

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RODRIGO RAFAEL MENDONÇA DOS SANTOS

**APROVEITAMENTO DO CAROÇO DO AÇAÍ COMO
SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

São Carlos

Outubro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**APROVEITAMENTO DO CAROÇO DO AÇAÍ COMO
SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

RODRIGO RAFAEL MENDONÇA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
Universidade Federal de São Carlos,
para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Orientação: Prof^a. Dra. Cristiane
Sanchez Farinas e Prof. Dr. José
Dalton Cruz Pessoa

São Carlos
Outubro de 2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237ac

Santos, Rodrigo Rafael Mendonça dos.

Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido / Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

83 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Açaí. 3. Fermentação. 4. *Aspergillus niger*. 5. CMCase. 6. Xilanase. I. Título.

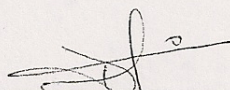
CDD: 660.6 (20ª)

Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos

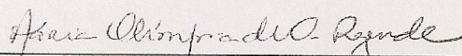
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 14/10/2010

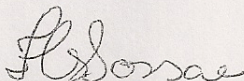
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Dalton Cruz Pessoa (Orientador)
EMBRAPA Instrumentação Agropecuária



Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende
IQSC - USP



Profa. Dra. Flavia Cristina Sossae
UNIARA – Centro Universitário de Araraquara

*Dedico esse trabalho aos
meus avôs e meus pais*

Agradecimentos

Primeiramente, à DEUS que me deu forças e coragem para enfrentar todos os desafios dessa incessante jornada.

Aos meus pais que nunca deixaram de acreditar e de me apoiar nas minhas fraquezas.

Aos meus avôs que, mesmo que “distantes”, não deixaram de torcer e rezar por mim.

À Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas pelas orientações e ensinamentos.

Ao Dr. José Dalton Cruz Pessoa pelas orientações e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório que compartilharam razões e emoções...

À Fernanda Marisa da Cunha por estar sempre presente...

Epígrafe

*“Surfando Karmas & DNA,
Dançando no Campo Minado,
Eu sigo em frente, pra frente eu vou,
Eu sigo enfrentando a onda onde muita gente naufragou...”*

(HG)

RESUMO

A agroindústria do açaí é uma das cadeias produtivas mais importantes da região Norte do Brasil. O excedente da comercialização do açaí é constituído principalmente de seus caroços, os quais são descartados em aterros sanitários e cursos d'água, sem qualquer tratamento. Uma possível aplicação para o caroço do açaí é sua utilização como substrato para fermentação no estado sólido (FES) para a produção de enzimas lignocelulolíticas, como CMCase e xilanases, as quais atuam na conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis. Atualmente, o custo de produção destas enzimas tem se apresentado como o maior entrave para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais e o processo de FES ganha destaque neste contexto por apresentar algumas vantagens sobre outras tecnologias. No processo de FES um grande número de variáveis afeta a produção de metabólicos de interesse, destacando-se as fontes de carbono e nitrogênio, indutores de crescimento e sais minerais. Assim, este trabalho teve como objetivo utilizar o caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por FES avaliando-se a influência da composição do meio de cultivo através da aplicação da metodologia de planejamento estatístico fatorial 2^4 completo para seleção das variáveis significativas. As variáveis estudadas foram a umidade inicial do meio e as concentrações de extrato de peptona de carne, extrato de levedura e CMC. Após a extração do complexo enzimático e quantificação das atividades da CMCase e xilanase, as variáveis concentração de extrato de peptona de carne e extrato de levedura mostraram-se significativas para a produção enzimática. Posteriormente, buscou-se a otimização dos parâmetros do processo através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). As maiores atividades foram atingidas com o incremento da concentração de extrato de peptona de carne e extrato de levedura chegando a $8,24 \text{ U g}^{-1}$ e $8,08 \text{ U g}^{-1}$, de CMCase e xilanase, respectivamente. Testes complementares foram feitos em concentrações 3 vezes maiores que as utilizadas no ponto central do DCCR, os quais indicaram um aumento de 1,59 e 1,16 vezes nas atividades enzimáticas da CMCase e xilanase, respectivamente. Porém, através do teste de Tukey, estes aumentos não apresentaram diferença estatística em relação aos resultados obtidos nos ensaios utilizando concentrações de reagentes ao nível codificado +1,41, conferindo vantagem econômica aos ensaios feitos com menores quantidades de reagentes. O caroço do açaí mostrou-se promissor como substrato para FES, porém novos estudos devem ser realizados visando à definição e otimização dos parâmetros do processo.

Palavras-chave: Caroço do açaí. Fermentação em estado sólido. *Aspergillus niger*. CMCase. Xilanase.

ABSTRACT

The açai agroindustry is the most important productive chains in northern Brazil. The residues in the marketing of açai consists mainly of its pits, which are discarded in landfills and waterways without any treatment. A possible application to açai pits is its use as substrate for solid state fermentation (SSF) for the production of lignocellulolytic enzymes as CMCase and xylanase, which act in the conversion of lignocellulosic materials into fermentable sugars. Currently, the cost of production of these enzymes has emerged as the biggest obstacle to the use of agro-industrial waste and the process of SSF gained prominence in this context due to several advantages over other technologies. The SSF process presents a large number of variables that affect the production of metabolites of interest, highlighting the sources of carbon and nitrogen, inducing growth and mineral salts. This study aimed to evaluate the use of pits of açai as substrate for enzyme production by SSF evaluating the influence of the composition of culture medium for SSF through application of the methodology of statistical design full factorial 2^4 for selection of significant variables. The variables studied were the initial medium moisture and the concentrations of meat peptone extract, yeast extract, and CMC. After extraction of the enzyme complex and quantification of CMCase and xylanase activities, the variables of concentration of meat peptone extract and yeast extract were significant for enzyme production. Subsequently, a central composite rotatable design (CCRD) was made to achieve the optimization of the process parameters. The highest activities were obtained by increasing the concentration of meat peptone extract and yeast extract, reaching 8.24 U g^{-1} and 8.08 U g^{-1} , to CMCase and xylanase, values, respectively. Additional tests were made at concentrations three times higher than those used at the midpoint of the CCRD, which indicated an increase of 1.59 and 1.16 times in the enzymatic activities of CMCase and xylanase, respectively. However, by Tukey test, these increases did not differ statistically in comparison to the tests results obtained using concentrations of reagents encoded at +1.41, giving economic advantage to the tests made with smaller amounts of reagents. The pit of açai has shown promising as a substrate for SSF, but additional studies are performed to define and optimize the process parameters.

Keywords: Açai pit. Solid-state fermentation. *Aspergillus niger*. CMCase. Xylanase.

FIGURAS

- Figura 1. Estrutura da celulose. (a) Destaque para a unidade de repetição, celobiose; (b) Cristal de celulose; (c) Cadeia celulósica na forma de fibras elementares (adaptado de ZHANG e LYND, 2004 (Figuras a e b); RAMOS, 2003; CASTRO, 2006 (Figura c) 19
- Figura 2. Estrutura da parede celular de biomassas lignocelulósicas (adaptado de SHLESER, 1994). 20
- Figura 3. Estrutura de uma fibra vegetal (SILVA et al., 2009). 21
- Figura 4. (a) Açaizeiro em várias touceiras e (b) o fruto do açaizeiro (adaptado de REIS et al., 2002). 24
- Figura 5. Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e celobiasas no sistema celulase de fungos (MARTINS, 2005). 32
- Figura 6. *Aspergillus niger*. Microscopia eletrônica do aparato reprodutivo assexuado (a) e imagens das colônias cultivadas em ágar em placa de Petri (b) (adaptado READ, 1991 e SLIVINSKI, 2007). 35
- Figura 7. Fluxograma para produção, extração e quantificação da atividade de CMCase e xilanase por FES 41
- Figura 8. Histograma dos efeitos das variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e de CMC e umidade inicial do meio sobre a atividade enzimática da CMCase. 54
- Figura 9. Histograma dos efeitos das variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e de CMC e umidade inicial do meio sobre a atividade enzimática da xilanase. 56
- Figura 10. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para atividade enzimática da CMCase no DCCR. 61
- Figura 11. Resíduos *versus* valores normais esperados para atividade enzimática da CMCase no DCCR. 62
- Figura 12. Superfície de respostas para a atividade enzimática da CMCase ($U\ g^{-1}$) em função das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura ($g\ L^{-1}$). 63
- Figura 13. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para atividade enzimática da xilanase. 68
- Figura 14. Resíduos *versus* valores normais esperados para atividade enzimática da xilanase. 68
- Figura 15. Superfície de respostas para a atividade enzimática da xilanase ($U\ g^{-1}$) em função das concentrações de extrato de peptona de carne e de extrato de levedura ($g\ L^{-1}$). 69

TABELAS

Tabela 1 Composição química de alguns materiais lignocelulósicos	26
Tabela 2 Composição do meio de cultura utilizado na preparação do inóculo	42
Tabela 3 Soluções para preparo do meio de sabugo de milho	43
Tabela 4. Composição do meio da FES.....	44
Tabela 5. Valores absolutos e codificados utilizados no planejamento fatorial 2 ⁴ completo.	46
Tabela 6. Matriz dos ensaios para o planejamento fatorial 2 ⁴ completo	46
Tabela 7. Valores absolutos e codificados utilizados para o DCCR.....	47
Tabela 8. Matriz dos ensaios para o DCCR	48
Tabela 9. Matriz dos ensaios para o teste de Tukey.....	49
Tabela 10. Resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ completo para as atividades enzimáticas de CMCase e xilanase (U.g ⁻¹).....	52
Tabela 11. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2 ⁴ completo para a atividade enzimática da CMCase.	53
Tabela 12. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2 ⁴ completo para a atividade enzimática da xilanase.....	55
Tabela 13. Condições dos ensaios realizados no DCCR e os resultados obtidos para atividades enzimáticas de CMCase e xilanase (U.g ⁻¹).	58
Tabela 14. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase.....	59
Tabela 15. Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, teste <i>t</i> e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase.	59
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da CMCase no DCCR após a exclusão das variáveis não significativas a 85% de confiança	60
Tabela 17. Valores obtidos nos ensaios experimentais, valores previstos pelo modelo e o desvio relativo para atividade enzimática da CMCase.	61
Tabela 18. Valores codificados para as variáveis estudadas e resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para atividade enzimática da CMCase.....	64
Tabela 19. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para a atividade enzimática da xilanase.....	65
Tabela 20. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, teste <i>t</i> e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da xilanase, com exclusão das variáveis não significativas	65

Tabela 21. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da xilanase no DCCR.	66
Tabela 22. Valores obtidos nos ensaios experimentais, valores previstos pelo modelo e o desvio relativo para atividade enzimática da xilanase.....	67
Tabela 23. Resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para atividade enzimática da xilanase.	70
Tabela 24. Atividades enzimáticas de CMCase e xilanase e médias utilizadas no teste de Tukey.	71
Tabela 25. Resultados obtidos para atividade enzimática da CMCase e xilanase por FES com diversos substratos.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Biomassa lignocelulósica	18
3.2	Fermentação em estado sólido (FES).....	22
3.3	Substrato sólido para a FES	23
3.3.1	Caroço do Açaí	24
3.4	Suplementação do meio para a FES.....	27
3.5	Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos	28
3.6	Enzimas	29
3.6.1	Atividade enzimática	30
3.6.2	Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos	30
3.6.3	Enzimas endoglucanases	31
3.6.4	Enzimas exoglucanases.....	31
3.6.5	Enzimas β -glucosidases ou celobiases	31
3.6.6	Enzimas xilanases	32
3.7	Microorganismo produtor de enzimas	32
3.7.1	Fungos filamentosos	33
3.7.2	Aspergillus niger.....	34
3.8	Planejamento experimental sequencial aplicado a FES.....	37
3.8.1	Teste de comparação de médias.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Materiais.....	40
4.1.1	Caroço do açaí.....	40
4.1.2	Microorganismo.....	40
4.1.3	Meios de cultura.....	40
4.2	Procedimento experimental	40
4.2.1	Preparação do inóculo.....	41
4.2.2	Preparação do substrato	43
4.2.3	Suplementação do meio para a fermentação em estado sólido	44
4.2.4	Inoculação do meio de fermentação em estado sólido	44
4.2.5	Planejamento fatorial 2^4 completo.....	45
4.2.6	Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	47
4.2.7	Fermentação em estado sólido (FES)	48
4.2.8	Extração do complexo enzimático.....	48
4.2.9	Teste de Tukey	49
4.3	Metodologia analítica.....	50
4.3.1	Quantificação das atividades enzimáticas	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1	Planejamento fatorial 2^4 completo	51

5.1.1	Atividade enzimática da CMCase pelo planejamento fatorial 2^4 completo.....	52
5.1.2	Atividade enzimática da xilanase para o planejamento fatorial 2^4 completo.....	54
5.2	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	57
5.2.1	Atividade enzimática da CMCase obtida no DCCR.....	58
5.2.2	Atividade enzimática da xilanase obtida no DCCR.....	64
5.3	Teste de Tukey.....	70
6	CONCLUSÕES.....	75
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria do açaí é uma das cadeias produtivas mais importantes da região Norte do Brasil, sobretudo para o estado do Pará. Somente na cidade de Belém existem cerca de 3 mil estabelecimentos que comercializam diariamente em torno de 305 toneladas do açaí (IBGE, 2008), gerando um excedente de 253 toneladas de lixo orgânico, constituído principalmente de caroços, descartados em sua maioria em lixões a céu aberto e cursos d'água. O desenvolvimento desta cadeia produtiva também depende da correta destinação de todos os subprodutos gerados, eliminando-se ao máximo o conceito de rejeito. Neste sentido, os subprodutos devem ser encarados como passíveis de valoração econômica, ganhando novo aspecto dentro da cadeia produtiva.

Adicionalmente, a busca de uma maior eficiência dos processos agroindustriais, com a utilização de tecnologias menos agressivas sob o ponto de vista ambiental e de baixo custo, com um menor consumo de reagentes e a produção de pouco ou nenhum resíduo, permitindo o controle mais simples e eficiente de sua eliminação, engloba o conceito de tecnologia limpa como o emprego de técnicas de reutilização, reciclagem e reaproveitamento desses materiais.

Os resíduos agroindustriais têm geração atrelada sempre à outra atividade produtiva, e muitas vezes não recebem tratamento adequado no momento de sua destinação, configurando-se um passivo ambiental. Disponibilizados em grande quantidade, são ricos em componentes lignocelulósicos. Estes componentes são hidratos de carbono continuamente reabastecidos pela redução fotossintética do dióxido de carbono pela energia da luz solar, configurando-se como a fonte natural renovável mais abundante do planeta.

Atualmente, diversos processos, como a fermentação em estado sólido (FES), têm sido desenvolvidos utilizando estes componentes lignocelulósicos para obtenção de produtos com alto valor agregado.

Neste contexto, o caroço do açaí destaca-se quanto sua utilização como substrato para FES por apresentar uma grande fração de celulose (53,20 %)

em sua composição, a qual pode ser utilizada pelo microorganismo fermentador na produção de enzimas celulolíticas de interesse comercial. Adicionalmente, a possibilidade de agregar valor a esse resíduo agroindustrial, geralmente tratado como lixo, e a geração em grande quantidade, a baixo custo, desperta interesse para pesquisas relacionadas ao seu aproveitamento eficiente e a redução dos impactos ambientais decorrentes de sua destinação final.

A bioconversão é uma das formas mais estudadas para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, porém algumas características desses materiais lignocelulósicos inibem sua degradação e/ou bioconversão. Os graus de cristalinidade e de lignificação, bem como a estrutura capilar da celulose, estão entre as maiores barreiras físicas e químicas a serem vencidas. Conseqüentemente, através da compreensão dessas estruturas é possível identificar as razões da resistência dos materiais lignocelulósicos à bioconversão (TENGERDY e SZAKACS, 2003; FUJITA et al, 2004).

A hidrólise enzimática vem se destacando como rota viável para a bioconversão. A utilização de enzimas altera a estrutura da biomassa celulósica e converte a celulose em açúcares fermentescíveis. Com várias aplicações industriais, a demanda de enzimas mais estáveis e altamente ativas tem crescido rapidamente, tendo seus principais exportadores localizados na Europa, Estados Unidos e Japão (INT, 2010).

Em todo o mundo, o custo de produção destas enzimas tem se apresentado como o maior problema para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais. De acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior do Governo Federal (ALICEWEB, 2010) sobre o mercado de enzimas do Brasil, no ano de 2009, as importações brasileiras ultrapassaram US\$ 71 milhões, enquanto as exportações atingiram US\$ 32,2 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, o que indica uma desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país.

Segundo Santos (2007), o mercado da tecnologia enzimática visa o desenvolvimento de tecnologias que possam reduzir os custos dos processos produtivos, além da minimização dos impactos ambientais. Atualmente o processo

de fermentação em estado sólido (FES) tem se destacado como promissor para a produção enzimática com a utilização de fungos filamentosos, que apresentam morfo-fisiologia adequada ao processo de fermentação e possuem importante papel na degradação de materiais orgânicos, possibilitando uma vasta aplicação biotecnológica.

No entanto, no processo de FES, um grande número de variáveis afeta o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a produção de metabólitos de interesse. Dentre estas, destaca-se a composição nutricional do meio de cultivo utilizado (SKOWRONEK e FIEDUREK, 2004).

Uma das principais funções do substrato na FES é fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento e metabolismo do fungo e, uma vez que o meio de cultura *in natura* não forneça a quantidade necessária de nutrientes, uma suplementação deve ser realizada em termos das fontes de nitrogênio, carbono e sais minerais. Indutores de crescimento e metabolismo podem compor a suplementação do meio quando um produto específico é desejado (SILVA e MELEIRO, 2004; SPIER, 2005). Outro fator importante para o processo de FES é a umidade do meio, que deve ser determinada considerando-se as características fisiológicas do microorganismo fermentador, bem como o produto desejado. Além disso, variáveis como temperatura, aeração e pH do meio influem significativamente no processo.

Uma vez que a biodegradação do caroço de açaí apresenta alto interesse social e econômico e que inexistem referências na literatura de trabalhos relacionando a utilização do caroço do açaí com a obtenção de produtos de alto valor agregado, como a produção de enzimas, a utilização desse resíduo agroindustrial como substrato para o processo de FES atribui um caráter inovador as pesquisas científicas com essa finalidade, além de agir como incentivo a novas descobertas quanto sua eficiente utilização em processos industriais.

No estudo deste processo, a metodologia do planejamento experimental sequencial pode ser utilizada para determinação e avaliação de variáveis que influenciam a produção enzimática com o aproveitamento do caroço do açaí como substrato. Segundo Rodrigues e lemma (2005), essa metodologia permite a obtenção de um maior número de informações a partir de um número reduzido de experimentos.

Assim, as variáveis estudadas foram: concentração de extrato de peptona de carne, concentração de extrato de levedura, concentração de carboximetilcelulose (CMC) e umidade inicial do meio. Celulases e xilanases foram as enzimas selecionadas por possuírem importante aplicação nos processos de conversão da biomassa com diversas aplicações industriais.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES), através do cultivo de uma linhagem selecionada do fungo filamentosso *Aspergillus niger*. De maneira específica os objetivos envolvem:

- Obtenção de enzimas carboximetilcelulases (CMCases) e xilanases pelo processo de fermentação em estado sólido (FES);
- Quantificar as atividade enzimáticas da CMCase e xilanase obtidas pelo processo de FES;
- Avaliar a influência das variáveis: i) concentração de extrato de peptona de carne; ii) concentração de extrato de levedura; iii) concentração de carboximetilcelulose (CMC); e iv) umidade inicial do meio no processo de produção enzimática pelo processo de FES;
- Identificar as variáveis significativas para a produção de CMCase e xilanase utilizando o caroço do açaí como substrato;
- Otimizar os valores das variáveis significativas para produção enzimática de CMCase e xilanase utilizando o caroço do açaí como substrato.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é constituída tipicamente por três principais frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (JEFFRIES, 1990). Essas frações majoritárias de hidratos de carbono são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais.

