



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
CENTRO DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO
SOCIOAMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

BIODEGRADAÇÃO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA
PRESENTES NO FARELO DE CACAU VISANDO À FORMAÇÃO DE
AÇÚCARES REDUTORES

INGRID SOUZA CAVALCANTE

ITAPETINGA

2013

BIODEGRADAÇÃO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA
PRESENTES NO FARELO DE CACAU VISANDO À FORMAÇÃO DE
AÇÚCARES REDUTORES

INGRID SOUZA CAVALCANTE

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia, para obtenção do título de
Mestre, do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais,
área de concentração em Meio
Ambiente e Desenvolvimento.

Orientador:

Prof.*D.Sc.* Marcelo Franco

Co-orientador:

Profa. *D.Sc.* Andréa Gomes da Silva

ITAPETINGA

2013

660.634 Cavalcante, Ingrid Souza.
C364b Biodegradação da celulose, hemicelulose e lignina presentes no farelo de cacau visando à formação de açúcares redutores. / Ingrid Souza Cavalcante. - Itapetinga: UESB, 2013.
72f.

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e co-orientação da Profa. D.Sc. Andréa Gomes da Silva.

1. Resíduos agroindustriais – Farelo de cacau. 2. Açúcares redutores – Atividades de enzimas - Fermentação em estado sólido. 3. Açúcares redutores - Produção - fungo *Aspergillus oryzae*. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Franco, Marcelo. III. Silva, Andréa Gomes da. IV. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na fonte:
Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Resíduos agroindustriais – Farelo de cacau
2. Açúcares redutores – Atividades de enzimas - Fermentação em estado sólido
3. Açúcares redutores - Produção - fungo *Aspergillus oryzae*

INGRID SOUZA CAVALCANTE

**BIODEGRADAÇÃO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA
PRESENTES NO FARELO DE CACAU VISANDO A FORMAÇÃO DE
AÇÚCARES REDUTORES**

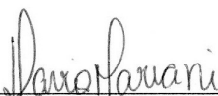
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 27/03 /2013

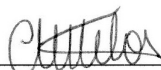
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcelo Franco – UESC
Orientador, Presidente



Prof.ª. Dr.ª. Flávia Mariani Barros – UESB



Prof.ª. Dr.ª. Cristiane Martins Veloso - UESB

*Ao meu Deus, que me permitiu sonhar e
conquistar mais esse sonho!*

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo seu imenso amor e fidelidade, sem Ele nada poderia fazer.

Aos meus pais, Pedro e Ihandira pela força, apoio e incentivo.

Ao meu filho Cauã em especial, por todo seu amor.

Ao meu amor Pedro Acáz, pela compreensão e carinho.

Ao Prof^oD.Sc. Marcelo Franco por sua contribuição, orientando-me para realização deste trabalho.

À Prof^aD. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo, por sua ajuda com a estatística.

A prof^a. M.Sc.Kátia Iro pela contribuição no LABRA.

À Prof^aD. Sc. Andrea Gomes da Silva pela co-orientação.

Aos meus queridos ajudantes de I. C. Alexsandra, Gleydison e Ismaicon que colaboraram diretamente com a minha pesquisa.

A todos meus companheiros de laboratório Adriana, Alexsandra, Clissiane, Grazielle, Gleydison, Ismaicom, Tamires e Thiago, pela força nos momentos difíceis, pela amizade que construímos durante esta caminhada, pelas horas de risadas, pelos conselhos, enfim por tudo que vivemos nestes dois anos maravilhosos juntos no LABRA.

A Ana Carolina em especial que além de me dar uma grande força, se tornou muito querida neste período em que trabalhamos juntas.

As professoras D. Sc Flávia Mariani e a D.Sc Cristiane Veloso, que aceitaram com carinho constituírem a banca avaliadora.

A CAPES por concessão da bolsa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração e realização deste trabalho.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca
vem a inteligência e o entendimento”
Provérbios 2:6

RESUMO

CAVALCANTE, I.S. **Biodegradação da Celulose, Hemicelulose e Lignina Presentes no Farelo de Cacau Visando à Formação de Açúcares Redutores**. Itapetinga - BA: UESB, 2013. 67 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento)*

O objetivo do presente trabalho consistiu no aproveitamento do farelo de cacau na produção de açúcares fermentáveis, utilizando o processo de fermentação em estado sólido (FES) com os fungos filamentosos *Aspegillus oryzae* e *Rhizopus* sp. Os fatores estudados foram: variação de tempo, umidade e temperatura. Após a fermentação, os extratos enzimáticos foram recuperados e realizadas as análises do teor de açúcar redutor, e das atividades enzimáticas, CMCCase, FPase, Xilanase, Lacases, Peroxidases e Manganês peroxidase. Os dados foram avaliados por meio da análise de variância e regressão, além da utilização da metodologia de superfície de resposta com o delineamento Box-Behnken (DBB) no esquema fatorial 2³. Os modelos foram escolhidos com base no coeficiente de determinação (r²) e no fenômeno em estudo, e a significância observada por meio do teste F, a 5% de probabilidade, utilizando o sistema de análises SAS e para montagem dos gráficos o programa SigmaPlot 11.0. Os fungos elevaram a concentração de açúcar redutor do resíduo (11 e 9%, sendo os valores para *Rhizopus* e *Aspergillus oryzae* respectivamente), e durante esse processo ocorreu atividade enzimática da CMCCase (17 e 22U/g), FPase (15 e 14U/g) Xilanase (26 e 20U/g), Lacase (15000 e 28000U/g), Peroxidase (45000 e 90000U/g) e Mn peroxidase(22000 e 28000U/g) sendo que, os fatores mais influentes neste trabalho foram o tempo e a umidade. Os fungos se mostraram promissores para produção de compostos de interesse industrial, como os açúcares fermentáveis na produção de bioetanol e as enzimas que tem mercado amplo em diversas áreas como de alimentos e farmácia, por exemplo. A FES é um processo viável e que permite aproveitar resíduos agregando valores para o mesmo beneficiando o agronegócio.

Palavras-chaves: Resíduo, Fermentação em Estado Sólido, Açúcar Redutor, Atividades Enzimáticas.

*Orientador: Marcelo Franco D. Sc. UESB.

ABSTRACT

CAVALCANTE, I. S. **Celulose Biodegradation, Hemicellulose and Lignin Found in Bran Cocoa Aiming the Formation of Reduction Sugars.** Itapetinga - BA: UESB, 2013. 67 p. (Thesis - Master in Environmental Sciences - Concentration Area in Environment and Development) *

The purpose of this work was the use of cocoa bran in the production of fermentable sugars, using the process of solid state fermentation (SSF) with the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus* sp. The factors studied were: time variation, humidity and temperature. After fermentation, the enzymatic extracts were recovered and submitted to the analysis of the content of reducing sugar, and enzymatic activities, CMC_{Case}, FPase, Xylanase, Laccases, Peroxidases and Manganese peroxidase. Data were evaluated by the analysis of variance and regression, in addition to the use of response surface methodology as the Box-Behnken design (DBB) in a factorial 2³. The models were chosen based on determination coefficient (R²) and on the experiment in study, and the significance observed by the F test, at 5% probability, using the analysis system SAS, and to elaborate the graphics the program SigmaPlot 11.0. Fungi increased the concentration of reducing sugar residue (11% and 9%, *Rhizopus* sp and *Aspergillus oryzae* respectively), and during this process occurred CMC_{Case} enzymatic activity (17 U / g and 22 U / g), FPase (15 U / g, 14 U / g) Xylanase (26 and 20 U / g) Laccase (15,000 U / g and 28,000 U / g), peroxidase (45,000 U / g and 90,000 U / g) and manganese peroxidase (22,000 U / g and 28,000U / g) the factors that influenced this work were time and humidity. Fungi were promising for the production of industrial interesting compounds such as fermentable sugars in the production of bioethanol and the enzymes that have a broad market in various fields such as pharmacy and food, for example. The SSF is a viable process that allows the use of waste by adding value, benefiting the agroindustrial complex of cocoa.

Keywords: Waste, SSF, Reducing Sugar, Enzymatic Activities.

*Orientador: Marcelo Franco D. Sc. UESB.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Variáveis estudadas na produção das enzimas e determinação de açúcares redutores pelo fungo *Aspegillus oryzae*
- Tabela 2** Variáveis estudadas na produção das enzimas e determinação de açúcares redutores pelo fungo *Rhizopus sp.*
- Tabela 3** Análise de variância da quantificação do açúcar redutor produzido pelo fungo *Rhizopus sp.*
- Tabela 4** Quantificação de AR em resíduo sem fermentação
- Tabela 5** Análise de variância da quantificação do açúcar redutor produzido pelo fungo *Aspergillus oryzae*.
- Tabela 6** Análise de variância da quantificação do açúcar redutor produzido pelos fungos *Rhizopus sp.* E *Aspergillus oryzae*.
- Tabela 7** Modelos reduzidos da produção de açúcar redutor pelos fungos *Rhizopus sp* e *Aspergillus oryzae*, em termos de valores não codificados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósicos	20
Figura 2	Cadeia de celulose (mostrando as ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4)).	21
Figura 3	Esquema estrutural proposto para lignina de <i>Picea abies</i>	22
Figura 4	Cacau – <i>Theobroma cacao</i> .	23
Figura 5	A e B Imagem de <i>Rhizopus sp.</i> a partir de um microscópio óptico.	27
Figura 6	Imagem de um exemplar do gênero <i>Aspergillus</i> .	28
Figura 7	A - Resíduo de cacau moído para fermentação; B - Moinho de facas.	30
Figura 8	Erlenmeyer contendo resíduo para pronto para fermentação	32
Figura 9	Incubadora (Shaker) com ventilação forçada.	32
Figura 10	Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis: tempo, temperatura e umidade de fermentação sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo <i>Rhizopus sp.</i>	40
Figura 11	Superfície de resposta da produção de açúcar pelo fungo <i>Rhizopus sp.</i>	41
Figura 12	Atividade de CMCase em relação ao tempo	42
Figura 13	Atividade de FPase do fungo <i>Rhizopus sp</i>	44
Figura 14	Atividade de xilanase do fungo <i>Rhizopus sp</i>	45
Figura 15	Atividade enzimática da lacase pelo fungo <i>Rhizopus sp</i>	46
Figura 16	Atividade da peroxidase do fungo <i>Rhizopus sp</i>	48
Figura 17	Atividade da manganês peroxidase do fungo <i>Rhizopus sp</i>	49
Figura 18	Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis: tempo, temperatura e umidade de fermentação sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	51
Figura 19	Produção de açúcar redutor pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	52
Figura 20	Atividade da CMCase produzida pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	53
Figura 21	Atividade da FPase produzida pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	55
Figura 22	Atividade da Xilanase produzida pelo <i>Aspergillus oryzae</i>	56

Figura 23	Atividade de Lacase do <i>Aspergillus oryzae</i>	57
Figura 24	Atividade de Peroxidase do <i>Aspergillus oryzae</i>	58
Figura 25	Atividade de manganês peroxidase do <i>Aspergillus oryzae</i>	59
Figura 26	Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo <i>Rhizopus</i> sp	61
Figura 27	Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i> no resíduo tratado	62
Figura 28	Produção de AR pelo <i>Rhizopus</i> sp no resíduo com 0 de açúcar inicial	63
Figura 29	Produção de AR pelo <i>Aspergillus oryzae</i> no resíduo com 0 de açúcar inicial	63

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Calculo da concentração de esporos	31
Equação 2	Modelo polinomial de segunda ordem	36
Equação 3	Modelo reduzido da produção de AR pelo <i>Rhizopus</i> sp	40
Equação 4	Modelo reduzido da atividade de CMCase do fungo <i>Rhizopus</i> sp	42
Equação 5	Modelo reduzido da atividade de FPase do fungo <i>Rhizopus</i> sp	43
Equação 6	Modelo reduzido da atividade de xilanase do fungo <i>Rhizopus</i> sp	44
Equação 7	Modelo reduzido da atividade de lacase do fungo <i>Rhizopus</i> sp	46
Equação 8	Modelo reduzido da atividade da peroxidase do fungo <i>Rhizopus</i> sp	47
Equação 9	Modelo reduzido da atividade da manganês peroxidase do fungo <i>Rhizopus</i> sp	48
Equação 10	Modelo reduzido da produção de AR pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	51
Equação 11	Modelo ajustado da atividade de CMCase pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	53
Equação 12	Modelo ajustado da atividade de FPase pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	54
Equação 13	Modelo ajustado da atividade de Xilanase pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	55
Equação 14	Modelo ajustado da atividade de Lacase pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	56
Equação 15	Modelo ajustado da atividade de peroxidase pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	57
Equação 16	Modelo ajustado da atividade de Manganês peroxidase pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	59

