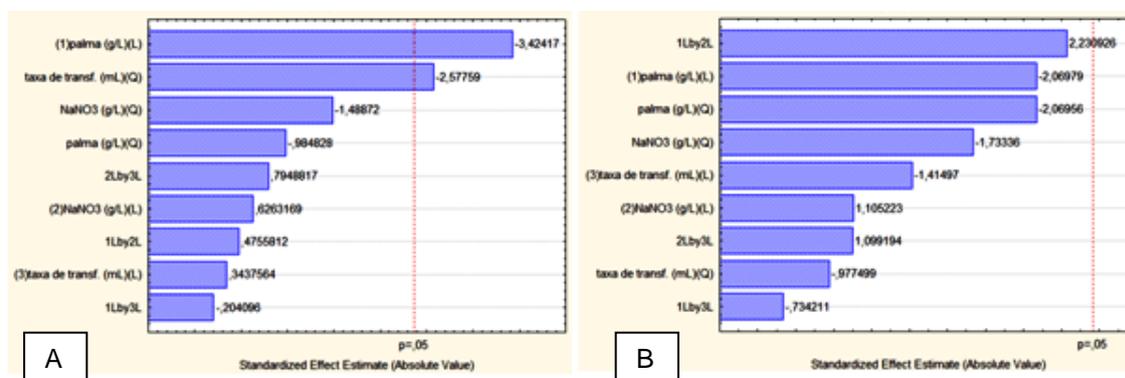


FIGURA 20 – DIAGRAMA DE PARETO GERADO USANDO O SOFTWARE STATISTICA v. 7.0. A – PARA A FPASE; B – PARA A CMCASE;

Conforme se pode observar nos diagramas de Pareto, para a FPase a concentração de palma utilizada foi um fator significativo, com intervalo de confiança de 95 %, na produção das enzimas. Porém, o efeito foi negativo, indicando que para maiores concentrações de palma não há aumento na atividade enzimática, conforme também indicado nas superfícies de resposta. Além da palma, a taxa de transferência também apresentou efeito significativo na produção da enzima, sendo este efeito negativo.

Utilizando o software Statística 7.0 para predizer o valor ótimo dos fatores, determinou-se, para a FPase uma concentração ótima do resíduo sólido de palma de 4 g/L, de NaNO₃ de 2,9 g/L e de taxa de inóculo ótima de 6,4 mL (21 %), cuja atividade predita pelo modelo é de 128 IU/L. Já para a CMCCase os valores ótimos foram: concentração de palma de 14 g/L, concentração de NaNO₃ de 2,4 g/L e de taxa de transferência de 4 mL (13% v/v), com atividade predita de 158 IU/L.

Como os valores de concentração das variáveis independentes otimizadas foram distintos, tanto para a FPase quanto para a CMCCase, optou-se por utilizar uma concentração de 10 g/L de palma (acima da concentração), 1,5 g/L de NaNO₃ e 3,0 mL (10%) de inóculo. Assim, usando a equação gerada pelo modelo, a atividade de FPase alcança , aproximadamente, 101 IU/L, enquanto a de CMCCase atingiu 155 IU/L (próximo do ótimo da CMCCase).

4.5 ESTUDO DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E DO INÓCULO

Com esse estudo pode-se verificar o efeito do tempo de crescimento do pré-inóculo e do inóculo na atividade enzimática de Fpase e de CMCCase. Assim, variou-se o tempo de crescimento do pré-inóculo (5, 7 e 9 dias) e do inóculo (3, 5, 7 e 9 dias) e fez-se uma combinação entre cada tempo de crescimento, e foram feitos experimentos em duplicata. Os resultados se encontram nas Figuras 21 e 22.

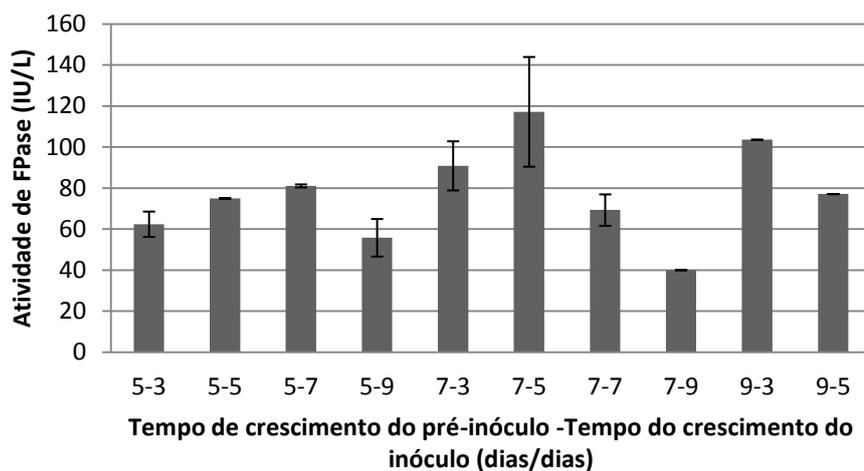


FIGURA 21 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE FPASE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

* Atividade sem diluição da enzima

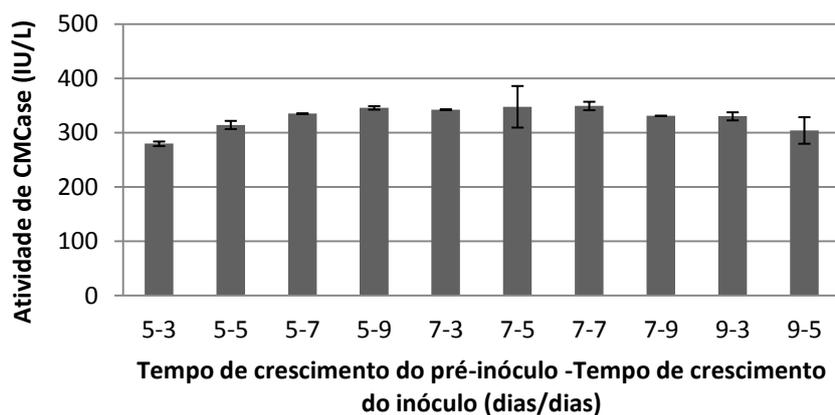


FIGURA 22 – RESULTADOS DA ATIVIDADE DE CMCase EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DO PRÉ-INÓCULO E INÓCULO.

* Atividade sem diluição da enzima

Das Figuras 21 e 22, verifica-se que a melhor atividade enzimática foi obtida para um tempo de crescimento do pré-inóculo de 7 dias e de 5 dias para o crescimento do inóculo, tanto com relação à atividade de CMCase (348 IU/L), quanto de PFase (117 IU/L).

Ainda, utilizou-se o Software estatística v. 7.0 para verificar se havia diferença significativa, com intervalo de confiança de 95%, entre as atividades de Fpase obtidas com pré-inóculo de 7 dias e inóculo de 3 dias

comparativamente ao pré-inóculo de 7 dias e inóculo de 5 dias. Também foi feita a mesma comparação, mas para a atividade de CMCase. Os resultados dessas comparações se encontram nos Anexos A e B. Conforme análise estatística apresentada no item ANEXOS, não há diferença significativa entre os dois casos. Nos demais experimentos foi utilizado 7 dias para crescimento do pré-inóculo e 5 dias para o inóculo, porém, os mesmos poderiam ser conduzidos com 7 dias de crescimento de pré-inóculo e 3 dias para o inóculo (totalizando 10 dias).

Ainda há de se observar que inicialmente utilizavam-se 10 dias para o crescimento pré-inóculo e de 7 dias para o crescimento do inóculo, com um total de 17 dias antes da passagem do inóculo para o meio de fermentação. Com esse estudo reduziu-se o tempo total (crescimento do pré-inóculo e inóculo) para 12 dias.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que dentre as linhagens selecionadas como potencialmente produtoras de celulases, descritos no subitem 2.3.2, a *Phanerochaete sp.* (PH-HD) foi a que apresentou a maior atividade, tanto de FPase (79 IU/L) quanto de CMCase (141 IU/L), no 5º dia de fermentação. Este resultado se mostrou interessante, pois trabalhou-se com fungos conhecidos na produção do complexo celulolítico, como a *Trichoderma sp.* e *Aspergillus niger*, sendo que a *Phanerochaete sp.* apresentou melhor produção de celulases em comparação com outros trabalhos na literatura sobre a produção de celulases, utilizando esse fungo.

Além disso, verificou-se que a troca da fonte de carbono no inóculo, a sacarose, por resíduo sólido de palma, fez a atividade das enzimas celulolíticas aumentar em 194 % em relação à FPase (de 79 IU/L para 233 IU/L), e de 31% em relação à CMCase (de 141 IU/L para 196 IU/L).

Dentre os resultados obtidos, verifica-se que a substituição da sacarose pela palma no meio Czapeck-Dox (inóculo), e usando o meio Mandels & Weber como meio de fermentação, propiciou uma maior atividade enzimática, tanto em relação à FPase (194%) quanto à CMCase (31%), se comparadas às atividades

obtidas durante o estudo de *screening*. Assim, esses foram os meios definidos para a produção da enzima por FSS.

Com o estudo de otimização dos componentes do inóculo, pôde-se reduzir a concentração de nitrato de sódio pela metade (1,5 g/L ao invés de 3,0 g/L), e selecionar a melhor concentração de resíduo sólido de palma e a taxa de inoculação. Além disso, no estudo dos tempos de crescimento do pré-inóculo e do inóculo pôde-se reduzir o tempo de 17 dias para 12 dias, antes da passagem da biomassa fúngica para o meio de fermentação.

CAP. II – OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES E CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

1. INTRODUÇÃO

O estudo de fatores influenciando a produção de biomoléculas é essencial em qualquer desenvolvimento de um bioprocessos. Geralmente uma produtividade maior tem sido alcançada pela otimização do meio de cultura. A prática clássica de mudar uma variável por vez enquanto se mantém as outras em níveis constantes tem sido ineficiente. Esta tarefa unidimensional não explica os efeitos de interação entre as variáveis e o efeito no processo de fermentação (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2008).

A otimização dos parâmetros físico-químicos tem um papel importante no desenvolvimento de qualquer processo devido ao impacto na economia e em sua eficácia. O *design* de um meio de produção apropriado e de suas condições é de importância crucial para aumentar a eficiência e a produtividade do processo de fermentação, sendo que isto pode afetar significativamente a concentração do produto, o rendimento, a facilidade e o custo do processo de *downstream*. (GURURAJ BHADRI, 2013).

Portanto, em anos recentes, os *designs* estatísticos estão sendo usados para a procura de fatores chaves rapidamente de um sistema multivariável, tais como o *design* Plackett-Burman e a metodologia de superfície de resposta (GURURAJ BHADRI, 2013).

O delineamento fatorial Plackett-Burman permite o *screening* (seleção) dos principais fatores de um grande número de variáveis de processo, sendo útil em estudos preliminares no qual o objetivo principal é selecionar variáveis que podem ser fixadas ou eliminadas nos outros processos de otimização, tais como a metodologia de superfície de resposta (SAXENA; SINGH, 2010).

O número de experimentos geralmente requeridos é um múltiplo de 4. O número de variáveis que são considerados nos experimentos, é um menos o número de experimentos, ou seja, trabalhando com 27 variáveis, realiza-se, no mínimo, 28 experimentos. Além disso, o *design* é ortogonal por natureza, significando que o efeito de cada variável é puro em natureza e não é

confundido com as interações entre as variáveis (SRINIVAS; CHAND; LONSANE, 1994).

O delineamento composto central rotacional (DCCR) é usado para construir um modelo experimental de segunda ordem. O DCCR é composto por um *design* fatorial, pontos centrais, e pontos axiais equidistantes ao ponto central. (FABIAN, 2012).

O componente do DCCR é da classe fatorial 2^k , no qual k representa o número de fatores relevantes ou variáveis. Cada uma das variáveis possuem dois níveis, significando que cada variável tem um valor numérico maior e menor. Um valor codificado de -1 e +1 representa esses valores mínimo (-1) e máximo (+1). (FABIAN, 2012).

Após a escolha do melhor microrganismo (*Screening*) produtor do complexo celulolítico, tanto da FPase quanto da CMCase, foi realizada a otimização do meio de fermentação (FSS), na tentativa de aumentar a produção das enzimas e também de definir um meio cujos componentes sejam realmente necessários para a produção da enzima.

Primeiramente foi feita a escolha da fonte de nitrogênio para o meio de fermentação (FSm), sendo que foram testadas a ureia, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio e nitrato de sódio. Após, foi verificada a influência dos componentes do meio de fermentação (meio de Mandels & Weber, descritos no item 2.3.4) realmente necessários para a produção da enzima. E, finalmente, foi realizada a otimização (DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional) para a definição da melhor concentração de resíduo de palma, da fonte de nitrogênio e do componente selecionado na etapa anterior. Por último, realizou-se a cinética de produção das enzimas.

2. OBJETIVOS

- Selecionar a melhor fonte de nitrogênio entre: ureia peptona, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de magnésio, para verificar o efeito dessas fontes na produção do complexo celulolítico e a escolha de uma fonte de nitrogênio, considerando o melhor custo-benefício;

- Selecionar os componentes estatisticamente significativos no meio de fermentação, usando a metodologia Plackett-Burman;
- Estudar a fonte de carbono (palma), fonte de nitrogênio (ureia) e sal (fosfato de potássio monobásico), componentes do meio de fermentação, utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Estudar a cinética de produção do complexo celulolítico em duas temperaturas diferentes (28 °C e 37 °C);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Utilizou-se o microrganismo PH-HD (*Phanerochaete sp.*), obtida do banco de cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

3.2 MEIOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM SÓLIDOS SUSPENSOS (FSS)

Para o inóculo utilizou-se o meio Czapeck-Dox, contendo como fonte de carbono a palma (10 g/L). Já com relação ao meio de fermentação utilizou-se o meio Mandels & Weber modificado, conforme subitem 3.3. Todo o procedimento da transferência do pré-inóculo até a etapa fermentação estão descritos nos sub-itens 3.5 a 3.7 do Capítulo I.