A celulose é o principal constituinte dos vegetais com uma síntese estimada em 4×10^7 toneladas por ano (KUBICEK, 1992), sendo assim o composto biológico terrestre mais abundante encontrado na Terra. É a matéria dominante do resíduo da agroindústria, na forma de talos, troncos, cascas e caroços; sendo também um dos principais produtos de resíduos naturais e de atividades produzidas pelo homem (GOKSOYR e ERIKSEN, 1980).

Como o amido, a celulose é um homopolímero linear composto por 8.000 a 12.000 moléculas de glicose (D-glicopiranoose) unidas por ligações glicosídicas β -1,4. Entretanto, ao contrário do amido, as cadeias lineares de celulose são tipicamente ordenadas paralelamente através de ligações de hidrogênio, as quais ocorrem ligadas à lignina e à hemicelulose (MATULOVA et al., 2005). Isso resulta em uma estrutura altamente ordenada, cristalina, insolúvel em água, resistente a despolimerização e a diversas condições reacionais (LYND; 1996, SILVA et al., 2009), e sua decomposição na natureza ocorre lentamente (ENARI, 1983).

O tamanho da molécula da celulose é normalmente expresso em termos do grau de polimerização, ou seja, o número de unidades de glicose presente em cada fibra. No entanto, a análise estrutural da cadeia polimérica informa que sua unidade de repetição é a celobiose (RAMOS, 2003; CASTRO, 2006) (Figura 1a). Isto se deve às ligações do tipo β , pelas quais os monômeros de glicose são unidos, fazendo com que moléculas adjacentes encontrem-se arranjadas com uma rotação de 180° entre si (STRYER, 1996). Este tipo de ligação permite a formação de fitas planas simetricamente dispostas que compõem uma estrutura altamente cristalina, estável e com uma alta força de tensão (ZHANG e LYND, 2004) (Figuras 1b e 1c).

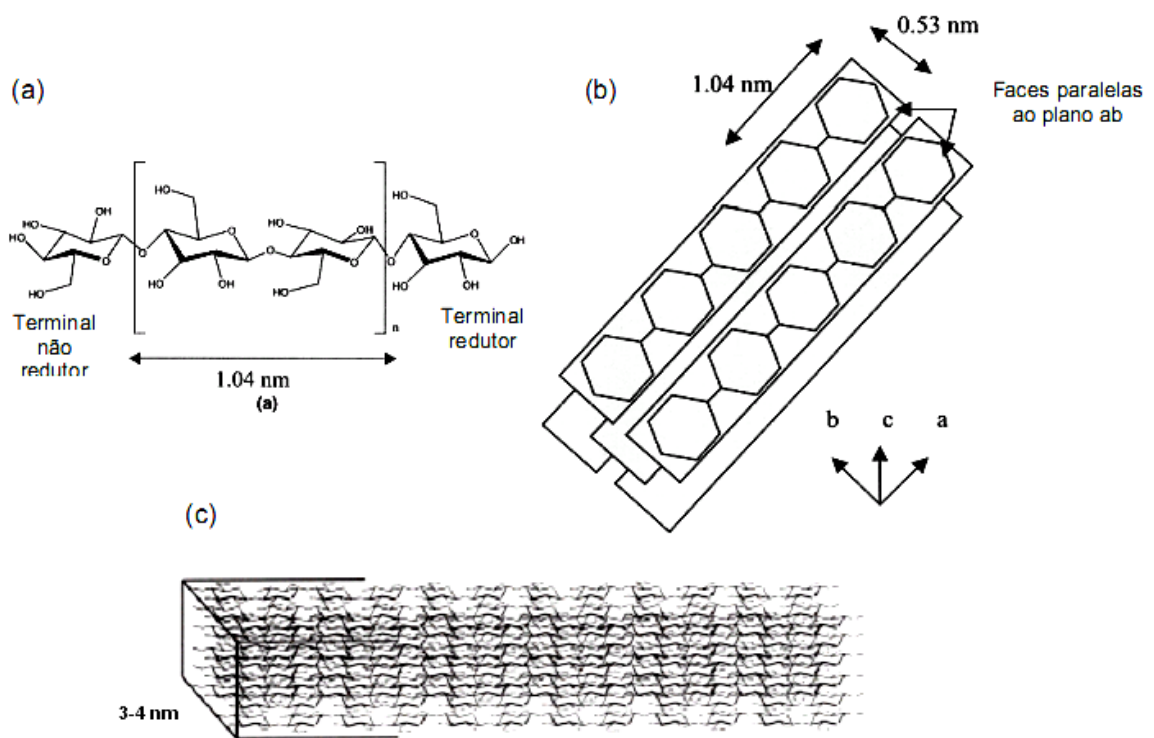


Figura 1. Estrutura da celulose. (a) Destaque para a unidade de repetição, celobiose; (b) Cristal de celulose; (c) Cadeia celulósica na forma de fibras elementares (adaptado de ZHANG e LYND, 2004 (Figuras a e b); RAMOS, 2003; CASTRO, 2006 (Figura c)

A hemicelulose, que, dependendo da espécie, é um heteropolímero ramificado de glicose ou xilose, cuja estrutura inclui pentoses, hexoses e ácidos urônicos, pode conter grupos acetil em suas cadeias laterais (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A hemicelulose liga-se por ligações de hidrogênio as microfibras de celulose, atuando como um elo químico entre a celulose e a lignina, fornecendo a espinha dorsal da parede celular.

A lignina é uma macromolécula composta por algumas estruturas fenólicas e cuja propriedade física principal é fornecer rigidez à planta (RAMOS, 2003), além de fornecer resistência a pestes e doenças. A presença de lignina na parede da célula, entretanto, impede a hidrólise enzimática dos hidratos de carbono. A estrutura dos materiais lignocelulósicos é esquematizada na Figura 2.

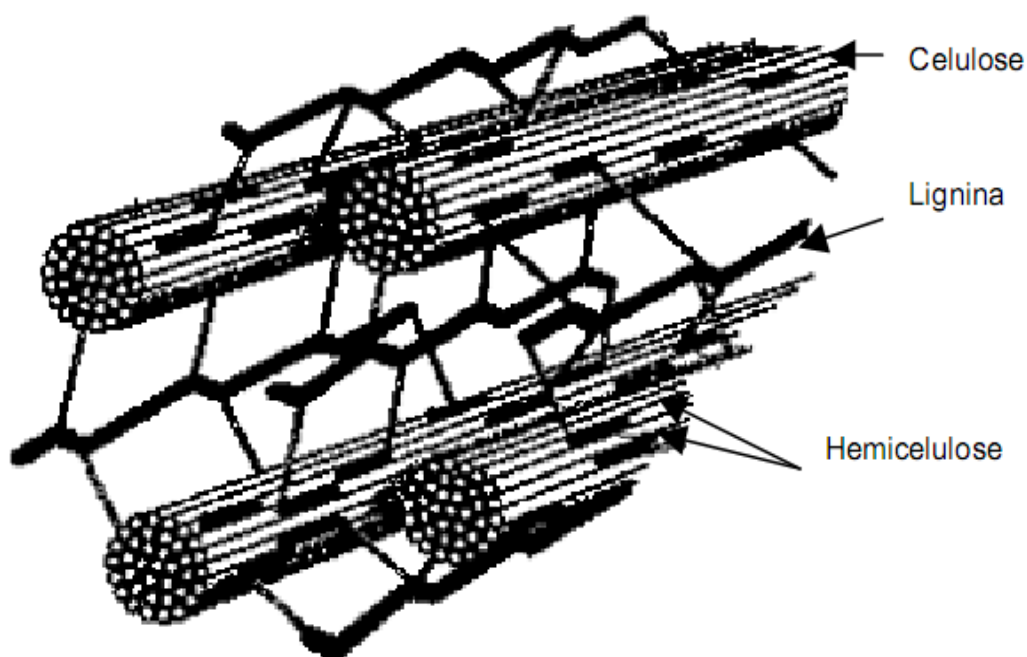


Figura 2. Estrutura da parede celular de biomassa lignocelulósicas (adaptado de SHLESER, 1994).

As paredes da célula vegetal são subdivididas em parede preliminar e parede secundária. A distribuição de celulose, de hemicelulose e de lignina varia consideravelmente entre estas camadas. A parede preliminar é uma camada fina, permeável e flexível em tecidos fisiologicamente ativos, mas pode tornar-se altamente lignificada dependendo da espécie. A parede secundária é formada por uma seqüência de três pequenas chapas, S1, S2 e S3, onde a camada central é geralmente mais grossa do que as outras. Em consequência, a maioria das propriedades da fibra, particularmente aquelas do interesse para a indústria de papel e celulose, são derivadas das características desta camada (RAMOS, 2003). A Figura 3 apresenta a estrutura esquematizada de uma fibra vegetal desde sua imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a 5 μm , até a celobiose, unidade de repetição da celulose, formada por duas moléculas de glicose.

A cristalinidade da celulose, a área de superfície acessível, a proteção da celulose pela lignina e a diversidade de componentes da biomassa contribuem para seu caráter recalcitrante à hidrólise (RYDHOLM, 1965; WENZEL, 1970; HSU et al., 1980; HSU, 1996; CHANG e HOLTZAPPLE, 2000). A variabilidade nestas características determina a digestibilidade variada entre fontes diferentes de biomassa lignocelulósicas (MOSIER et al., 2004). Entretanto, a cristalinidade sozinha é insuficiente para impedir significativamente a hidrólise se uma

concentração suficiente de enzimas for utilizada. Assim, uma alta concentração de enzimas é necessária para que a digestibilidade enzimática tenha rendimento superior a 20%, devido às características estruturais da biomassa celulósica.

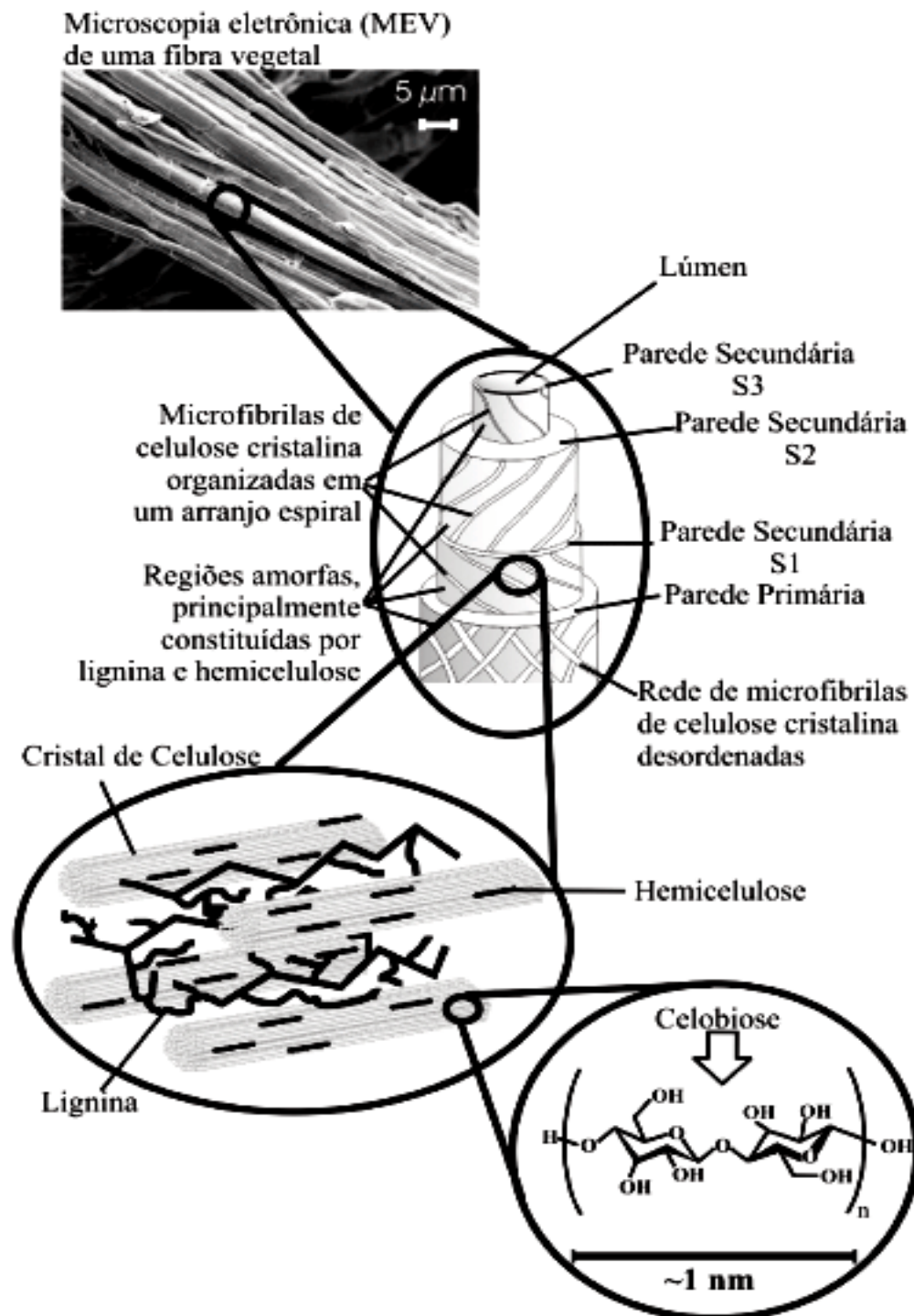


Figura 3. Estrutura de uma fibra vegetal (SILVA et al., 2009).

3.2 Fermentação em estado sólido (FES)

Os processos fermentativos de produção de enzimas podem ser conduzidos tanto em meio líquido, chamado de fermentação submersa (FS), quanto em meio sólido, chamado de fermentação em estado sólido (FES).

A fermentação em estado sólido é definida como o processo de desenvolvimento microbiano em superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microorganismo, isto é, isento de água livre (RAHARDJO et al., 2005), sendo estes materiais sólidos biodegradáveis ou não, com ou sem nutrientes solúveis.

Por ser um processo com baixos níveis de água residual, a FES apresenta-se como um processo industrial limpo. Pode ser classificada em dois tipos: i) as condições para o crescimento do microorganismo fermentador são propiciadas pelo próprio substrato; e ii) o crescimento do microorganismo ocorre em um suporte inerte. Em todos os casos é necessária à seleção da matéria-prima, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita e o controle da mesma, bem como a extração e a purificação dos produtos que se deseja. Dentre os parâmetros do processo, deve-se atentar a necessidade da utilização de pré-tratamentos do substrato, como a moagem e lavagem, e para fatores físico-químicos e bioquímicos: temperatura de incubação; transferência de massa (O_2 , CO_2) e de energia (calor produzido na fermentação); suplementação de nutrientes ao substrato (N, C, P); aeração; umidade relativa do sistema; entre outros (PANDEY, 2003; RAMOS, 2003; SILVERSTEIN, 2004; MOSIER et al., 2004; PITARELO, 2007).

O uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o *habitat* natural destes microorganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produção quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER et al., 2004). Sob o

ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada ao menor volume de efluente produzido e à possibilidade de conduzir o processo em condições semi-estéreis.

No entanto, o processo de fermentação em estado sólido apresenta como principais desvantagens a dificuldade de medida e controle da aeração, da temperatura e da umidade durante o processo. O tamanho das partículas do substrato interfere diretamente nessas variáveis. Partículas maiores aumentam a aeração e impedem o aquecimento do sistema pela respiração do fungo, porém limitam a superfície do substrato a qual o microorganismo tem acesso. Por outro lado partículas menores podem ocasionar a compactação do substrato, dificultando a aeração e o equilíbrio térmico do processo. Além disso, a homogeneidade das condições do meio também é dificultada pela não solubilização do substrato (HONG et al., 1988; RODRIGUES e SANT'ANNA, 2001).

3.3 Substrato sólido para a FES

O custo e a viabilidade de uso são os fatores primordiais a serem analisados na escolha do substrato mais adequado para a fermentação em estado sólido (PANDEY et al., 2000). A utilização de resíduos agroindustriais é vantajosa economicamente, uma vez que o custo do processo é minimizado, já que estes resíduos são sub-produtos de outras atividades industriais (COELHO et al., 2001), possuem geração em grande quantidade e, normalmente, não apresentam nenhum valor comercial. Além disso, sua destinação, muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento, acarreta a geração de problemas ambientais.

Segundo Alexandrino et al. (2007), nos últimos anos, há um crescente interesse no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos e enzimas.

Diversos resíduos agroindustriais, como os farelos de cereais, bagaço de cana de açúcar, mandioca e laranja, polpa de café entre outros, podem ser utilizados como substratos para FES. As estruturas básicas desses materiais

(celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, fibras) conferem as propriedades de sólidos aos substratos e, geralmente, servem de fontes de carbono e energia para o desenvolvimento do microorganismo fermentador (BRAVO et al., 2000; CAPUDI et al., 2003; CANUTO, 2006).

Atualmente, novos resíduos agroindustriais estão sendo estudados. Dentre estes, o caroço do açaí apresenta um grande potencial para utilização como substrato para FES devido a sua disponibilidade crescente e baixo custo, sobretudo na região Norte do Brasil.

3.3.1 Caroço do Açaí

Açaí é o nome popular do fruto de uma palmeira do gênero *Euterpe*, espécie *Euterpe oleracea*. De origem amazônica, é encontrado em estado silvestre e faz parte da vegetação das matas de terra firme, várzea ou igapó (BACELLAR, 2006), crescendo em touceiras (Figura 4a), compostas por vários estipes e pode chegar até 25 pés em cada touceira (REIS et al., 2002).

Fornecedor do principal produto do extrativismo vegetal da Região Norte do Brasil, o açazeiro é uma palmeira tropical de origem amazônica, em ecossistemas de várzea, cujo fruto, o açaí (Figura 4b), constitui grande relevância sócio-ambiental e econômica para a região, tendo sua produção e comercialização concentradas em uma área não muito grande. Utilizado na alimentação por grande parte da população apresenta crescente utilização na indústria fármaco-alimentícia e produtos para exportação (ROGEZ, 2000; NASCIMENTO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008; SCHIRMANN, 2009).

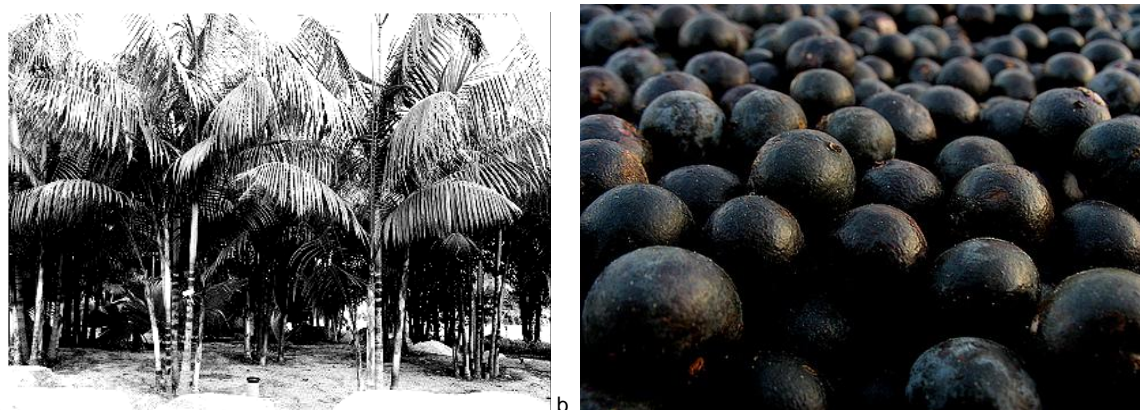


Figura 4. (a) Açazeiro em várias touceiras e (b) o fruto do açazeiro (adaptado de REIS et al., 2002).