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Enzimas celulasas com funções endoclucanases
FPase	Mistura de enzimas celulasas com funções endoglucanases e exoglucanases
DNS	Àcido 3,5-Dinitrosalicílico
TEM	Tempo
T	Temperatura
UM	Umidade
pH	Potencial de hidrogênio
aW	Atividade de água
μL	Micro litro
nm	Nanómetros
mM	micro Mol
E	Coefficiente de absorção molar
AR	Açúcar redutor
FES	Fermentação em Estado Sólido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Resíduos Agroindustriais.....	19
2.1.1 Compostos Lignocelulósicos.....	20
2.1.1.1 Celulose.....	20
2.1.1.2 Hemicelulose.....	21
2.1.1.3 Lignina.....	21
2.2 Resíduo de Cacau.....	22
2.3 Fermentação em Estado Sólido.....	23
2.3.1 Fatores que Influenciam a FES.....	24
2.3.1.1 pH.....	24
2.3.1.2 Temperatura.....	24
2.3.1.3 Umidade e Atividade de Água (aw).....	25
2.4 Fungos Filamentosos na FES.....	26
2.4.1 <i>Rhizopus</i>	26
2.4.2 <i>Aspergillus</i>	27
2.5 Enzimas.....	28
2.6 Açúcares redutores.....	29
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	30
3.1 Resíduo de Cacau.....	30
3.1.1 Resíduo de cacau pré-tratado.....	30
3.2 Microrganismos.....	31
3.2.1 Preparo da solução de esporos.....	31

3.3 Fermentação em Estado Sólido.....	31
3.4 Extração do extrato enzimático.....	33
3.5 Determinação de açúcares redutores.....	33
3.6 Análises das atividades enzimáticas.....	33
3.6.1 Determinação da enzima CMCase.....	33
3.6.2 Determinação da enzima FPase.....	34
3.6.3 Determinação de Xilanase.....	34
3.6.4 Determinação da atividade enzimática da Lacase.....	35
3.6.5 Determinação da atividade enzimática da peroxidase.....	35
3.6.6 Determinação da atividade enzimática de manganês peroxidase.....	35
3.6.7 Curva de Calibração.....	36
3.7 Análises Estatísticas.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Produção de açúcares redutores pelo fungo <i>Rhizopus</i> sp.....	39
4.2 Hidrólise enzimática do <i>Rhizopus</i> sp durante a produção de açúcar.....	42
4.2.1 Atividade da CMCase.....	42
4.2.2 Atividade da FPase.....	43
4.2.3 Atividade da xilanase.....	44
4.2.4 Atividade da Lacase.....	46
4.2.5 Atividade da Peroxidase.....	47
4.2.6 Atividade da Manganês peroxidase.....	48
4.3 Produção de açúcares redutores pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	50
4.4 Hidrólise enzimática do <i>Aspergillus oryzae</i> durante a produção de açúcar redutor.....	53
4.4.1 Atividade da CMCase.....	53
4.4.2 Atividade da FPase.....	54

4.4.3 Atividade da xilanase.....	55
4.4.4 Atividade da Lacase.....	56
4.4.5 Atividade da Peroxidase.....	57
4.4.6 Atividade da Manganês peroxidase.....	58
4.5 Quantificação da produção de açúcares redutores em resíduo pré-tratado para retirada dos açúcares redutores.....	60
5 CONCLUSÃO.....	65
6 REFERENCIAS.....	66

1INTRODUÇÃO

A geração de resíduos é um problema que abrange todos os setores de produção e o descarte incorreto desses, causam diversos problemas ambientais (ASGHER, 2008), tornando-se necessário minimizar os impactos causados. Considerando que esses resíduos são recursos renováveis, sub-produtos ou produtos secundários, muitos estudos têm sido realizados visando o seu aproveitamento de forma viável (SPIER, 2005; GHORAI, 2009).

No agronegócio cacaueteiro aproveita-se menos de 8% do fruto para produção de manteiga e chocolate. O aproveitamento destes resíduos seria vantajoso para aumentar a margem de lucros deste agronegócio. O estado da Bahia é um dos maiores responsáveis por a produção nacional deste fruto, e o único da região Nordeste (MAPA, 2013). Uma parte do resíduo do cacau é o farelo de cacau, que é o subproduto da retirada do tegumento antes da torrefação das sementes (CARVALHO, 2006) e pode ser encontrado no mercado com preços acessíveis.

Como esses resíduos são de origem vegetal e a parede celular dos vegetais é rica em lignocelulose, que por sua vez é constituída principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (ZUNIGA, 2010), os quais são os compostos orgânicos mais abundantes do planeta, e diversas pesquisas científicas têm se destacado, com a finalidade de biotransformar esses compostos em açúcares fermentáveis.

Os processos fermentativos para aproveitamento desses compostos lignocelulósicos tornam viável a produção de produtos com alto valor agregado (PANDEY, 2003). Neste contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento desses resíduos, pois devido ao crescimento microbiano, ocorre à síntese de diversos compostos, dos quais muitos são de grande interesse para segmentos industriais (PINTO, 2005).

Os fungos filamentosos são os mais promissores na produção de biomassa, uma vez que além de elevarem o teor protéico, também aumentam a biodisponibilidade de diversos compostos, como açúcares fermentáveis e diversas enzimas de interesse biotecnológico. O gênero *Rhizopus* é considerado especialmente importante, pela produção de proteínas com

elevada digestibilidade e ausência de substâncias tóxicas, enquanto que o *Aspergillus* pode produzir cerca de 20 tipos diferentes de enzimas (CASTRO, 2006; SILVEIRA, 2007).

A partir do exposto, este trabalho teve como objetivo o aproveitamento do farelo de cacau na produção de açúcares fermentáveis, utilizando o processo de fermentação em estado sólido com os fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* e *Rhizopus* sp. Para alcançar este objetivo, foram definidos alguns objetivos específicos:

- Fermentar o resíduo sólido do cacau;
- Recuperar os extratos enzimáticos;
- Quantificar a quantidade de açúcares redutores antes e após a fermentação;
- Avaliar as atividades das enzimas produzidas no bioprocessamento;

2REFERENCIAL TEÓRICO

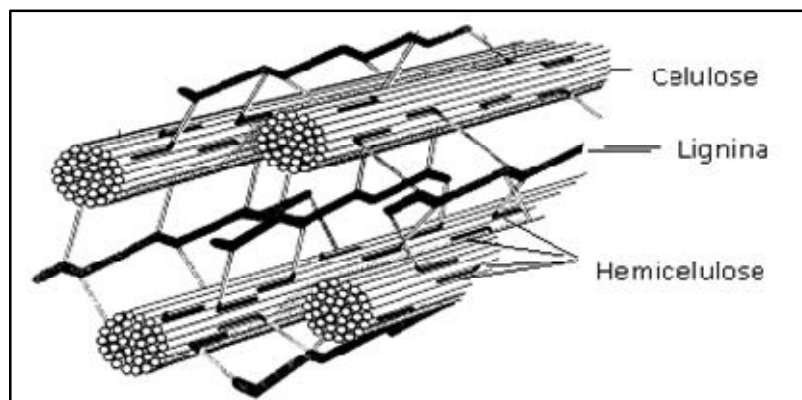
2.1 Resíduos agroindustriais

Assim como outros setores da economia, o agronegócio tem gerado grandes quantidades de resíduos, que causam diversos danos ambientais, como a poluição dos solos, das águas e da atmosfera (ASGHER, 2008). Esses resíduos são gerados principalmente por indústrias de processamento de frutas, carnes, de celulose e papel, usinas sucroalcooleiras, entre outras (DANTAS & AQUINO, 2010). Para amenizar o efeito dos problemas causados pelo descarte incorreto, várias medidas visando proteger e recuperar o meio ambiente estão se expandindo nos mais diversos setores de produção e a sociedade tem refletido mais profundamente a questão da poluição causada pelos resíduos gerados (SILVA, 2006).

Entre essas medidas, diversos estudos estão sendo realizados visando aproveitar esses resíduos que são considerados sub-produtos ou produtos secundários e o seu aproveitamento pode ser uma alternativa viável e promissora (SPIER, 2005; GHORAI, 2009), pois são gerados em grande quantidade e muitas vezes sem nenhum valor comercial (SANTOS, 2010). Os resíduos agroindustriais como o farelo de cacau, bagaço de cana, palha de milho, por exemplo, são ricos em compostos lignocelulósicos que são compostos orgânicos mais abundantes no planeta, disponíveis nas paredes celulares das plantas.

A formação das paredes celulares acontece durante o processo de divisão da célula, e são elas: a parede primária, que é formada por celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos e a parede secundária, que basicamente consiste de celulose e outros polissacarídeos, além de outras substâncias como a lignina que são depositadas na parede (CUTTER, 1986). A lignina se liga fortemente a fibra de celulose e à hemicelulose, e com essa formação o complexo lignocelulósicos (Figura 1) é resistente à conversão por agentes químicos e microbianos (ZUNIGA, 2010). A porcentagem da composição pode variar de acordo a espécie, contudo a maior parte é de celulose, seguida da lignina e hemicelulose (SANTOS *et al.*, 2011a).

Figura 1 - Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (LEE, 1997 *apud* AGUIAR, 2010).



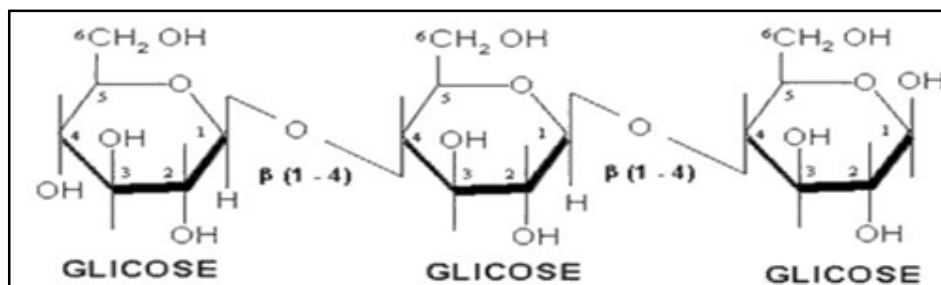
2.1.1 Compostos lignocelulósicos

2.1.1.1 Celulose

A celulose é um polímero estrutural linear formado por unidade de β -D-glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) como apresentado na Figura 2 (SANTINO *et al.*, 2008). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica eliminando uma molécula de água e envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4, esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose, que é a unidade conformacional mínima da celulose, sendo que a glicose é a unidade fundamental das cadeias (AGUIAR, 2010).

Normalmente, o tamanho da molécula de celulose é expresso de acordo o número de unidades de glicose presente na fibra (SANTOS, 2010). Na síntese das moléculas de celulose, elas sofrem um rearranjo e formam um grande número de ligações de pontes de hidrogênio que competem com a água de hidratação das hidroxilas, onde se forma um complexo cristalino chamado microfibrila, extremamente compactado e desidratado que resiste a grandes ações externas, como a hidrólise ácida e também a enzimática (KERBAUY, 2008; SANTOS, 2011). Porém, só a cristalinidade não é capaz de impedir a hidrólise enzimática se uma alta concentração de enzimas for utilizada (SANTOS, 2010).

Figura 2 - Cadeia de celulose (mostrando as ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4)).
BIOMASSA, 2012.