3.3 SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

O meio Mandels & Weber original é composto por duas fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e peptona). Nesta etapa pretendeu-se substituir as fontes originais por apenas uma fonte de nitrogênio. Para a escolha da melhor fonte de nitrogênio foi verificado o aspecto custo-benefício da fonte, e também a fonte de nitrogênio que produz maior quantidade de enzimas celulolíticas.

Foram utilizadas como fontes de nitrogênio o sulfato de amônio, peptona, extrato de levedura, nitrato de sódio e ureia. Além disso, foi realizado o controle positivo (composição original) e o negativo (sem fonte de nitrogênio).

Para determinar a concentração de cada fonte de nitrogênio utilizada foi mantida a mesma quantidade de nitrogênio presente no meio original. Como exemplo, no meio Mandels & Weber há a presença de duas fontes, o sulfato de amônio e a peptona. No caso do sulfato de amônio a concentração inicial era de 1,4 g/L e de peptona 1,0 g/L. Assim, como foi preparado 90 mL de meio, a massa de nitrogênio no meio seria de 36 mg (equivalente a 2,62 mmol). No caso de se utilizar ureia como fonte de nitrogênio, utilizar-se-ia 2,62 mmol de nitrogênio, que corresponde a uma concentração de 1,6 g/L, nos 100 mL de meio de fermentação.

A peptona, extrato de levedura e nitrato de sódio foram esterilizados juntos com o meio, já no caso do sulfato de amônio e ureia, foram adicionados após a autoclavagem, passando por um microfiltro de 0.22 μ M de poro para a eliminação de qualquer célula que poderia contaminar as amostras. Essa medida foi necessária pois a ureia e sulfato de amônio são componentes termossensíveis, ou seja, podem se decompor a altas temperaturas, gerando novos componentes no meio de fermentação (KIRK-OTHMER, 2009; CHEN, 1998). Já para as demais fontes de nitrogênio não há essa sensibilidade à temperatura, podendo os mesmos serem autoclavados juntos com o meio. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

3.4 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES

Após a seleção da melhor fonte de nitrogênio na etapa 4.1, foi feita a seleção de alguns componentes (macro e micronutrientes), estatisticamente significativos, para a produção das enzimas.

Os componentes do meio de fermentação estão descritos no Subitem 3.4. Para determinar quais componentes são importantes, utilizou-se o modelo estatístico Plackett-Burman Screening Design 11/12 com o Software Statistica v7.0.

As fermentações submersas com sólido suspenso (FSS) foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, à temperatura de 28°C e 120 rpm de agitação (*shaker* Tecnal, TE-420), com uma taxa de inoculação de 10 % v/v, durante 5 dias. As soluções de microcomponentes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CoCl_2), foram todas preparadas à parte e adicionadas de acordo com o delineamento experimental. Os níveis decodificados para cada componente (nutriente) encontram-se na Tabela 13.

TABELA 13 – NÍVEIS UTILIZADOS NA SELEÇÃO DE COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES

Componente	Níveis		
	-1	0	+1
KH_2PO_4	0	2 g/L	4 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0	0,3 g/L	0,6 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	0,3 g/L	0,6 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	5 mg/L	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	1,6 mg/L	3,2 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	1,4 mg/L	2,8 mg/L
CoCl_2	0	2,0 mg/L	4,0 mg/L
Tween - 80	0	1,0 mL/L	2,0 mL/L

Utilizando o software Statistica 7.0, gerou-se o seguinte delineamento experimental, com ensaios aleatórios, de acordo com a Tabela 14.

TABELA 14 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PLACKET-BURMAN 11/12 NA SELEÇÃO DE COMPONENTES

Ensaio	KH_2PO_4	CaCl_2	MgSO_4	FeSO_4	MnSO_4	ZnSO_4	CoCl_2	Tween-80
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1

3.5 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES USANDO A METODOLOGIA DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Após a seleção dos componentes estatisticamente significativos no subitem 3.4, foi feita uma otimização dos componentes do meio de fermentação utilizando o modelo DCCR.

As variáveis estudadas foram: concentração do resíduo de palma, a fonte de nitrogênio selecionada na etapa 3.3 e o componente estatisticamente significativo, $p < 0.05$, selecionado na etapa 3.4. Os níveis estudados estão na Tabela 15.

TABELA 15 – NÍVEIS UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE PRODUÇÃO DE CELULASES APLICANDO O DCCR

Componente	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Fonte de Carbono (g/L)	4,8	15	30	45	55,2
Fonte de Nitrogênio (g/L)	0,6	2	4	6	7,4
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	0,8	2	3,2	4

Novamente utilizou-se o software Statistica 7.0 para gerar a matriz de ensaios, Tabela 16.

TABELA 16 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO FINAL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

Ensaio	Palma (g/L)	Ureia (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
16 (C)	0	0	0
15 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0
8	1	1	1
6	1	-1	1
18 (C)	0	0	0
12	0	1,68	0
11	0	-1,68	0
9	-1,68	0	0
1	-1	-1	-1
10	1,68	0	0
4	-1	1	1
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
2	-1	-1	1
7	1	1	-1
3	0	1	-1
5	1	-1	-1

3.6 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASE USANDO O FUNGO PH-HD (*PHANEROCHAETE sp.*) EM FRASCOS ERLLENMEYER

Para a condução dos experimentos utilizou-se frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 1,5 g de resíduo sólido de palma, solução de 4 g/L de KH₂PO₄ e 2 g/L de ureia. A fermentação foi realizada em duplicata, durante 7 dias, a 28°C e a 37 °C. A cada 24 horas foi analisada a atividade enzimática da FPase e CMCase e o pH, tanto na temperatura de 28°C quanto a 37°C.

Foram utilizadas duas temperaturas, pois, segundo Mahajan (2011), a temperatura ótima de cultivo do *Phanerochaete chrysosporum* ficava na faixa de 25-39 °C, sendo que a temperatura ótima era de 37 °C, assim, testou-se essa temperatura o efeito da temperatura na produção do complexo celulolítico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Os resultados do estudo da seleção de fontes de nitrogênio estão apresentados nas Figuras 23 e 24, expressos em atividades de FPase e CMCase do extrato enzimático bruto, obtidos com o uso de diferentes fontes de nitrogênio.

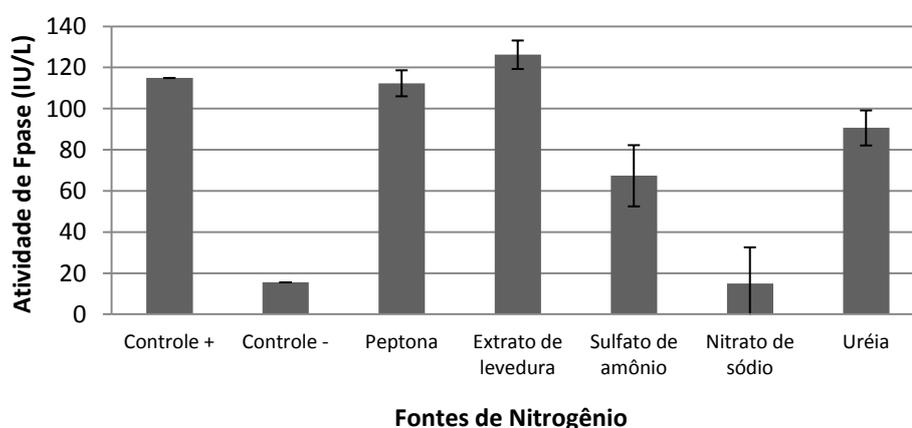


FIGURA 23 – ATIVIDADE DE FPASE OBTIDAS NA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

* Atividade diluindo a enzima em 1:3

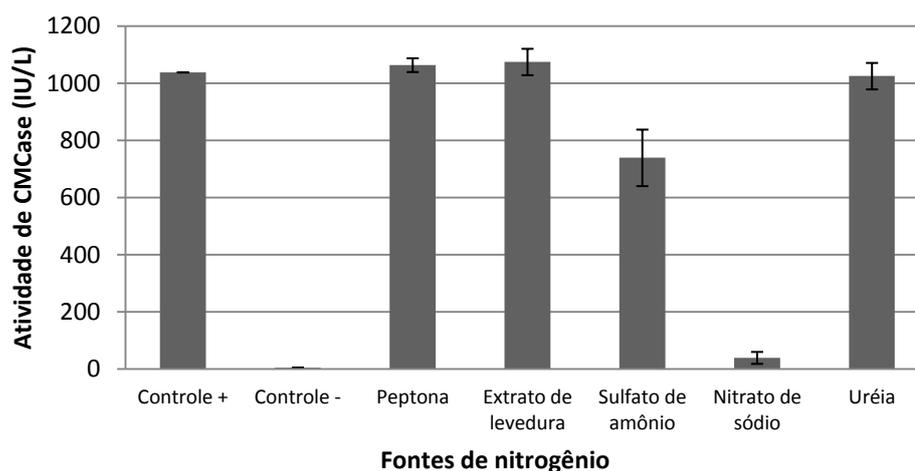


FIGURA 24 – ATIVIDADE DE CMCASE OBTIDAS NA SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

* Atividade diluindo a enzima em 1:5

Conforme se pode observar, as fontes suplementadas no meio de FSS que propiciaram maior atividade enzimática foram, em ordem decrescente, o extrato de levedura (126,3 IU/L de FPase e 1074,2 IU/L de CMCCase), a peptona (112,4 IU/L de FPase e 1063,2 IU/L de CMCCase) e a ureia (90,7 IU/L de FPase e 1024,7 IU/L de CMCCase).

Para verificar se há diferença significativa entre as atividades enzimáticas utilizando cada fonte de nitrogênio foi utilizado o Software GraphPad 5.0. Os resultados se encontram no Anexo C e D. Conforme os Anexos C e D, há diferença significativa entre as diferentes fontes, com 95% de confiança. Para uma pós-análise utilizou-se o Teste de Tukey entre as diferentes fontes.

Tanto para a FPase quanto para a CMCCase não houve diferença significativa entre as fontes que apresentaram maior atividade enzimática de FPase e CMCCase, as já citadas. Para a escolha da fonte, recorreu-se ao critério econômico. Conforme pesquisa de preços das fontes (site da empresa Sigma-Aldrich, EUA), verifica-se que a ureia é a que apresenta menor custo final, sendo utilizada uma concentração aproximadamente duas vezes menor que a peptona e o extrato de levedura, o que corresponde a um custo final quase dez vezes menor na composição do meio (Tabela 17). Assim, a ureia foi a fonte escolhida para a continuação dos estudos.

TABELA 17 – COTAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO, AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO MEIO DE FERMENTAÇÃO E O CUSTO FINAL DOS COMPONENTES

	Preço (R\$/kg)	Concentrações (g/L)	Custo (R\$/L de meio)
Ureia	244,00	1,57	0,38
Peptona	942,00	3,19	3,00
Extrato de levedura	1122,00	3,36	3,76

Fonte: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/y1625?lang=pt®ion=BR>>
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/33247?lang=pt®ion=BR>>
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/p0556?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em 27/11/2013.

4.2 TESTES USANDO A UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES

A ureia é um componente volátil. Assim, quando foi realizado o teste para a escolha da fonte de nitrogênio, foi preparada uma solução de ureia (concentrada) e microfiltrada em uma membrana de 0.22 μm de abertura antes da inoculação no meio de fermentação. Três testes com ureia foram realizados: Teste A (Um controle nas mesmas condições da seleção da fonte de nitrogênio); Teste B (Ureia autoclavada junto com o meio de fermentação); Teste C (Ureia autoclavada à parte (100 mL de ureia) em frascos Erlenmeyer de 250 mL);

Os resultados das atividades de CMCase e FPases se encontram nas Figuras 25 e 26.