Do fruto do açazeiro é obtida uma bebida chamada de “vinho”, principal produto da indústria do açaí. A produtividade da *Euterpe oleracea*, nas várzeas periodicamente inundáveis, concentra-se nos meses de julho a novembro. Segundo dados do IBGE (2008), o Estado do Pará é responsável por 92,2 % da produção nacional de açaí com 111.460 toneladas por ano do fruto. Esta produção supera em 11,9 % a registrada no ano anterior (2007), evidenciando o aumento da produção da agroindústria do açaí. Deste total, 92.512 toneladas por ano é de resíduo (caroço), ou seja, cerca de 83% do total produzido.

Ainda sem destinação ambiental adequada, o caroço vem sendo jogado pelas ruas e nos lixões, sem nenhum tratamento. Por vezes, é queimado para a geração de energia elétrica, contribuindo com a emissão de CO₂ para a atmosfera.

Principal subproduto da indústria de processamento do açaí, o caroço do açaí é uma semente oleaginosa formada por um pequeno endosperma sólido ligado a um tegumento que na maturidade é rico em celulose. Rodríguez-Zúñiga et al. (2008) reportam que o caroço do açaí é composto por 53,20 % de celulose, 12,26 % de hemicelulose e 22,30 % de lignina. A Tabela 1 apresenta a análise comparativa da composição química dos principais componentes do caroço do açaí, farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar, madeira dura e madeira mole.

Tabela 1 Composição química de alguns materiais lignocelulósicos

<i>Componentes</i>	<i>Caroço do açaí</i>	<i>Farelo de trigo</i>	<i>Bagaço de cana de açúcar</i>	<i>Madeira dura</i>	<i>Madeira mole</i>
Celulose (%)	53,20	10,90	46,86	40-55	45-50
Hemicelulose (%)	12,26	23,71	27,50	24-40	25-35
Lignina (%)	22,30	4,90	26,27	18-25	25-35
Proteínas (%)	5,20	17,60	-	-	-

(Fonte: SAHA, 2001; HOWARD et al., 2003; CANILHA et al., 2007; SILVA, 2007)

O grau de celulose de 53,20 % presente no caroço do açaí é alto em relação a outros resíduos agroindustriais, como farelo de trigo (10,90 %), atraindo atenção para sua utilização como substrato no processo de produção de enzimas. No entanto, o alto teor de lignina e baixo teor de proteínas conferem ao caroço do açaí pouca susceptibilidade aos processos enzimáticos.

Segundo Teixeira et al. (2004), o caroço do açaí apresenta quimicamente 97,40 % de matéria orgânica, 2,60 % de cinza, relação C/N 48,50, pH 5,05; 1,17 % de N; 0,13 % de P₂O₅; 0,49 % de K₂O; 0,06 % de Ca; 0,02 % de Mg; e 0,19 % de S; 180 mg kg⁻¹ de Fe; 258 mg kg⁻¹ de Mn; 13,5 mg kg⁻¹ de Cu; 28 mg kg⁻¹ de Zn e 42,5 mg kg⁻¹ de B. Adicionalmente, conforme Nogueira (2007), esse resíduo disponibiliza um potencial energético de 4500 kcal kg⁻¹.

Por conter taninos, o caroço do açaí possui sabor adstringente sendo indigesto para formulação de ração animal, além de apresentar baixo valor nutricional para ruminantes, requerendo etapas complementares de beneficiamento, o que acarreta o aumento dos custos de produção (VALADARES FILHO et al., 2006).

Assim, a utilização do caroço do açaí como substrato para o processo de FES mostra-se promissor frente a sua composição química e baixo custo de aquisição. A geração crescente e a concentração da produção em uma pequena área da Região Norte brasileira garantem a sustentabilidade de seu fornecimento à indústria de tecnologia enzimática.

3.4 Suplementação do meio para a FES

Um grande número de variáveis afeta a produção de compostos por fungos, dentre elas destaca-se a composição do meio de cultura utilizado (SKOWRONEK e FIEDUREK, 2004). Quando o fungo é cultivado em laboratório, se o meio de cultura *in natura* não fornecer uma quantidade necessária de nutrientes, uma suplementação deve ser realizada.

Segundo Cruz et al. (2001), os elementos essenciais encontrados nos principais nutrientes usados por fungos, quanto à quantidade, são o carbono e o nitrogênio, sendo que o fornecimento destes dois elementos pode ser determinado visando a assimilação ou o metabolismo, constituindo parâmetros importantes na regulação do crescimento e do metabolismo celular.

O nitrogênio é um macro elemento naturalmente encontrado na forma de amônio ou nitrato. Participante da síntese de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, o nitrogênio é de vital importância para o desenvolvimento do fungo. As fontes de nitrogênio podem ser inorgânicas na forma de sais de nitritos, nitratos ou amônio, ou orgânicas na forma de uréia, aminoácidos, extrato de peptona (animal ou vegetal) ou extrato de levedura. A escolha de um destes compostos depende do tipo de microorganismo utilizado (PUTZKE e PUTZKE, 2002).

Segundo Cereia et al. (2000); Shafiq et al. (2002) e Rustiguel (2009), as fontes de carbono e nitrogênio interferem na produção e na secreção de amilases, celulasas e de outras enzimas de interesse por fungos do gênero *Aspergillus*. Adicionalmente, Slivinski (2007) cita vários autores (ELLAIAH et al., 2002; PESSOA et al., 2003; BERTOLIN et al., 2003; ANTO et al., 2006) que relatam a utilização de uréia, peptona de carne (hidrolisado de proteína animal) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fontes suplementares deste macronutriente resultam em aumento significativo na produção dessas enzimas.

Fujii et al. (2004) constataram a preferência de diversas espécies de fungos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.*) por fontes de nitrogênio definidas (extrato de levedura – autolisado de *Saccharomyces cerevisiae*) ao invés de fontes de nitrogênio complexas para o seu desenvolvimento celular e metabolismo.

Em relação às fontes de carbono, a utilização de glicose vem sendo relatada na literatura como fonte eficiente de suplementação. No entanto, Vitti (1988) e Camargo et al. (2005) observaram que as celuloses que não são facilmente hidrolisadas pelas celulasas, como Avicel, algodão, celulose em pó e carboximetilcelulose (CMC) parecem ser os melhores substratos para induzir a produção de celulasas por fungos (gêneros *Aspergillus* e *Thichoderma*).

As concentrações e a seleção das fontes nitrogênio e a presença dos indutores devem ser consideradas para a suplementação do meio, a fim de se obter o máximo desenvolvimento e rendimento do microorganismo produtor de enzimas. Segundo Lima et al. (2001), o meio deve, igualmente, fornecer fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas. Os macros e micronutrientes participam do metabolismo celular, principalmente na elaboração de ácidos nucléicos e como cofatores de várias enzimas.

3.5 Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

A conversão efetiva do material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis através da hidrólise enzimática requer, geralmente, a realização de um pré-tratamento, uma vez que a presença da lignina e da hemicelulose dificultam o acesso das enzimas, reduzindo a eficiência da hidrólise (MOSIER et al., 2004).

Ainda segundo Mosier et al. (2004) e Silverstein (2004), o pré-tratamento visa, além do rompimento das estruturas da lignina e da hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade do material. Os métodos de pré-tratamentos podem ser caracterizados como físicos, químicos físico-químicos e microbiológicos. Dentre os pré-tratamentos físicos destacam-se a trituração (redução mecânica do tamanho das partículas da biomassa) e explosão a vapor. Hidrotermólise, hidrólise ácida e hidrólise alcalina são alguns exemplos de pré-tratamentos químicos utilizados em alguns materiais lignocelulósicos (MOSIER et al., 2004; SILVERSTEIN, 2004; BAUDEL, 2006; PITARELO, 2007).

Um pré-tratamento eficaz é caracterizado por diversos critérios. Dentre estes se destacam: a preservação das frações de pentose (hemicelulose) e a minimização do custo das necessidades operacionais e dos limites de energia

requeridos no processo. Estas propriedades, junto com outras incluindo o baixo custo do catalisador (utilizado para diminuir a energia de ativação no processo de mudança de conformação estrutural do material) no pré-tratamento ou a utilização de catalisadores recicláveis, e a geração de co-produtos de lignina formam uma base da comparação para as várias opções do pré-tratamento (MOSIER et al., 2004).

3.6 Enzimas

As enzimas são biomoléculas com propriedades catalíticas importantes, tais como alta conversão, especificidade na transformação substrato-produto e elevada atividade em condições de temperatura e pressão amenas. Assim, a sua aplicação como catalisador em processos é de grande interesse (CASTILHO et al., 1996 *apud* MENEZES, 2006, LEHNINGER, 2006).

As enzimas comerciais podem ser encontradas solubilizadas ou em pó. Enzimas, em geral, são solúveis em água e praticamente insolúveis em álcool, clorofórmio e éter. Os preparados enzimáticos líquidos estão geralmente em soluções aquosas, tendo ponto de ebulição levemente acima de 100 °C e apresentam coloração marrom escura, enquanto os preparados enzimáticos sólidos encontram-se na forma de pó fino e não cristalino, cuja cor varia do branco ao marrom claro (NOSB, 1999 *apud* MENEZES, 2006).

As preparações enzimáticas comerciais são obtidas de fontes animais, vegetais ou por fermentação com o uso de microorganismos (BORRIS, 1987). As células microbianas presentes no processo de fermentação são fontes potenciais de enzimas, oferecendo uma série de vantagens: permitem um aumento de produção em menor tempo, possuem facilidade de serem cultivadas em ambientes controlados, além de permitirem a produção de várias enzimas dependendo das condições de cultivo (FROST e MOSS, 1987).

Segundo Menezes (2006), a aplicação industrial de enzimas é determinada pela sua especificidade, atividade, estabilidade de armazenamento e uso, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é influenciada pela sua concentração e a do seu substrato, concentração de cofatores, efetores alostéricos, presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e

tempo de reação. A maneira como cada uma destas variáveis afeta a atividade enzimática é objeto de estudo da cinética enzimática.

3.6.1 Atividade enzimática

As enzimas apresentam a capacidade de reagir com determinados componentes celulares (substratos) formando produtos. Esta capacidade, denominada atividade enzimática, depende da estrutura da proteína, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo dessas cadeias na molécula e da natureza do substrato (KIRK et al., 2002).

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Segundo Vitti et al. (2007), uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto, nas condições estabelecidas do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por grama de proteína (U g^{-1}).

3.6.2 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos

A hidrólise ácida e a hidrólise enzimática são as tecnologias envolvidas no processo de produção de etanol a partir de material lignocelulósico. A hidrólise ácida utiliza processos à base de ácidos fortes (H_2SO_4), o que em termos econômicos e ambientais é desfavorável (LYND, 1996). Já a conversão enzimática de resíduos lignocelulósicos para a obtenção de açúcares fermentescíveis tem sido apontada como a rota alternativa promissora e de grande interesse industrial para o aumento da produtividade do etanol (OGIER et al., 1999; WYMAN, 1999; KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004). Fatores que influenciam a hidrólise enzimática incluem o tipo do material, a quantidade de enzimas, as condições da reação, como temperatura e pH, e inibidores do produto final.

Na natureza, o grau de ordenação da celulose requer que os microorganismos celulolíticos produzam uma complexa mistura de enzimas, as celulases, para efetuar a degradação da celulose cristalina. Esse complexo de enzimas é necessário para a solubilização completa e efetiva da celulose no processo de hidrólise (HIMMEL et al., 1999).

Atualmente, o mecanismo de hidrólise enzimática mais aceito descreve a ação sinérgica de três classes principais de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases ou celobiasas (ZHANG e LYND, 2004). Adicionalmente, a presença de enzimas auxiliares tem importante função no aumento do rendimento do processo. Pectinases e xilanases são exemplos de enzimas auxiliares atuam sobre o substrato liberando açúcares fermentescíveis.

3.6.3 Enzimas endoglucanases

Enzimas endoglucanases (EC 3.2.1.4) pertencem ao complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, atuando sobre celooligossacarídeos, celulose contendo ácido fosfórico, celulose substituída como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC), liberando oligossacarídeos e causando mudança rápida no grau de polimerização (ZHANG e LYND, 2004).

3.6.4 Enzimas exoglucanases

Enzimas exoglucanase (EC 3.2.1.91) clivam a celulose cristalina a partir do terminal redutor e não redutor da cadeia desses polímeros, liberando celobiose, um dissacarídeo resultante da hidrólise parcial da celulose. Essas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela ruptura física do substrato, promovendo aumento na taxa de hidrólise da celulose por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (ZHANG e LYND, 2004).

3.6.5 Enzimas β -glucosidases ou celobiasas

Enzimas celobiasas (EC 3.2.1.21) hidrolisam ligações glicosídicas β -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos solúveis, com liberação de glicose (ZHANG et al., 2006).

A figura 5 apresenta o esquema sinérgico entre as três classes de enzimas clivando a fibra celulósica à glicose (glicose).

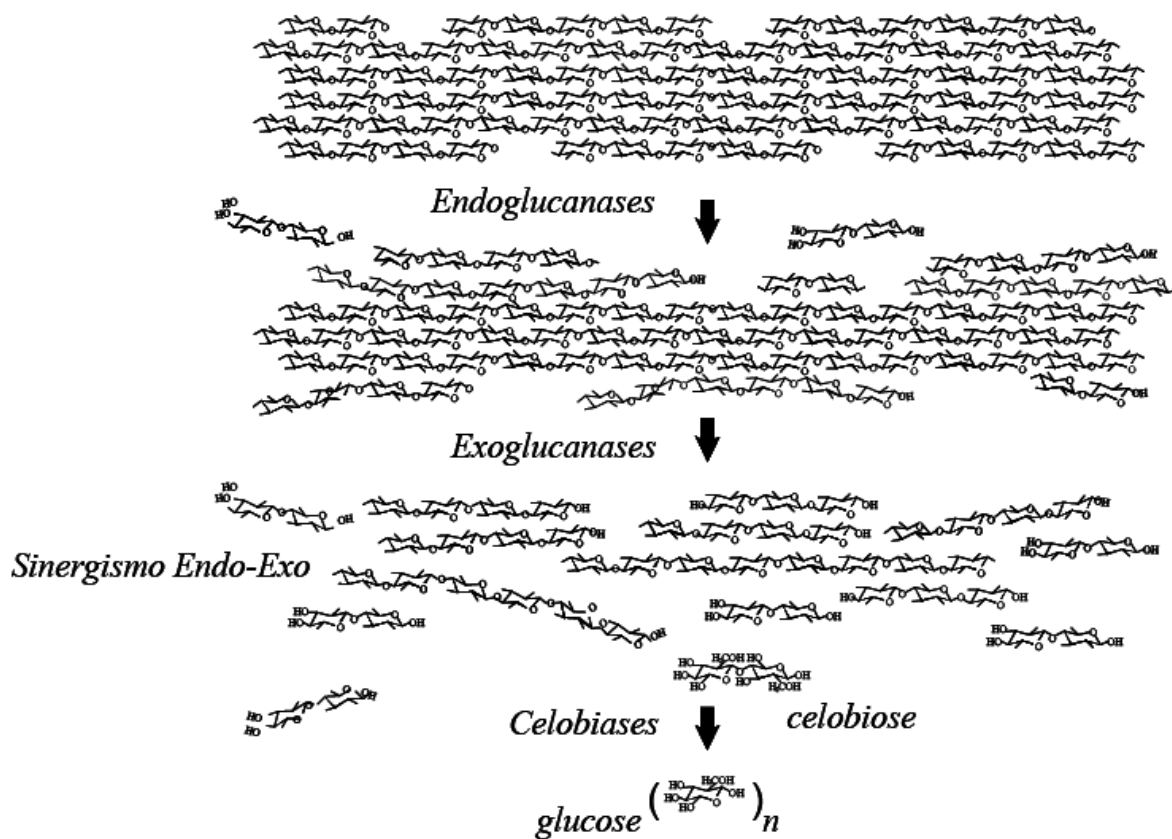


Figura 5. Sinergismo entre endoglucanases, exoglucanases e celobiases no sistema celulase de fungos (MARTINS, 2005).

3.6.6 Enzimas xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) são as enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, que é o principal polissacarídeo constituinte das hemiceluloses. A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal.

Este grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas dificultando a ação das celulases durante o processo de sacarificação (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008).

3.7 Microorganismo produtor de enzimas

Os microorganismos produtores de enzimas hidrolíticas são geralmente encontrados em toda biota onde há acúmulo de resíduo celulósico, e ocorrem em populações mistas compreendendo espécies celulolíticas e não

celulolíticas, as quais agem muitas vezes em associação. Além disso, os ecossistemas microbianos são comunidades com enorme potencial de aquisição de diversidade genética (WHITMAN et al., 1998).

Em seu trabalho, Rodrigues (2008), citando diversos autores (BEGUIN, 1990; BAYER et al., 1998; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; ZHANG et al., 2006), indica que as celulasas podem ser produzidas por uma vasta e diversa população fúngica, tais como os dos gêneros *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Phoma* e bactérias aeróbicas e anaeróbicas: Anaeróbicas: *Acetovibrio*, *Bacteróides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Pseudonocardia*, *Ruminococcus* e *Thermoanaerobacter*. Aeróbicas: *Acidothermus*, *Bacillus*, *Celvibrio*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* e *Xanthomonas*.

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* destacam-se como importantes microorganismos produtores de enzimas celulolíticas.

3.7.1 Fungos filamentosos

Conforme Menezes (2006), a denominação fungos filamentosos abrange os fungos formados por hifas, uni ou pluricelulares, que formam revestimentos esbranquiçados ou coloridos, sobre o substrato onde crescem. São descritas mais de 100.000 espécies, distribuídas em aproximadamente 3.000 gêneros. As células em formato tubuliforme são ricas em exo e endoenzimas. Um emaranhado de hifas constitui o micélio.

Os fungos filamentosos constituem, atualmente, materiais biológicos ideais para produção de substâncias de interesse biotecnológico, possuindo crescimento rápido e baixo custo de cultivo, possibilitando cultivos sob condições controladas em laboratório (SIMÕES e TAUK-TORNISIELO, 2005). Ainda segundo Menezes (2006), citando Lonsane et al. (1985), nas fermentações em estado sólido o crescimento do fungo acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinada pela disponibilidade dos nutrientes e pelas características do substrato. Dentre as espécies de fungos filamentosos mais utilizados no processo de FES destacam os do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Nos últimos anos, é crescente o desenvolvimento de trabalhos com a utilização desses fungos em processos de fermentação em estado sólido. Gupta e Madamwar (1997) descrevem que uma cultura mista de *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* desenvolvida em bagaço de cana de açúcar pré-tratado com solução de hidróxido de cálcio a 2% foi favorável à produção de celulases e β -glicosidase, após 8 dias de fermentação.

Lima et al. (2009) relatam a produção de CMCase e FPase com a utilização de farelo de trigo, farelo de cevada e bagaço de cana suplementado com nitrato de sódio, a partir de *A. fumigatus*, em 4 dias de FES. De maneira análoga, Liu e Yang (2007) obtiveram celulases (FPase e CMCase) utilizando *Trichoderma koningii* em FES, a partir de resíduos da indústria de vinagre. Uma linhagem mutante de *Aspergillus foetidus* foi utilizada por Chapla et. al. (2010) para produção de xilanase por FES adotando farelo de trigo, bagaço de cana, sabugo de milho e palha de arroz como substratos. Alguns trabalhos utilizando *Aspergillus niger* são citados no item seguinte.

3.7.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é um fungo filamentososo e uma das mais comuns espécies do gênero *Aspergillus*. A classificação taxionômica do *A. niger* é apresentado a seguir.

Taxionomia:

Domínio: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Subfilo: *Pezizomycotina*

Classe: *Eurotiomycetes*

Ordem: *Eurotiales*

Família: *Trichocomaceae*

Gênero: *Aspergillus*

Espécie: *Aspergillus niger*

O *Aspergillus niger* é onipresente no solo possuindo importante função na decomposição de matéria orgânica no meio ambiente. De fácil manipulação, esse fungo é capaz de sintetizar uma ampla faixa de enzimas lignocelulolíticas a partir de uma grande variedade de matérias primas de baixo custo (CHANG, 2001; SPIER, 2005, SLIVINSKI, 2007).