2.1.1.2 Hemicelulose

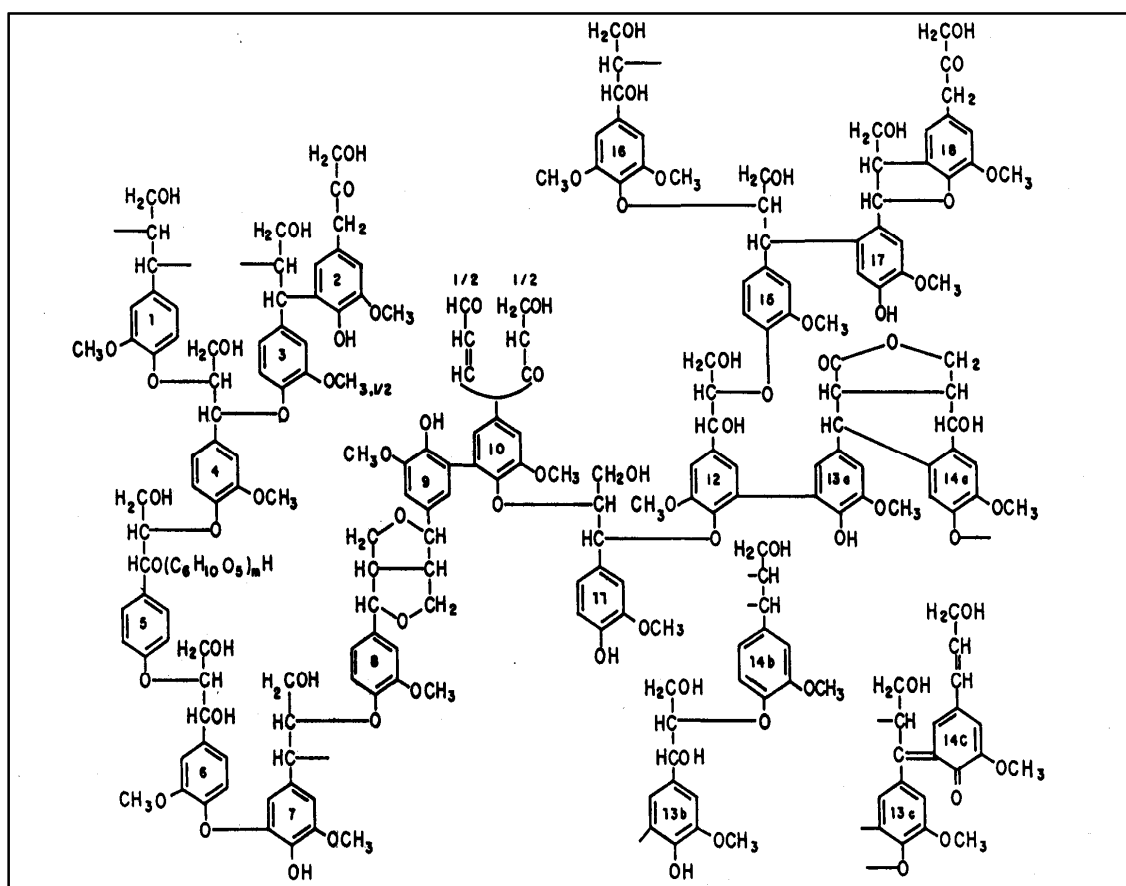
A hemicelulose não é quimicamente homogênea, diferente da celulose, é um heteropolissacarídeo, pois apresenta cadeias laterais curtas de diferentes tipos de açúcares (SANTINO *et al.*, 2008). Entre as substâncias mais encontradas nas hemiceluloses são as pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-*O*-metil-glucurônico e galacturônico) (MONTE, 2009). As hemiceluloses são interligadas por polímeros pécticos, interconectando as fibrilas (CUTTER, 1986). Segundo Santos (2008), o termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo, cada componente, propriedades peculiares.

2.1.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula ramificada (Figura 3) e amorfa, com estrutura heterogênea que forma uma rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aril-éter (ZUNIGA, 2010). A lignina funciona como um suporte de defesa atuando como uma barreira natural no tecido da planta contra microrganismos e que pode formar complexos de elevada estabilidade com as enzimas (SILVA *et al.*, 2010; ZUNIGA, 2010). Sabe-se também que a lignina é importante no transporte de água, nutrientes e metabólitos (SALIBA *et al.*, 2001).

A estrutura tridimensional confere a lignina uma rigidez e resistência a força de compressão na parede celular, agindo também como um agente permanente de ligação entre as células (SANTOS, 2008).

Figura 3 - Esquema estrutural proposto para lignina de *Picea abies* (VELOSO, 1993).



2.2 Resíduo de cacau (*Theobroma cacao* L.)

O cacau (Figura 4) é uma planta originária da América Central que adaptou-se muito bem ao clima do sul da Bahia, sendo considerado uma cultura muito importante nas microrregiões onde é cultivado (CUENCA & NAZARIO, 2004). No Brasil os estados produtores de cacau são Acre, Amazonas, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Rondônia, Roraima e Pará (MAPA, 2013).

Apenas 8 % em peso do fruto é aproveitado, assim em relação a esta cultura é uma fonte que se destaca para estudo, pois reaproveitar os subprodutos e/ou resíduos (aproximadamente 92%) pode ser um fator importante na viabilidade econômica desse agronegócio.

Considerando que o farelo de cacau representa 10% da produção das amêndoas secas de cacau, que é cerca de aproximadamente 200 mil toneladas por ano (MAPA, 2013), estima-se que a produção brasileira desse subproduto seja de 20.000 t. O farelo de cacau é o subproduto da retirada do tegumento antes da torrefação das sementes, para produção de manteiga ou chocolate (CARVALHO, 2006).

Figura4 - Cacau –*Theobroma cacao*. Fonte: (Ceplac, 2012).



2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido pode ser definida como a deposição de microrganismos sobre partículas sólidas (resíduo) com atividade de água suficiente para o crescimento celular (GERVAIS, 2003), sendo que a quantidade de água varia de um resíduo para o outro (SPIER, 2005). Este processo é utilizado desde a antiguidade, sendo que o uso do molho de soja da China é reportado desde 3000 a.C e no Japão e sudoeste da Ásia desde 1000 a.C (ARAÚJO, 2004).

A Fermentação em Estado Sólido (FES) possui um papel de destaque quando se refere em aproveitamento de resíduos sólidos, pois é um processo viável para a produção de compostos com alto valor agregado (PANDEY, 2003; DANTAS & AQUINO, 2010), sendo um bioprocesso específico para a transformação de biomassa vegetal, pois em virtude do crescimento microbiano, ocorre à síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para diversos segmentos industriais (PINTO, 2005) como, a produção de enzimas, biocompostos, aromas, ácidos orgânicos, queijos, fungos

comestíveis, enriquecimento proteico e produção de alimentos orientais fermentados (ANUPAMA, 2000; SPIER, 2005).

A transformação industrial de biomassa apresenta inúmeras vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais de produção de enzimas. As vantagens mais características são: a alta velocidade de crescimento; o alto conteúdo de biocompostos; a possibilidade de utilização de uma grande diversidade de fontes de carbono alternativas; as instalações para o desenvolvimento dos processos fermentativos ocupam pequenas áreas e resultam em alta produção; a produção microbiana independe das variações climáticas (REGULY, 2000). Como também o baixo custo, pois além de poder utilizar resíduos agroindustriais, estes, necessitam apenas de um pré-tratamento simples (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Além das vantagens apresentadas acima, Bon *et al.* (2008) também destaca como sendo vantagens da FES: a simplicidade dos meios de cultivo (o substrato pode requerer apenas adição de água); ausência do requerimento de equipamentos sofisticados; reduzido consumo de energia; baixo grau de umidade, reduzindo o risco de contaminação; estabilidade da enzima secretada e baixo nível de repressão catabólica; possibilidade de extração imediata do produto através da adição direta de solventes ou por filtração do meio fermentado e pequenas quantidades de águas residuais.

2.3.1 Fatores que influenciam a FES

2.3.1.1 pH

Em qualquer processo biológico o pH é uma variável importante, e para cada microrganismo existe um valor mínimo, ótimo e máximo para seu desenvolvimento (SANTOS, 2007). Para os fungos o pH varia de 4,5 à 5,0.

2.3.1.2 Temperatura

Na fermentação em estado sólido, devido à atividade metabólica dos microrganismos, é liberada grande quantidade de calor e por isso, o processo é considerado exotérmico (ROCHA, 2010). A temperatura para os fungos filamentosos é um fator considerável, pois afeta diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação dos produtos (SOUZA, 2008).

No início do processo fermentativo, a temperatura e a concentração de oxigênio são os mesmos em qualquer ponto do substrato (SANTOS, 2007), mas o oxigênio vai se difundindo com o progresso da fermentação permitindo assim que as reações metabólicas aconteçam, liberando calor que não é dissipado por causa da baixa condutividade térmica do substrato (ROCHA, 2010). Portanto, são formados gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos a depender dos parâmetros para controlar o sistema (SANTOS, 2007), e a partir desse momento podem ser formadas zonas de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio, afetando negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (PALMA, 2003).

Para tentar solucionar este problema de liberação de calor em escala industrial, Santos (2007) faz algumas sugestões como: aeração forçada com ar úmido para remover calor por condução; aeração forçada com ar seco removendo calor por evaporação; resfriamento da superfície externa do biorreator, com jaqueta de água; circulação de água resfriada através de um trocador de calor interno; e por fim, colocar o biorreator em uma sala com temperatura controlada ou em um banho com água.

2.3.1.3 Umidade e atividade de água (aw)

A umidade refere-se à concentração de água existente no material e a atividade de água, mede a quantidade de água disponível no resíduo à disposição do microrganismo, influenciando o crescimento e os processos bioquímicos (COLEN, 2006; SANTOS, 2007).

Na FES a água tem um papel muito importante, pois é responsável pela disseminação de solutos, gases, metabólitos inibitórios e pela absorção celular (ROCHA, 2010). A umidade do substrato é um fator importante, pois afeta diretamente o produto final e o desenvolvimento do microrganismo (SANTOS, 2007). Pinheiro (2006) afirma que se a umidade estiver muito elevada, diminui a porosidade do substrato, dificultando a transferência de oxigênio. É muito importante controlar a umidade na FES para aumentar a produção de enzimas (ROCHA, 2010).

A umidade ótima para cultivar o microrganismo depende da capacidade do substrato em reter água, podendo variar de um resíduo para o outro, pois de acordo com Santos (2007) a umidade para cultivar *Aspergillus niger* em arroz é de 40% e em polpa

de café é de 80%, por isso é difícil estabelecer apenas uma umidade ideal pra todos os substratos.

2.4 Fungos filamentosos na FES

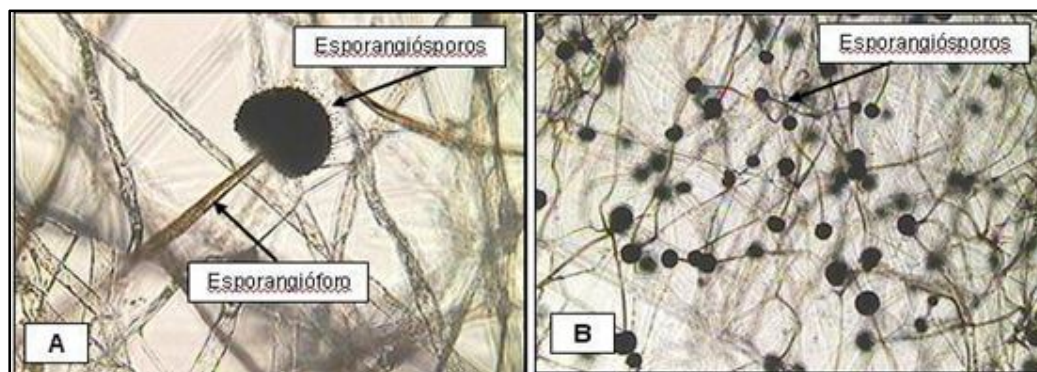
Os fungos filamentosos tem se destacado na fermentação em estado sólido, pois esse processo simula o habitat natural oferecendo nutrientes básicos para os microrganismos e essa vantagem se estende a produção de enzimas (SANTOS *et al.*, 2010; ALEXANDRINO *et al.*, 2007). Outra vantagem dos fungos filamentosos é que a depender do tipo de resíduo, se desenvolvem em baixas umidades e essa não é uma característica das bactérias e leveduras (SPIER, 2005).

Muitas enzimas de interesse industrial são produzidas pelos fungos. Bon *et al.* (2008), falam que sua forma de crescimento em hifas, boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica conferem aos fungos vantagens em relação aos microrganismos unicelulares para colonizar os substratos sólidos. A formação de esporos que são dispersos por correntes de ar e se caracterizam pela nutrição através da absorção, é outro fator de vantagem dos fungos, com exceção das leveduras (que a maioria é unicelular), geralmente as espécies produzem um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas (SPIER, 2005).

2.4.1 *Rhizopus*

O gênero *Rhizopus* pertence ao filo Eumycophyta, que são considerados fungos verdadeiros. O corpo desses microrganismos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, formando um emaranhado chamado micélio. O *Rhizopus sp.* pertence ao grupo dos ficomicetos, desenvolvem-se sobre matéria orgânica úmida, constituindo o bolor com coloração preta e apresentam micélio ramificado e desorganizado. Santos *et al.* (2011a), afirma que a estirpe de *Rhizopus sp.* é muito promissora na produção de enzimas celulósicas. A Figura 5 mostra uma imagem feita de *Rhizopus sp.* a partir de um microscópio óptico.