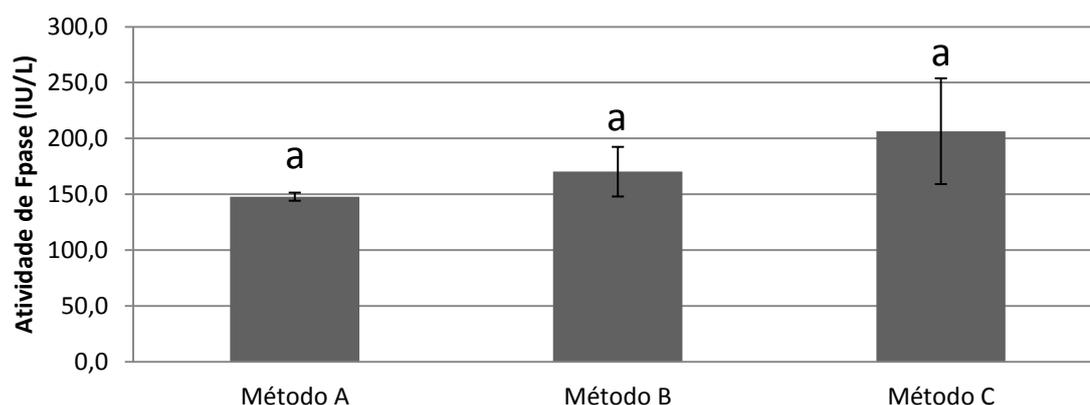


FIGURA 25 – ATIVIDADE DE FPASE OBTIDA EM DIFERENTES TESTES USANDO A UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO

* Atividade diluindo a enzima em 1:3

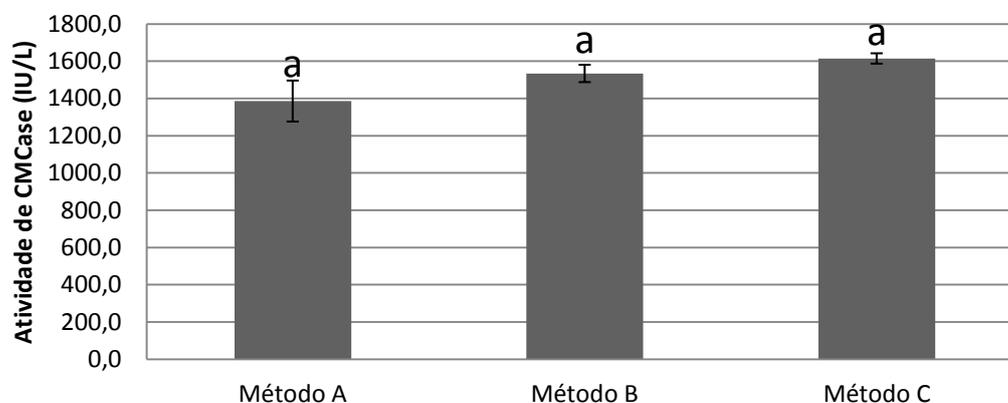


FIGURA 26 – ATIVIDADE DE CMCase OBTIDA EM DIFERENTES TESTES USANDO A UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO

* Atividade diluindo a enzima em 1:5

Conforme se pode observar nas Figuras 24 e 25, o teste C, (com ureia esterilizada separadamente), foi o que apresentou maior atividade enzimática, tanto para a FPase (206 IU/L) quanto para a CMCase (1614 IU/L).

Foi utilizado o Software Graphpad 5.0 para verificar se havia diferença significativa entre as atividades de Fpase e CMCase, entre os três métodos. Os resultados se encontram nos Anexos E e F.

Conforme se verifica nesses Anexos, não há diferença significativa entre os métodos B e C, porém, há diferença significativa entre os métodos A e C, com $p < 0.05$. Assim, para os demais estudos o método C foi selecionado, pois torna-se prático autoclavar a ureia separadamente para uma posterior inoculação, ao invés de microfiltrá-la, por apresentar maior risco de contaminação.

No aumento de escala selecionou-se o método B, pois em maiores escalas torna-se pouco prático adicionar a ureia esterilizada após a esterilização do meio de produção das enzimas.

4.3 SELEÇÃO DOS COMPONENTES DO MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES

Neste teste selecionou-se os componentes do meio de fermentação utilizando a metodologia de Plackett-Burman. Os ensaios de fermentação foram realizados a 28°C, 120 rpm, utilizando o meio de fermentação Mandels & Weber modificado.

Na Tabela 18 estão os resultados dos ensaios do planejamento Plackett-Burman.

TABELA 18 – TABELA DE RESPOSTAS DO PLACKETT-BURMAN, PARA A SELEÇÃO DE COMPONENTES SIGNIFICATIVOS, $p < 0.05$, DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	FeSO ₄	MnSO ₄	ZnSO ₄	CoCl ₂	Tween-80	FPase (IU/L)	CMCase (IU/L)
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,0	12,8
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	93,1	921,5
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	240,6	1006,1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5,7	47,7
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	14,8	30,4
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,0	21,1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	141,1	1069,9
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	64,3	793,1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	155,9	1216,3
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	199,2	996,0
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	221,7	988,1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	114,5	666,2

* Para a FPase diluiu-se a enzima em 1:3 e para a CMCase em 1:5

Verificando a Figura 27, a presença do sal KH₂PO₄ é importante na atividade de CMCase (estatisticamente significativo $p < 0.05$), embora este fator não tenha apresentado diferença significativa ($p < 0.05$) para a atividade de FPase. Os ensaios 11, 12, 9 e 3 não possuem o fosfato de potássio monobásico (-1), sendo que nesses ensaios as atividades são próximas de zero, para ambas as enzimas.

A partir da modelagem utilizando a metodologia de Plackett-Burmann foram gerados os gráfico de Paretos (para FPase e CMCase), que estão na Figura 27.

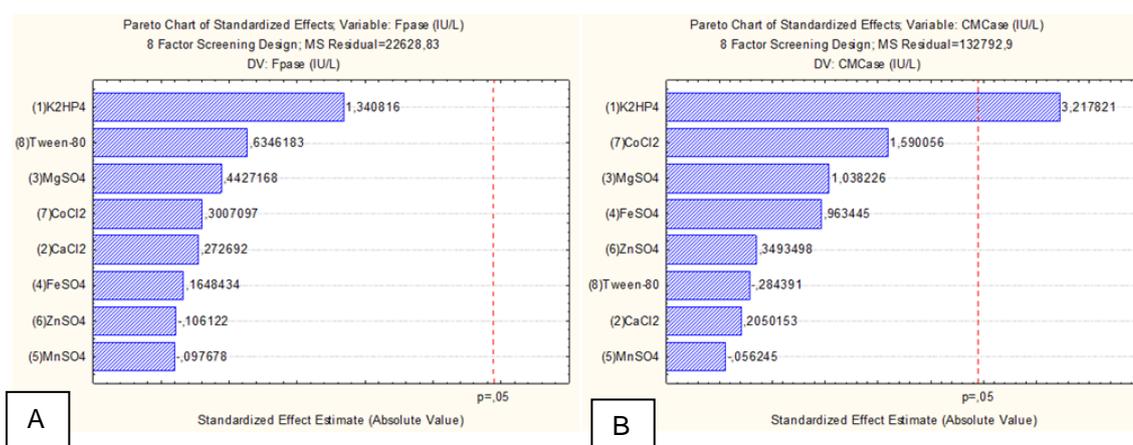


FIGURA 27 – GRÁFICO DE PARETO PARA O PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN.

(A) - PARA A ENZIMA FPASE. (B) – PARA A ENZIMA CMCASE

Conforme se pode observar na Figura 27 o único fator significativo, com significância de 95 %, foi o sal fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), na atividade de CMCase. Assim, esse foi o único sal escolhido para as próximas etapas.

Ratha (2012) usando farelo de arroz, fermentação em estado sólido e o microrganismo *Penicillium sp.*, verificou o efeito de quatorze componentes na produção da CMCase, entre indutores, fontes de nitrogênio e sais. No caso dos sais eles chegaram à conclusão que o KH_2PO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foram significativos na produção da enzima, com 95 % de confiança. Porém, o $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ apresentaram efeito negativo na produção da CMCase, assim, ele descartou estes sais nos próximos experimentos que foram realizados, e, entre os componentes estudados, ele verificou que o KH_2PO_4 foi o componente que apresentou maior efeito na atividade de CMCase (valor de p próximo de 0).

Em outros dois estudos, El-Sersy et al (2010), usando *Streptomyces ruber*, e Ali (2013), usando *Cellulomonas fimi* NCIM-5015, uma bactéria gram-positiva, também demonstraram a importância do KH_2PO_4 na produção do complexo celulolítico.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS USANDO O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Utilizando o planejamento delineamento composto central rotacional (DCCR), foram avaliadas diferentes concentrações de palma (g/L), ureia (g/L) e fosfato de potássio monobásico (g/L) nas atividades de FPase e CMCase. Os resultados se encontram na Tabela 19.

TABELA 19 – TABELA DE RESPOSTAS DO DCCR DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

Ensaio	Palma (g/L)	Ureia (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Fpase (IU/L)	CMCase (IU/L)
15 (C)	30	4	2	120,5	901,9
16 (C)	30	4	2	124,3	966,6
8	45	6	3,19	179,7	1109,8
6	45	2	3,19	156,9	1125
17 (C)	30	4	2	159,4	1028,8
12	30	7,36	2	205,2	928,6
11	30	0,64	2	159,7	1040,8
9	4,77	4	2	90,1	699,9
1	15	2	0,81	37,9	638,7
10	55,23	4	2	149,3	899,4
4	15	6	3,19	168,6	1049,8
13	30	4	0	79	664,3
14	30	4	4	143,9	1047,5
2	15	2	3,19	197,9	1110,7
7	45	6	0,81	58,4	300,8
3	15	6	0,81	146,2	938,5
5	45	2	0,81	94,2	638,7
18 (C)	30	4	2	148,8	1052,8

* Para a FPase fez-se uma diluição de 1:3 e para a CMCase de 1:5

Analisando a Tabela 19 verifica-se que, mesmo aumentando a concentração de palma (ensaio 10, apresenta a maior concentração de palma em relação aos demais ensaios, 55 g/L), a atividade enzimática não apresenta um grande aumento em relação ao ensaio 9, no qual se utiliza a menor concentração de palma (4,8 g/L) e mesma concentração da ureia e de KH₂PO₄ do ensaio 10. O aumento na atividade de FPase e de CMCase foi de 60 % no ensaio 10, em relação ao ensaio 9, sendo que no ensaio 9 utiliza-se apenas 8 % da concentração de palma, em relação ao ensaio 10.

No caso do ensaio 13, no qual não se utiliza o fosfato monobásico de potássio, a atividade teve um decréscimo significativo em relação à melhor atividade enzimática obtida (para a FPase 205 IU/L no ensaio 12 e CMCase 1111 IU/L no ensaio 2), sendo que os decréscimos foram de 58 % para a FPase e de 35 % em relação à CMCase. O mesmo foi observado para o ensaio 7 (75 % de decréscimo para FPase e 71 % para CMCase) e o ensaio 1 (81 % de decréscimo para a FPase e 38 % para CMCase), no qual a concentração de fosfato de potássio monobásico era baixa (0,81 g/L).

A partir da Tabela de ANOVA gerada pelo programa STAT 7.0, (Tabelas 20 e 21), verifica-se que o único componente significativo, com intervalo de confiança de 95 %, na atividade de FPase e CMCase, foi o KH_2PO_4 (L).

TABELA 20 – TABELA DE ANOVA PARA A FPase

Fatores	SQ	GL	QM	F	p
palma (L)	106,7	1	106,7	0,0713	0,7971
palma (Q)	571,0	1	571,0	0,3815	0,5563
ureia (L)	1486,9	1	1486,9	0,9937	0,3520
ureia (Q)	2561,7	1	2561,7	1,7120	0,2320
KH_2PO_4 (L)	16563,2	1	16563,2	11,0692	0,0126
KH_2PO_4 (Q)	1136,2	1	1136,2	0,7593	0,4124
palma (L) x ureia (L)	1058,0	1	1058,0	0,7071	0,4282
palma (L) x KH_2PO_4 (L)	0,3	1	0,3	0,0002	0,9887
ureia (L) x KH_2PO_4 (L)	780,1	1	780,1	0,5214	0,4937
Erro	10474,4	7	1496,3		
Total SQ	36509,7	16			

TABELA 21 – TABELA DE ANOVA PARA A CMCase

Fatores	SQ	GL	QM	F	p
palma (L)	3800,7	1	3800,7	0,1546	0,7059
palma (Q)	42160,3	1	42160,3	1,7145	0,2318
ureia (L)	6715,0	1	6715,0	0,2731	0,6174
ureia (Q)	206,4	1	206,4	0,0084	0,9296
KH_2PO_4 (L)	466227,0	1	466227,0	18,9600	0,0033
KH_2PO_4 (Q)	19207,3	1	19207,3	0,7811	0,4061
palma (L) x ureia (L)	43808,0	1	43808,0	1,7815	0,2238
palma (L) x KH_2PO_4 (L)	63368,0	1	63368,0	2,5770	0,1524
ureia (L) x KH_2PO_4 (L)	180,5	1	180,5	0,0073	0,9341
Erro	172130,7	7	24590,1		
Total SQ	814977,1	16			

Os coeficientes de regressão (R^2) foram de 0,71 para a FPase (significando que 71 % dos dados obtidos experimentalmente se ajustam ao modelo obtido) e 0,78 para a CMCase (78 % dos dados obtidos experimentalmente se ajustam ao modelo obtido), confirmando que o modelo se ajusta bem aos dados.