Os conídios são relativamente grandes, com diâmetro entre 15 a 130 µm, sendo de coloração negra (*niger*), comumente denominado “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com Prado (2002) e Slivinski (2007), este fungo apresenta colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente forma milhares de esporos. As formas mutantes desta espécie também são bastante utilizadas, já que o rendimento de um processo enzimático produtivo pode ser melhorado através da seleção de mutantes que sejam mais resistentes à repressão catabólica e que sintetizem maiores quantidades de enzima sem a presença de um indutor (MENEZES, 2006).

Fotos do microorganismo em microscopia eletrônica do aparato reprodutivo assexuado e imagens das colônias observadas no cultivo em ágar em placa de Petri são apresentadas na Figura 6a e 6b, respectivamente.

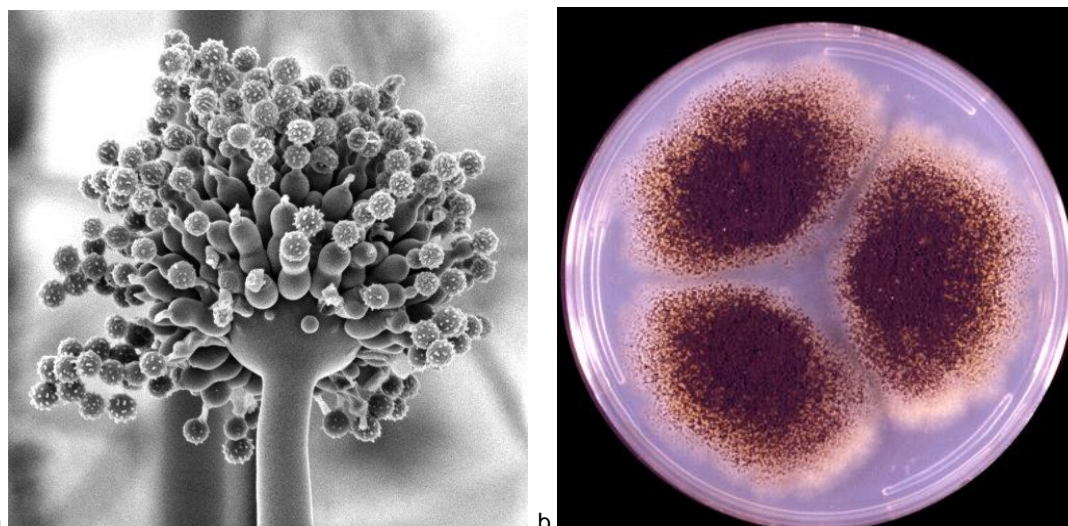


Figura 6. *Aspergillus niger*. Microscopia eletrônica do aparato reprodutivo assexuado (a) e imagens das colônias cultivadas em ágar em placa de Petri (b) (adaptado READ, 1991 e SLIVINSKI, 2007).

O *A. niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos recobertos por conídios negros, apresentados na Figura 6a (SLIVINSKI, 2007). Os conídios, esporos assexuados capazes de gerar novos organismos em condições favoráveis.

A Figura 6b apresenta colônias de *A. niger* em fase de esporulação. Os esporos são visualizados com coloração escura.

Amplamente relatado como microorganismo fermentador, o fungo *A. niger* tem sido utilizado como produtor de enzimas celulolíticas, ácidos orgânicos e outros produtos com alto valor agregado através de processos de fermentação em estado sólido (PRASERTSAN et al., 1997; SKOWRONEK e FIEDUREK, 2004; CASTRO, 2006; CHANDRA et al., 2007; CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Esse fungo atende diversas exigências para a produção comercial de enzimas, dentre as quais, destacam-se a capacidade de crescer em substrato de baixo custo e a produção, em velocidade elevada, de enzimas estáveis a variações de temperatura e pH, além de serem de fácil recuperação (SLIVINSKI, 2007).

A produção de enzimas por *Aspergillus niger* em FES vem sendo amplamente investigada, havendo relatos de estudos que compreendem desde as condições ótimas de crescimento do fungo até estudos de caracterização e purificação dos extratos enzimáticos obtidos. Esse fungo pode ser considerado, algumas vezes, superior a outros fungos reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como os pertencentes ao gênero *Trichoderma*. (AGUIAR e MENEZES, 2000).

Em seu trabalho, Slivinski (2007) estudou a purificação e caracterização bioquímica de glucoamilases produzidas por *A. niger* através de FES. O resíduo de uma indústria de processamento de batata foi utilizado como substrato sólido indutor para produção enzimática, sendo fermentado por um período de 96 h, a 32 °C.

Vilhena e Gutiérrez-Correa (2007), visando à obtenção de enzimas lignocelulolíticas, avaliaram a influência de etileno-glicol na adesão dos esporos e germinação de *A. niger* em fermentação submersa e em biofilmes formados em tecidos de poliéster. Os valores máximos obtidos para atividades enzimáticas de endoglucanase e xilanase foram muito maiores nas fermentações em biofilmes (4,70 e 4,61 IU mL⁻¹, respectivamente) em relação as fermentações submersas (1,31 e 2,30 IU mL⁻¹, endoglucanase e xilanase, respectivamente).

Maciel et al. (2008) avaliaram a produção de xilanase pelo fungo *A. niger* no processo de FES utilizando substratos lignocelulósicos, compostos por diferentes razões de bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. Foi utilizado um planejamento estatístico experimental visando à otimização das condições. A maior atividade enzimática da xilanase (3.09 IU g^{-1}) foi obtida nos ensaios contendo bagaço de cana de açúcar e farelo de soja na proporção de 1,86 : 1, com unidade inicial do meio de 85 %, pH 6,0 e temperatura de 30 °C.

3.8 Planejamento experimental sequencial aplicado a FES

Em um sistema diversos fatores ou variáveis influenciam a resposta desejada. Assim, experimentos de triagem (screening) podem ser executados para avaliar um grande número de variáveis, bem como suas interações, com o objetivo de determinar quais desses fatores apresentam influência estatisticamente significativa sobre diferentes respostas de interesse.

Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema, é preciso avaliar a metodologia experimental (tempo, custo, etc.). As variáveis que não foram selecionadas nessa etapa devem ser fixadas e controladas durante todo o processo de fermentação. Em uma etapa seguinte, deve-se escolher qual planejamento usar, fatorial completo ou fracionário, para estimar a influência (o efeito) das diferentes variáveis no resultado (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Em seguida, a metodologia estatística do delineamento composto central rotacional (DCCR) pode ser executada quando se busca a otimização dos parâmetros das variáveis identificadas como significativas para o processo. Otimizar, ou aperfeiçoar, segundo Teófilo e Ferreira (2006), significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores.

O delineamento composto central rotacional (DCCR) possui características interessantes para a busca do ponto da região ótima, que são: um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e a possibilidade de ser realizado seqüencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização das condições experimentais envolvidas no sistema (MATEUS et al., 2001).

Ainda segundo Mateus et al. (2001), o DCCR é constituído basicamente de uma parte fatorial (ou fração de um fatorial) com dois níveis +1 e -1 (que permite estimar todos os efeitos de primeiro grau e os efeitos das interações), e de pontos axiais ou estrela nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ de cada fator para o nível médio dos demais fatores que partem de um ponto ou mais pontos localizados no centro do delineamento.

Aliado ao DCCR, uma metodologia de análise de superfícies de respostas e análise de resíduos podem ser utilizado no auxílio da definição das melhores condições operacionais. A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

A análise de resíduos consiste em: teste de significância do ajuste do modelo, baseados na análise de variância (ANOVA), para verificar a qualidade desse ajuste; na determinação do coeficiente de determinação (R^2), que fornece uma medida da proporção da variação (através da equação de regressão); e o teste F, que avalia se a regressão foi significativa ou não (RODRIGUES e IEMMA, 2005; BRANDÃO, 2007; BRANDÃO et al., 2008).

Um planejamento experimental construído para estimar coeficientes, segundo algum modelo aproximado, deve reunir certos critérios desejáveis, sendo os principais: proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos e, fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste (MYERS e MONTGOMERY, 2002).

Neste trabalho foi utilizado um planejamento experimental para determinar a melhor composição do meio de suplementação nutricional adicionada ao caroço do açaí no processo de fermentação em estado sólido com o fungo *A. niger*. O fornecimento de uma suplementação do meio com tipos e quantidades de nutrientes adequados as necessidades do fungo fermentador, bem como a utilização do caroço do açaí como substrato de baixo custo no processo de FES,

tende a elevar a produção enzimática sem que os custos do processo o inviabilizem economicamente.

3.8.1 Teste de comparação de médias

Testes de comparação de médias, ou testes de comparação múltipla, avaliam o efeito dos tratamentos em estudo atuando como complemento ao teste F da análise de variância (ANOVA), quando este for significativo para os resultados obtidos. São utilizados para identificar diferenças estatisticamente significativas entre pares de médias, adotando-se um único nível de significância. Os testes *t-Student*, Scheffé, Duncan, Dunnett e Bonferroni e Tukey são alguns dos testes citados na literatura.

O teste de Tukey, utilizado neste trabalho, destaca-se por ser rigoroso e apresentar facilidade de aplicação. Consiste em calcular o valor $D_{crít}$, acima do qual a diferença entre duas médias amostrais (em absoluto) é significativamente diferente de zero. A fórmula utilizada para o cálculo de $D_{crít}$ é apresentado na equação 1

$$D_{crít} = \frac{q_{r, n_T - r}}{\sqrt{2}} \sqrt{QME \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} \quad (1)$$

onde, $q_{r, n_T - r}$ representa o valor tabelado (vindo de uma distribuição da amplitude studentizada – “studentized range”) associado ao nível de significância adotado; e QME representa a média quadrática do erro associado aos resultados obtidos nos experimentos (RENNÓ, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Caroço do açaí

O caroço do açaí utilizado como substrato para a FES foi obtido a partir do despulpamento do fruto do açaizeiro (Amazon fruit - Belém, PA) em novembro de 2008, sendo armazenado em saco de ráfia, a temperatura ambiente e sem exposição à luz solar, não sendo identificada degradação nesse período. Posteriormente, o caroço do açaí foi moído em moinho de facas (peneira 4 mm) e mantido sob congelamento a -18 °C.

4.1.2 Microorganismo fermentador

Como agente de fermentação foi utilizado uma linhagem do fungo filamentosos *Aspergillus niger* da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ), armazenada em solo estéril e sob condições de congelamento a -18 °C.

4.1.3 Meios de cultura

Os meios utilizados na fermentação em estado sólido tiveram como base o meio desenvolvido por Mandels e Weber (1969), suplementado com as fontes de nitrogênio (extrato de peptona de carne e extrato de levedura) e de um indutor de produção de celulasas (carboximetilcelulose – CMC), em diferentes concentrações conforme o planejamento experimental (item 4.2.5).

4.2 Procedimento experimental

Na Figura 7 é apresentado o fluxograma da sequência experimental de produção, extração e quantificação da atividade de CMCase e xilanase pelo processo de fermentação em estado sólido. Todo o processo inicia-se na preparação do inóculo do fungo fermentador, do substrato (caroço do açaí) e da solução de suplementação nutricional do meio, definida no planejamento fatorial 2⁴

completo (item 4.2.5). Posteriormente, os fermentadores (frascos erlenmeyer 250 mL), contendo todos os elementos, são acondicionados em estufa a 32° C. Após o período de 72 h, é feita a extração do complexo enzimático (item 4.2.8) e quantificação das atividades das enzimas CMCase e xilanase (item 4.3.1).

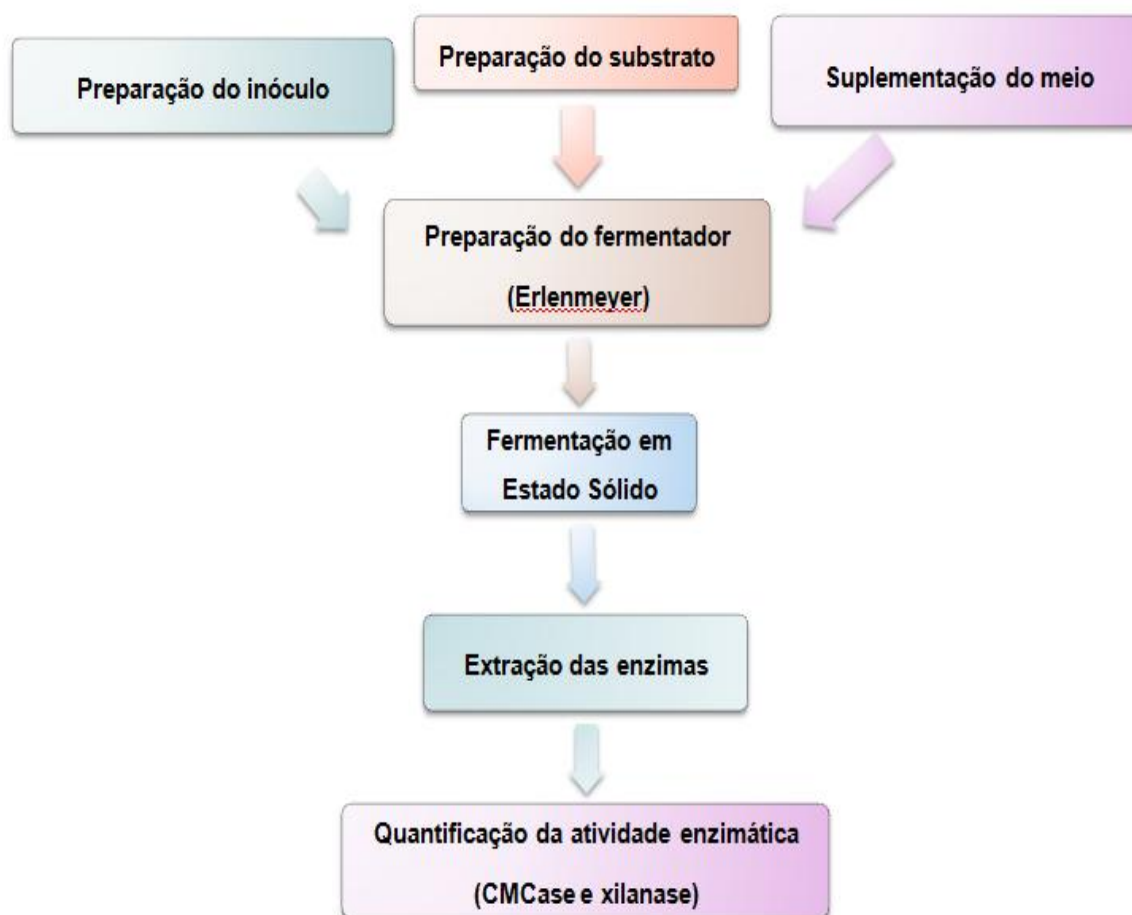


Figura 7. Fluxograma para produção, extração e quantificação da atividade de CMCase e xilanase por FES

4.2.1 Preparação do inóculo

A preparação do inóculo para a FES seguiu a metodologia descrita por COURI e FARIAS (1995). Em tubos com crescimento de *A. niger* em meio de cultura (Tabela 2) foram adicionados, com técnica asséptica, 5 mL de solução surfactante (TWEEN 80® - REAGEN) a 0,3 %, e passada uma alça de platina na superfície do meio para o total desprendimento dos conídios, utilizando capela de fluxo laminar e manipulação asséptica. Um volume de 1 mL dessa suspensão de conídios foi transferido para o meio de sabugo de milho, e incubado em estufa a 32 °C por 5 dias. O sabugo de milho foi triturado em moinho de facas (peneira de 4 mm). Um

volume de 6 mL do meio (Tabela 3) foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL contendo 4,6 g de farelo de sabugo de milho. A mistura foi esterilizada em autoclave a 121 °C, 1 kgf cm² (1 atm), durante 20 minutos.

Tabela 2 Composição do meio de cultura utilizado na preparação do inóculo

Componente	Concentração (g L⁻¹)
Nitrato de sódio P.A.	3,00
Fosfato dibásico de potássio P.A. (K ₂ HPO ₄)	1,00
Sulfato de Magnésio P.A. (MgSO ₄)	0,50
Cloreto de Potássio P.A. (KCl)	0,50
Sulfato de Ferroso P.A. (FeSO ₄ . 7 H ₂ O)	0,01
Ágar-ágar P.A.	30,00

Fonte: COURI e FARIAS, 1995

Tabela 3 Soluções para preparo do meio de sabugo de milho

Solução A:	
KHPO ₄	20,00 g
H ₂ O destilada	100,00 mL
Solução B:	
ZnSO ₄	3,96 g
FeSO ₄	4,60 g
MnSO ₄	0,01 g
H ₂ SO ₄ (95 - 97 %)	0,50 mL
H ₂ O destilada	100,00 mL
Solução C:	
Peptona	2,80 g
HCL 2 mol L ⁻¹	0,05 mL
Solução A	0,19 mL
Solução B	0,025 mL
H ₂ O destilada	50,00 mL

Fonte: COURI e FARIAS, 1995

Adicionou-se 100 mL da solução de surfactante (TWEEN 80[®] - REAGEN) a 0,3 % ao frasco que continha o sabugo de milho e os conídios incubados, utilizando capela de fluxo laminar e manipulação asséptica. A suspensão de esporos foi homogeneizada com um bastão de vidro e transferida para um béquer (estéril), utilizando uma gaze estéril para a retenção dos grãos do sabugo.

4.2.2 Preparação do substrato

O caroço do açaí foi moído em moinho de facas (peneira 4 mm), tendo sua granulometria padronizada em peneira de mesh 20 (aproximadamente 0,84 mm). Pesaram-se dez gramas do substrato em frascos do tipo erlenmeyer de 125 mL. Aos frascos contendo o substrato foi adicionada a solução contendo a

suplementação nutricional do meio, seguindo o planejamento experimental. Em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 kgf cm² (1 atm), durante 20 minutos.

4.2.3 Suplementação do meio para a fermentação em estado sólido

Utilizou-se para produção enzimática o meio de cultura descrito por Mandels e Weber (1969), com composição apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Composição do meio da FES

Componente	Concentração
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄) em HCl 0,1mol L ⁻¹	5 g L ⁻¹
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	3 g L ⁻¹
Uréia	0,30 g L ⁻¹
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	0,5 g L ⁻¹
Cloreto de potássio (KCl)	0,5 g L ⁻¹
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ . 2 H ₂ O)	4,0 g L ⁻¹
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ . 6 H ₂ O)	2,0 mg L ⁻¹
Sulfato de ferro (FeSO ₄ . 7 H ₂ O)	23,0 mg L ⁻¹
Sulfato de cobre (CuSO ₄ . 5 H ₂ O)	6,0 mg L ⁻¹
Sulfato de zinco (ZnSO ₄)	5,0 mg L ⁻¹
Sulfato de manganês (MnSO ₄ . 5 H ₂ O)	1,6 mg L ⁻¹

Fonte: MANDELS e WEBER, 1969.

Seguindo as condições previstas no planejamento fatorial 2⁴ completo (item 4.2.5), foram adicionadas ao meio de suplemento fontes de nitrogênio orgânico, extrato de peptona de carne e extrato de levedura, e carboximetilcelulose (CMC), como indutor para produção de celulasas. Procedeu-se o ajuste de pH entre 5,0 e 6,0 com soluções de HCl (2 mol L⁻¹) e NaOH (1 mol L⁻¹).

4.2.4 Inoculação do meio de fermentação em estado sólido

A inoculação do meio em FES seguiu a metodologia descrita por COURI e FARIAS (1995). Utilizou-se a suspensão de conídios produzidos em sabugo de milho. A concentração de conídios necessária para a inoculação foi determinada em câmara de Neubauer após a devida diluição da densa suspensão obtida. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando uma concentração final de 10⁷ conídios por grama de substrato.

Após a determinação da concentração de esporos o inóculo foi transferido para os erlenmeyers previamente autoclavados com o substrato e o meio de suplementação. Em seguida, esses frascos foram transferidos para uma estufa a 32 °C por 72 h.