Figura 5 A e B - Imagem de *Rhizopus sp.* obtida de um microscópio óptico. Fonte: Spier (2005).



O *Rhizopus sp.* é usado na produção de queijos e ácidos orgânicos, em especial ácido fumárico, além de serem produtores de enzimas como fitase, glicoamilase e outras (RAMACHANDRAN, 2004; ESPOSITO, 2004; THAN, 2002).

2.4.2 *Aspergillus*

Esse gênero é um dos mais conhecidos por ser um dos mais estudados, principalmente na produção de enzimas no setor alimentício. O gênero *Aspergillus* (Figura 6) pertence a família Trichocomaceae, ordem dos Eurotiales e ao filo Ascomycota. As colônias de fungos deste gênero podem apresentar coloração branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde, e a taxa de crescimento é rápida a moderadamente rápida (SPIER, 2005). As espécies mais conhecidas desse gênero são: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor* (SANTANA, 2012).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são economicamente importantes, sendo utilizados em numerosas fermentações, incluindo a produção de ácidos cítrico e glutâmico, além de ser citado como o microrganismo mais usado na produção de diversos compostos. O molho shoyu é preparado à base de soja e trigo que são fermentados por *Aspergillus soyae* ou *Aspergillus oryzae* (ESPOSITO, 2004).

Figura 6 - Imagem de um exemplar do gênero *Aspergillus*. Fonte: Aspergillus (2012)



2.5 Enzimas

A história das enzimas começa no início do século XIX, quando foram descobertas e desde então muitos estudos sobre as mesmas, têm sido realizados (SANTINO, 2008). Elas catalisam diversas estruturas e desempenham diferentes tarefas como a biossíntese de muitos metabólitos (OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009). Atualmente as enzimas de uso industrial são um dos principais interesses do mercado biotecnológico. Diante disso, estudos tem se realizado visando tornar esse processo de produção de enzimas mais barato, utilizando microrganismos na produção e aproveitando materiais lignocelulósicos, e buscando formas de reproduzir esse processo em escala industrial.

As enzimas celulases são um complexo enzimático, responsável pela degradação de celulose e está dividido em: endoglucanases e exoglucanases. As endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise e por solubilizar rapidamente o polímero celulósico, quebrando primeiramente as ligações internas produzindo oligossacarídeos com peso molecular menor (SANTOS *et al.* 2011b), e conseqüentemente liberam novos terminais, um reductor e outro não-reductor. As exoglucanases são enzimas que atuam na região externa da celulose (CASTRO & PEREIRA Jr, 2010), que se dividem em celobiohidrolases, que liberam celobiose das extremidades da celulose, e as

glucanohidrolases, hidrolisam a fibra celulósica liberando glicose diretamente do polímero (SANTOS *et al.*, 2011a;). A xilanase é uma enzima que hidrolisa a xilana presente na hemicelulose (ALEXANDRINO *et al.* 2007), e por sua vez, tem despertado interesse da indústria de alimentos e da indústria de combustível líquido, entre outros. A lacase, a lignina peroxidase e Manganês peroxidase, que são enzimas lignolíticas responsáveis pela degradação da lignina, também se destacam nos mais variados estudos.

2.6 Açúcares fermentáveis

Os açúcares redutores são carboidratos monossacarídeos que possuem grupos carbonílico ou cetônicos livres, ou seja, uma extremidade de sua cadeia carbônica está liberada para reagir e estes carbonos são conhecidos como carbonos anoméricos, por não estar envolvido em ligações glicosídicas e são capazes de oxidarem na presença de agentes oxidantes, como íons férricos (Fe^{3+}) e cúpricos (Cu^{2+}) em soluções alcalinas (SILVA *et al.* 2003; SCHIMITES, 2013).

Na indústria de alimentos é muito importante determinar a concentração dos açúcares para conhecer o valor nutritivo dos componentes digeríveis, como também para conhecer a composição centesimal e assim enquadrar determinado alimento dentro dos padrões aceitáveis da alimentação, e em alguns alimentos como o leite condensado a depender da concentração exerce o papel de conservante (G100, 2013).

Para a indústria de combustível líquido, os açúcares são muito importantes pois através do processo de fermentação alcoólica onde as leveduras utilizam o açúcar para produzir energia que usa em suas atividades fisiológicas, e durante este processo são transformados em etanol e CO_2 , catalisados por enzimas (CASADEI, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Resíduo de Cacau

O farelo de cacau (Figura 7A) foi cedido por fábricas produtoras de cacau, localizadas na região sul da Bahia. O resíduo passou por um processo de secagem e esterilização a 70 °C durante 24 horas, em secadora SOLAB e em seguida triturado em um moinho de facas tipo Willey (Figura 7B), sendo obtido ao final do processo um resíduo com aproximadamente 2 milímetros de granulometria.

Figura 7 - A) Resíduo de cacau moído para fermentação; B) Moinho de facas. Fonte: O autor



3.1.1 Pré-tratamento de Resíduo de cacau

Uma parte do resíduo de cacau passou por processo para extração de todo o açúcar redutor disponível. A extração do açúcar foi baseado no método de determinação de açúcares redutores por calorimetria (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), onde para cada 10 g de resíduo foi adicionado 50 ml de água que foi aquecido até ebulição, em seguida transferida para um balão volumétrico de 200 mL e o volume completado, agitado e filtrado em papel filtro seco. Esse processo foi realizado por três vezes com o mesmo resíduo e em seguida realizou-se a titulação para comprovar que a quantidade de açúcar

reduzido chegou a 0. Depois desse processo, o resíduo passou pela estufa de secagem à 70° C por 24 horas para ser submetido às condições desejadas no processo de fermentação.

3.2 Microrganismos

Os microrganismos selecionados para o desenvolvimento desse trabalho foram os fungos filamentosos *Rhizopus sp.* E *Aspergillus oryzae* proveniente do Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais - LABRA da UESB campus de Itapetinga.

3.2.1 Preparo da solução de esporos

Os fungos foram inoculados em meio de cultura (PDA - 5,02) a 30° C durante 168 horas. A cultura esporulada foi suspensa numa solução Tween 80 (marca Vetec) a 0,01% de concentração, em que a contagem do número de esporos em suspensão foi feita utilizando uma câmara de Neubauer com a assistência a partir do microscópio binocular (BIOVAL L1000). O cálculo da concentração de esporos foi realizado segundo o método de Raimbault e Alazard (1980) descrito por PARIS (2008) conforme a Equação 1.

$$\text{Conc. (esporos/mL)} = \frac{\text{Número Médio Esporos Contados X Fator Diluição}}{4.10^{-4} \text{ mL}}$$

Equação 1: Cálculo da concentração de esporos.

3.3 Fermentação em Estado Sólido

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers contendo 10g de resíduo (Figura 8). Neste resíduo foi adicionada a suspensão de esporos com a concentração de 10⁷ esporos/ml de solução por cada grama de substrato, e em seguida adicionados os volumes de água esterilizada em autoclave até a umidade desejada.

Figura 8 - Erlenmeyer contendo resíduo para pronto para fermentação.



Os cultivos foram realizados com variação de temperatura (25, 30 e 35) ° C, de tempo (10 h, 40 h e 70 h para o *Aspergillus oryzae* e de 12 h, 42 h e 72 h para *Rhizopus* sp.) e umidade (40 %, 50 % e 60 %). As amostras foram colocadas no incubador refrigerado com ventilação forçada de ar (Figura 9).

Figura 9 - Incubadora (Shaker) com ventilação forçada. Fonte: O autor.



3.4 Extração do extrato enzimático

Após o processo de fermentação, foi adicionado 50 mL de solução tampão de citrato de sódio com um pH de 4,8 e 50 mM, e logo após foi realizado a extração do extrato enzimático por meio de filtração mecânica.

3.5 Determinação de açúcares redutores

Para determinação dos açúcares redutores pesou-se 10 g da amostra em um erlenmeyer de 125mL que foi fermentada. Após a fermentação adicionou-se 50ml de água na amostra que foi aquecida em banho-maria com água em ebulição, por 5 minutos e depois resfriada, em seguida foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL. O volume foi completado, agitado e logo após filtrado em papel de filtro seco. O filtrado foi transferido para a bureta. Em um erlenmeyer de 250mL, com o auxílio de pipetas de 10 mL foi colocado cada uma das soluções de Fehling A e B, e adicionado 40 mL de água. Esta solução foi aquecida até ebulição. Em seguida adicionou-se, às gotas, a solução da bureta sobre a solução do erlenmeyer em ebulição, sempre em agitação, até que esta solução passou de azul a um vermelho tijolo (no fundo do balão formou-se um precipitado vermelho de óxido de cobre (Cu_2O)) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

As soluções de Fehling A e B utilizadas na reação foram preparadas da seguinte maneira:

Solução A – Pesou 34,639g de sulfato de cobre - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL e completou o volume com água.

Solução B – Pesou 173 g de tartarato de sódio e potássio - $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e dissolveu em 250 mL de água. Adicionou 250 mL de solução de NaOH a 20%, recém-preparada, transferiu-se tudo para um balão de 1000 mL e completou o volume.

3.6 Análises das atividades enzimáticas

3.6.1 Determinação da enzima CMCase

A atividade de CMCase, que compreende enzimas endoglucanases, foi realizado com a dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC) a 2% p/v diluído previamente na solução citrato de sódio

(da marca VETEC) pH 4,8 segundo o método descrito em Ghose (1987). As reações foram conduzidas adicionando em tubo de ensaio 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 e 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de solução de CMC (carboximetilcelulose). Para fazer a comparação com a reação, em outro tubo foram adicionados 0,5 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático chamado de controle da reação. O branco, continha 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de solução tampão. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica QUIMIS a 50° C por 10 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de DNS. Os tubos foram submergidos em água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorbância em 540 nm realizada em espectrofotômetro BEL PHOTONICS 2000 UV.

3.6.2 Determinação da Enzima FPase

A atividade de FPase, ou atividade em papel filtro, é determinada a partir da degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm, segundo Ghose (1987). No tubo contendo o ensaio reacional foi adicionado 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8, e 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro. Para controle da reação, em outro tubo foi adicionado 1mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, no terceiro tubo foi adicionado 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro, este foi comparado ao controle. As amostras foram incubadas em estufa a 50°C por uma hora e a reação foi interrompida com a adição de 3mL DNS. Os tubos foram alocados em água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorbância em de 540 nm.

3.6.3 Determinação de Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada segundo Miller (1959). O primeiro tubo consiste na mistura de 1mL de extrato enzimático, 1 mL de solução de 1% de concentração de xilana diluída em tampão citrato pH 4,8, depois é incubado à 50°C por 30 minutos e em seguida é adicionado 2 mL de DNS para interromper a reação e adicionado 6,5ml de água destilada para posterior medição de absorbância a 550nm.

3.6.4 Determinação da Atividade Enzimática da Lacase

A atividade de lacase foi determinada utilizando-se como substrato 0,1mL de uma solução etanólica de siringaldazine (4-hidroxi-3,5-azino-metoxibenzaldide) em uma concentração de 1mM. A reação de oxidação foi conduzida em 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 5,0 e 0,6 mL de extrato enzimático. A reação foi quantificada depois de 10 minutos através da leitura da absorbância num espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV) com um comprimento de onda de 525nm (SZKLARZ *et al*, 1989).

3.6.5 Determinação da atividade enzimática da peroxidase

Dois tubos de 10 x 100 mm foram usados, um para a amostra não aquecida e outro para a amostra aquecida. A cada tubo foi adicionado 0,6 mL da amostra a ser analisada, 0,2 mL do tampão de fosfato-citrato e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Um tubo foi aquecido em banho-maria durante 10 minutos (controle) e em seguida, removido e resfriou-se. O tempo inicial (zero) foi determinada como a medição de absorbância no momento em que 0,1 mL de syringadazine foi adicionado. Outra medição foi feita após 10 minutos. De cada tubo alíquotas de 1mL foram retirados das amostras aquecidas e das amostras não aquecidas, e foram medidos no comprimento de onda de 460 nm (ARCHIBALD, 1992).