A partir do DCCR, a superfície de resposta (Figura 28) e modelos polinomiais (Equações 3 e 4, para FPase e CMCase), se encontram abaixo:

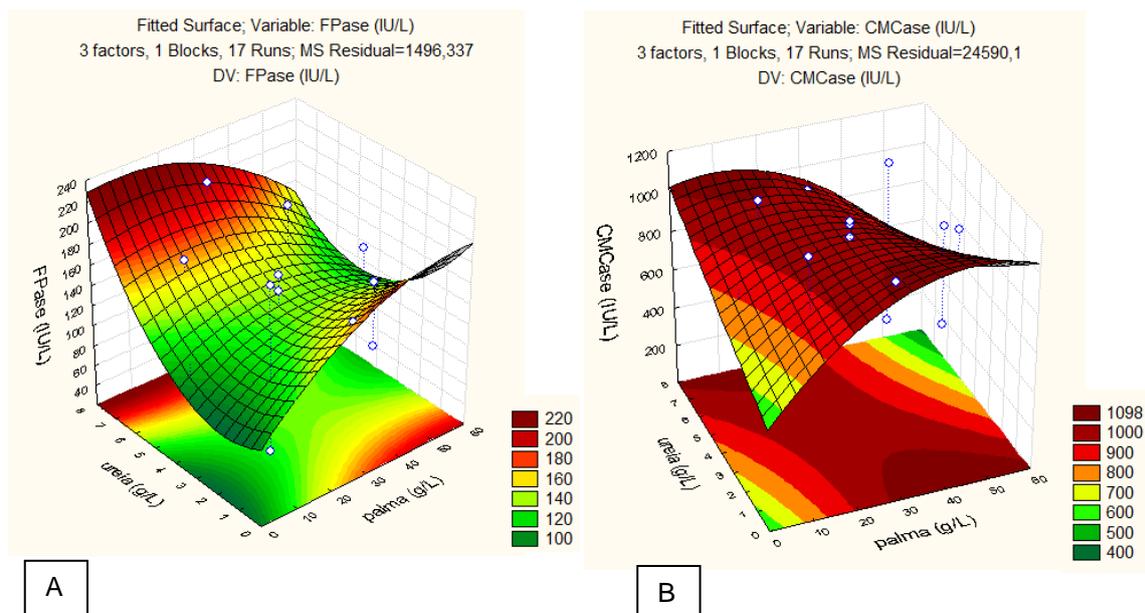


FIGURA 28 – CURVAS DE NÍVEL (SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS) GERADA PELO SOFTWARE STATISTICA 7.0, FIXANDO A CONCENTRAÇÃO DE KH_2PO_4 EM 2 g/L (PONTO CENTRAL). A – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A FPASE. B – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A CMCASE

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade FPase} \left(\frac{IU}{g \text{ de palma}} \right) = & -33,81 - 3,90 * [palma] - 0,037 * \\
 [palma]^2 - 2,88 * [uréia] + 3,49 * [uréia]^2 + 77,17 * [KH_2PO_4] - 7,91 * \\
 [KH_2PO_4]^2 - 0,38 * [palma] * [uréia] - 0,011 * [palma] * [KH_2PO_4] - 4,15 * \\
 [uréia][KH_2PO_4] & \quad \quad \quad \text{(Equação 3)}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade CMCCase} \left(\frac{IU}{g \text{ de palma}} \right) = & 318,69 + 17,04 * [palma] - 0,30 * \\
 [palma]^2 + 73,04 * [uréia] + 0,77 * [uréia]^2 + 151,17 * [KH_2PO_4] - 34,36 * \\
 [KH_2PO_4]^2 - 2,47 * [palma] * [uréia] + 4,99 * [palma] * [KH_2PO_4] - 2,00 * \\
 [uréia][KH_2PO_4] & \quad \quad \quad \text{(Equação 4)}
 \end{aligned}$$

Analisando a Figura 28 (A), verifica-se que a atividade de FPase possui dois máximos. Em um máximo a concentração de palma fica na faixa de 0 – 40 g/L enquanto a concentração de ureia na faixa de 6,5 – 8 g/L. Já o outro valor ótimo a concentração de palma fica na faixa de 30 – 60 g/L, enquanto a concentração de ureia na faixa de 0 – 1 g/L.

Em relação à atividade de CMCCase verifica-se na Figura 28 (B) que o comportamento também foi semelhante. Para obter a atividade máxima de

CMCase, pode-se trabalhar com baixas concentrações de palma (0 – 20 g/L) e altas concentrações de ureia (6,5 – 8 g/L), ou altas concentrações de palma (30 – 60 g/L) e baixas concentrações de ureia (0 – 2 g/L).

Além disso, com as superfícies geradas, verifica-se que não foi encontrada a melhor superfície. Teriam que ser feitos novos testes com outras faixas para se determinar uma superfície na qual se encontre o ponto ótimo. Poder-se-ia trabalhar com concentrações mais elevadas de ureia ou com altas concentrações de palma, do que as utilizadas neste planejamento.

Porém, o modelo prediz um melhor ponto, dentro a faixa utilizada. Assim, com o modelo gerado pelo Software Statistica v. 7.0, definiram-se as concentrações de 15 g/L de palma, 2,0 g/L de ureia e 4 g/L de KH_2PO_4 . Com essas concentrações a atividade de Fpase, segundo o modelo, foi de 165 IU/L e de CMCase de 927 IU/L.

4.5 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CELULASE USANDO O FUNGO PH-HD (*PHANEROCHAETE* sp.) EM FRASCOS ERLLENMEYER

Neste estudo realizou-se a cinética de produção de celulases em frascos Erlenmeyer utilizando o fungo *Phanerochaete* sp. PH-HD, a 28 °C e 37°C e 120 rpm, utilizando resíduo de processamento de palma como fonte de carbono, ureia como fonte de nitrogênio e o sal KH_2PO_4 .

Os resultados de atividade de FPase, CMCase, pH e produtividade das enzimas durante 168 horas de FSS (fermentação submersa com sólidos suspensos) conduzidas a 28°C e a 37°C podem ser observados nas Figuras 29 a 32.

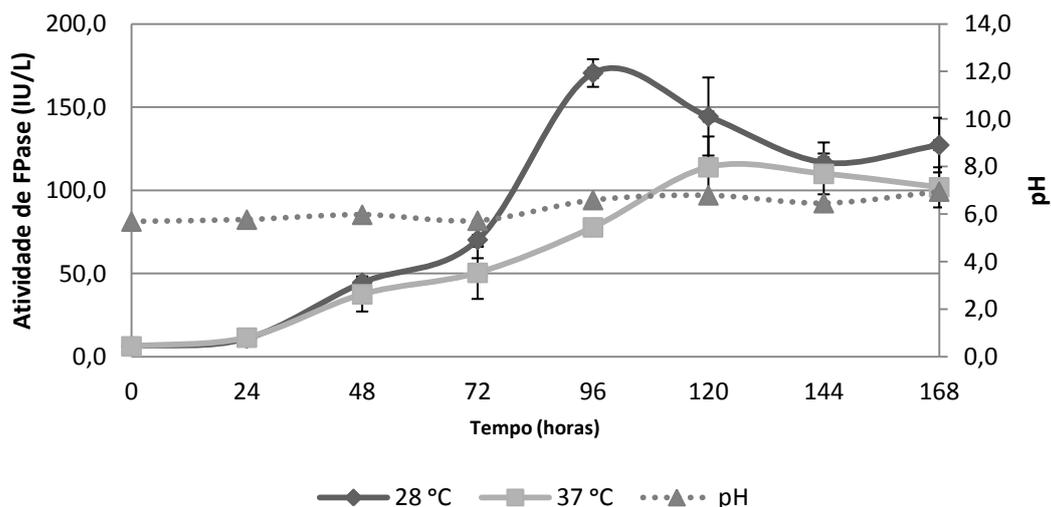


FIGURA 29 – CINÉTICA DE ATIVIDADE Fpase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS A 28 °C E 37 °C POR *PHANEROCHAETE* sp. (PH-HD)

* Atividade diluindo a enzima em 1:3, somente para o tempo de 0 e 24 que não se fez diluição da enzima

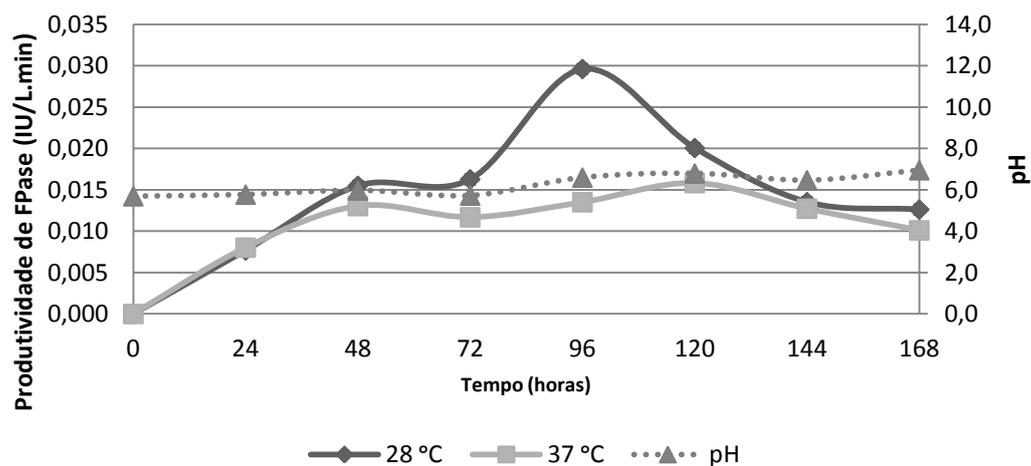


FIGURA 30 – CINÉTICA DE PRODUTIVIDADE (IU/L.min) DE Fpase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS INCUBADO A 28 °C E 37 °C POR *PHANEROCHAETE* sp. (PH-HD)

* Atividade diluindo a enzima em 1:5, somente para o tempo de 0 e 24 que não se fez diluição da enzima

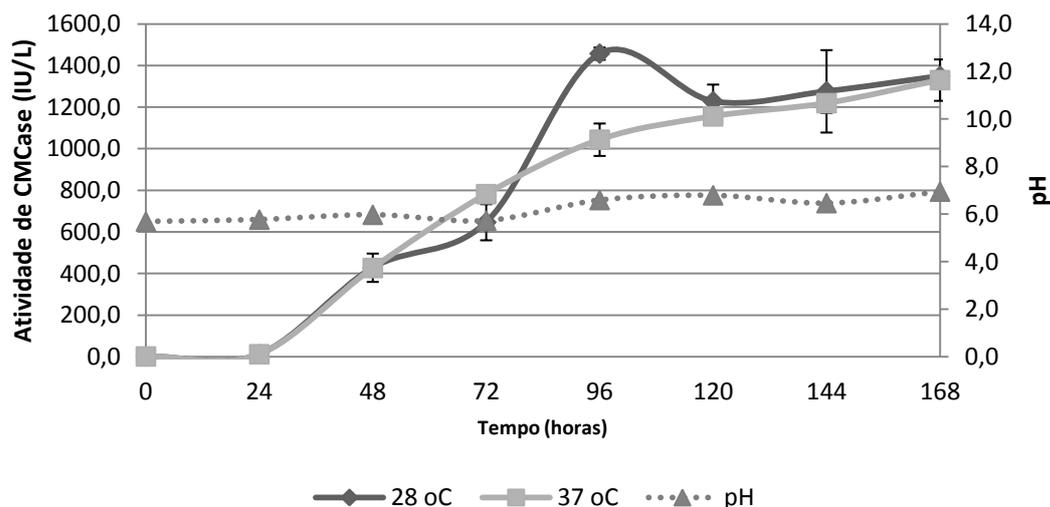


FIGURA 31 – CINÉTICA DE ATIVIDADE DE CMCase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS INCUBADO A 28 °C E 37 °C POR *PHANEROCHAETE sp.* (PH-HD)

* Atividade diluindo a enzima em 1:5, somente para o tempo de 0 e 24 que não se fez diluição da enzima

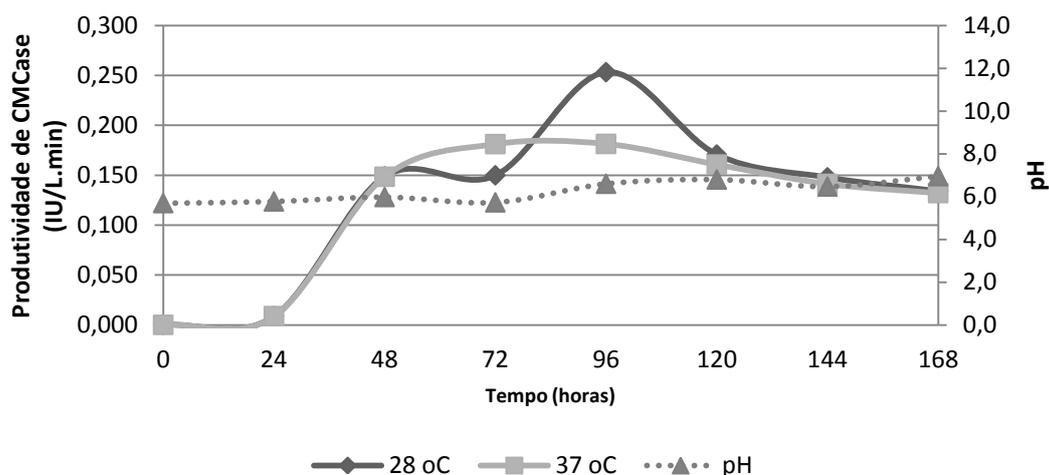


FIGURA 32 – CINÉTICA DE PRODUTIVIDADE (IU/L.min) DE CMCase NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO FSS DURANTE 168 HORAS INCUBADO A 28 °C E 37 °C POR *PHANEROCHAETE sp.* (PH-HD)

* Atividade diluindo a enzima em 1:5, somente para o tempo de 0 e 24 que não se fez diluição da enzima

Conforme se pode observar na Figura 29, a atividade enzimática de FPase na FSS conduzida a 28°C atingiu atividade máxima (170,6 IU/L) após 96 horas de fermentação. Já a 37°C a atividade enzimática máxima de FPase (114 IU/L) foi alcançada no 5º dia de fermentação (120 horas), com isto foi requerido

um dia a mais para a atingir a maior produção enzimática. Além disso, analisando a Figura 30, na qual se tem a produtividade de FPase a 28°C e 37°C, a produtividade a 28°C atinge o máximo após 96 horas (0,03 IU/L.min), e, após este tempo, decresce rapidamente. Enquanto a 37°C a produtividade atinge o máximo após 120 horas de fermentação (0,016 IU/L.min), tendo um decréscimo lento após este tempo.