4.2.5 Planejamento fatorial 2⁴ completo

As variáveis estudadas para a produção enzimática através do planejamento experimental foram: i) concentração de extrato de peptona de carne; ii) concentração de extrato de levedura; iii) concentração de carboximetilcelulose (CMC); e iv) unidade inicial do meio. A unidade inicial do meio foi obtida pela razão entre a massa do meio suplementação pela massa de substrato (Equação 2).

$$\text{Umidade inicial do meio (\%)} = \frac{\text{massa do meio de suplementação (g)}}{\text{massa do substrato (g)} \cdot 100} \quad (2)$$

O planejamento fatorial 2⁴ completo, em dois níveis (-1 e +1), envolvendo as variáveis independentes citadas contou ainda com 3 ensaios sob as condições do pontos centrais (nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão. Assim, o planejamento fatorial consistiu em 19 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 5. Adicionalmente ao planejamento experimental foram realizados 3 ensaios com farelo de trigo como substrato, sob as condições do ponto central, para a obtenção de valores comparativos. Os experimentos do planejamento experimental foram realizados em triplicata e as variáveis resposta (dependentes) analisadas foram as atividades enzimáticas da CMCase e xilanase.

Tabela 5. Valores absolutos e codificados utilizados no planejamento fatorial 2⁴ completo.

Fatores	Nível (-1)	Ponto central (0)	Nível (+1)
Peptona (g L ⁻¹)	2	8	14
Extr. de levedura (g L ⁻¹)	1	5	9
CMC (%)	0,5	1,5	2,5
Umidade inicial do meio (%)	40	60	80

Para determinação dos efeitos das variáveis para produção enzimática obtida foi utilizado o software Statística[®] (Windows versão 7.0).

A Tabela 6 ilustra a matriz com as combinações possíveis para as quatro variáveis estudadas: concentração de extrato de peptona de carne, extrato de levedura e CMC e a umidade inicial do meio.

Tabela 6. Matriz dos ensaios para o planejamento fatorial 2⁴ completo

Ensaio	Extrato de peptona	Extrato de levedura	CMC	Umidade inicial do meio
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17 (Ponto central)	0	0	0	0
18 (Ponto central)	0	0	0	0
19 (Ponto central)	0	0	0	0

4.2.6 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Visando obter o máximo da atividade enzimática da CMCase e xilanase, buscou-se a otimização do meio de cultura através da elaboração de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para determinar os melhores valores das variáveis significativas: concentração de peptona e extrato de levedura. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial com as duas variáveis independentes em 4 níveis (-1,41; -1; +1; +1,41) e 3 pontos centrais (nível zero) para a elaboração de um modelo quadrático e a determinação do erro experimental, respectivamente. Assim, o DCCR constou de 11 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 7. Ao planejamento experimental foram adicionados 3 ensaios realizados, sob as condições do nível zero, com farelo de trigo como substrato, para a obtenção de valores comparativos. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Para determinação dos efeitos das variáveis sobre os resultados obtidos foi utilizado o software Statística[®] (Windows versão 7.0). Sobre os resultados obtidos foram aplicadas as análises estatísticas de variância (ANOVA) e testes de hipóteses.

Tabela 7. Valores absolutos e codificados utilizados para o DCCR.

Fatores	Nível (-1,41)	Nível (-1)	Ponto central (0)	Nível (+1)	Nível (+1,41)
Extr. de peptona (g L ⁻¹)	11,36	14,0	20,0	26,0	28,64
Extr. de levedura (g L ⁻¹)	6,36	9,0	15,0	21,0	23,60

Os valores das concentrações das variáveis extrato de peptona e extrato de levedura foram incrementados na elaboração do DCCR. A faixa de concentração de extrato de peptona estudada no DCCR assumiu valores entre 11,36 g L⁻¹ e 28,64 g L⁻¹. Já a faixa de estudo adotada para a concentração de levedura foi de 6,36 g L⁻¹ a 23,60 g L⁻¹.

A matriz contendo as condições experimentais com os valores codificados das variáveis é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8. Matriz dos ensaios para o DCCR

Ensaio	Extrato de peptona	Extrato de levedura
1	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00
3	-1,00	1,00
4	1,00	1,00
5	-1,41	0,00
6	1,41	0,00
7	0,00	-1,41
8	0,00	1,41
9 (Ponto Central)	0,00	0,00
10 (Ponto Central)	0,00	0,00
11 (Ponto Central)	0,00	0,00

4.2.7 Fermentação em estado sólido (FES)

Os experimentos de FES para a produção das enzimas, segundo metodologia de Couri e Farias, 1995, foram conduzidos em erlenmeyer (125 mL), com 10 g de caroço do açaí e meio de complemento conforme planejamento fatorial 2^4 completo. Os erlenmeyers foram esterilizados em autoclave 121 °C, 1 kgf cm² (1 atm), durante 20 minutos e inoculados com conídios de *A. niger* (concentração de 10^7 conídios por grama de substrato) e levados a estufa (32 °C) por um tempo total de fermentação de 72 horas. Esse período foi selecionado a partir dos resultados obtidos por Rodríguez-Zúñiga et al. (2008) para cinética enzimática com a utilização de parâmetros semelhantes e farelo de trigo como substrato. A umidade do processo foi regulada através da presença no interior da estufa de um béquer contendo água destilada.

4.2.8 Extração do complexo enzimático

Após 72 horas de fermentação a 32 °C procedeu-se à etapa de extração do complexo enzimático. As amostras foram extraídas com tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹, pH 4,5, na relação 2:1 (v:m), incubando os frascos em shaker a 120 rpm e 32 °C por 1 hora. Em seguida, os extratos foram filtrados em filtro (Whatman nº 1) com auxílio de bomba a vácuo, a fim de reter a massa do fungo. Os

extratos enzimáticos recuperados foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos para obtenção do sobrenadante. Os extratos foram rapidamente congelados em ultra-freezer (-80 °C) a fim de impedir a formação de micro-cristais de gelo, ocasionando mudanças estruturais das enzimas e, conseqüentemente diminuindo a estabilidade do complexo (TATTINI JR. et al., 2006). Em seguida, foram armazenados a -18 °C para posterior análise da atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.9 Teste de Tukey

O teste de Tukey foi utilizado em complemento a ANOVA na avaliação dos efeitos dos tratamentos estudados, a fim de se identificar estatisticamente a ocorrência ou não de diferenças entre os resultados obtidos para as atividades enzimáticas estudadas. As variáveis concentrações de peptona e de extrato de levedura foram avaliadas em seus menores e maiores níveis adotados no DCCR, -1,41 e +1,41, respectivamente. Adicionalmente, foram realizados ensaios em condições 3 vezes maiores as utilizadas no ponto centro do DCCR. A Tabela 9 apresenta a matriz dos ensaios experimentais para o teste de Tukey.

Tabela 9. Matriz dos ensaios para o teste de Tukey.

Ensaio	Extrato de peptona	Extrato de levedura
12	3,00	3,00
13	3,00	3,00
14	3,00	3,00
15	-1,41	-1,41
16	-1,41	-1,41
17	-1,41	-1,41
18	1,41	1,41
19	1,41	1,41
20	1,41	1,41

4.3 Metodologia analítica

4.3.1 Quantificação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas de carboximetilcelulase (CMCase) e xilanase dos extratos obtidos foram quantificadas em triplicata e os resultados das análises foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato inicial. A quantificação de grupos redutores foi realizada pelo método DNS (Vetec - código 1025) (MILLER, 1959) e as atividades expressas em unidade internacional por grama de substrato inicial ($U\ g^{-1}$). Conforme Vitti et al. (2007), a unidade internacional de atividade enzimática (U) refere-se à quantidade de enzimas capaz de catalisar a formação de um μmol de grupos redutores por minuto, sob as condições do ensaio. Foi utilizada a curva padrão de glicose para determinação da atividade de carboximetilcelulase e de xilose para determinação da atividade de xilanase, segundo metodologia descrita por Wood e Garcia-Campayo (1990). Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata.

Enzima celulolítica CMCase: A atividade CMCase, tendo como substrato a carboximetilcelulose (Sigma, EUA) 0,4 % (celulose amorfa), fornece uma indicação da ação das endoglucanases. Uma unidade de atividade CMCase corresponde a 1 μmol de grupos redutores liberados por minuto de reação, em pH 4,2 a 50 °C (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990).

Enzima xilanase: A atividade da xilanase foi medida em termos de produção de açúcares redutores a partir de xilana comercial em tampão fosfato 0,67 $\text{mol}\ L^{-1}$. Uma unidade de atividade xilanase corresponde a 1 μmol de xilose liberado por minuto de reação, em pH 4,2 a 50 °C (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1990).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a realização dos experimentos de FES nas condições definidas no planejamento experimental sequencial, as atividades enzimáticas de CMCase e xilanase foram analisadas permitindo a identificação, através de métodos estatísticos e empíricos, do efeito das variáveis estudadas (concentrações de peptona, de extrato de levedura e de CMC e a umidade inicial do meio) e das variáveis significativas ao processo.

Tanto para o planejamento fatorial 2^4 completo, para o delineamento composto central rotacional (DCCR), quanto para os ensaios utilizados no teste de comparação de médias, as atividades enzimáticas foram analisadas primeiramente para CMCase e posteriormente para xilanase, obtidas ao final de 72 horas de fermentação, com a utilização do caroço do açaí como substrato e *Aspergillus niger* como microorganismo fermentador.

5.1 Planejamento fatorial 2^4 completo

Os valores codificados empregados no planejamento fatorial 2^4 completo e os resultados obtidos para atividades de CMCase e xilanase, utilizando caroço do açaí como substrato, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados do planejamento fatorial 2^4 completo para as atividades enzimáticas de CMCCase e xilanase (U g^{-1}).

Ensaio	Extr. de peptona	Extr. de levedura	CMC	Umidade inicial do meio	CMCase (U g^{-1})	Xilanase (U g^{-1})
1	-1	-1	-1	-1	0,51	0,85
2	1	-1	-1	-1	1,11	1,85
3	-1	1	-1	-1	1,56	1,87
4	1	1	-1	-1	3,38	4,75
5	-1	-1	1	-1	0,75	0,92
6	1	-1	1	-1	1,70	2,02
7	-1	1	1	-1	2,57	2,30
8	1	1	1	-1	3,60	4,67
9	-1	-1	-1	1	1,46	1,75
10	1	-1	-1	1	1,61	2,03
11	-1	1	-1	1	1,13	1,11
12	1	1	-1	1	2,68	2,53
13	-1	-1	1	1	1,09	0,75
14	1	-1	1	1	1,24	1,54
15	-1	1	1	1	1,54	1,18
16	1	1	1	1	1,79	3,06
17 (C)	0	0	0	0	2,24	1,50
18 (C)	0	0	0	0	2,14	1,89
19 (C)	0	0	0	0	2,60	1,77

(c) condições de ponto central.

5.1.1 Atividade enzimática da CMCCase pelo planejamento fatorial 2^4 completo

Os efeitos das variáveis independentes foram avaliados inicialmente em termos da atividade da enzima CMCCase. Observou-se que, em condições de maior concentração de peptona de carne (14 g L^{-1}) e maior concentração de extrato de levedura (9 g L^{-1}), nível +1, a atividade enzimática da CMCCase atingiu $3,60 \text{ U g}^{-1}$. Nas condições com os menores valores para todas as variáveis (nível -1) foi obtido o menor resultado para atividade enzimática da CMCCase ($0,51 \text{ U g}^{-1}$).

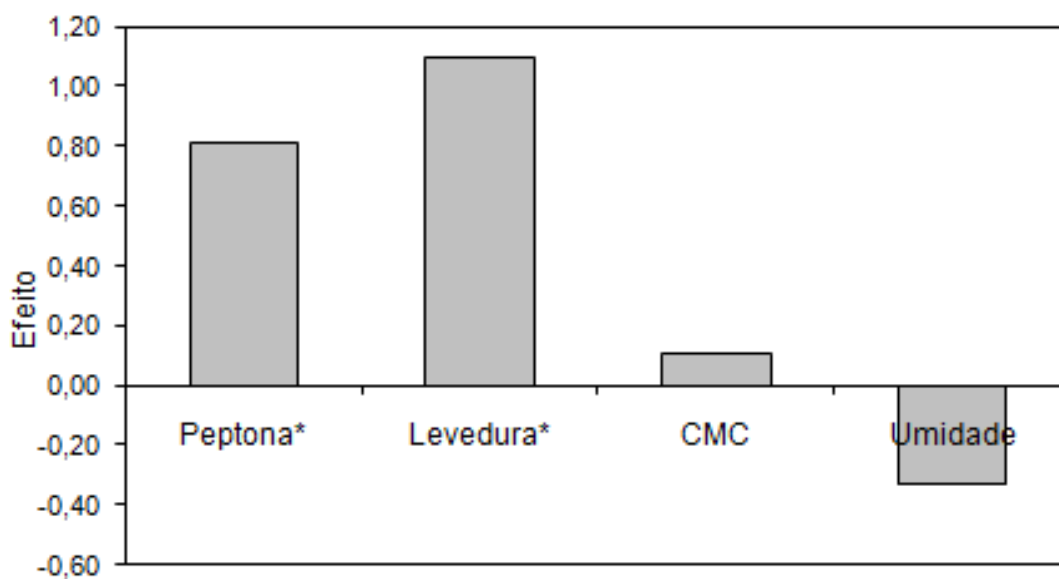
A Tabela 11 apresenta a estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2⁴ completo para atividade enzimática da CMCase.

Tabela 11. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2⁴ completo para a atividade enzimática da CMCase.

	Efeitos	Desvio padrão	t (8)	p-valor	Lim. Conf. - 90 %	Lim. Conf. + 90 %
Média*	1,826	0,097	18,798	0,000	1,645	2,006
(1) Extr. de peptona*	0,812	0,212	3,838	0,005	0,419	1,206
(2) Extr. de levedura*	1,099	0,212	5,190	0,001	0,705	1,492
(3) CMC	0,104	0,212	0,492	0,636	-0,290	0,498
(4) Umidade inicial	-0,330	0,212	-1,557	0,158	-0,723	0,064
1 x 2	0,350	0,212	1,653	0,137	-0,044	0,743
1 x 3	-0,217	0,212	-1,024	0,336	-0,610	0,177
1 x 4	-0,286	0,212	-1,352	0,213	-0,680	0,107
2 x 3	0,081	0,212	0,382	0,712	-0,313	0,475
2 x 4*	-0,659	0,212	-3,114	0,014	-1,053	-0,266
3 x 4*	-0,411	0,212	-1,939	0,088	-0,804	-0,017

* variáveis significativas a 90% de confiança (p<0,1)

As variáveis concentrações de extrato de peptona de carne e extrato de levedura e os efeitos de interação entre a concentração de extrato de levedura e umidade inicial do meio e entre a concentração de CMC e umidade inicial do meio se mostraram estatisticamente significativas a 90 % de confiança para atividade de CMCase no intervalo estudado. A variável umidade inicial e a interação entre o extrato de peptona e extrato de levedura foram consideradas nas estimativas dos efeitos por apresentarem-se significativos próximos a 90 % de confiança. A variável concentração de CMC não apresentou efeito estatisticamente significativo a 90 % de confiança. O histograma do efeito das principais variáveis estudadas é apresentado na Figura 8.



* variáveis significativas a 90 % de confiança

Figura 8. Histograma dos efeitos das variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e de CMC e umidade inicial do meio sobre a atividade enzimática da CMCCase.

O histograma (Figura 8) e a Tabela 11 apresentam um efeito positivo significativo a 90 % de confiança do extrato de peptona e do extrato de levedura para produção de CMCCase, indicando que o incremento dessas variáveis resultaria em maiores respostas. Já a umidade inicial do meio apresentou efeito negativo, indicando que melhores resultados são obtidos com os níveis mais baixos dessa variável.

Ensaio comparativos realizados nas mesmas condições do ponto central, porém utilizando farelo de trigo como substratos elevaram a produção de CMCCase a $11,62 \text{ U g}^{-1}$. Apesar de ser superior aos valores obtidos usando o caroço do açaí como substrato, a crescente disponibilidade, a baixo custo, desse resíduo pode ser uma vantagem no processo de obtenção das enzimas de interesse.

5.1.2 Atividade enzimática da xilanase para o planejamento fatorial 2^4 completo

Em relação à atividade enzimática da xilanase, as melhores respostas foram observadas em meios contendo maiores concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura, com menor concentração de CMC e menor umidade inicial, atingindo $4,75 \text{ U g}^{-1}$ (Tabela 10). Já os menores valores de atividade enzimática da xilanase foram observados em condições opostas, ou seja, menores concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura, com maior concentração de CMC e maior umidade inicial do meio, atingindo $0,75 \text{ U g}^{-1}$.

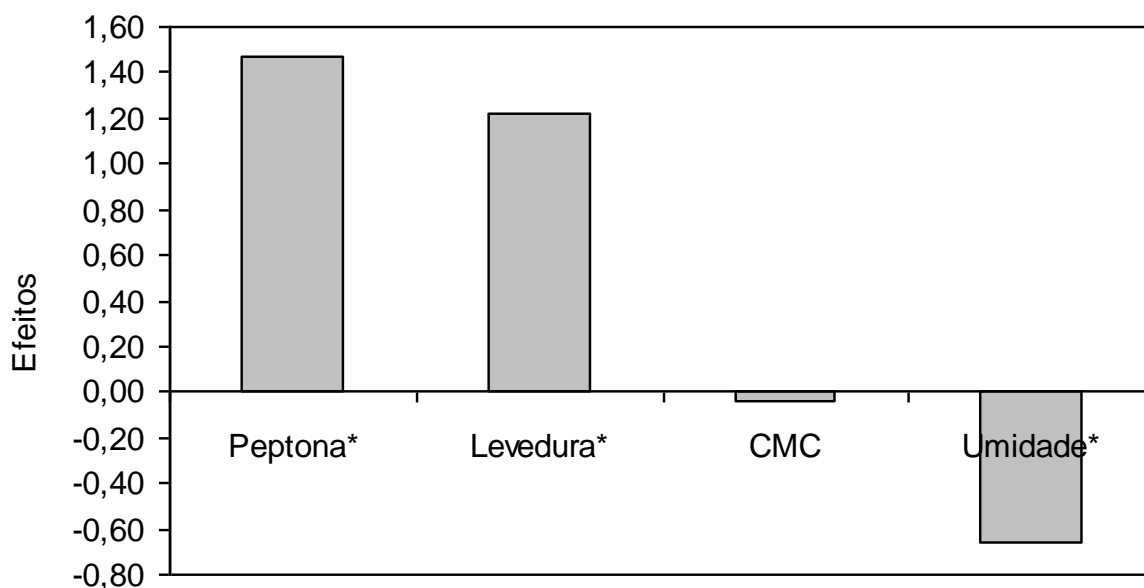
A Tabela 12 apresenta a estimativa dos efeitos e teste de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^4 completo para a atividade enzimática da xilanase.

Tabela 12. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^4 completo para a atividade enzimática da xilanase

	Efeitos	Desvio padrão	t(8)	p-valor	Lim. Conf. - 90 %	Lim. Conf. + 90 %
Média*	2,017	0,075	26,740	0,000	1,877	2,157
(1) Extr. de peptona*	1,466	0,164	8,916	0,000	1,160	1,771
(2) Extr. de levedura*	1,221	0,164	7,427	0,000	0,915	1,527
(3) CMC	-0,038	0,164	-0,229	0,825	-0,343	0,268
(4) Umidade inicial*	-0,660	0,164	-4,015	0,004	-0,966	-0,354
1 x 2*	0,672	0,164	4,086	0,004	0,366	0,977
1 x 3	0,072	0,164	0,440	0,672	-0,233	0,378
1 x 4*	-0,373	0,164	-2,268	0,053	-0,679	-0,067
2 x 3	0,275	0,164	1,671	0,133	-0,031	0,580
2 x 4*	-0,768	0,164	-4,672	0,002	-1,074	-0,462
3 x 4	-0,184	0,164	-1,120	0,295	-0,490	0,122

* variáveis significativas 90% de confiança ($p < 0,1$)

As variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e a umidade inicial do meio apresentaram efeito estatisticamente significativo a 90 % de confiança. Já a variável concentração de CMC não apresentou efeito estatisticamente significativo no intervalo estudado. O histograma do efeito das variáveis estudadas é apresentado na Figura 9.