3.6.6 Determinação da atividade enzimática de manganêsuperoxidase

O peróxido de manganês foi determinado pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol a 0,1% (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajustamento contínuo do pH a 7,4) em 1,25 mL de tampão succinato de sódio pH 4,5, e 1,5 mL de lactato de sódio, 0,5 mL de albumina a 1%, 0,5 mL de sulfato de manganês (MnSO₄), 0,5 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Após 10 minutos de reação, 1mL da mistura contida no tubo de ensaio foi removido e para este volume foi feita a adição de 30 µL de hidróxido de sódio para interromper a reação e para realizar a leitura no espectrofotômetro. A reação foi avaliada medindo a absorbância do produto de reação em 610 nm. A atividade de manganês peroxidase foi calculada com base na absortividade molar do vermelho de fenol oxidada (ANASTASI, 2009).

3.6.7 Curva de analítica

A chamada curva analítica foi construída a partir da determinação de glicose nas concentrações de (0,2 a 1,0) g/L⁻¹ pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico DNS (MILLER, 1959). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcares redutores por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U por grama de substrato (U/g). A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm.

3.7 Análise Estatística

Um estudo das condições ideais para a produção das enzimas foi realizado com base na metodologia de superfície de resposta, juntamente com o delineamento Box-Behnken (DBB) com três níveis de variação (+1, 0, -1), utilizando três variáveis independentes (tempo de fermentação, umidade e temperatura) e com 4 repetições no ponto central (Tabelas 1 e 2, uma para cada fungo estudado), aplicado para a determinação do efeito destes sobre a produção dos açúcares redutores e das enzimas estudadas.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para os modelos e a importância do modelo examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R²). Os resultados obtidos a partir de experiências foram submetidos à análise de variância ANOVA, e os efeitos foram considerados significativos quando p < 0,1.

Com um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 2), dados experimentais e de regressão de coeficiente e coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla, onde b₀, b_i, b_{ii}, b_{ij}, e b_{ijk} representa todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de X_i, e o efeito de interação entre X_i e X_j, X_i, X_j e X_k sobre a produção de açúcar redutor e atividade enzimática. Os dados foram rodados no software estatístico SAS (*Statistical Analysis System*[®]) versão 9.3. Para elaboração dos gráficos, foi utilizado o software *SigmaPlot*[®] 11.0.

$$EA = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k$$

Equação 2 Modelo polinomial de segunda ordem

Tabela 1 – Variáveis estudadas na produção das enzimas e determinação de açúcares redutores pelo fungo *Aspegillus oryzae*

Delineamento fatorial (DBB)			Delineamento com as variáveis		
X1(%)	X2 (h)	X3 (C°)	X1(%)	X2 (h)	X3 (C°)
-1	-1	-1	40	10	25
-1	-1	1	40	10	35
-1	1	-1	40	70	25
-1	1	1	40	70	35
1	-1	-1	60	10	25
1	-1	1	60	10	35
1	1	-1	60	70	25
1	1	1	60	70	35
-1	0	0	40	40	30
1	0	0	60	40	30
0	-1	0	50	10	30
0	1	0	50	70	30
0	0	-1	50	40	25
0	0	1	50	40	35
0	0	0	50	40	30
0	0	0	50	40	30
0	0	0	50	40	30
0	0	0	50	40	30
0	0	0	50	40	30

Tabela 2 – Variáveis estudadas na produção das enzimas e determinação de açúcares redutores pelo fungo *Rhizopus sp.*

Delineamento fatorial (DBB)			Delineamento com as variáveis		
X1(%)	X2 (h)	X3 (C°)	X1(%)	X2 (h)	X3 (C°)
-1	-1	-1	40	12	25
-1	-1	1	40	12	35
-1	1	-1	40	72	25
-1	1	1	40	72	35
1	-1	-1	60	12	25
1	-1	1	60	12	35
1	1	-1	60	72	25
1	1	1	60	72	35
-1	0	0	40	42	30
1	0	0	60	42	30
0	-1	0	50	12	30
0	1	0	50	72	30
0	0	-1	50	42	25
0	0	1	50	42	35
0	0	0	50	42	30
0	0	0	50	42	30
0	0	0	50	42	30
0	0	0	50	42	30
0	0	0	50	42	30

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de açúcares redutores pelo fungo *Rhizopus sp*

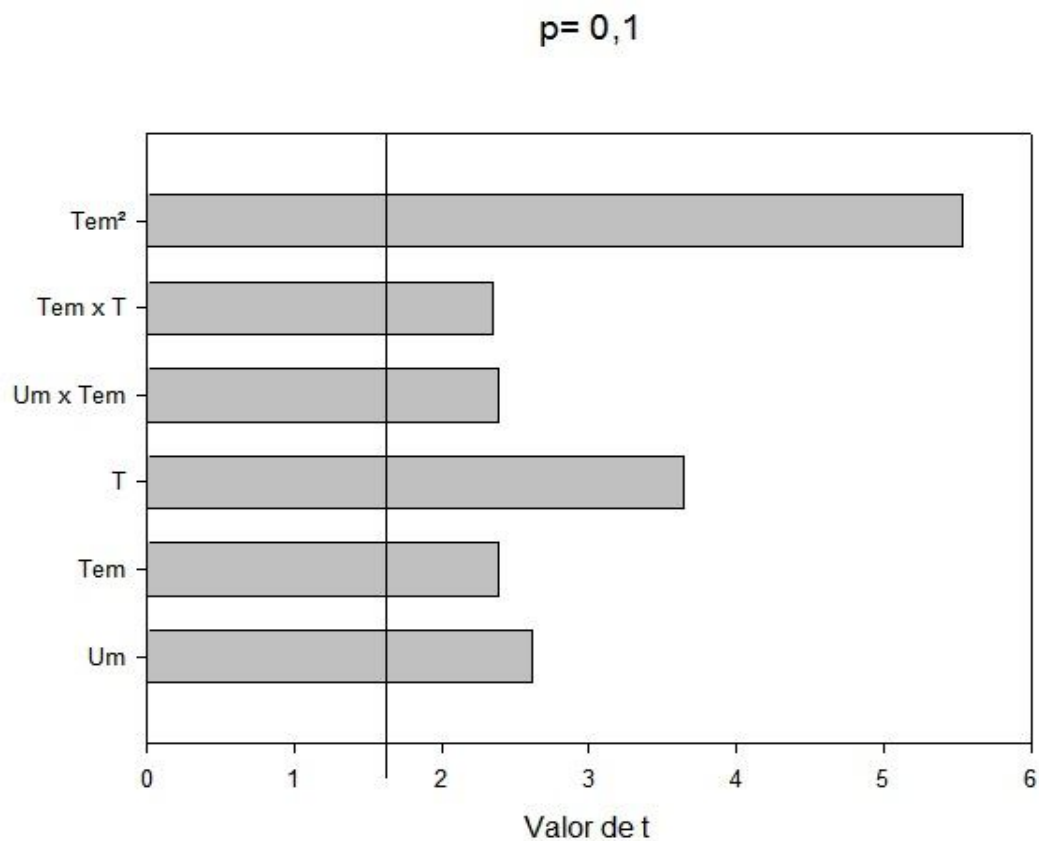
Para avaliar quais fatores (umidade, tempo e temperatura) que tiveram um efeito significativo sobre a produção de açúcares redutores, primeiramente foi realizada a análise de variância, ANOVA (Tabela 3) e os parâmetros de estimativas conduzidos em fatorial fracionado 2³. A análise do modelo realizada e a significância avaliada através do teste estatístico de Fisher (teste F) aplicado a diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R²). Uma vez que os modelos completos de segunda ordem (modelos contendo ambas as interações de parâmetros) não foram aceitos pelos ensaios mencionados, foram melhorados pela eliminação dos coeficientes do modelo até que as condições determinadas foram preenchidas. Os fatores que não foram significativos em 10% foram então reunidos para o termo de erro e um novo modelo reduzido foi obtido para as variáveis de resposta por análise de regressão usando apenas os fatores significativos indicados anteriormente.

Tabela 3 – Análise de variância da quantificação do açúcar redutor produzido pelo fungo *Rhizopus sp*.

FV	GL	SQ	QM	F	Prob
Modelo	6	41,60717	6,93453	9,73	0,0007
Erro	11	7,84349	0,71304		
Total	17	49,45065			
R2	0,8414				

O resultado da análise de variância está apresentado num diagrama de Pareto (Figura 10), em que o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado estimada (o efeito estimativa dividida pelo erro padrão) de cada elemento é traçado em ordem decrescente, com 90% de confiança ($p = 0,10$). Através deste gráfico é possível observar que o tempo foi o fator que mais influenciou na produção do açúcar assim como a melhor interação foi entre o tempo e a umidade.

Figura 10 - Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis: tempo, temperatura e umidade de fermentação sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo *Rhizopus* sp.



O modelo reduzido pode ser descrito na Equação 3, em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} \text{Quant. (AR)} = & 7,72782 - 0,12949Um - 0,20624Tem + 0,36115T \\ & + 0,00237UmTem - 0,00468TemT + 0,00246Tem^2 \end{aligned}$$

Onde:

AR = Açúcar Redutor (%)

Um = Umidade (%)

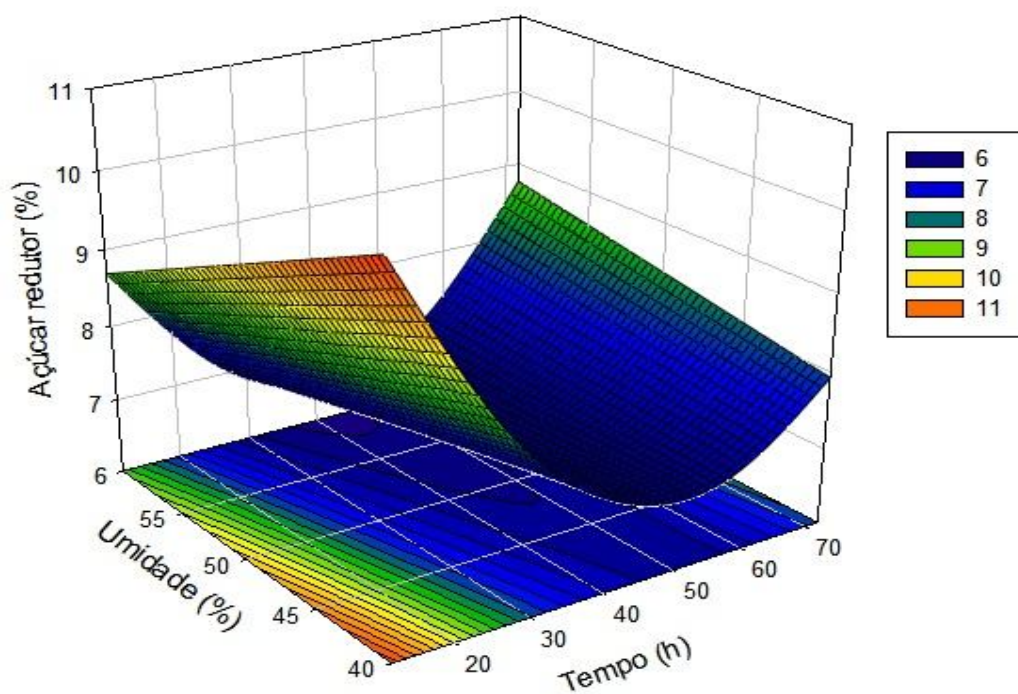
Tem = Tempo (h)

T = Temperatura (°C)

Equação 3 Modelo reduzido da produção de AR pelo *Rhizopus* sp.

A Figura 11 exemplifica a combinação das variáveis independentes tempo (Tem) e umidade (Um) sobre a produção de açúcar redutor, a partir do modelo ajustado (Equação 3). Nas primeiras 20 horas de fermentação, com umidade de 40% houve um aumento da quantidade de açúcar redutor em quase 3 %, considerando que a quantidade inicial antes da fermentação era de 7,3 % e após o processo chegou próximo de 11 %.

Figura 11 – Superfície de resposta da produção de açúcar pelo fungo *Rhizopus* sp.



Nas horas seguintes, houve uma queda na quantidade de AR chegando a 6 % pois provavelmente, o fungo começou a utilizar o açúcar disponível nas suas atividades metabólicas, mais a partir das 70 horas e com a umidade próxima aos 60% o fungo voltou a produzi-lo chegando a 9 %.