Com relação à CMCase verificando a Figura 31, a 28°C, a atividade máxima também é alcançada após 96 horas (1457,7 IU/L). Já a 37°C, a atividade de CMCase continuou aumentando ao longo de todo o tempo de fermentação. Analisando a Figura 32, a produtividade da CMCase, a 28°C, atinge seu valor máximo após 96 horas de fermentação (0,25 IU/L.min), decrescendo após este tempo. E a 37°C, a produtividade de CMCase atinge seu máximo após 72 horas de fermentação (0,18 IU/L.min), se mantendo constante até 96 horas, e, após, decrescendo.

Além disso, observa-se que a atividade enzimática de FPase a 28°C atinge 171 IU/L após 96 horas de fermentação. Já na FSS conduzida a 37°C a atividade alcançou 114 IU/L, e após 120 horas. Com relação à CMCase, a 28°C, a atividade foi de 1458 IU/L, após 96 horas de fermentação, e com relação à 37°C após 96 horas, a atividade enzimática foi de 1044 IU/L. Assim, fica claro que a produção de celulasas foi maior a 28°C em comparação com a produção em 37°C.

Esse resultado se mostra interessante, pois é necessário menor conteúdo energético para manter a temperatura do biorreator, principalmente se for considerado a instalação de um biorreator em uma cidade mais fria, como é o caso da região sul do país, em que a temperatura ambiente varia entre 20-25°C.

Conforme já citado, segundo Mahajan (2011), a temperatura ótima de cultivo do *Phanerochaete chrysosporum* está situada na faixa de 25-39°C, sendo que a temperatura ótima é de 37°C. Com esse estudo verificou-se que se pode trabalhar com essas duas temperaturas (28°C e 37°C) para a produção do complexo celulolítico. Porém, ainda segundo estudo realizado pelo Mahajan (2011), utilizando o *Phanerochaete carnosus* e Avicel como fonte de carbono, ele concluiu que, dentre as temperaturas selecionadas pelo autor, de: 22°C, 27°C, 30°C e 37°C, no meio de fermentação para a produção do complexo celulolítico,

a temperatura que apresentou maior influência produção de celulases foi a de 27°C, assim, ficando próximo à temperatura de 28°C, deste estudo.

Com relação ao pH, não houve grandes variações dos valores nas 168 horas de fermentação (entre 5,5 e 7,0). A faixa ideal de pH da *Phanerochaete* foi de 4-7 conforme estudos de Naghavi (2013) e a temperatura ótima ficou entre 40°C e 50°C. Já para Khan (2007) (usando a *Phanerochaete chrysosporium*) o pH ideal ficou entre 5,1 a 5,6 e a temperatura ótima de 32°C.

Após essa etapa conclui-se que a temperatura de 28°C é adequada para a produção da enzima e que 96 horas é um tempo suficiente de fermentação para a produção do complexo celulolítico.

5. CONCLUSÕES

Com os estudos realizados observa-se que não há a necessidade de se utilizar fontes orgânicas mais complexas, como o extrato de levedura e a peptona para se obter uma boa produção do complexo celulolítico. Além disso, estas fontes são mais caras em comparação com as fontes inorgânicas estudadas.

Nos estudos de otimização verificou-se que, dos componentes utilizados no meio Mandels & Weber, apenas um (fosfato de potássio monobásico) realmente tem influência na produção das enzimas. Com isto pode-se reduzir o custo do meio de fermentação, pois não há a necessidade de vários sais para a produção das celulases. Isto, industrialmente, acarreta em uma grande economia, pois neste caso trabalha-se com meios na ordem de milhares de litros. Com a aplicação da metodologia DCCR chegou-se à concentração ótima de fonte de carbono, nitrogênio e KH_2PO_4 , para a produção do complexo celulolítico.

Com relação à cinética nota-se que a produção enzimática acontece já nos primeiros dias de fermentação e, ainda, não se necessita de temperaturas mais elevadas, como 37 °C, para produzir maiores quantidades das enzimas.

CAP. III – AVALIAÇÃO DO AVICEL COMO INDUTOR, PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E AUMENTO DE ESCALA.

1. INTRODUÇÃO

Celulases são enzimas induzíveis que são produzidas predominantemente por fungos. O gênero *Trichoderma*, contém muitas espécies celulolíticas. Muitas fontes de carbono, tanto solúveis em água quanto as insolúveis têm sido reportadas para a determinação do melhor indutor. (CHEN; WUYNAN, 1992)

A celulose é usualmente considerada como sendo o melhor indutor para a produção de um sistema de celulase bem balanceado (CHEN; WUYNAN, 1992).

Além da celulose, vários celooligosacarídeos e seus derivados têm sido pesquisados para a identificação da indução da produção de celulases. A celobiose, o menor celooligosacarídeo com uma ligação β -1,4, foi reportado como indutor de celulase por muitos pesquisadores. Surpreendentemente, a sofrorose, que é um dissacarídeo de glicose com ligação β -1,2, pode induzir 2500 vezes mais a produção de celulose do que a celobiose usando como produtor de celulase a *Hypocrea jecorina* (SUTO; TOMITA, 2001).

Muitos bioprocessos são desenvolvidos e implementados de diferentes maneiras. Estes processos são operados em diferentes escalas, tais como a bancada, piloto e planta. Na pesquisa, muitos processos em pequena escala são desenvolvidos para a seleção e melhoramento de cepas, melhoramento de culturas existentes, uso eficiente do meio e manuseio do processo mais eficientemente com máxima produtividade (NAJAFPOUR, 2007).

Os fenômenos de transporte são especialmente dependentes no escalonamento, tais como a transferência do oxigênio, a mistura, a tensão de cisalhamento. Mudanças nessas variáveis inevitavelmente alteram o metabolismo microbiano, assim como parâmetros como o rendimento e produtividade. O desafio de um escalonamento bem sucedido é manter a cinética ótima que foi desenvolvida em escala menor (CLARKE, 2013)

A ultrafiltração é uma técnica de separação muito utilizada em biotecnologia para a concentração de macromoléculas, como enzimas em solução aquosa (EHSANI, 1995).

O fracionamento de enzimas de materiais biológicos por ultrafiltração tem tido sucesso limitado devido à grande distribuição de poros das membranas. A performance da ultrafiltração é alterada por parâmetros físicos como a temperatura, pressão, forças de cisalhamento, interações com diferentes superfícies e químicos como o pH e força iônica (EHSANI, 1995).

Na ultrafiltração a água e outras pequenas moléculas são conduzidas através de uma membrana semipermeável por uma força transmembrana como pressão elevada. O diâmetro da membrana é escolhido de acordo com a enzima de interesse, esta precisa ser maior que o diâmetro da membrana, para ficar retida. Tem-se uma grande quantidade disponível de membranas poliméricas com diferentes tamanhos moleculares, possibilitando a separação de macromoléculas de interesse, como as enzimas (PANESAR, 2010)

2. OBJETIVOS

- Estudar o efeito do indutor Avicel (celulose microcristalina) na produção do complexo celulolítico;
- Realizar uma ultrafiltração do extrato enzimático bruto para uma concentração parcial da enzima;
- Aumentar a escala: produção de celulasas em biorreatores do tipo coluna de bolhas e tanque agitado (STR)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o PH-HD (*Phanerochaete sp.*) obtido do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB I), da Universidade Federal do Paraná.

3.2 SUBSTRATO E MEIOS

Como substrato foi utilizado o resíduo de palma, na granulometria de 0,35 mm a 0,80 mm para o estudo da presença do indutor, e no aumento de escala a granulometria menor que 0,35 mm. Como meio para inóculo utilizou-se o Czapeck-Dox modificado, com 10 g/L de palma ao invés da sacarose, e como meio de fermentação o meio otimizado, com 15 g/L de palma, 2 g/L de ureia e 4 g/L de KH_2PO_4 .

3.3 ESTUDO DA PRESENÇA DO INDUTOR - AVICEL

Para induzir a produção de celulase, utilizou-se o Avicel® PH-101 (Fluka, Sigma-Aldrich). Os ensaios de fermentação foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL incubados a 28°C em agitadores do tipo *shaker*. O meio utilizado nas fermentações continha 1,5 g de palma (para cada frasco Erlenmeyer), 4 g/L de KH_2PO_4 e 2 g/L de ureia. Sendo que cada frasco Erlenmeyer continha 90 mL de meio e 10 mL de inóculo (taxa de inoculação equivalente a 10% v/v).

Para verificar se o Avicel induzia a atividade de celulases, utilizou-se as concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% m/v de Avicel. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO COMPLEXO CELULOLÍTICO

A concentração do complexo celulolítico consistiu em quatro etapas.

A primeira foi a passagem de uma amostra do extrato enzimático por um filtro grosso (papel Whatmann nº1) utilizando uma bomba de vácuo (Da Dia Pump, modelo CA). Esta etapa foi necessária para a eliminação de partículas insolúveis, para clarificar a amostra e não danificar os filtros dos equipamentos das etapas posteriores.

Após a primeira etapa, realizou-se a microfiltração do filtrado da etapa anterior em membrana de celulose de 0,45 μm , para a separação da biomassa, e a retirada de outros sólidos insolúveis. Esta etapa foi realizada a temperatura

reduzida (15°C), a amostra foi resfriada e mantida em banho de gelo enquanto ocorria a operação, visto que as enzimas celulolíticas presentes na amostra poderiam degradar o material celulósico dos filtros. Esta operação foi realizada com auxílio de uma bomba a vácuo.

Após estas etapas preliminares, filtrado da etapa 2 foi ultrafiltrado em um sistema de ultrafiltração tangencial (Quixstand Benchtop System (GE Healthcare, Suécia)) (Figura 12, pág. 42), em membranas de porosidade 100 kDa. As pressões de operação do sistema foram de 5-10 psi na entrada e 5-10 psi na saída, com fluxo de 3 mL/min. O equipamento foi previamente equilibrado com tampão citrato de sódio a 50 mM, pH 4,8 antes da passagem da amostra. Desta terceira etapa obteve-se a fração retida na membrana (> 100 kDa) e outra fração que foi permeada (< 100 kDa). Foram determinadas as atividades enzimáticas das frações.

Posteriormente, o permeado foi novamente ultrafiltrado em membrana de 10 kDa no mesmo equipamento, obtendo-se uma fração retida (entre 10 e 100 kDa) e uma fração permeada (< 10 kDa). O volume de cada fração foi medido, assim como realizou-se a atividade enzimática de FPase e CMCase de cada fração.

3.5 AUMENTO DE ESCALA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO UTILIZANDO BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS E BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO (STR)

Para aumentar a escala utilizaram-se dois biorreatores, um denominado coluna de bolhas, com capacidade de 700 mL, e o biorreator de pás planas (STR), com capacidade de até 7 L (volume útil de 3,5 L), conforme apresentado na Figura 33.

O biorreator coluna de bolhas consiste em uma coluna cilíndrica com capacidade máxima de até 1,5 L, sendo que o volume útil é de 700 mL (diâmetro de 80 mm e altura de 300 mm). O biorreator coluna de bolhas possui uma entrada para o ar na parte inferior da coluna e as bolhas são formadas em uma placa porosa (A). Já a parte superior possui três conexões: a conexão central para a retirada de amostras (C), e duas laterais, uma para a saída de ar e gases

produzidos na fermentação (B), e outra para a introdução do inóculo na coluna (D). Na Figura 33 encontra-se o esquema do biorreator de bolhas.



FIGURA 33 – (1) - BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS, UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES. (2) – BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO (STR)

O ensaio no biorreator coluna de bolhas foi realizado em duplicata, no qual foi testada a influência da taxa de aeração, utilizadas 2 vvm e 4 vvm, na produção das enzimas celulolíticas. Utilizou-se 630 mL de meio de fermentação submersa (FSm) contendo 15 g/L de resíduo de palma moído, na granulometria < 0,35 mm. 4 g/L de K_2HPO_4 , 2 g/L de ureia e Avicel 2,0 g/L. A temperatura utilizada foi de 31 °C. A taxa de inóculo foi de 10 % v/v, compreendendo 70 mL, totalizando 700 mL, correspondente ao volume útil da coluna. Foram retiradas amostras após 96 e 144 horas para a verificação da atividade enzimática de FPase e CMCase.

Com relação ao biorreator tipo STR, utilizou-se o modelo MDL da marca B.E. MARUBISHI, com volume total de 7L e volume útil de 3,5 L. Neste biorreator a agitação é realizada através de pás internas do tipo hélice. A aeração é forçada e ocorre através de um compressor de ar na parte inferior do biorreator. Neste biorreator há controle de temperatura e aeração. A agitação utilizada no biorreator foi de 100 rpm com aeração de 1,5 L de ar /min (0,5 vvm) e temperatura de 32°C. O meio de cultivo foi o mesmo utilizado no biorreator de bolhas (condição otimizada de meio de fermentação, obtido no capítulo 3, além

da presença do indutor), uma taxa de inóculo de 10% v/v, compreendendo 350 mL, sendo que foram retiradas amostras a cada 24 horas, durante 7 dias, para a determinação das atividades enzimáticas de FPase e CMCase. A imagem do biorreator do tipo tanque agitado (STR) encontra-se na Figura 33.