* variáveis significativas a 90 % de confiança

Figura 9. Histograma dos efeitos das variáveis concentrações de extrato de peptona, de extrato de levedura e de CMC e umidade inicial do meio sobre a atividade enzimática da xilanase

O histograma (Figura 9) e a Tabela 12 apresentam um efeito positivo significativo das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura para atividade enzimática da xilanase, indicando que o incremento dessas variáveis resultaria em maiores respostas. Já a concentração de CMC e a umidade inicial do meio apresentaram efeito negativo (significativo a 90 % de confiança para umidade inicial do meio), indicando que melhores resultados são obtidos com os níveis mais baixos dessas variáveis.

Da mesma forma que para a enzima CMCCase, foram realizados ensaios comparativos utilizando farelo de trigo como substrato para produção de xilanase. Atividades enzimáticas de até $14,56 \text{ U g}^{-1}$ foram obtidas em condições do ponto central. Novamente, a crescente disponibilidade do caroço do açaí a baixo custo configura-se como uma vantagem quanto à utilização desse resíduo como substrato no processo FES para obtenção de enzimas de interesse.

A partir das análises estatísticas feitas sobre os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^4 completo foi possível identificar as variáveis concentração de extrato de peptona de carne e concentração de extrato de levedura como significativas estatisticamente com p -valor menores que 10 % ($p < 0,1$) para as atividades de CMCCase e xilanase. O efeito dessas duas variáveis se apresentou como positivo para a produção enzimática, indicando que melhores resultados

podem ser obtidos com o incremento de seus valores nas etapas seguintes do planejamento experimental sequencial, como o delineamento composto central rotacional (DCCR).

Embora não tenha sido identificada como variável estatisticamente significativa para atividade de CMCase no intervalo estudado, a umidade inicial do meio é uma variável com grande influência para o processo de FES, sendo que altos valores de umidades afetam negativamente na produção enzimática. Neste sentido, a umidade inicial do meio foi fixada no nível mais baixo utilizado anteriormente (40 %).

Visando a otimização do processo de produção das enzimas, bem como a redução dos custos operacionais, a variável concentração de CMC, também identificada como não significativa a 90 % de confiança no planejamento experimental, foi fixada no nível mais baixo estudado (0,5 %).

A partir desses resultados pode-se definir as variáveis significativas ao processo e selecionar as condições experimentais do ensaio do delineamento composto central rotacional (DCCR)

5.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Um novo planejamento estatístico com o incremento nos valores das variáveis significativas, concentração de extrato de peptona de carne e concentração de extrato de levedura (Tabela 7), foi realizado utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR). O delineamento foi constituído por 4 ensaios em dois níveis (-1 e +1), 4 pontos axiais (-1,41 e +1,41) e 3 pontos centrais. Foram realizados ainda 3 ensaios como controle utilizando o farelo de trigo como substrato, totalizando 14 ensaios. A matriz contendo as condições dos ensaios realizados com caroço do açaí e as respostas obtidas para atividade enzimática da CMCase e xilanase é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13. Condições dos ensaios realizados no DCCR e os resultados obtidos para atividades enzimáticas de CMCase e xilanase (U g^{-1}).

Ensaio	Extr. de peptona	Extr. de levedura	CMCase (U g^{-1})	Xilanase (U g^{-1})
1	-1,00	-1,00	5,54	3,11
2	1,00	-1,00	7,19	5,51
3	-1,00	1,00	7,77	5,98
4	1,00	1,00	8,24	8,08
5	-1,41	0,00	6,82	4,46
6	1,41	0,00	6,93	6,30
7	0,00	-1,41	5,81	3,62
8	0,00	1,41	7,93	7,08
9 (C)	0,00	0,00	6,62	5,79
10 (C)	0,00	0,00	5,93	5,99
11 (C)	0,00	0,00	5,76	6,04

(c) condições de ponto central.

Para as análises estatísticas dos resultados obtidos para as atividades enzimáticas CMCase e xilanase o nível de confiança foi ajustado a 85 % visando uma melhor adequação do modelo gerado.

5.2.1 Atividade enzimática da CMCase obtida no DCCR

Com base nos resultados obtidos no DCCR (Tabela 13) foi possível observar um aumento de 2,29 vezes na atividade enzimática da CMCase em relação ao planejamento fatorial completo, atingindo $8,24 \text{ U g}^{-1}$ (Tabela 10).

A Tabela 14 apresenta a estimativa por ponto e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para atividade enzimática da CMCase. Os efeitos dos termos lineares são apresentados associados à letra L e os termos quadráticos associados à letra Q.

Tabela 14. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase.

	Efeitos	Desvio padrão	t (5)	p-valor	Lim. Conf. - 85 %	Lim. Conf. + 85 %
Média*	6,103	0,359	16,992	0,000	5,493	6,714
(1)Peptona (L)*	1,279	0,440	2,908	0,033	0,532	2,027
Peptona (Q)*	0,925	0,524	1,766	0,138	0,035	1,815
(2)Extr. de Levedura (L)*	0,858	0,440	1,951	0,109	0,111	1,606
Extr. de Levedura (Q)*	0,928	0,524	1,773	0,136	0,038	1,818
1L x 2L	-0,592	0,622	-0,951	0,385	-1,649	0,465

* variável significativas a 85% de confiança ($p < 0,15$)

Apenas a interação entre as concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura não se mostrou estatisticamente significativo a 85 % de confiança, tendo sido incorporado aos resíduos nas análises seguintes.

Assim, a Tabela 15 apresenta os resultados para o coeficiente de regressão, desvio padrão, teste t , p-valor e limites de confiança obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase, após a exclusão das variáveis identificadas como não significativa a 85 % de confiança (Tabela 14).

Tabela 15. Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da CMCase.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (6)	p-valor	Lim. Conf. - 85 %	Lim. Conf. + 85 %
Média	6,103	0,356	17,128	0,000	5,515	6,692
(1) Extr. de peptona (L)	0,640	0,218	2,932	0,026	0,280	1,000
Extr. de peptona (Q)	0,462	0,260	1,780	0,125	0,034	0,891
(2)Extr. de levedura(L)	0,429	0,218	1,967	0,097	0,069	0,789
Extr. de levedura(Q)	0,464	0,260	1,787	0,124	0,036	0,893

Os dados obtidos apresentam uma variância desprezível ($\sigma^2 = 0,0002$). A Tabela 16 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da CMCase no DCCR, com a exclusão da variável não significativa a 85 % de confiança.

Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da CMCase no DCCR após a exclusão das variáveis não significativas a 85 % de confiança

Variáveis Estatísticas	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados
Regressão	6,624	4	1,656
Resíduo	2,282	6	0,380
Total	8,907	10	
$F_{(Modelo)}$		4,35	
R^2		0,7437	
Nível de confiança		85 %	
	$F_{\text{tabelado}}(4; 6; 0,15) =$	2,52	
	$F_{\text{modelo}} / F_{\text{tabelado}} =$	1,73	

No teste F, o F do modelo foi 1,73 vezes maior que o F tabelado e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,7437$) se mostraram satisfatórios para obtenção de um modelo preditivo da atividade enzimática da CMCase.

O modelo com as variáveis codificadas, que representa a atividade enzimática ($U \cdot g^{-1}$) em função da concentração de extrato de peptona de carne e da concentração de extrato de levedura na faixa estudada pode ser representado pela equação (3).

$$\text{Atividade enzimática da CMCase} = 6,103 + (0,640 \cdot [\text{peptona}]) + (0,429 \cdot [\text{levedura}]) + (0,462 \cdot [\text{peptona}]^2) + (0,464 \cdot [\text{levedura}]^2) \quad (3)$$

A tabela 17 apresenta os valores obtidos nos ensaios experimentais, os valores previstos pelo modelo e o desvio relativo para atividade enzimática da CMCase em cada ensaio.

Tabela 17. Valores obtidos nos ensaios experimentais, valores previstos pelo modelo e o desvio relativo para atividade enzimática da CMCCase.

Ensaio	Atividade enzimática experimental da CMCCase (U g ⁻¹)	Atividade enzimática prevista da CMCCase (U g ⁻¹)	Desvio	Desvio Relativo (%)
1	5,54	5,96	-0,42	-7,63
2	7,19	7,24	-0,05	-0,64
3	7,77	6,82	0,95	12,26
4	8,24	8,10	0,14	1,77
5	6,82	6,42	0,40	5,81
6	6,93	7,64	-0,71	-10,27
7	5,81	6,12	-0,31	-5,33
8	7,93	7,93	0,00	0,00
9 (C)	6,62	6,10	0,52	7,76
10 (C)	5,93	6,10	-0,17	-2,87
11 (C)	5,76	6,10	-0,34	-6,02

(c) condições de ponto central.

Através da Tabela 17 é possível verificar que os dados previstos pelo modelo apresentam pequeno desvio relativo em relação aos dados obtidos nos ensaios experimentais para atividade enzimática da CMCCase, indicando uma boa concordância entre os dois valores (Figura 10).

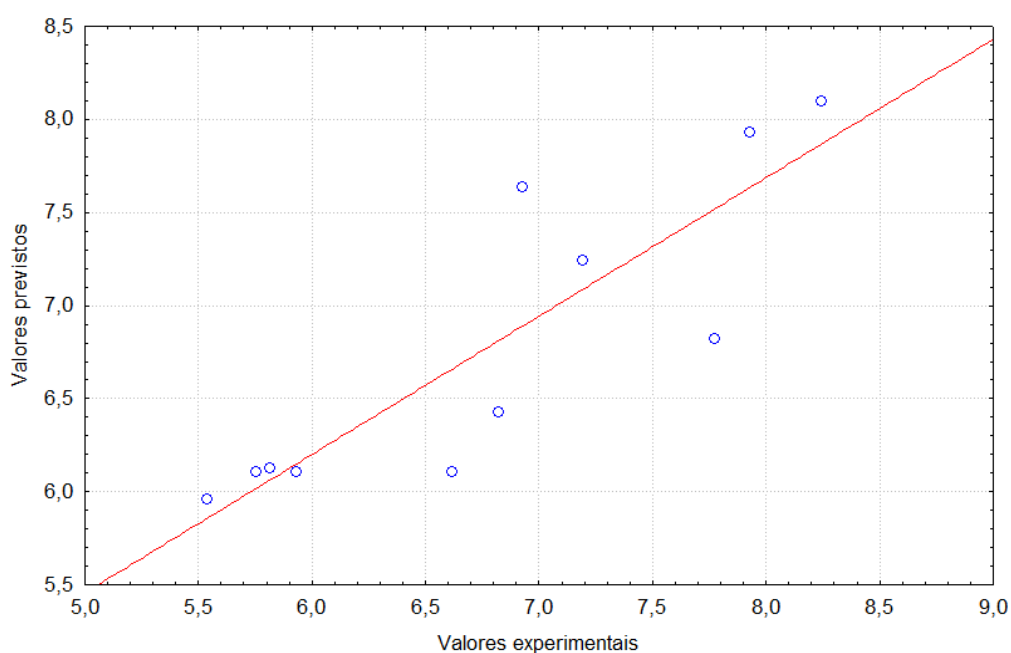


Figura 10. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para atividade enzimática da CMCCase no DCCR.

O gráfico de normalidade (Figura 11) indica uma distribuição normal e independente dos resíduos (erros de ajustamento) em torno da reta, corroborando o bom ajuste e validação do modelo.

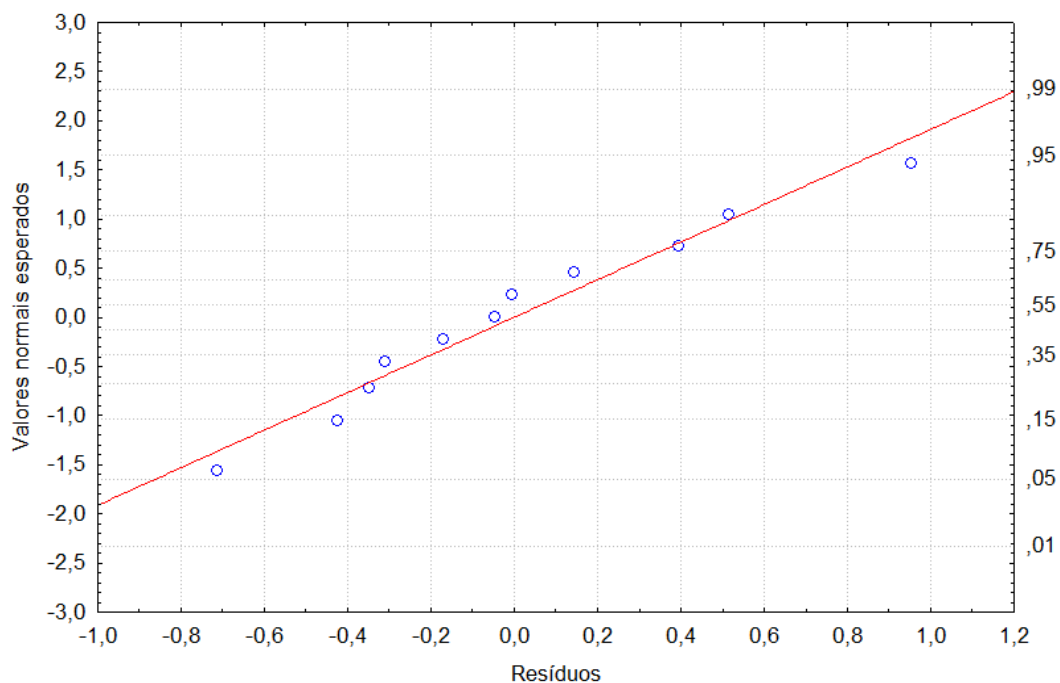


Figura 11. Resíduos *versus* valores normais esperados para atividade enzimática da CMCCase no DCCR.

Os dados obtidos pelo modelo para atividade enzimática da CMCCase foram utilizados para a construção do gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 12.

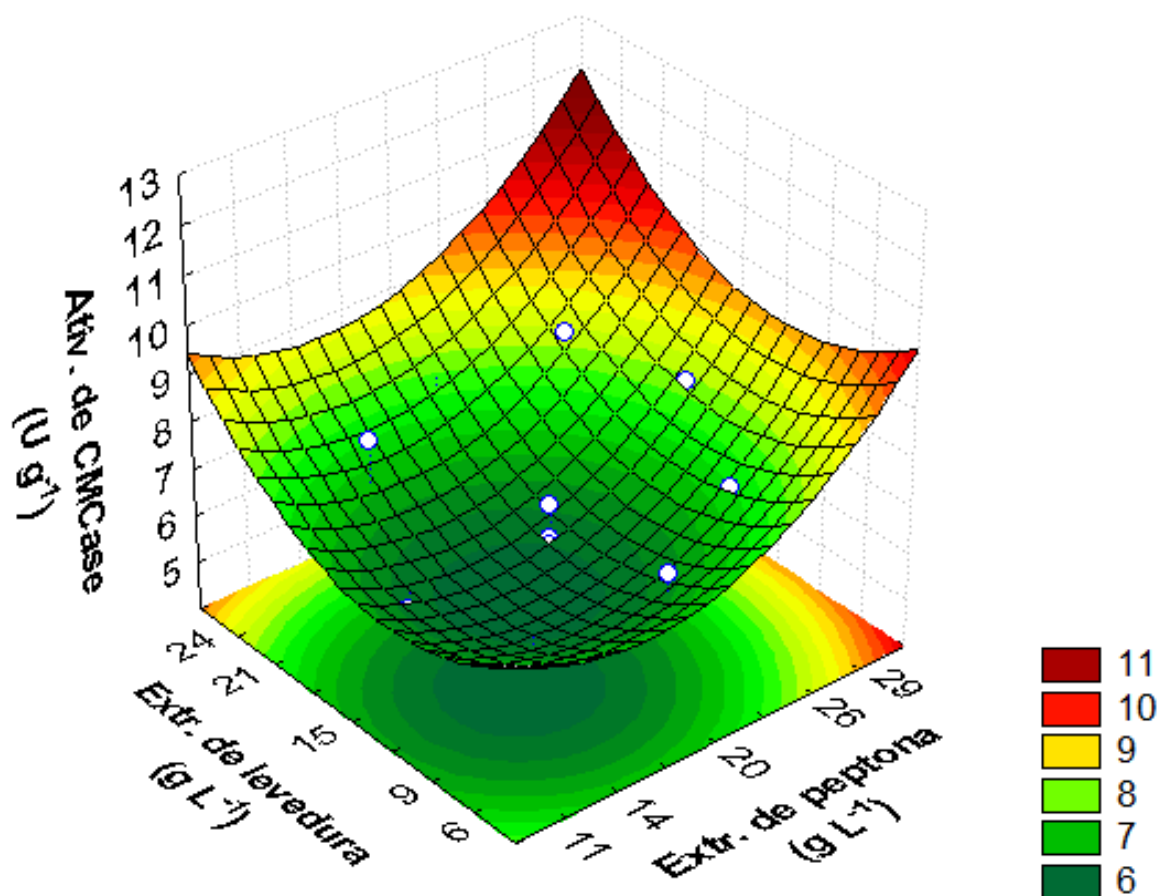


Figura 12. Superfície de respostas para a atividade enzimática da CMCCase ($U\ g^{-1}$) em função das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura ($g\ L^{-1}$).

Apesar dos resultados obtidos no DCCR apresentarem um incremento na atividade enzimática da CMCCase em relação ao planejamento fatorial 2^4 completo, o estudo da superfície de resposta indica que melhores resultados podem ser obtidos com o incremento das variáveis concentração de extrato de peptona e levedura.

Neste sentido, foram feitos ensaios com concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura três vezes maiores ao ponto central utilizados na primeira otimização (DCCR) a fim de ser obter resultados preliminares para uma segunda otimização. Assim, os novos valores adotados foram $60\ g\ L^{-1}$ de extrato de peptona e $45\ g\ L^{-1}$ de extrato de levedura. Os resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para a atividade enzimática da CMCCase ($U\ g^{-1}$) são apresentados na tabela 18.

Tabela 18. Valores codificados para as variáveis estudadas e resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para atividade enzimática da CMCCase.

Ensaio	Extrato de peptona	Extrato de levedura	CMCase (U g⁻¹)
12	3,00	3,00	15,13
13	3,00	3,00	15,39
14	3,00	3,00	14,39

Através da análise da Tabela 18 observa-se que em média os resultados obtidos (13,09 U g⁻¹) representam um acréscimo de 1,59 vezes na atividade enzimática da CMCCase em relação aos valores atingidos na primeira otimização (8,24 U g⁻¹) (Tabela 13).

Estes resultados corroboram o aumento da atividade enzimática da CMCCase diretamente relacionado com o incremento das concentrações de extrato de peptona e extrato de levedura pressuposto no DCCR. No entanto, após a aplicação do teste de Tukey (item 5.3), esse aumento não se mostrou estatisticamente diferente dos resultados obtidos ao nível +1,41, indicando que o aumento da atividade enzimática obtida não justifica economicamente o incremento das concentrações das variáveis estudadas.

5.2.2 Atividade enzimática da xilanase obtida no DCCR

Em relação à xilanase, as melhores respostas obtidas no DCCR foram observadas em meios contendo as mesmas condições encontradas para CMCCase chegando a 8,08 U g⁻¹, indicando um aumento de 1,7 vezes na atividade enzimática em relação ao planejamento fatorial 2⁴ completo.

A Tabela 19 apresenta a estimativa por ponto e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para atividade enzimática da xilanase. Os termos lineares das variáveis estudadas são apresentados associados à letra L e os termos quadráticos associados à letra Q.