A quantidade de AR disponível no resíduo antes e após a fermentação encontrado neste trabalho é superior ao encontrado por Silva *et al.* (2003) em sua pesquisa, comparando métodos para quantificar açúcares utilizando o mel como substrato, onde a média de AR foi de 3%. No trabalho de Caetano *et al.* (2012) a quantidade de AR encontrada no suco e na polpa de acerola foram de 5,17 e 5,26%, respectivamente. Albuquerque *et al.* (2010) encontrou 1,56% de AR em polpas de manga armazenadas em temperatura ambiente e cerca 3,51% nas que foram armazenadas à 10°C. Possivelmente, os

valores de AR nos trabalhos citados poderiam ser maiores se passassem pelo processo de fermentação.

4.2 Hidrolise enzimática do *Rhizopus sp* durante a produção de açúcar

4.2.1 Atividade da CMCase

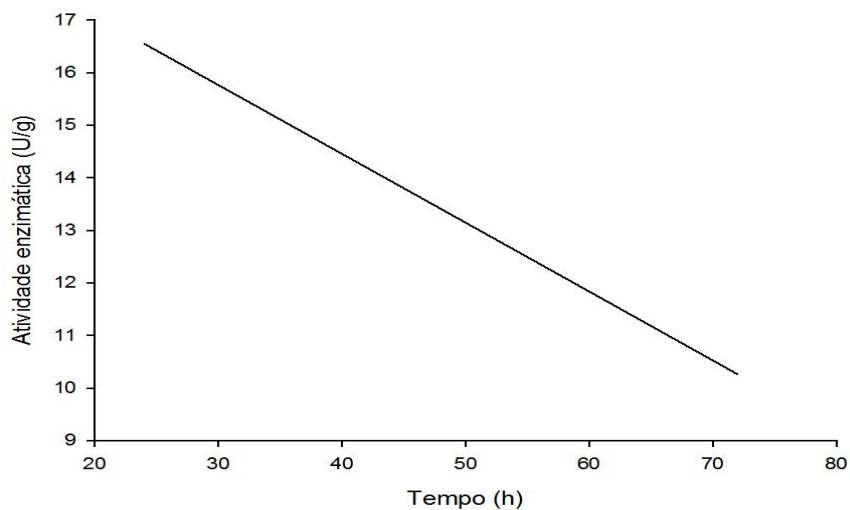
O modelo reduzido da Equação 4 ilustra a atividade enzimática de CMCase, em termos de valores não codificados.

$$Ativ(CMCase) = 19,694 - 0,131Tem$$

Equação 4 Modelo reduzido da atividade de CMCase do fungo *Rhizopus sp*.

Nas primeiras horas de fermentação a atividade chegou próximo a 17U/g e com o passar das horas a mesma foi caindo (Figura 12). O valor da atividade encontrada está acima do encontrado por Pacheco *et al.* (2012), de 64,44 U/mg (que corresponde a 0,064 U/g) e no tempo de 70 horas utilizando semente de jaca como substrato. Já Santos *et al.* (2011a) encontrou a sua maior atividade de 11,06U/g em 72 horas, onde utilizou o resíduo de seriguela como substrato.

Figura 12 – Gráfico do modelo reduzido da atividade de CMCase.



A produção enzimática pode variar de um microrganismo para o outro, como também a diferença pode ser do resíduo utilizado ou das condições analisadas. O fungo

aqui estudado mostrou-se eficiente na produção desta enzima, principalmente durante as primeiras horas de fermentação com o substrato utilizado.

Ao comparar a atividade de CMCase com a produção de AR, ao mesmo tempo que a atividade da enzima estava em alta, nas primeiras 20 horas, a quantidade de açúcar também estava em alta. Provavelmente a CMCase, uma enzima endoglucanase, estava quebrando os polissacarídeos em monossacarídeos que ao atingir certa quantidade, iniciou a inibição da enzima e o fungo começou a consumir o açúcar que estava disponível.

4.2.2 Atividade da FPase

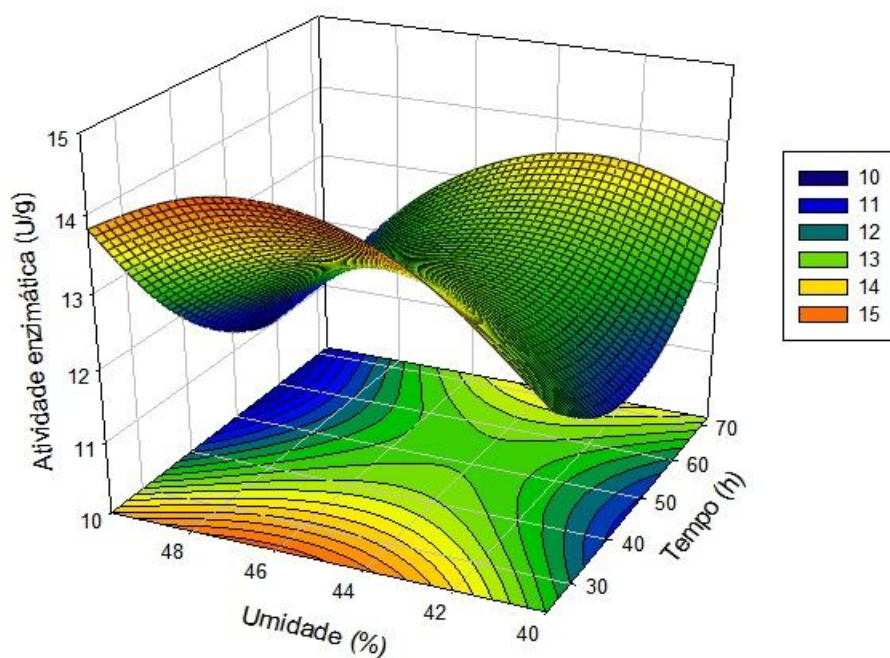
O modelo reduzido da atividade de FPase pode ser descrito na Equação 5 em termos de valores não codificados.

$$At(FPase) = -93,58 + 0,0977Tem + 4,6853Um + 0,0019Tem^2 - 0,0489Um^2 - 0,0067TemUm$$

Equação 5 Modelo reduzido da atividade de FPase do fungo *Rhizopus* sp.

A quantidade de FPase deste trabalho difere do encontrado por Santos *et al.* (2011b) que encontrou 2,55U/g de atividade entre 100 e 120 horas. Assim como na atividade de CMCase, nas primeiras horas de fermentação a FPase também estava em alta chegando a atividade de 14U/g com a umidade entre 44 e 48% e diminuindo nas horas seguintes (Figura 13). Porém, a atividade começou a aumentar novamente a partir das 60 horas com tendência de crescer ainda mais. É importante salientar que em poucas horas de fermentação, a atividade encontrada já estava superior aos trabalhos citados mostrando-se vantajoso na produção desta enzima.

Figura 13 – Atividade de FPase do fungo *Rhizopus* sp.



Por ser uma enzima endoglucanase e exoglucanase, num primeiro momento é provável que juntamente com a CMCase, iniciou a hidrólise interna da celulose e depois com o passar das horas e a diminuição da quantidade de açúcares redutores, começou a hidrolisar também a parte externa da celulose. Essas enzimas são importantes por iniciarem a quebra da celulose disponibilizando assim, mais açúcar redutor no meio.

4.2.3 Atividade da xilanase

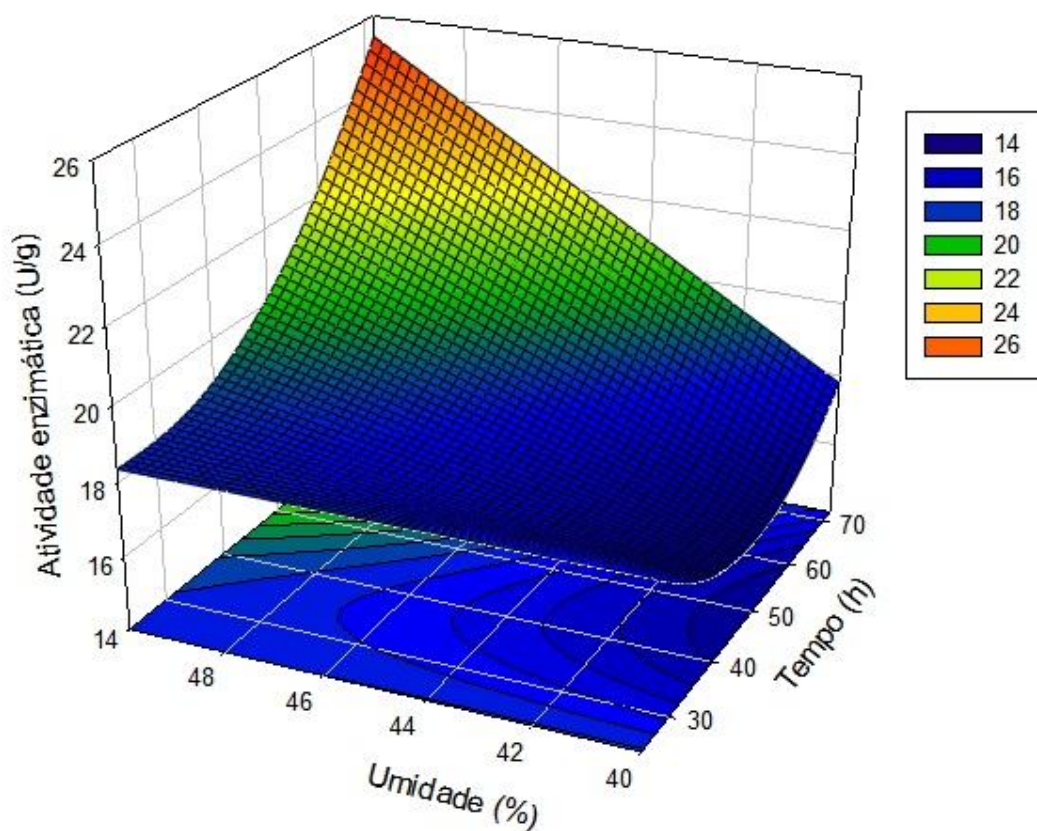
Para a atividade da xilanase, o fator tempo e a interação entre o tempo e a umidade foram importantes. O modelo reduzido está descrito Equação 6 em termos de valores não codificados.

$$Ativ(xil) = 41,035 - 1,008Tem - 0,40Um + 0,0036Tem^2 + 0,0162TemUm$$

Equação 6 Modelo reduzido da atividade de xilanase do fungo *Rhizopus* sp.

A atividade de xilanase encontrada chegou a quase 26 U/g com umidade de 50% e começando a partir das 60 horas (Figura 14).

Figura 14 – Superfície de resposta da atividade de xilanase do fungo *Rhizopus* sp.



Silva et al (2005) utilizando diferentes substratos encontrou valores que variaram de 8 a 107U/g de atividade em 4 dias (96h) de fermentação. É provável que se o tempo de fermentação fosse maior, a atividade enzimática seria ainda maior. O que se pode notar também que a atividade varia entre um substrato e outro.

Diferente das enzimas citadas anteriormente, a xilanase estava numa concentração estabilizada enquanto a quantidade de AR ainda era alta e sua atividade começou a aumentar provavelmente, no processo de quebra da xilana que está presente na hemicelulose para produção de açúcares redutores quando a quantidade destes havia diminuído em relação ao início da fermentação, pois comparando a atividade enzimática com a produção de AR é possível observar que o aumento é simultâneo, juntamente com a atividade da FPase.

4.2.4 Atividade da Lacase

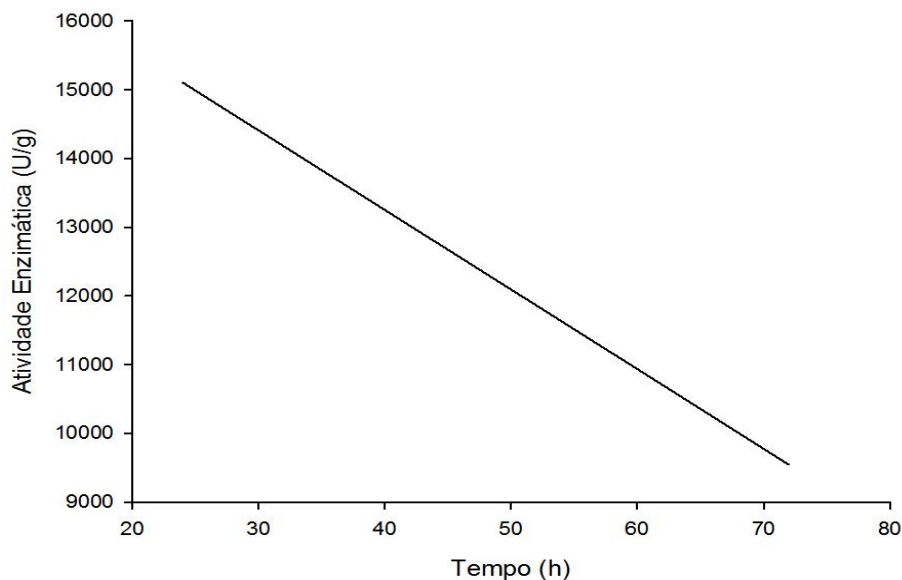
A lacase é uma enzima lignolítica, que atua na hidrólise da lignina. A atividade enzimática da lacase do fungo *Rhizopus* sp. no presente trabalho, sofreu influência apenas do tempo. O modelo reduzido é apresentado na Equação 7 em termos de valores não codificados.

$$Ativ(lac) = 17883,95 - 115,79Tem$$

Equação 7 Modelo reduzido da atividade de lacase do fungo *Rhizopus* sp.