Além da produção do complexo celulolítico em biorreator STR, foi realizada uma etapa de ultrafiltração do extrato enzimático bruto do biorreator STR (pois apresenta menor atividade de FPase e CMCase em relação ao biorreator coluna de bolhas), após 144 horas de fermentação, para verificar se *Phanerochaete* sp. PH-HD realmente estava produzindo o complexo celulolítico. A amostra foi filtrada (usando um filtro de papel) e, após, centrifugada a 4000 rpm (2060 g). O sobrenadante (3 mL) foi ultrafiltrado em dois tubos falcon contendo filtro de 10 kDa (de celulose da GE). Após, foram centrifugados a 4000 rpm (2060 g) durante 20 minutos, sendo que após 10 minutos de centrifugação, os tubos foram armazenados em banho de gelo durante 5 minutos, para preservar a baixa temperatura do complexo celulolítico e não danificar o material do filtro, além de poder ocorrer a perda de atividade enzimática. Essa etapa foi repetida mais duas vezes, sendo que na terceira o tempo de centrifugação foi de 35 minutos, pela dificuldade do volume permear o ultrafiltro. A concentração teórica foi de 16 vezes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRESENÇA DO INDUTOR AVICEL NA PRODUÇÃO DE CELULASES USANDO O FUNGO PHANEROCHAETE sp.

Com relação ao teste da presença do indutor Avicel, foi realizado um estudo com as concentrações de Avicel variando de 0,2 % a 1,0 %. Os resultados se encontram nas Figuras 34 e 35.

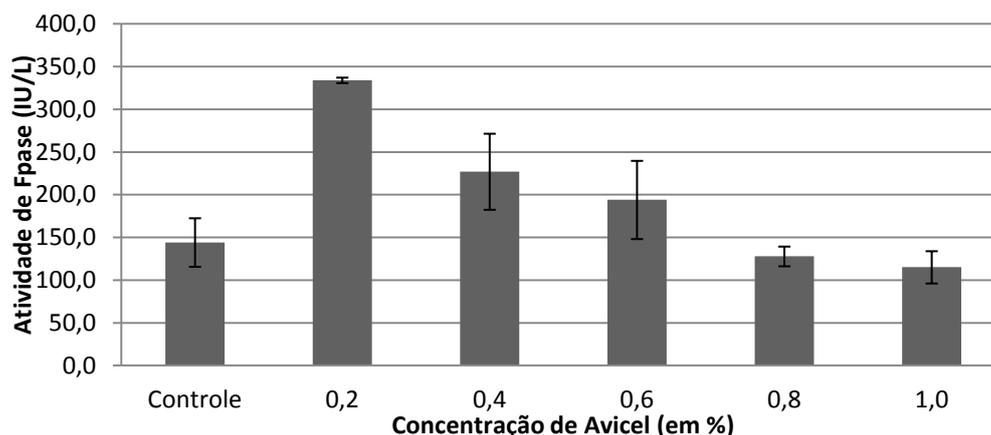


FIGURA 34 – ATIVIDADE DE FPase PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO INDUTOR (AVICEL) NA PRODUÇÃO DA ENZIMA. O CONTROLE CORRESPONDE À AUSÊNCIA DO INDUTOR

* Atividade diluindo a enzima em 1:3

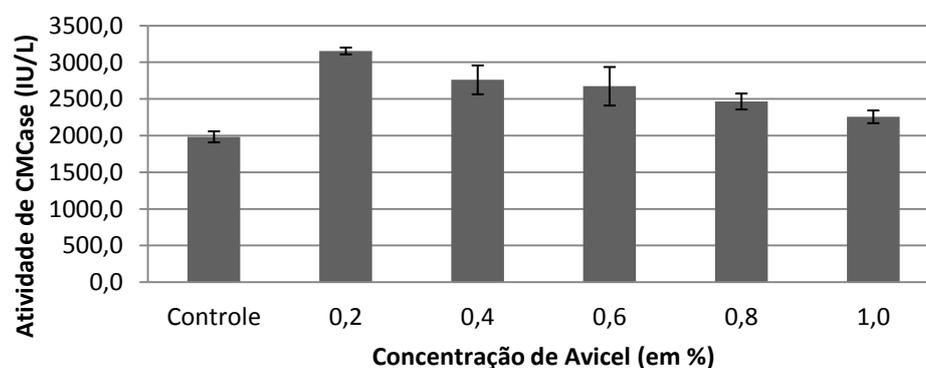


FIGURA 35 – ATIVIDADE DE CMCase PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO INDUTOR (AVICEL) NA PRODUÇÃO DA ENZIMA. O CONTROLE CORRESPONDE À AUSÊNCIA DO INDUTOR

* Atividade diluindo a enzima em 1:10

Conforme pode ser observado nas Figuras 34 e 35, a atividade enzimática aumentou com a presença do indutor Avicel (a partir de 0,2% m/v), em relação à ausência do indutor (controle), porém, decrescendo em função do aumento da concentração do Avicel (0,2 a 1,0% m/v). A atividade enzimática de FPase aumentou em 131% (334 IU/L) na concentração de Avicel de 0,2% (p/v), já com relação da atividade de CMCase houve um acréscimo de 59% (3156 IU/L), sendo que estes aumentos foram em relação ao controle. Além disso, neste estudo verificou-se que o Avicel é um bom indutor na produção de celulases.

4.2 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO COMPLEXO CELULOLÍTICO

No estudo da concentração parcial das celulasas produzidas por FSS, verificou-se o efeito de concentração da celulase utilizando uma sequência de etapas de microfiltração seguida de ultrafiltrações. Os resultados encontram-se nas Tabelas 22 e 23.

TABELA 22 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE FPases ETAPAS DE CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

Ensaio	Atividade (IU/L)	Volume (L)	Atividade total (IU)	% de atividade relativa	% perda	Concentração (%)
Extrato bruto	60,5	0,26	15,7	100	0	0
Microfiltro	60,5	0,26	15,7	100	0	0
#300 retido	98,1	0,075	7,4	46,8	53,2	62
#300 filtrado	12,3	0,18	2,2	14,1	85,9	-79,6
#10 retido	16,4	0,02	0,3	2,1	97,9	-72,8
#10 filtrado	0	0,18	0	0	100	-100
#10 resíduo	0	0,02	0	0,0	100,0	-100

* Atividade diluindo a enzima em 1:3, somente para o tempo de #10 filtrado e #10 resíduo que não se fez diluição da enzima

TABELA 23 – RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE CMCases ETAPAS DE CONCENTRAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

Fração	Atividade (IU/L)	Volume (L)	Atividade total (IU)	% de atividade relativa	% perda	Concentração (%)
Extrato bruto	2134,6	0,26	555	100	0	0
Microfiltro	2134,6	0,26	555	100	0	0
#300 retido	2350,1	0,075	176,3	31,8	68,2	10,1
#300 filtrado	981,1	0,18	176,6	5	95	-54
#10 retido	1374,1	0,02	27,5	9,7	90,3	-35,6
#10 filtrado	299,2	0,16	53,8	0,6	99,4	-86
#10 resíduo	162,3	0,2	3,2	0	100	-92,4

* Atividade diluindo a enzima em 1:10, somente para o tempo de #10 filtrado e #10 resíduo que não se fez diluição da enzima

Verifica-se, pelas Tabelas 22 e 23, que a concentração maior da enzima (46,8%) se encontra na fração retida da membrana de 300 kDa (#300). A concentração da enzima não foi muito elevada (1,62 x para a FPase e 1,1 x para CMCases), mesmo com o decréscimo do volume (de 260 mL para 75 mL no

caso da membrana de #300), indicando que pode estar havendo bastante perda de atividade na própria coluna.

Além disso, pode-se realizar outras formas de concentração da enzima como a precipitação usando, como exemplo, o sulfato de amônio. BAKARE (2005) precipitou celulases produzidas pelo *Pseudomonas fluorescens* com sulfato de amônio em 90% de saturação, conseguindo uma recuperação de 64 % da enzima, e um aumento na atividade enzimática de 7,23 vezes. Já Goldbeck (2013) purificou celulases (FPase e CMCCase) produzidas pelo microrganismo *Acremonium strictum* usando precipitação com etanol e acetona. Para a FPase, Goldbeck (2013) conseguiu uma recuperação de apenas 11,7% com um aumento na atividade enzimática de 1,5 vezes, porém, com acetona ele conseguiu uma recuperação de 65% e um aumento na atividade enzimática de 7,1 vezes. Já com relação à CMCCase usando etanol recuperou-se 12,25% com um aumento na atividade de CMCCase de 1,6 vezes, e com a acetona recuperou-se 80,7 % da enzima e com um aumento na atividade enzimática de 8,9 vezes.

Novos estudos precisam ser realizados usando a ultrafiltração, pois, industrialmente, esta seria a forma mais fácil de purificar o produto, já que a precipitação, por exemplo, demandaria grandes quantidades de sais, um excelente controle de temperatura (para as enzimas não perderem atividade enzimática) e grandes tanques para acondicionar todo o extrato bruto enzimático.

4.3 AUMENTO DE ESCALA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO UTILIZANDO BIORREATOR DE BOLHAS E BIORREATOR DO TIPO TANQUE AGITADO (STR)

Os resultados de atividades de FPase e CMCCase em biorreator de bolhas e em biorreator STR se encontram na Tabela 24.

TABELA 24 – PRODUÇÃO DO COMPLEXO CEULOLÍTICO USANDO O BIORREATOR DE BOLHAS

Biorreator coluna de bolhas com aeração de 2 vvm		
Tempo (horas)	Atividade Fpase (IU/L)	Atividade CMCCase (IU/L)
96	12,5 ± 3,5	82,7 ± 7,4
144	14,9 ± 3,8	88,1 ± 13,2
Biorreator coluna de bolhas com aeração de 4 vvm		
Tempo (horas)	Atividade Fpase (IU/L)	Atividade CMCCase (IU/L)
96	8,6 ± 2,5	73,8 ± 14,7
144	22,7 ± 1,7	67,9 ± 2,7
Biorreator STR		
Tempo (horas)	Atividade Fpase (IU/L)	Atividade CMCCase (IU/L)
144	8,7 ± 1,0	14,3 ± 0,8

* Atividade sem diluição da enzima, tanto para a FPase quanto para a CMCCase

Conforme pode ser verificado na Tabela 24 não ocorreu uma grande produção do complexo celulolítico usando o biorreator coluna de bolhas. Comparando com as condições otimizadas de produção de FPase (334 IU/L) e CMCCase (3155,6 IU/L) em frascos Erlenmeyer, a produção de FPase, após 96 horas de fermentação, decresceu 96,3% (12,5 IU/L) e de CMCCase 97,4% (82,7 IU/L) utilizando aeração de 2 vvm. No caso de aeração de 4 vvm houve um decréscimo de FPase de 97,4% (8,6 IU/L) e de CMCCase 97,7% (73,8 IU/L). Com isso, verificou-se um sério problema na produção das enzimas usando este tipo de biorreator. Possivelmente isso ocorreu devido à alteração do processo de aeração, pois em frascos Erlenmeyer a aeração ocorre por difusão, enquanto que no biorreator do tipo coluna de bolhas a aeração é forçada. Com relação ao crescimento da biomassa, verificou-se, visualmente, um bom crescimento do fungo, tanto usando 2 vvm de aeração quanto 4 vvm. Mesmo com o bom crescimento fúngico, não houve a produção do complexo enzimático de forma significativa. Segundo Mahajan (2011), para *Phanerochaete chrysosporum*, a aeração aumenta a produção do complexo celulolítico, não sendo verificado no atual experimento, pois não houve quase diferença nas atividades de FPase e CMCCase em diferentes aerações. Essa perda de atividade pode ter ocorrido pelo fungo utilizado ser um basidiomiceto (cogumelo), que apresenta maior sensibilidade quando submetido a mudanças físicas, como maiores níveis de oxigênio dissolvido, além da agitação.

Ainda, na Tabela 24 tem-se a atividade de FPase e CMCase após 144 horas fermentação, para o biorreator STR. A atividade de FPase alcançada foi de 8,7 IU/L enquanto que a de CMCase de 11,4 IU/L (produção inferior a encontrada nos biorreatores do tipo frascos Erlenmeyer e mesmo no biorreator coluna de bolhas). Comparando os dois biorreatores, verifica-se que o biorreator de bolhas foi melhor na produção das celulasas em comparação com o biorreator STR, tanto para a atividade de FPase quanto a de CMCase.

Como as atividades de FPase e CMCase eram muito inferiores em relação à produção do complexo celulolítico em frascos Erlenmeyer, foi realizada uma etapa de ultrafiltração do extrato bruto do biorreator STR. Em relação ao extrato bruto (144 horas de fermentação no biorreator STR), a atividade de FPase aumentou 4 vezes (36 IU/L) e de CMCase 13 vezes (195 IU/L). Com isso, verificou-se que realmente houve produção do complexo celulolítico no biorreator STR. Porém, para a atividade de FPase, a ultrafiltração foi ineficiente (recuperação de 25%), podendo ter ocorrido perdas de atividade enzimática durante o processo de ultrafiltração, adsorção de proteínas na membrana do ultrafiltro ou mesmo fração da enzima retida no volume não permeado. Também pode ter ocorrido a perda de algum cofator importante para a manutenção da atividade enzimática pela baixa atividade no volume retido. Para a CMCase a ultrafiltração foi bem satisfatória (recuperação de 82%), indicando que pode ter ocorrido menor perda de atividade durante o processo, talvez pela não adsorção das endoglucanases no material celulósico.

Para verificar o efeito diminuição da granulometria da palma (< 0,35 mm) na atividade enzimática do complexo celulolítico, foi realizado um teste da produção da enzima, usando o meio de fermentação otimizado, em frascos Erlenmeyer. Assim, nesse teste utilizou-se o meio Mandels & Weber modificado, contendo 15 g/L de palma moída com granulometria < 0,35 mm, 2 g/L de uréia e 4 g/L de KH_2PO_4 em um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, com taxa de inoculação de 10%. Foi obtido nesse teste atividade de FPase de 323 ± 26 IU/L e de CMCase de 2852 ± 89 IU/L. As atividades obtidas usando palma moída na granulometria entre 0,35 e 0,85 mm foram de $334,1 \pm 3,2$ IU/L para a FPase e de $3155,6 \pm 46$ IU/L. Ou seja, quase não houve diferença entre o uso das duas granulometrias. Assim, não foi por esse motivo que as atividades enzimáticas se apresentaram tão baixas em biorreator STR e coluna de bolhas.