Tabela 19. Estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os efeitos a partir dos resultados obtidos no DCCR para a atividade enzimática da xilanase.

	Efeitos	Desvio padrão	t (5)	p-valor	Lim. Conf. - 85 %	Lim. Conf. + 85 %
Média*	5,938	0,289	20,578	0,000	5,448	6,429
(1)Peptona (L)*	2,352	0,353	6,655	0,001	1,751	2,953
Peptona(Q)	-0,436	0,421	-1,036	0,348	-1,151	0,279
(2)Extr. de Levedura (L)*	2,011	0,353	5,690	0,002	1,410	2,612
Extr. de Levedura (Q)	-0,407	0,421	-0,967	0,378	-1,122	0,308
1L by 2L	-0,154	0,500	-0,308	0,770	-1,004	0,695

* variáveis significativas a 85 % de confiança ($p < 0,15$)

Apenas os termos lineares das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura se apresentaram estatisticamente significativos a 85 % de confiança. Todos os termos quadráticos e o efeito de interação não se mostraram significativos a 85 % de confiança, tendo sido incorporado aos resíduos nas análises seguintes.

A Tabela 20 apresenta os resultados para o coeficiente de regressão, desvio padrão, teste t , p-valor e limites de confiança obtidos pelo DCCR para a atividade enzimática da xilanase, após a exclusão das variáveis identificadas como não significativas a 85 % de confiança (Tabela 19).

Tabela 20. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, teste t e p-valor obtidos no DCCR para a atividade enzimática da xilanase, com exclusão das variáveis não significativas

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (8)	p-valor	Lim. Conf. - 85 %	Lim. Conf. + 85 %
Média	5,632	0,137	40,991	0,000	5,413	5,851
(1) Extr. de peptona (L)	1,176	0,161	7,299	0,000	0,919	1,433
(2) Extr. de levedura (L)	1,005	0,161	6,241	0,000	0,749	1,262

Os dados obtidos apresentam, assim como para atividade enzimática da CMCase, uma variância desprezível ($\sigma^2 = 0,0006$). A Tabela 21 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da xilanase no DCCR, com a exclusão da variável não significativa a 85 % de confiança.

Tabela 21. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática da xilanase no DCCR.

Variáveis Estatísticas	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média dos Quadrados
Regressão	19,151	2	9,576
Resíduo	1,661	8	0,208
Total	20,812	10	
$F_{(Modelo)}$		46,11	
R^2		0,9202	
Nível de confiança		85 %	
	$F_{\text{tabelado}}(2; 8; 0,15) =$	2,43	
	$F_{\text{modelo}} / F_{\text{tabelado}} =$	18,98	

O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9202$) e o teste F (18,98 vezes o valor do F tabelado) se mostraram muito satisfatórios para obtenção de um modelo preditivo da atividade enzimática da xilanase.

O modelo com as variáveis codificadas que representa a atividade enzimática ($U\ g^{-1}$) em função das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura na faixa estudada pode ser representado pela equação (4).

$$\text{Atividade enzimática da xilanase} = 5,632 + (1,176 \cdot [\text{peptona}]) + (1,005 \cdot [\text{levedura}]) \quad (4)$$

A Tabela 22 apresenta os valores obtidos nos ensaios experimentais, os valores previstos pelo modelo e o desvio relativo para atividade enzimática da xilanase em cada ensaio.

Tabela 22. Valores obtidos nos ensaios experimentais, valores previstos pelo modelo e o desvio relativo para atividade enzimática da xilanase.

Ensaio	Atividade enzimática experimental de xilanase (U g⁻¹)	Atividade enzimática prevista de xilanase (U g⁻¹)	Desvio	Desvio Relativo (%)
1	3,11	3,45	-0,34	-11,04
2	5,51	5,80	-0,29	-5,21
3	5,98	5,46	0,52	8,69
4	8,08	7,81	0,27	3,31
5	4,46	4,21	0,25	5,54
6	6,30	7,05	-0,76	-12,00
7	3,62	3,97	-0,35	-9,77
8	7,08	7,30	-0,21	-3,02
9 (C)	5,79	5,63	0,16	2,73
10 (C)	5,99	5,63	0,36	5,97
11 (C)	6,04	5,63	0,40	6,69

(c) condições de ponto central.

Com análise da Tabela 22 é possível verificar que os dados previstos pelo modelo apresentam pequeno desvio em relação aos dados obtidos nos ensaios experimentais para atividade enzimática da xilanase, indicando uma boa concordância entre os dois valores (Figura 13).

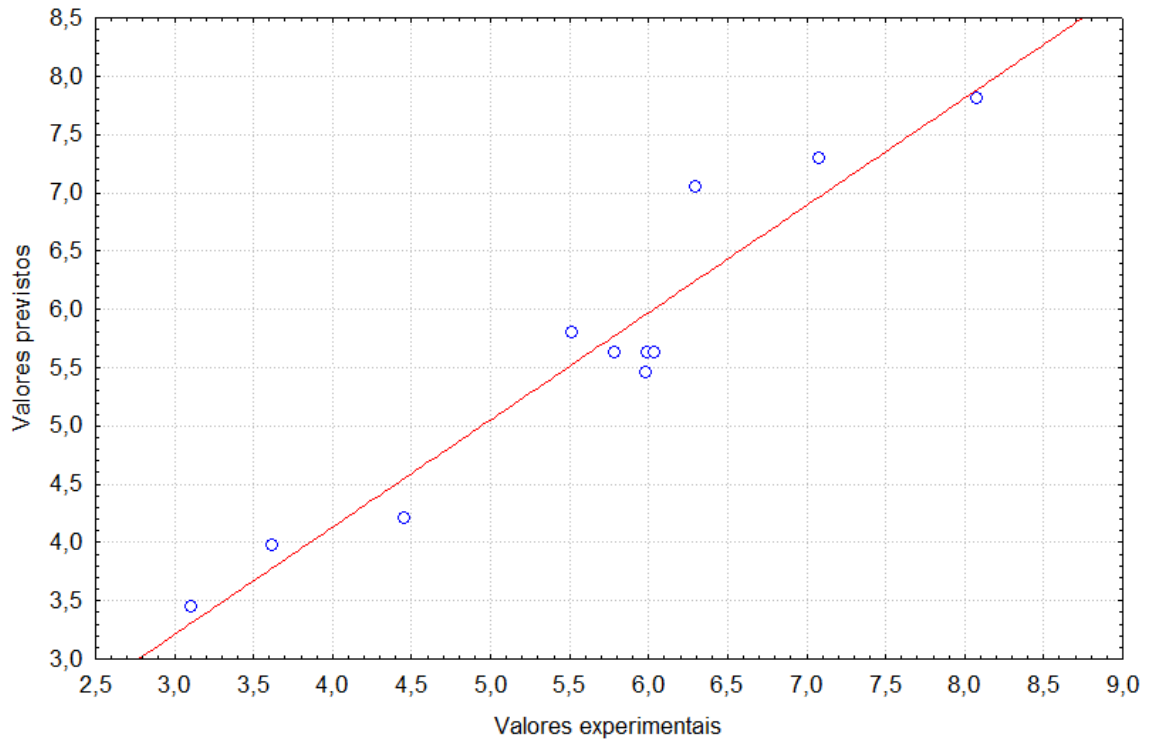


Figura 13. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para atividade enzimática da xilanase.

O gráfico de normalidade (Figura 14) indica uma distribuição normal e independente dos resíduos em torno da reta, corroborando o bom ajuste e validação do modelo.

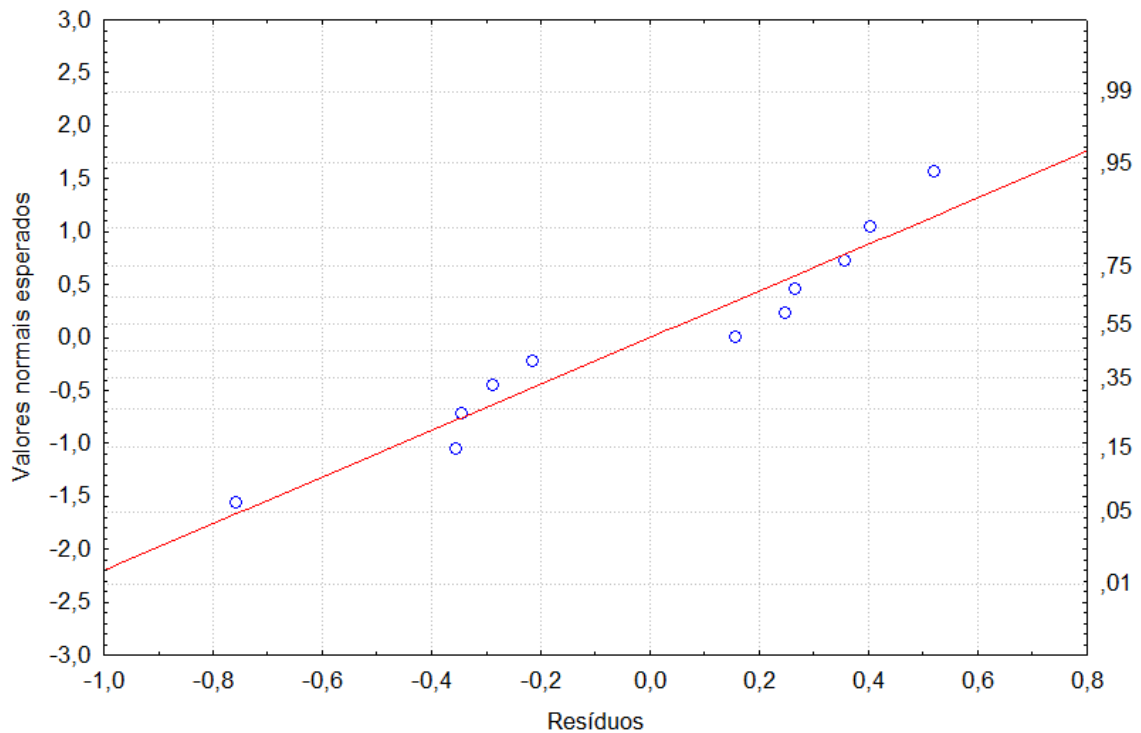


Figura 14. Resíduos *versus* valores normais esperados para atividade enzimática da xilanase.

Os dados obtidos pelo modelo para atividade enzimática da xilanase foram utilizados para a construção do gráfico de superfície de resposta apresentado na Figura 15.

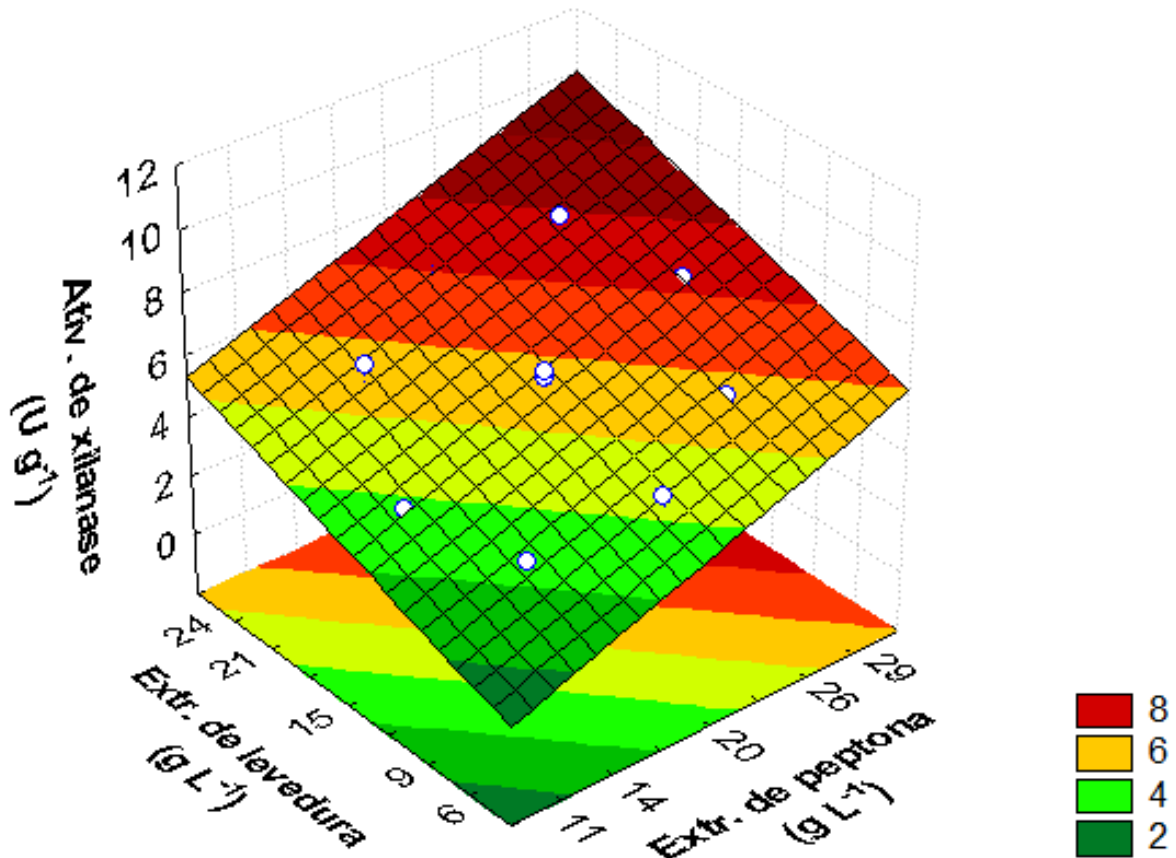


Figura 15. Superfície de respostas para a atividade enzimática da xilanase (U g^{-1}) em função das concentrações de extrato de peptona de carne e de extrato de levedura (g L^{-1}).

Apesar dos resultados obtidos no DCCR também apresentarem um incremento na atividade da xilanase em relação ao planejamento fatorial 2^4 completo, o estudo da superfície de resposta indica que melhores resultados podem ser obtidos com o incremento das variáveis concentração de extrato de peptona e de extrato de levedura.

Neste sentido, foram feitos ensaios com concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura três vezes maiores ao ponto central utilizados na primeira otimização (DCCR) a fim de ser obter resultados preliminares para uma segunda otimização. Assim, os novos valores adotados foram 60 g L^{-1} de extrato de peptona e 45 g L^{-1} de extrato de levedura. Os resultados preliminares obtidos para a

segunda otimização para a atividade enzimática da xilanase (U g^{-1}) são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados preliminares obtidos para a segunda otimização para atividade enzimática da xilanase.

Ensaio	Extrato de peptona	Extrato de levedura	Xilanase (U g^{-1})
12	3,00	3,00	9,69
13	3,00	3,00	9,20
14	3,00	3,00	9,47

Observa-se que em média os resultados obtidos ($9,45 \text{ U g}^{-1}$) representam um acréscimo de 1,16 vezes na atividade enzimática da xilanase em relação aos valores atingidos no DCCR ($8,08 \text{ U g}^{-1}$) (Tabela 13).

A exemplo do ocorrido com a atividade enzimática da CMCase, estes resultados também corroboram o aumento da atividade enzimática da xilanase através do incremento das concentrações de extrato de peptona e de extrato de levedura pressuposto no DCCR. No entanto, novamente após a aplicação do teste de Tukey (item 5.3), esse aumento não apresentou diferença estatística dos resultados obtidos ao nível +1,41, indicando que o aumento da atividade enzimática obtida não justifica economicamente o incremento das concentrações das variáveis estudadas.

5.3 Teste de Tukey

O teste de Tukey foi aplicado nos resultados obtidos em novos ensaios experimentais, sob condições de menor (-1,41) e maior (1,41) concentração de extrato de peptona e concentração de extrato de levedura, bem como em condições 3 vezes maiores ao ponto central utilizadas no DCCR para as variáveis estudadas (Tabela 9 - Item 4.2.9), visando à identificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das atividades enzimáticas de CMCase e xilanase. Os ensaios identificados com as letras α , β e γ são triplicatas entre si. As médias obtidas marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem-se significativamente entre si, com intervalo de 5 % de confiança, e são apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24. Atividades enzimáticas de CMCase e xilanase e médias utilizadas no teste de Tukey.

Ensaio	CMCase (U g ⁻¹)	Média*	Xilanase (U g ⁻¹)	Média
12 α	15,13		9,69	
13 β	15,39	14,97 ^a	9,20	9,45 ^d
14 γ	14,39		9,47	
15 α	7,06		1,78	
16 β	6,91	7,16 ^b	2,37	1,88 ^e
17 γ	7,50		1,50	
18 α	13,10		7,27	
19 β	13,82	13,69 ^a	6,21	6,79 ^d
20 γ	14,15		6,88	

α , β , γ : triplicatas

*médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Através do teste de Tukey verificou-se que tanto para atividade enzimática da CMCase e para atividade enzimática da xilanase houve diferença estatisticamente significativa entre os ensaios feitos nos maiores níveis (+1,41) utilizados no DCCR para o extrato de peptona e extrato de levedura e os ensaios feitos nos menores níveis (-1,41) das variáveis no intervalo estudado. Os resultados obtidos para os níveis +1,41 e +3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os ensaios experimentais para as duas atividades enzimáticas.

Estes dados indicam que os incrementos das variáveis estudadas ao nível +3 não resultam atividades enzimáticas estatisticamente superiores às obtidas ao nível +1,41. Assim, o aumento das atividades enzimáticas não justifica a necessidade do incremento nas concentrações das variáveis estudadas, uma vez que, é possível a obtenção de respostas estatisticamente semelhantes entre os dois níveis estudados, conferindo vantagem econômica aos ensaios feitos com menores concentrações de reagentes.

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos comparados com os relatados na literatura para atividade enzimática da CMCase e da xilanase pelo processo de FES, com a utilização de diferentes substratos e microorganismos fermentadores.

Tabela 25. Resultados obtidos para atividade enzimática da CMCase e xilanase por FES com diversos substratos

Microorganismo	Substrato	Meio	CMCase (U g ⁻¹)	Xilanase (U g ⁻¹)	Fonte
<i>Aspergillus niger</i>	Caroço de açaí	1	14,97	9,45	Este trabalho
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	1	11,78	15,70	Este trabalho
<i>A. niger</i>	Caroço de açaí	2	1,54	1,73	Rodríguez-Zúñiga et al., 2008
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	2	31,09	54,48	Rodríguez-Zúñiga et al., 2008
<i>A. niger</i>	Casca de arroz	2	1,85	0,29	Rodríguez-Zúñiga et al., 2010
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	3	3,24	-	Chandra et al., 2007
<i>A. niger</i>	Casca de amendoim	3	1,36	-	Chandra et al., 2007
<i>A. niger</i>	Farelo de arroz	3	1,09	-	Chandra et al., 2007
<i>A. niger</i>	Casca de arroz	4	0,0	5,07	Park et al., 2002
<i>A. niger</i>	Casca de dendê	5	-	33,99	Kheng et al., 2005
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	6	-	13,8	Archana et al., 1997
<i>B. licheniformis</i>	Farelo de trigo	6	-	14,9	Archana et al., 1997
<i>B. licheniformis</i>	Casca de arroz	6	-	10,1	Archana et al., 1997
<i>A. ellipticus</i> e <i>A. fumigatus</i>	Bagaço de cana de açúcar	7	14,55	-	Gupta; Madamwar (1997)
<i>M. albomyces</i>	Palha de trigo	8	-	7,8	Narang et al., 2001
<i>P. themophila</i>	Palha de trigo	9	-	18,5	Yang et al., 2006

1 – Mandels e Weber, extr. peptona 26 g L⁻¹, extr. levedura 21 g L⁻¹, CMC 5,0 %

2 – Mandels e Weber, (NH₄)₂SO₄ 0,90 %

3 – Czapek Dox, sacarose 30 g L⁻¹, CMC 5 g L⁻¹

4 – Água de maceração de milho 50 % (v/w), extr. levedura 5 % (w/w)

5 – Mandels, NaNO₃ 0,075 % (w/w) e 1,67 mg glucosamina por grama de substrato

6 – MgSO₄ 0,5 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1,5 g L⁻¹, extr. de levedura 2,0 g L⁻¹; peptona, 2,0 g L⁻¹

7 – Mandels, (NH₄)₂SO₄ 0,90 %

8 – Uréia 5,1 %, extr. levedura, 0,74 %

9 – Extr. levedura 5 % (w/w)

Através da Tabela 25 é possível concluir que os valores obtidos neste trabalho para os ensaios realizados em condições de alta concentração das variáveis extrato de peptona (60 g L^{-1}) e extrato de levedura (45 g L^{-1}) são satisfatórios, atingindo níveis superiores aos obtidos por Chandra et al. (2007) - $3,24 \text{ U g}^{-1}$ para CMCCase com farelo de trigo e *A. niger* - e por Park et al. (2002) – $5,07 \text{ U g}^{-1}$ para xilanase com casca de arroz e *A. niger*.