Ao começar o processo de fermentação, as enzimas lignolíticas como a lacase assim como as enzimas que hidrolisam a celulose, também começam o processo de hidrólise da lignina em polímeros menores. Essas enzimas são de interesse de vários setores industriais (ALEXANDRINO *et al*, 2007). A atividade enzimática da lacase pode ser melhor visualizada na Figura 15.

Figura 15 – Atividade enzimática da lacase pelo fungo *Rhizopus* sp.



Nas primeiras horas de fermentação a lacase teve a sua mais alta atividade de 15000U/g e com o passar do tempo essa atividade foi diminuindo, o mesmo comportamento da enzima CMCase que hidrolisa a celulose. Nos trabalhos de Alexandrino *et al.* (2007) e de Erden *et al.* (2009) o fator tempo também foi o que mais

influenciou na atividade desta enzima, corroborando com o que foi encontrado neste trabalho, porém a maior atividade enzimática foi abaixo do encontrado por esta pesquisa e aconteceu com 15 e 7 dias de fermentação respectivamente. Contudo, no trabalho de Gomes *et al.* (2009) o fator que mais influenciou foi a temperatura diferente do encontrado aqui onde não teve influencia sobre a atividade.

4.2.5 Atividade da Peroxidase

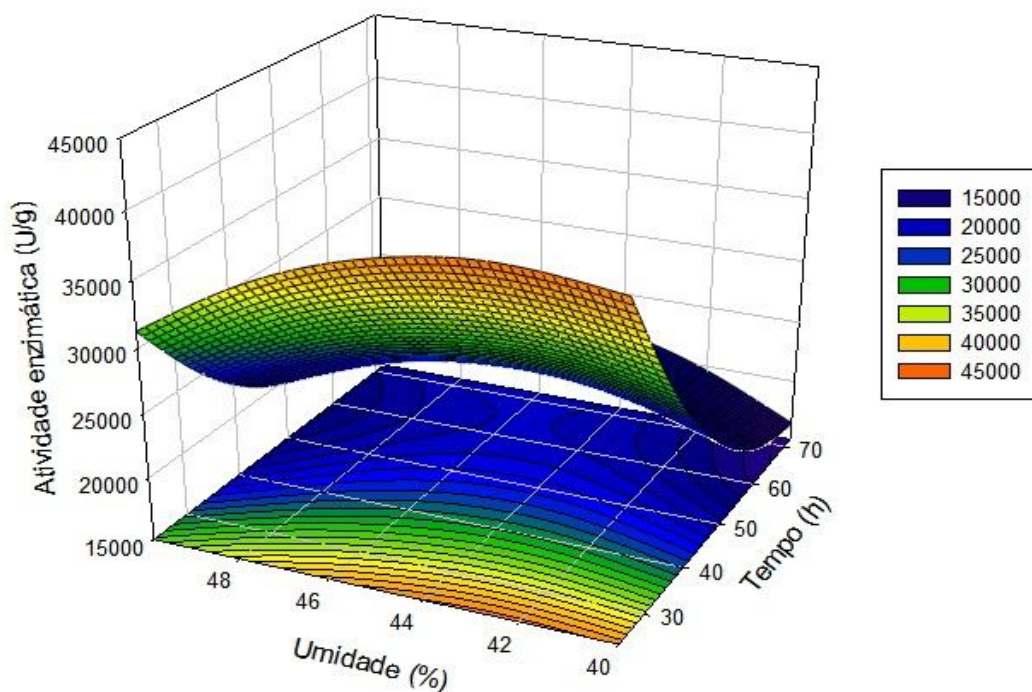
A peroxidase, assim como a lacase atua na degradação da lignina. Neste trabalho, a produção desta enzima sofreu influência do tempo, da umidade, como da interação entre eles. O modelo reduzido encontra-se descrito na Equação 8 em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} \text{Ativ (per)} = & -181959,037 - 2462,73Tem + 12435,75Um + 9,85Tem^2 \\ & - 154,43Um^2 + 25,79TemUm \end{aligned}$$

Equação 8 Modelo reduzido da atividade da peroxidase do fungo *Rhizopus* sp.

A peroxidase alcançou sua melhor atividade próximo a 40000U/g com a umidade variando de (40 à 46)% e nas primeiras 30 horas de fermentação como é possível verificar na Figura 16.

Figura 16 – Atividade da peroxidase do fungo *Rhizopus* sp.



Gomes *et al.* (2009) obteve a melhor atividade da peroxidase influenciada pela temperatura e Silva *et al* (2010) verificou que o tempo foi o fator que mais influenciou nesta atividade enzimática. Em resumo, o que pode ser analisado é que mesmo não conseguindo alcançar a máxima atividade enzimática, a produção foi vantajosa e em menor tempo que os trabalhos citados configurando assim certa vantagem para este estudo.

4.2.6 Atividade da Manganês peroxidase

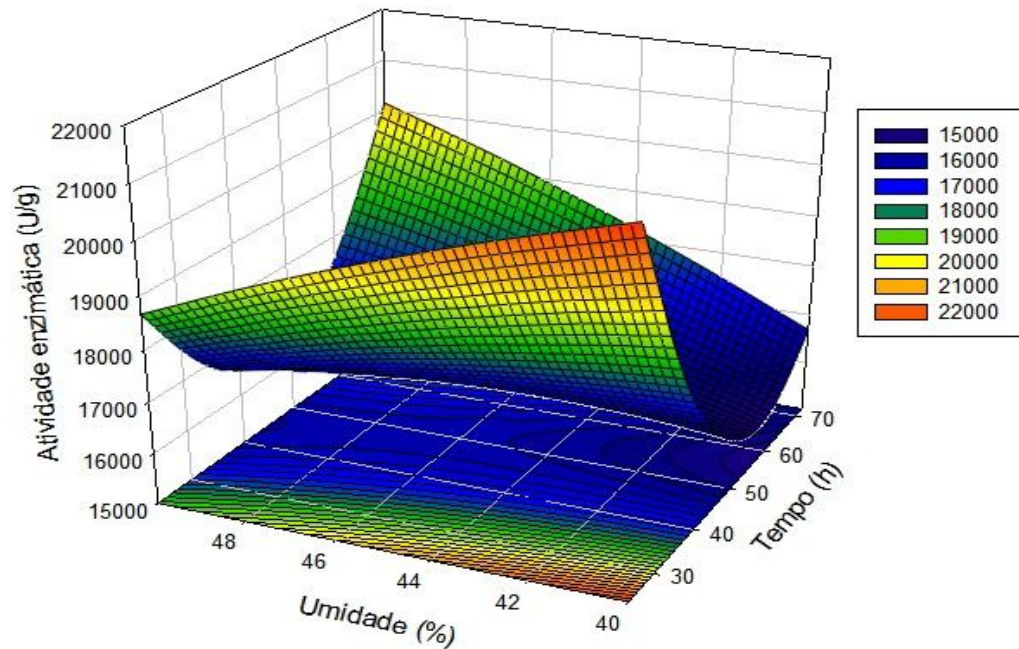
A atividade enzimática da manganês peroxidase sofreu influencia do tempo e da interação do tempo com a umidade. O modelo reduzido encontra-se na Equação 9 em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} \text{Ativ}(Mn \text{ per}) = & 43885,72 - 1130,05Tem + 5,17Tem^2 \\ & - 6,805Um^2 + 13,283TemUm \end{aligned}$$

Equação 9 Modelo reduzido da atividade da manganês peroxidase do fungo *Rhizopus* sp.

A maior atividade alcançada foi próxima a 22000U/g nas primeiras 30 horas de fermentação e umidade de 40% com um decréscimo nas horas seguintes, voltando a crescer próximo às 70 horas e umidade de 50% (Figura 17).

Figura 17 - Atividade da manganês peroxidase do fungo *Rhizopus* sp



O tempo foi o fator de maior influencia nos trabalhos de Erden *et al* (2009), Silva *et al* (2010) e de Alexandrino *et al* (2007), sendo que os dois últimos produziram próximo de 70 U/g em 30 dias. Todos sofreram a influencia do tempo na produção enzimática, corroborando com este trabalho. A produção aqui alcançada é consideravelmente maior e em tempo reduzido o que torna a produção enzimática vantajosa em relação a outros métodos.

Das três enzimas lignolíticas, a manganês peroxidase foi a única a apresentar atividade no momento em que o açúcar redutor voltou a ser produzido a partir das 70 horas de fermentação. Dessa forma, é possível considerar que esta enzima contribui para formação de açúcares redutores quando a concentração destes está baixa.

4.3 Produção de açúcares redutores pelo fungo *Aspergillus oryzae*

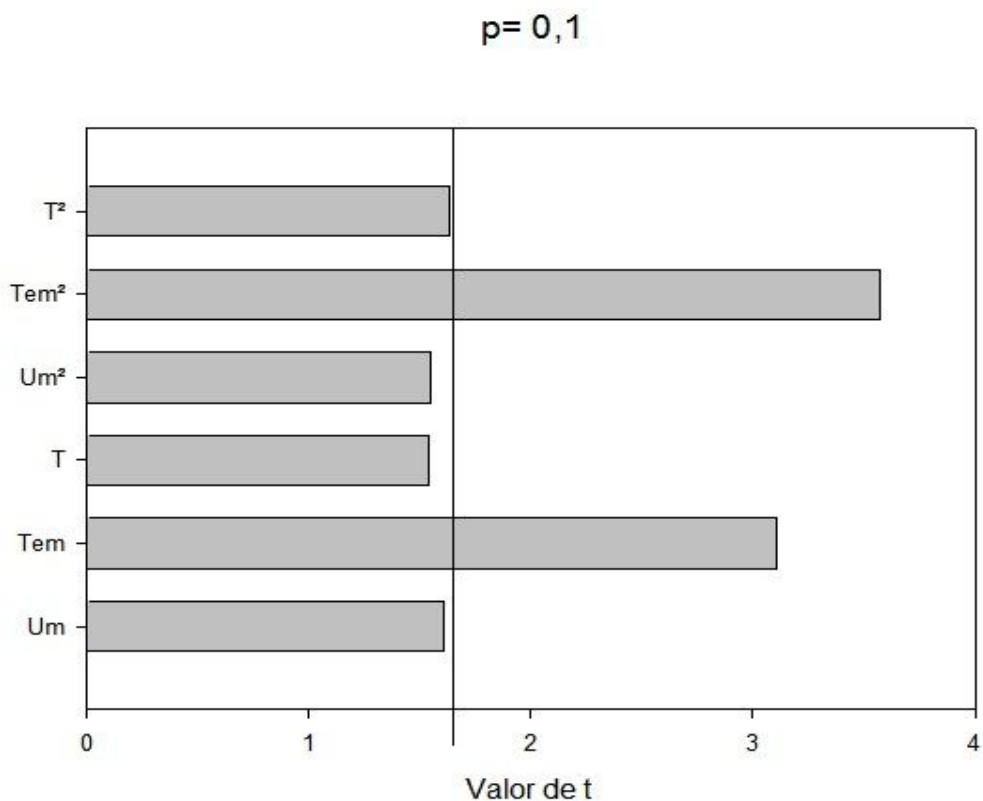
Fatores como a umidade, o tempo e a temperatura foram avaliados para verificar se tiveram um efeito significativo sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo *Aspergillus oryzae*. Para começar, foi realizada a análise de variância, ANOVA (Tabela 5) e a significância do modelo avaliada através do teste estatístico de Fisher (teste F) aplicado a diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão, a falta de ajuste, eo coeficiente de determinação múltipla (R^2). Durante a análise, os modelos completos de segunda ordem (modelos com todas as interações de parâmetros) que não foram aceitos pelos ensaios mencionados, foram melhorados pela eliminação dos termos do modelo até que as condições determinadas foram preenchidas. Todos os fatores que não foram significativos em 10% foram então reunidos para o termo de erro e um novo modelo reduzido foi obtido para as variáveis de resposta por análise de regressão usando apenas os fatores significativos indicados anteriormente.