Com relação a estudos realizados por outros autores, Kim (1997) verificou o efeito no uso de diversos tipos de biorreatores (STR, *Air-lift*, Coluna de bolhas e frasco em agitador do tipo shaker) na produção do complexo celulolítico. Ele utilizou o microrganismo *Aspergillus niger* KKS em 10-20 g/L de palha de arroz. Na fermentação em frasco utilizaram-se erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio a 200 rpm por 7 dias. No caso do STR ele utilizou 2,1 L de volume útil a 300 rpm e com aeração de 1,0 vvm. No caso do *air lift* a aeração foi de 1 vvm e 1,4 L de volume útil. Já quando usou o reator coluna de bolhas, o volume útil foi de 0,8 litros. Em todos os casos as fermentações foram conduzidas a temperatura de 30 °C.

Verificou-se que a maior produtividade da FPase foi obtida usando o biorreator de coluna de bolhas (7,8 IU/L.hr), sendo que na cultura em frascos Erlenmeyer em agitador do tipo shaker a produtividade foi de 3,1 IU/L.hr.

5. CONCLUSÕES

No estudo da presença do indutor verificou-se que o Avicel é um indutor adequado para a produção de celulases por *Phanerochaete sp.*, usando palma como substrato. Além disso, com o estudo de concentração parcial da celulase verificou-se a necessidade de mais estudos visando o aumento na eficiência da concentração do complexo celulolítico. O biorreator do tipo coluna de bolhas se mostrou inadequado, inicialmente, para a produção das celulases, pois o mesmo operado em duas taxas de aerações diferentes, resultou em produção enzimática muito baixa. Desta forma sugere-se que novos estudos sejam realizados para a definição dos parâmetros que permitam o aumento de escala com concomitante produção de celulases a níveis de produção superiores ou mesmo comparáveis aos obtidos em FSS conduzidas em frascos do tipo Erlenmeyer em agitador do tipo shaker.

3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização de um novo *screening*, entre outros microrganismos potencialmente produtores de celulasas. No Laboratório de Processos Bioecnológicos I (LPB I) há outras cepas disponíveis de *Aspergillus niger*, de *Trichoderma sp.*, de *Phanerochaete sp.*, etc, que poderiam ser testadas utilizando inicialmente um critério qualitativo, verificando a maior produção de celulasas, para microrganismos do mesmo gênero. E, após a seleção dos melhores usando este critério qualitativo, produzir o complexo celulolítico usando o critério quantitativo, com a produção em Erlenmeyers em *shaker*.
- Realizar um novo teste para verificação da presença de outros sais no meio de fermentação, além dos sais presentes no meio Mandels & Weber, na produção das enzimas celulolíticas com os microrganismos selecionados no *screening*.
- Teste com palma pré-tratada, utilizando diferentes pré-tratamentos e a influência dos mesmos na produção das celulasas;
- Testes de outros indutores relatados na literatura, principalmente priorizando indutores que tenham baixo custo e que possam induzir a máxima produção do complexo celulolítico;
- Teste do efeito da concentração de glicose e celobiose na inibição da produção da enzima;
- Caracterização da enzima: efeito da temperatura na estabilidade enzimática, a temperatura e pH ótimos para atuação da enzima, efeito dos íons na atividade enzimática;
- Testes de concentração do complexo celulolítico, como a liofilização, precipitação, e testes de purificação para a identificação das enzimas.
- Novos testes de aumento de escala. Verificação mais minuciosa do efeito da aeração na produção enzimática, utilização de outros biorreatores e verificação da influência da agitação na produção do complexo celulolítico;
- Estudo da produção de celulasas em batelada alimentada;
- Testes de mutação genética para verificar se os mutantes expressariam mais a produção enzimática;

- Teste de hidrólise enzimática produzida pela *Phanerochaete sp.* (PH-HD) comparativamente com a enzima produzida comercialmente, tentando manter a mesma atividade da enzima por grama de resíduo de palma (em base seca).

4. REFERÊNCIAS

ABNISA, F.; ARAMI-NIYA, A.; WAN DAUD, W. M. A.; SAHU, J. N.; NOOR, I. M. **Utilization of oil palm tree residues to produce bio-oil and bio-char via pyrolysis.** Energy Conversion and Management, v. 76, p. 1073–1082, dez. 2013.

AGARWAL, P. K. **Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function.** Microbial cell factories, v. 5, p. 2, jan. 2006.

AL, M.-O. ET. **The Role of Trichoderma reesei Cellulases in Cotton Finishing.** American Association of Textile Chemists and Colorists, 2001.

ALI, S. B. R.; MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. **Enhanced Production of Cellulase from Tapioca Stem Using Response Surface Methodology.** Innovative Romanian Food Biotechnology, v. 12, p. 40–51, 2013.

ANACLETO, A. **Viabilidade de extração de óleo de dendê no estado do pará.** [s.l: s.n.].

ANDRÉ, L.; SILVA, F.; MARIA, A.; ANTUNES, D. S.; JUNIOR, N. P. **Use of Patent Applications as a Tool for Technology Development Investigations on Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass in Brazil.** v. 7, n. 3, p. 80–90, 2012.

BAIG, M.; YASMEEN, M. **Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes.** African journal of Biotechnology, v. 3, n. 9, p. 447–450, 2005.

BAKARE, M. K.; ADEWALE, I. O.; AJAYI, A.; SHONUKAN, O. O. **Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of Pseudomonas fluorescens.** v. 4, n. September, p. 898–904, 2005.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. **Production of cellulases from Aspergillus niger NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues.** Waste management (New York, N.Y.), v. 32, n. 7, p. 1341–6, jul. 2012.

BHAT, K.; MAHALINGESHWARA, B. **Methods for Measuring Cellulase Activities.** International Union, v. 160, p. 87–112, 1988.

BISEN, P. S.; BAGHEL, R. K.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; PRASAD, G. B. K. S. **Lentinus edodes: a macrofungus with pharmacological activities.** Current medicinal chemistry, v. 17, n. 22, p. 2419–30, jan. 2010.

BOUDET, A.-M. **Lignins and lignification: Selected issues.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 38, n. 1-2, p. 81–96, jan. 2000.

BOYCE, S.; COLLEGE, T. **Enzyme Classification and Nomenclature.** p. 1–11, 2001.

BRINCHI, L.; COTANA, F.; FORTUNATI, E.; KENNY, J. M. **Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications.** Carbohydrate polymers, v. 94, n. 1, p. 154–69, 15 abr. 2013.

CARAMEZ, M.; DAMASO, T.; TERZI, C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, C. P. DE; FRAGA, M. E.; COURI, S. **Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 55, n. August, p. 513–520, 2012.

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

CHANG, S. H. **An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production.** Biomass and Bioenergy, v. 62, p. 174–181, jan. 2014.

CHEN, S.; WUYNAN, M. **Novel Inducers Derived from Starch for Cellulase Production by Trichoderma reesei.** Process Biochemistry, v. 27, p. 327–334, 1992.

CHEN, J. P; ISA, K. **Thermal Decomposition of Urea and Derivatives by Simultaneous TG / (DTA) / MS.** Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 1998.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. **AMORPHOUS CELLULOSE – STRUCTURE AND CHARACTERIZATION.** v. 45, p. 13–21, 2011.

CLARKE, K. G. **Bioprocess Engineering An Introductory Engineering and Life Science Approach.** WoodHead Publishing, 2013.

EDUARDO, E. **Avaliação do impacto energético e ambiental da cogeração no balanço energético e no ciclo de vida do biodiesel de óleo de palma africana.** [s.l.] Universidade Federal de Itajubá, 2008.

EGÜÉS, I.; ECEIZA, A.; LABIDI, J. **Effect of different hemicelluloses characteristics on film forming properties.** Industrial Crops and Products, v. 47, p. 331–338, maio 2013.

EHSANI, N; NYSTRÖM, M; OJAMO, H; SIIKA-AHO, M. **Separation of Enzymes Produced by Trichoderma reesei with Hydrophobic Ultrafiltration Membranes.** Elsevier, vol. 31, p. 253-263, 1995.

ELISASHVILI, V.; PENNINGKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. **Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition.** Bioresource technology, v. 99, n. 3, p. 457–62, fev. 2008.

EL-SERSY, N. A.; ABD-ELNABY, H.; ABOU-ELELA, G. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-TOUKHY, N. M. K. **Optimization , economization and characterization of**

cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. v. 9, n. 38, p. 6355–6364, 2010.

FABIAN, F. M. **Application of Response Surface Methodology and Central Composite Design for 5P12-RANTES Expression in the *Pichia pastoris* System**. [s.l: s.n.].

FERNANDES, D. L. A.; PEREIRA, S. R.; SERAFIM, L. S.; EVTUGUIN, D. V.; XAVIER, A. M. R. B. **Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics : Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor**. 2010.

GHOSE, T. K. **Measurement of Cellulase Activities**. International Union of Pure and Applied Chemistry, v. 59, n. 2, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review**. Bioresource technology, v. 101, n. 13, p. 4775–800, jul. 2010.

GUPTA, M.; MANISHA, K.; GROVER, R. **Effect of Various Media Types on the Rate of Growth of *Aspergillus niger***. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, v. 2, n. 2, p. 141–144, 2012.

GURURAJ BHADRI, S. H. **Statistical Optimization of Medium Components by Response Surface Methodology for Enhanced Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter persimmonis***. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, v. 04, n. 01, p. 1–5, 2013.

GUSTINELLI, N. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ” Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar Nara Gustinelli Bortolazzo Piracicaba**. 2011.

HAMMAD, A. I.; SWELIM, M.; GANNAM, R. B. **Enhanced Production of Cellulase (S) By *Aspergillus spp* . Isolated From Agriculture Wastes by Solid State Fermentation**. American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences, v. 8, n. 4, p. 402–410, 2010.

HENDY N.; WILKE, C.; BLANCH, H. **Enhanced Cellulase Production using Solka Floc in a Fed-batch Fermentation**. Biotechnology Letters, v. 4, n. 12, p. 785–788, 1976.

HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M. **The Rote of Plant and Microbial Hydrolytic Enzymes in Pesticide Metabolism**. 2001.

HUBBELL, C. A; RAGAUSKAS, A. J. **Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization**. Bioresource technology, v. 101, n. 19, p. 7410–5, out. 2010.

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

KAMEI, I.; HIROTA, Y.; MEGURO, S. **Integrated delignification and simultaneous saccharification and fermentation of hard wood by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60**. Bioresource technology, v. 126, p. 137–41, dez. 2012.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. **Bubble column reactors**. Process Biochemistry, v. 40, n. 7, p. 2263–2283, jun. 2005.

KERDSUWAN, S.; LAOHALIDANOND, K.; WASTE, T. **Renewable Energy from Palm Oil Empty Fruit Bunch**. 2010.

KHALIL, A. I. **Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 18, p. 753–759, 2002.

KHAN, M. H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. **Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme**. Journal of Environmental Science and Health, Part B, v. 42, n. 4, p. 381–386, 7 maio 2007.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. **Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors**. Bioresource Technology, v. 59, n. 1, p. 63–67, jan. 1997.

KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of Chemical Technology**. Vol. 2, 3^a ed.

KUBICEK, C. P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. **Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina***. Biotechnology for biofuels, v. 2, p. 19, jan. 2009.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. **Microbial cellulases and their industrial applications**. Enzyme research, v. 2011, p. 280696, jan. 2011.

LAW, K.; JIANG, X. **Comparative papermaking properties of oil-palm empty fruit bunch**. Tappi Journal Peer Reviewed Paper, v. 84, n. 1, p. 1–13, 2001.

LECHNER, B. E.; PAPINUTTI, V. L. **Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw**. Process Biochemistry, v. 41, n. 3, p. 594–598, mar. 2006.

LEE, H.; JANG, Y.; CHOI, Y.-S.; KIM, M.-J.; LEE, J.; LEE, H.; HONG, J.-H.; LEE, Y. M.; KIM, G.-H.; KIM, J.-J. **Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs**. Journal of microbiological methods, v. 97, p. 56–62, fev. 2014.

LEE, H.; LIM, W.; LEE, J. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry Improvement of ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysates by the removal of inhibitors.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 19, n. 6, p. 2010–2015, 2013.

LENGTH, F. **Identification and characterization of cellulases produced by Acremonium strictum isolated from Brazilian biome.** v. 4, n. 6, p. 135–146, 2013.

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

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. VAN; PRETORIUS, I. S. **Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology.** v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MACHADO, I.; TEIXEIRA, J. A; RODRÍGUEZ-COUTO, S. **Semi-solid-state fermentation: a promising alternative for neomycin production by the actinomycete Streptomyces fradiae.** Journal of biotechnology, v. 165, n. 3-4, p. 195–200, 10 jun. 2013.

MAHAJAN, S. **Characterization of the White-rot Fungus , Phanerochaete carnosa , through Proteomic Methods and Compositional Analysis of Decayed Wood Fibre.** [s.l: s.n.].

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; THANGAVELU, K. P.; HEESE, K. **Secretome analysis of Ganoderma lucidum cultivated in sugarcane bagasse.** Journal of proteomics, v. 77, p. 298–309, 21 dez. 2012.