No entanto, valores superiores aos obtidos neste trabalho também são relatados na literatura, porém em outras condições experimentais quanto à suplementação do meio, substrato e microorganismo fermentador. Estas diferenças indicam que novos parâmetros experimentais, como: i) outras concentrações das variáveis; ii) utilização conjunta de outros substratos em diferentes proporções; e iii) utilização de outros microorganismos fermentadores, devem ser estudadas visando à otimização do processo e maximização da produção das enzimas CMCCase e xilanase.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho avaliou-se a viabilidade da utilização do caroço de açaí como substrato para a produção das enzimas celulases e hemicelulases pelo processo de fermentação em estado sólido.

Nos testes realizados, a utilização desse resíduo apresentou menores valores de atividade enzimática da CMCase e xilanase em relação à utilização do farelo de trigo como substrato. Porém, o caroço do açaí mostrou-se promissor por apresentar disponibilidade crescente a baixo custo. A utilização desse resíduo agroindustrial possibilitaria minimizar os problemas ambientais ocasionados por sua destinação no meio ambiente, quase sempre sem nenhum tratamento. Outro fator é a possibilidade de agregar valor ao resíduo tornando-se uma nova fonte de renda para as populações ribeirinhas da Região Norte do Brasil, que tem no cultivo do açaí sua principal atividade financeira.

Através da metodologia de planejamento fatorial 2^4 completo foi possível, através de um número reduzido de ensaios, identificar as variáveis estudadas como significativas ou não para a produção de celulases e hemicelulases. Assim, os valores para concentração de extrato de peptona de carne e concentração de extrato de levedura apresentaram-se estatisticamente significativas a 90 % de confiança no intervalo estudado. Por outro lado, a concentração de CMC e a umidade inicial do meio não se apresentaram estatisticamente significativas, podendo ser fixadas em seu menor nível (0,5 % e 40 %, respectivamente), reduzindo os custos do processo.

Após a elaboração de um delineamento composto central rotacional (DCCR), as maiores atividades enzimáticas obtidas para CMCase ($8,24 \text{ U g}^{-1}$) e xilanase ($8,08 \text{ U g}^{-1}$) foram obtidas com adição de 26 g L^{-1} de extrato de peptona de carne e 21 g L^{-1} de extrato de levedura ao meio de suplementação.

As análises das superfícies de resposta indicam que o incremento nos valores destas variáveis resultaria em melhores atividades enzimáticas. Neste sentido, novos ensaios foram realizados em condições de concentrações de extrato de peptona e extrato de levedura 3 vezes maiores às adotadas no ponto central do

DCCR, resultando em aumento da atividade enzimática da CMCase em 1,59 vezes e para atividade enzimática da xilanase em 1,16 vezes.

No entanto, a aplicação do teste de comparação de médias, teste de Tukey, indicou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos nos ensaios feitos em concentrações de extrato de peptona e extrato de levedura nos níveis +1,41 e +3. Esse resultado sugere vantagem econômica aos ensaios feitos ao nível +1,41, uma vez que é possível a utilização de reagentes do processo em menor quantidade.

Esse resultado sugere que novos ensaios de otimização dos parâmetros podem ser realizados próximos a essas concentrações, possibilitando a redução das quantidades dos reagentes e, conseqüentemente, aumentar a viabilidade econômica do processo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A metodologia e os resultados obtidos aqui apresentados podem ser utilizados para diversos fins, porém sugere-se o desenvolvimento de trabalhos complementares, tais como:

- elaboração de uma nova otimização dos parâmetros para as variáveis estudadas;
- identificação e avaliação de novas variáveis influentes no processo de produção enzimática;
- utilização de outros tipos de substratos (farelo de trigo, soja, arroz), em diferentes proporções, em complementação ao caroço do açaí;
- caracterização dos extratos enzimáticos obtidos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos** - Boletim, v.18, n.1. Curitiba : [s.n.], jan./jun. 2000.
- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G. de; SOUZA, C.G.M. de; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.2, p.364-368, abr./Jun. 2007.
- ALICEWEB. Ministério do desenvolvimento e comércio exterior do Brasil. Disponível em:<<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 22 fev. 2010.
- ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation Department of Microbiology, **University of Delhi**. South Campus, New Delhi, India, v.21, p.12-17, 1997.
- BACELLAR, A.A. et al. **Geração de renda na cadeia produtiva do açaí em projeto de abastecimento de energia elétrica em comunidades isoladas no município de Manacapuru-Am**. Manaus: Centro de Desenvolvimento Energético Amazônico; Universidade Federal do Amazonas, 2006.
- BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. **III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol**, São Paulo, dez. 2006.
- BORRIS, R. Biology of enzymes. In: REHM, H.J.; REED, O.G. (Ed.). **Biotechnology**. v.7a., cap.2. Weinheim: VCH, 1987.
- BRANDÃO, K.S.R. **Otimização do processo de produção de biodiesel metílico e etílico do óleo de mamona (*Ricinus Communis* L.) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR)**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão. São Luis, 2007.
- BRANDÃO, K.S.R.; PENHA, M. da N.C.; MENDONÇA, K.K.M.; MACIEL, A.P.; SOUSA, A.G.; SILVA, F.C. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de mamona usando o delineamento composto central rotacional (DCCR)**. [6 p.]. Universidade Federal do Maranhão. São Luis, 2008.
- BRAVO, C.E.C.; CARVALHO, E. P. de; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e agrotecnologia**, v.24 (Edição Especial), p.137-152, dez., 2000.
- CAMARGO, L.A.; DENTILLO, D.B.; CARDELLO, L.; GATTÁS, E.A. de L. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus sp*. **Alimento e Nutrição**. v.16, n.2, p.153-156, abr./jun. ISSN 0103-4235. Araraquara, 2005.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. **47º Congresso Brasileiro de Química**. [s.n.] : Natal-RN, 2007.
- CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CAPUDI, M.; CASTRO, M.C. de; RAMSDORF, W.A.; SILVA, E.R. Biodegradação de compostos lignocelulósicos pelo fungo *Pleurotus sajor-caju*. In: Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, p.22. **Anais...** Joinville : [s.n.], 2003.

- CARPITA, N.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, London, v.3, n.1, p.1–30, 1993.
- CASTRO, A.M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- CASTRO, A.M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química. Nova**, v.33, n.1, p.181-188, São Paulo, 2010.
- CEREIA, M.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A.; GREENE, L.J.; ROSA, J.C.; POLIZELI, M.L.T.M. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*: biochemical and regulatory properties. **Journal of Basic Microbiology**. v.2, p.83-92, London, 2000.
- CHANDRA, M.S.; VISWANATH, B.; RAJASEKHAR REDDY, B. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.323–328. Anantapur: Sri Krishnadevaraya University, dez., 2007.
- CHANG, S.T. Bioconversion technology: composting and production of microbial and metabolites. In: SILVA, E.R. **Biodegradação fúngica de resíduos agroindustriais para produção de biomassa microbiana, enzimas lignocelulolíticas e redução de fitatos**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2001.
- CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity., **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, p.5–37. Clifton: EBSCO, 2000.
- CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, n.49, v.3, p.361–369. [S.I.]: Elsevier, 2010.
- COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M. de F.; FURTADO, A.A.L.. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - Boletim**, v.19, n.1, p.3342. Curitiba: [s.n.], jan./jun. 2001.
- COURI, S.; FARIAS, A.X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v.26, p.314-317. São Paulo, 1995.
- CRUZ, S.H., CASSIO, F., LEÃO, C., ERNANDES, J.R. O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônio em *Saccharomyces cerevisiae*. **Eclética química**, vol. 26, n. 001. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, [s.n.], 2000.
- ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FORGATY, W.M. (Org.). **Microbial enzymes and biotechnology**. p.183-223. New York: Applied Science, 1983.
- FROST, M.G.; MOSS, D.A. Production of enzymes by fermentation. In: REHM, H.J.; REED, O.G. (Ed.). **Biotechnology**. v.7a. Weinheim: VCH, 1987.
- FUJII, S.; ASSUNÇÃO, F.G.A.; TANIWAKI, M.H.; SCHOLZ, M.B. dos S.; GÓMEZ, R.J.H.C.; HIROOKA, E.Y. Atividade fungistática “in vitro” de cafeína em fungos associados com grãos de café. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.26, n.3, p.279-285. Maringá, 2004.
- FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.2, p.1207-1212, Washington DC: American society for microbiology, 2004.

- GOKSOYR, J.; ERIKSEN, J. Cellulases. In: ROSE, A.H. (Ed.). **Microbial enzymes and bioconversions**. v.5, p.47. London: Academic Press, 1980.
- GUPTA, A., MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and betaglucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Process**, v.13, n.4, p.166-169, Washington DC : American society for microbiology, 1997.
- HIMMEL, M.E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.4, p.358-364, [S.l.] : Elsevier, 1999.
- HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, Issue 2, p.175-186, Dordrecht : EBSCO, 2004.
- HONG, K.; TANNER, R.D.; CROOKE, P.S.; MALANEY, G.W. Semisolid state fermentation of baker's yeast in an air-fluidized bed fermentor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.18, p.3-17. Dordrecht : EBSCO, 1988.
- HOWARD, R.L.; MASOKO, P.; ABOTSI, E. Enzyme activity of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.9, p.296-300. Abraka : Academic Journals, 2003.
- HSU, T.A. Pretreatment of biomass. In: WYMAN, C.E. (Ed.). **Handbook on bioethanol, production and utilization**. Washington: Taylor & Francis, 1996.
- HSU, T.A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v.10, n.5, p.315–319. London : RSC, 1980.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: anuário 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2008/comentario.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2010.
- INT – INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA. **Biocatálise auxilia no desenvolvimento de tecnologias limpas**. Ministério da Ciência e Tecnologia – Brasil. Disponível em: <<http://www.int.gov.br/Novo/Menu/C%F3pia%20de%20main.html>>. Acesso em: 14 maio 2010.
- JEFFRIES, T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**. v.1, p.163-176. [S.l.] : Springer, 1990.
- KHENG, P.P.; OMAR, I.C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. **Journal of Science Technology**. v.27, n.2. Songklanakarín : [S.l. : s. n.], 2005.
- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n.4, p.345-351. [S.l. : s.n.], 2002.
- KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p.147-150. [S.l.] : Informa UK Ltd., 2004.
- KUBICEK, C.P. The Cellulose proteins of *Thichoderma reesei*: structures, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemistry Engineering / Biotechnonology**, v.45, p1-27. [S.l. : s.n], 1992.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. v.1, 4.ed. São Paulo: Salvier, 2006.
- LIMA, A.L.G-.; VINHA, F.N.M. da; SOUZA, D.T.; BISPO, A.S.R.; BOM, E.P.S.; COELHO, R.R.R.; NASCIMENTO, R.P. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied Biochemist Biotechnology**, v.155, p.321–329, DOI 10.1007/s12010-008-8482-y. [S.l.], 2009.

- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v.3, p.247-270. São Paulo : Editora Edgard Blucher Ltda., 2001.
- LIU, J.; YANG, J. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. **Food Technology in Biotechnology**, v.45, n.4, p.420–425. [S.I.] : Elsevier, 2007.
- LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, n.6, p.258-265. [S.I.] : Elsevier, 1985.
- LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v.21, p.403-465. [S.I.] : Annual reviews, 1996.
- MACIEL, G.M.; VANDENBERGHE, L.P. de S.; HAMINIUK, C.W.I.; FENDRICH, R.C.; BIANCA, B.E.D.; BRANDALIZE, T.Q. da S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. **Food Technology in Biotechnology**, v.46, n.2, p.181–187. [S.I.], 2008.
- MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, Washington, 1969.
- MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2005.
- MATEUS, N.B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, v.23, n.6, p.1537-1546. Maringá, 2001.
- MATULOVA, M. R. NOUAILLE, R.; CAPEK, P.; PE´AN, M.; FORANO, E.; DELORT, A.-M Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.3, p.1247-1253. Dordrecht : EBSCO, 2005.
- MENEZES, G.D.G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, v.31, p.426-428. [S.I.], 1959.
- MOSIER, N.S.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, n.2005, p.673-686. [S.I.], 2004.
- MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology**. New York : Wiley, 2002.
- NARANG, S.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS-68 In: **Solid state fermentation using response surface methodology**. J. Biosci. Bioeng. v.92, p.425– 427. [S.I.], 2001.
- NASCIMENTO, W.M.O.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CICERO, S.M. Conseqüências fisiológicas da dessecação em sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**. v.29, n.2, p.38-43. [S.I.], 2007.
- NOGUEIRA, M.F.M. **Biomassa energética: caracterização de biomassa**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2007.

OGIER, J.C.; BALLERINI, D. ; LEYGUE, J.P. ; RIGAL, L. ; POURQUIE, J. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 67-94, 1999.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, v. 74, p. 81-87. Amsterdam, 2000.

PARK, Y.S.; KANG, S.W.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. 2002. Xylanase production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Appl. Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.761-766. [S.I.], 2002.

PITARELO, A. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana de açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná. [S.I.], 2007.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

PRASERTSAN, P.; KITTIKUL, A.H.; KUNGHA, A.; MANEESRI, J.; OI, S. Optimization for xylanase and cellulose production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.13 p.555-559, 1997.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos fungos**. 2.ed. v.1, p.605. Santa Cruz do Sul : EDUNISC, 2002.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, n.2, p.161-179. [S.I.], 2005.

RAMOS, L.P. The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, n.6, p.863-871. [S.I.], 2003.

READ, N.D. Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions. In: MENDGEN, K.; LESEMANN, D.E. **Electron microscopy of plant pathogens**, p.17-29. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

REIS, B.O.; SILVA, I.T.; SILVA, I.M.O.; ROCHA, B.R.P. **Produção de briquetes energéticos a partir de caroços de açaí**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2002.

RENNÓ, C.D. Estatística: aplicação ao sensoriamento remoto. **INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, DPI – Divisão de Processamento de Imagens**. [S.I.] : Ministério da Ciência e Tecnologia, 2010. Disponível em: <www.dpi.inpe.br/~camilo/estatistica2010/07testehipotese.ppt>. Acesso: 01/07/2010.

RODRIGUES, A.M.; SANT'ANNA, E.S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.21, n.1, pp. 57-62. ISSN 0101-2061. [S.I.], 2001.

RODRIGUES, G.R. **Prospecção de genes de celulase presentes em biblioteca metagenômica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Pecuária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora. Campinas - SP, 2005.

- RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; BERTUCCI, V.; LEMO, V.A. Produção de complexos lignocelulíticos em substratos derivados de resíduos agroindustriais por fermentação semi-sólida. Workshop de Biotransformação e Biotransformação. **Anais ...** Guarujá – SP, 2008.
- ROGEZ, H. **Açaí**: preparo, composição e melhoramento da composição. Belém: EDUFPA, 2000.
- RUSTIGUEL, C.B. **Produção, purificação e caracterização bioquímica das invertases do fungo filamentoso *Aspergillus phoenicis***. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.
- RYDHOLM, S.A. **Pulping processes**, p.3-90. New York: Interscience; John Wiley, 1965.
- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Ind. Microbiological and Biotechnological**, v.30, p.279-291, [S.l. : s.n.], 2001.
- SANTOS, E.V.M.; SILVA FILHO, H.A.; SAMPAIO, G.M.M.S.; RODRIGUES, K.A. Avaliação de dois TDH no tratamento biológico de efluente têxtil em reatores com fungos. In: Congresso de pesquisa e inovação da rede norte nordeste de educação tecnológica, 2., 2007, João Pessoa. **Anais...** [S.l. : s.n.], 2007.
- SCHIRMANN, G.da S. **Composição em ácidos graxos do açaí (*Euterpe edulis*) de diversas regiões de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- SHAFIQ, K.; SIKAND, A.; LKRAM, H. Effect of Different mineral nutrients on invertase production by *Sacharomyces cerevisiae* GCB-K5. **Biotechnology**. v.1, n.1, p.40-44, [S.l.], 2002.
- SHLESER, R. **Ethanol Production in Hawaii**: Processes, Feedstocks and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii. Honolulu: Energy Division, Dept. of Business, Economic Development and Tourism, State of Hawaii, 1994.
- SILVA, J.P.A. **Estudo da produção do etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova** [online], v.32, n.3, p.661-671, 2009.
- SILVA, V.R. da; MELEIRO, L.A. da C. **Estudos preliminares sobre modelagem e simulação de processos fermentativos no estado sólido**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004
- SILVERSTEIN, R.A. A Comparison of Chemical Pre-treatment Methods for Converting Cotton Stalks to Ethanol. **Biological and agricultural engineering**, p.19. Raleigh, 2004.
- SIMÕES, M.L.G.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. **Holos Environment**, v.5, n.2, p.94. [S.l.], 2005.
- SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J. Optimization of inulinase production by *Aspergillus niger*. **Food Technology Biotechnology**, v.42, n.3, p.141-146. Lublin, 2004.
- SLIVINSKI, C.T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.
- SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

- STRYER, L. **Bioquímica**. 4^o Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1996.
- TATTINI JR., V.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.1, jan./mar. [S.I.], 2006
- TEIXEIRA, L.B.; OLIVEIRA, R.F. de; FURLAN JR., J.; GERMANO, V.L.C. **Características químicas de composto orgânico produzido com lixo orgânico, caroço de açaí, capim e serragem**. Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico. Belém, 2004.
- TEIXEIRA, L.N. ; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.A. de. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**. v.55, n.4, p.297-304, ISSN 0034-737X. [S.I.], 2008.
- TENGERDY, R.P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.169-179. [S.I.], 2003.
- TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29, n.2, p.338-350. [S.I. : s.n.], 2006.
- VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CAPELLE, E.R. **Tabela brasileira de composição de alimentos para bovinos**. p.288. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.
- VILLENA, G.K.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Production of lignocellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* biofilms at variable water activities **Electronic Journal of Biotechnology** v.10 n.1, ISSN: 0717-3458, [S.I.], 2007.
- VITTI, D.C.C.; KLUGE, R.A.; JACOMINO, A.P.; LIMA, G.P.P. Tratamento térmico para controle da lanosidade em pêssegos 'Dourado-2' refrigerados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.12, p.1705-1713. ISSN 0100-204X. Brasília, dez. 2007.
- VITTI, L.S.S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus sp* e seus mutantes isolados de bagaço de cana**. 108 p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1988.
- WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995.
- WENZEL, H.F. **The Chemical technology of wood**. New York: Academic Press, 1970.
- WHITMAN, W.B.; WYMAN, C.E.; GROHMANN, K. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, v.95, p.6578. Washington DC., 1998.
- WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, v.1, p.147-161. Dordrecht, 1990.
- WYMAN, C.E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v.24, p.189-226. [S.I.], 1999.
- YANG, S.Q.; YAN, Q.J.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; TIAN, H.M.; WANG, Y.Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.97, n.15, p.1794-1800. [S.I.], 2006.
- ZHANG, Y-H. P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, p.797-824. [S.I.], 2004.
- ZHANG, Y-H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, n.5, p.452-481. [S.I.], 2006.