MARY, M.; JAMES, W. **The Production of Cellulases.** In: Cellulases and Their Applications. [s.l.] AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1969. v. 95p. 23–391.

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. **Production of cellulase by a newly isolated strain of Aspergillus sydowii and its optimization under submerged fermentation.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 78, p. 24–33, mar. 2013.

MONRROY, M.; IBAÑEZ, J.; MELIN, V.; BAEZA, J.; MENDONÇA, R. T.; CONTRERAS, D.; FREER, J. **Bioorganosolv pretreatments of P. radiata by a brown rot fungus (Gloeophyllum trabeum) and ethanolysis.** Enzyme and Microbial Technology, v. 47, n. 1-2, p. 11–16, jul. 2010.

MONRROY, M.; ORTEGA, I.; RAMÍREZ, M.; BAEZA, J.; FREER, J. **Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis.** Enzyme and microbial technology, v. 49, n. 5, p. 472–7, 10 out. 2011.

NAGHAVI, N. S.; EMTIAZI, G.; KARIMIAN, N. **Partial Purification and Immobilization of Cellulase Enzymes from the Fungus Aspergillus Terreus**

Isolated from Rotten Wood. Journal of Life Sciences and Technologies, v. 1, n. 1, p. 7–9, 2013.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology.** Elsevier, 2007.

NAKARI-SETÄLÄ, T.; PENTTILÄ, M. **Production of Trichoderma reesei cellulases on glucose-containing media.** Applied and environmental microbiology, v. 61, n. 10, p. 3650–5, out. 1995.

PANESAR, P. S; MARWAHA, S. S; CHOPRA, H. K. **Enzymes in Food Processing Fundamentals and Potential Applications.** L. K. International Publishing House, 2010.

PEREIRA, N.; COLTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. **Biomass of Lignocellulosic Compostion for Fuel Ethanol Production and the Context of Biorefinery.** [s.l: s.n.]. v. 2

RAGHUWANSHI, S.; DESWAL, D.; KARP, M.; KUHAD, R. C. **Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of Trichoderma asperellum RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose.** Fuel, v. 124, p. 183–189, maio 2014.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. **Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by Candida rugosa and kinetic modeling.** Chinese Journal of Biotechnology, v. 24, n. 3, p. 436–44, mar. 2008.

RATHA, J.; ADTHALUNGRONG, C. **Selection of nutrient parameters for endoglucanase production from rice bran by Penicillium sp . using Plackett-Burman design.** v. 17, n. 6, p. 965–971, 2012.

RITTER, C. E. T.; FONTANA, R. C.; CAMASSOLA, M.; DA SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. **The influence of sorbitol on the production of cellulases and xylanases in an airlift bioreactor.** Bioresource technology, v. 148, p. 86–90, nov. 2013.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; PARADA, J. L.; MEDEIROS, A. B. P.; DE CARVALHO, J. C.; LACERDA, L. G.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R. **Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation.** Process Biochemistry, v. 48, n. 2, p. 374–379, fev. 2013.

RUSSEL, R.; PATERSON, M. **Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory.** Phytochemistry, v. 67, n. 18, p. 1985–2001, set. 2006.

SADHU, S.; MAITI, T. K. **Cellulase Production by Bacteria : A Review.** v. 3, n. 3, p. 235–258, 2013.

SALIU, B. K.; SANI, A. **Bioethanol Potentials of Corn Cob Hydrolysed using Cellulases of *Aspergillus niger* and *Penicillium decumbens***. EXCLI Journal, p. 468–479, 2012.

SAMUELS, G. J. **Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus**. Mycological Research, v. 100, n. 8, p. 923–935, ago. 1996.

SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi**. Biotechnology advances, v. 27, n. 2, p. 185–94, 2009.

SARAVANAN, P.; MUTHUVELAYUDHAM, R.; RAJESH KANNAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. **Optimization of cellulase production using *Trichoderma reesei* by RSM and comparison with genetic algorithm**. Frontiers of Chemical Science and Engineering, v. 6, n. 4, p. 443–452, 4 dez. 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. **Bioethanol production from agricultural wastes: An overview**. Renewable Energy, v. 37, n. 1, p. 19–27, jan. 2012.

SAXENA, R.; SINGH, R. **Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus sp***. v. 54, n. 2, p. 135–141, 2010.

SCHILLING, J. S.; AI, J.; BLANCHETTE, R. A.; DUNCAN, S. M.; FILLEY, T. R.; TSCHIRNER, U. W. **Lignocellulose modifications by brown rot fungi and their effects, as pretreatments, on cellulolysis**. Bioresource technology, v. 116, p. 147–54, jul. 2012.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; M, V. DIJCK. P. W. **On the safety of *Aspergillus niger*--a review**. Applied microbiology and biotechnology, v. 59, n. 4-5, p. 426–35, ago. 2002.

SHAFAWATI, S. N.; SIDDIQUEE, S. **Composting of oil palm fibres and *Trichoderma spp.* as the biological control agent: A review**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 85, p. 243–253, nov. 2013.

SHAHLAEI, M.; POURHOSSEIN, A.; DRUG, N.; CLUB, Y. R.; BRANCH, K. **Biomass of *Aspergillus Niger*: Uses and Applications**. v. 2, n. 1, p. 66–72, 2013.

SHAHRIARIN, M.; ABD WAHAB, M. N.; ARIFF, A.; MOHAMAD, R. **Screening, Isolation and Selection of Cellulolytic Fungi from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibre**. Biotechnology(Faisalabad), v. 10, n. 1, p. 108–113, 1 jan. 2011.

SHANMUGAPRIYA, K.; SARAVANA, P. S.; MANOHARAN, M. **Isolation, Screening and Partial Purification of Cellulase from Producing Bacteria**. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, v. 3, n. 1, p. 509–514, 2012.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production**

technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541–549, jun. 2010.

SMITH, A. H. **Review of Literature.** Disponível em: <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/10214/7/07_chapter_2.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2014.

SRINIVAS, M. R. S.; CHAND, N.; LONSANE, B. K. **Use of Plackett–Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS 234 in solid state fermentation system.** *Bioprocess Engineering*, v. 10, n. 3, p. 139, 1994.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. **Microbial cellulases □ Production , applications and challenges.** v. 64, n. November, p. 832–844, 2005.

SUTO, M.; TOMITA, F. **Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi.** *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 92, n. 4, p. 305–11, jan. 2001.

SZAB, I. J. **control of catabolite repression by fed-batch cultivation.** v. 48, p. 221–230, 1996.

UMIKALSON, M. S.; ARIFF, A. B.; ZULKIFLI, H. S.; TONG, C. C.; HASSAN, M. A.; KARIM, M. I. A. **The Treatment of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibre for Subsequent Use as Substrate for Cellulase Production by *Chaetomium Globosum* Kunze.** *Bioresource Technology*, v. 62, p. 1–9, 1997.

VERMA, S. R.; DWIVEDI, U. N. **Lignin genetic engineering for improvement of wood quality: Applications in paper and textile industries, fodder and bioenergy production.** *South African Journal of Botany*, v. 91, p. 107–125, mar. 2014.

WATSON, T. G.; NELLIGAN, I.; LESSING, L. **Cellulase production by *Trichoderma reesei* (RUT-C30) in fed-batch culture.** *Biotechnology Letters*, v. 6, n. 10, p. 667–672, out. 1984.

WILLIAMS, J. A. **Keys to Bioreactor Selections.** EPS: Environmental & Production Solutions, LLC, n. March, p. 34–41, 2002.

WU, S.-H.; NILSSON, H. R.; CHEN, C.-T.; YU, S.-Y.; HALLENBERG, N. **The white-rotting genus *Phanerochaete* is polyphyletic and distributed throughout the phleboid clade of the Polyporales (Basidiomycota).** *Fungal Diversity*, v. 42, n. 1, p. 107–118, 6 fev. 2010.

ZOPPAS, F. M.; MENEGUZZI, Á.; TRAMONTINA, F. **Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes.** v. 3, p. 2374–2381, 2013.

ANEXO A

ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE FPASE DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DE PRÉ-INÓCULO (7 DIAS) E INÓCULO (3 E 5 DIAS), SUB-ITEM 4.4, CAPÍTULO I.

Column A	7-3
VS	vs
Column B	7-5
Unpaired t test	
P value	0,2369
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.278 df=8
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	104.6 ± 8.010 N=6
Mean ± SEM of column B	121.6 ± 11.07 N=4
Difference between means	-17.00 ± 13.30
95% confidence interval	-47.66 to 13.66
R squared	0,1696
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.273, 3, 5
P value	0,7572
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

ANEXO B

ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DAS ATIVIDADES DE CMASE DOS TEMPOS DE CRESCIMENTO DE PRÉ-INÓCULO (7 DIAS) E INÓCULO (3 E 5 DIAS), SUB-ITEM 4.4, CAPÍTULO I.

Column A	7-3
vs	vs
Column B	7-5
Unpaired t test	
P value	0,8076
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.2568 df=5
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	341.8 ± 11.07 N=5
Mean ± SEM of column B	347.8 ± 27.06 N=2
Difference between means	-6.013 ± 23.42
95% confidence interval	-66.22 to 54.20
R squared	0,01302
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.388, 1, 4
P value	0,3943
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

ANEXO C

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ATIVIDADE DE FPASE OBTIDA USANDO AS TRÊS MELHORES FONTES DE NITROGÊNIO, DENTRE AS ESTUDADAS (EXTRATO DE LEVEDURA, PEPTONA E URÉIA), SUB-ITEM 4.1, CAPÍTULO II.

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	35,90				
R squared	0,9410				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	21010	4	5254		
Residual (within columns)	1317	9	146,3		
Total	22330	13			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Peptona vs Extrato de levedura	-15,00	2,148	No	ns	-48.22 to 18.22
Peptona vs Sulfato de amônio	43,67	6,252	Yes	*	10.45 to 76.88
Peptona vs Nitrato de sódio	91,93	13,16	Yes	***	58.72 to 125.2
Peptona vs Ureia	20,12	2,576	No	ns	-17.02 to 57.25
Extrato de levedura vs Sulfato de amônio	58,67	8,400	Yes	**	25.45 to 91.88
Extrato de levedura vs Nitrato de sódio	106,9	15,31	Yes	***	73.72 to 140.2
Extrato de levedura vs Ureia	35,12	4,497	No	ns	-2.021 to 72.25
Sulfato de amônio vs Nitrato de sódio	48,27	6,911	Yes	**	15.05 to 81.48
Sulfato de amônio vs Ureia	-23,55	3,016	No	ns	-60.69 to 13.59
Nitrato de sódio vs Ureia	-71,82	9,197	Yes	***	-109.0 to -34.68

ANEXO D

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ATIVIDADE DE CMCASE OBTIDA USANDO AS TRÊS MELHORES FONTES DE NITROGÊNIO, DENTRE AS ESTUDADAS (EXTRATO DE LEVEDURA, PEPTONA E URÉIA), SUB-ITEM 4.1, CAPÍTULO II.

One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	193,4				
R squared	0,9872				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2329000	4	582300		
Residual (within columns)	30110	10	3011		
Total	2359000	14			
Tukey's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Peptona vs Extrato de levedura	-11,03	0,3483	No	ns	-158.5 to 136.4
Peptona vs Sulfato de amônio	324,2	10,23	Yes	***	176.7 to 471.6
Peptona vs Nitrato de sódio	1024	32,31	Yes	***	876.3 to 1171
Peptona vs Ureia	38,43	1,213	No	ns	-109.0 to 185.9
Extrato de levedura vs Sulfato de amônio	335,2	10,58	Yes	***	187.8 to 482.6
Extrato de levedura vs Nitrato de sódio	1035	32,66	Yes	***	887.3 to 1182
Extrato de levedura vs Ureia	49,47	1,561	No	ns	-97.98 to 196.9
Sulfato de amônio vs Nitrato de sódio	699,6	22,08	Yes	***	552.1 to 847.0
Sulfato de amônio vs Ureia	-285,7	9,019	Yes	***	-433.2 to -138.3
Nitrato de sódio vs Ureia	-985,3	31,10	Yes	***	-1133 to -837.9

ANEXO E

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ATIVIDADE DE FPASE COMPARANDO OS MÉTODOS A, B e C, USANDO A URÉIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO, SUB-ITEM 4.2, CAPÍTULO II.

One-way analysis of variance					
P value	0,0085				
P value summary	**				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	6,665				
R squared	0,4705				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	9,999				
P value	0,0067				
P value summary	**				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table					
	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	11050	2	5524		
Residual (within columns)	12430	15	828,9		
Total	23480	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Método A (Controle) vs Método B	-23,34	1,986	No	ns	-66.52 to 19.84
Método A (Controle) vs Método C	-60,18	5,120	Yes	**	-103.4 to -17.00
Método B vs Método C	-36,84	3,135	No	ns	-80.03 to 6.339

ANEXO F

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ATIVIDADE DE CMCASE COMPARANDO OS MÉTODOS A, B e C, USANDO A URÉIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO, SUB-ITEM 4.2, CAPÍTULO II.

One-way analysis of variance	
P value	0,0027
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
F	9,015
R squared	0,5459

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	0,09102
P value	0,9555
P value summary	Ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	159300	2	79630
Residual (within columns)	132500	15	8833
Total	291700	17	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Método A (Controle) vs Método B	-145,1	3,783	Yes	*	-286.1 to -4.172
Método A (Controle) vs Método C	-227,5	5,930	Yes	**	-368.5 to -86.57
Método B vs Método C	-82,39	2,147	No	ns	-223.4 to 58.57