Tabela 5 – Análise de variância da quantificação do açúcar redutor produzido pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

FV	GL	SQ	QM	F	Prob
Modelo	6	30,98798	5,16466	5,63	0,0068
Erro	11	10,08951	0,91723		
Total	17	41,07748			
R2	0,7544				

Primeiramente, apresentamos o resultado da análise de variância num diagrama de Pareto (Figura 18), em que o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado estimada (o efeito estimativa dividida pelo erro padrão) de cada elemento é traçado em ordem decrescente, com 90% de confiança ($p = 0,10$) representado pela linha vertical tracejada. Através deste gráfico é possível observar que o tempo é o fator que mais influenciou na formação de açúcares redutores pelo *Aspergillus oryzae*.

Figura 18: Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis: tempo, temperatura e umidade de fermentação sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo *Aspergillus oryzae*.



O modelo reduzido da produção de açúcar redutor está descrito na Equação 10, em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} Quant(AR) = & 3,88097 - 0,93608Um - 0,16364Tem + 2,15686T + 0,00902Um^2 \\ & + 0,00231Tem^2 - 0,03800T^2 \end{aligned}$$

Onde:

AR = Açúcar Redutor (%)

Um = Umidade (%)

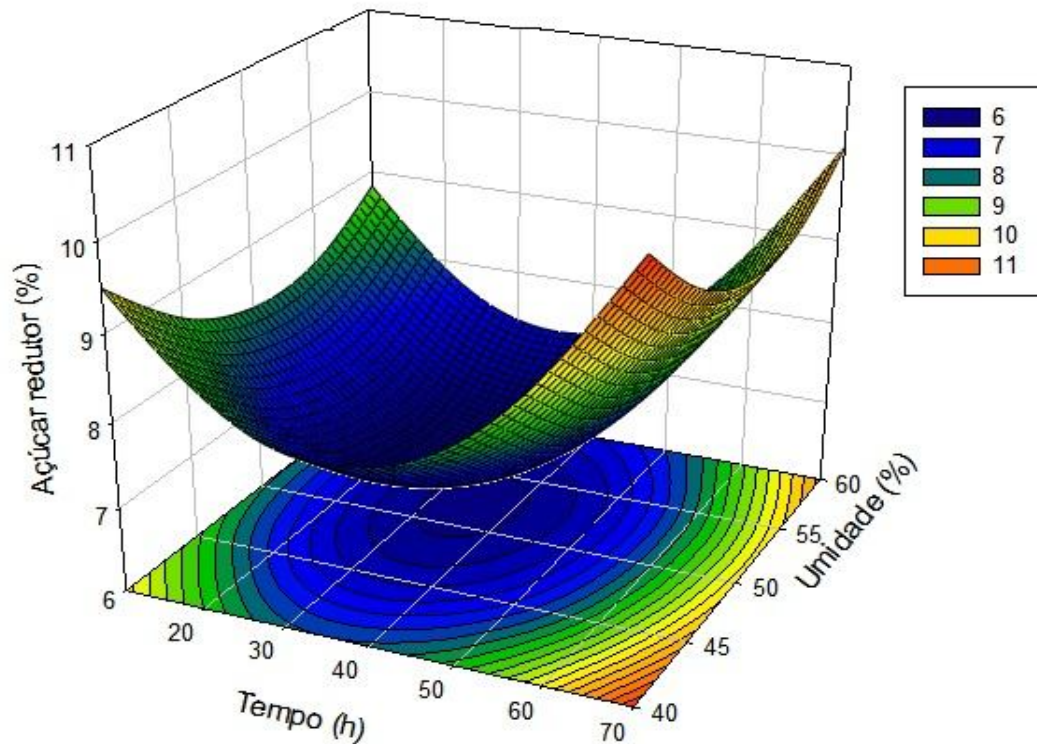
Tem = Tempo (h)

T = Temperatura (°C)

Equação 10 Modelo reduzido da produção de AR pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

Antes da fermentação, o açúcar redutor presente no resíduo estava numa média de 7,3%. Após a fermentação, nas primeiras 20 horas houve uma pequena produção de açúcar redutor pelo fungo *Aspergillus oryzae* está representado na Figura 19, onde elevou a quantidade para quase 10%. Com o passar das horas o AR diminuiu, provavelmente no momento em que o fungo começou a consumi-lo para realizar suas funções metabólicas.

Figura 19 – Superfície de resposta da produção de açúcar redutor pelo fungo *Aspergillus oryzae*



Após as 40 horas quando o açúcar chegou ao nível de 6%, a produção de AR recomeçou chegando a 11% às 70 horas de fermentação na umidade de 40% com tendência de aumentar com o tempo. Caetano *et al.* (2011) encontrou uma quantidade de 5,17% de açúcar redutor na polpa de uva. É possível observar que ao utilizar a fermentação em estado sólido pode-se aumentar a quantidade de açúcares redutores disponíveis para ser utilizados em outros processos.

4.4 Hidrólise enzimática do *Aspergillus oryzae* durante a produção de açúcar redutor

4.4.1 Atividade de CMCase

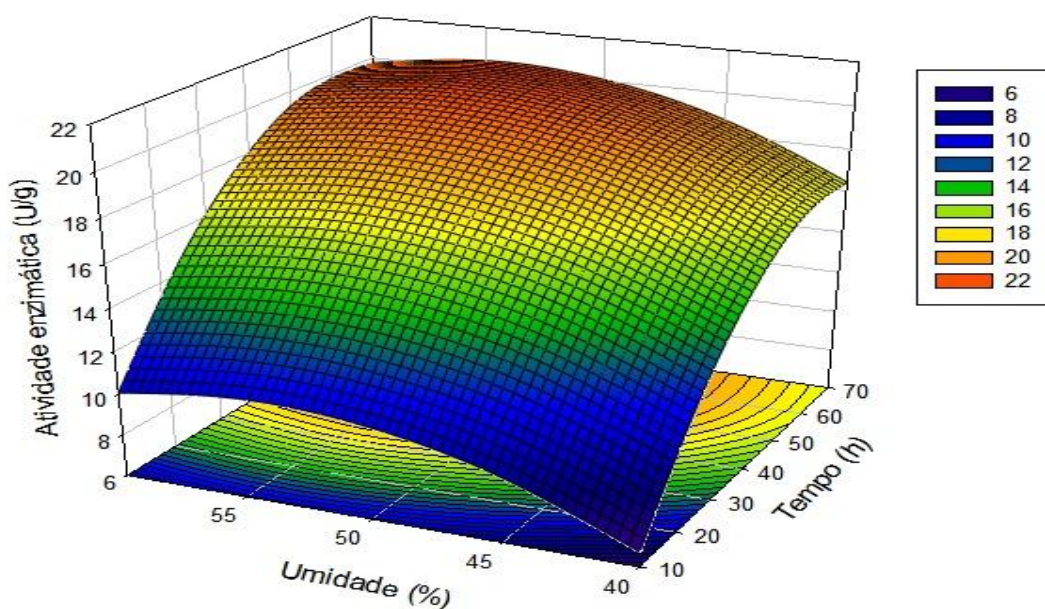
O modelo reduzido encontra-se na Equação 11, em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} \text{Ativ}(\text{CMCase}) = & -196,80670 + 2,15087Um + 0,44037Tem + 10,71337T \\ & - 0,01984Um^2 - 0,00348Tem^2 - 0,19314T^2 \end{aligned}$$

Equação 11 Modelo ajustado da atividade de CMCase pelo fungo *Aspergillus oryzae*.

Através da Figura 20 é possível perceber que a atividade de CMCase alcançou seu ponto máximo de produção às 60 horas, com umidade entre 53 % e 57 %, chegando a 22U/g. Em relação à produção de açúcares redutores, esta enzima iniciou sua atividade enquanto a concentração de AR estava baixa. É provável que neste momento o fungo começou a produzi-la para atuar na quebra da celulose para liberação de cadeias menores de carboidratos, os monossacarídeos ou açúcares redutores. Ao analisar as Figuras 19 e 20, a concentração de açúcar redutor estava se elevando chegando à aproximadamente 11% ao mesmo momento em que a CMCase alcançava a sua mais alta atividade, entre 60 e 70 horas.

Figura 20 – Atividade da CMCase produzida pelo *Aspergillus oryzae*



Basso *et al.* (2010) alcançou sua produção máxima de 6U/g de CMCase em quinze dias de fermentação e Santos *et al.* (2011b) conseguiu a maior atividade de 7,26 U/g num tempo médio de 71 horas. O que se pode notar é que a atividade encontrada neste trabalho chega a ser até quatro vezes maior em relação aos trabalhos citados, o que torna esta pesquisa viável e eficiente na produção desta enzima.

4.4.2 Atividade de FPase

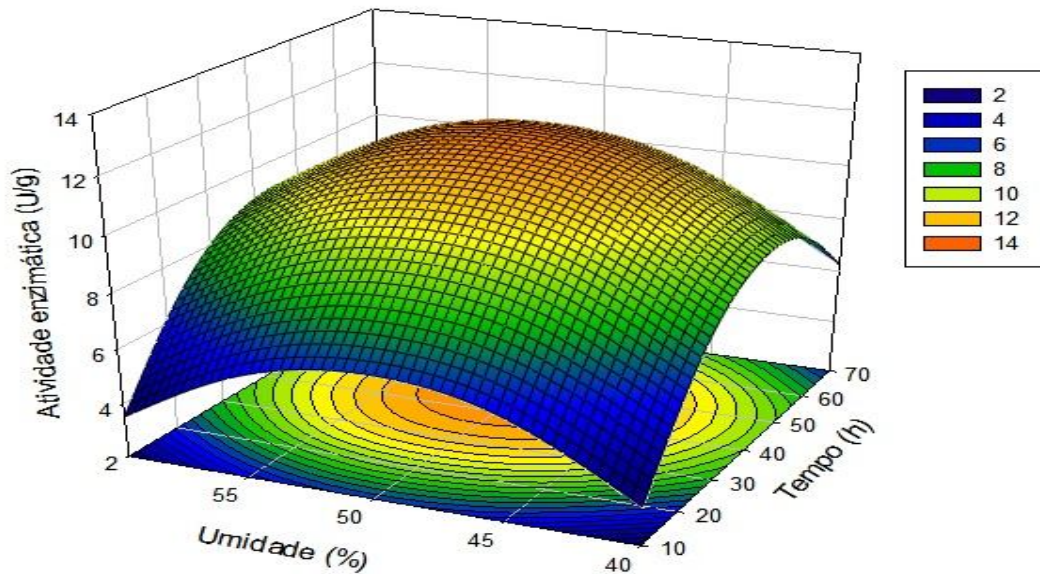
A Equação 12 é o modelo reduzido da atividade enzimática em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} \text{Ativ}(FPase) = & -92,26510 + 3,039087Um + 0,40133Tem + 1,64814T \\ & - 0,03033Um^2 - 0,00442Tem^2 - 0,03332T^2 \end{aligned}$$

Equação 12 Modelo ajustado da atividade de FPase pelo fungo *Aspergillus oryzae*

A produção da FPase atingiu sua maior atividade de 14 U/g entre 45 e 50 horas com 50% de umidade (Figura 21), sendo que essa atividade máxima da FPase ocorreu num momento em que a produção de AR voltou a crescer, esse fato pode ter ocorrido porque além de ser uma enzima endoglucanase, ao mesmo tempo também é uma enzima celulolítica exoglucase e estava quebrando a celulose tanto por dentro como por fora, em açúcares para que o fungo pudesse utilizá-lo em seu metabolismo.

Figura 21 – Atividade da FPase produzida pelo *Aspergillus oryzae*



Santos *et al.* (2011b) em sua pesquisa, produziu cerca de 2,55 U/g em 98 horas de fermentação da mesma enzima. Basso *et al.* (2010) assim como Santos *et al.* (2011b), chegou a produzir próximo a 2,5 U/g de FPase, porém o tempo para alcançar essa produção foi de quinze dias.

4.4.3 Atividade de Xilanase

A produção de xilanase está descrita na Equação 13 no modelo reduzido, em termos de valores não codificados.

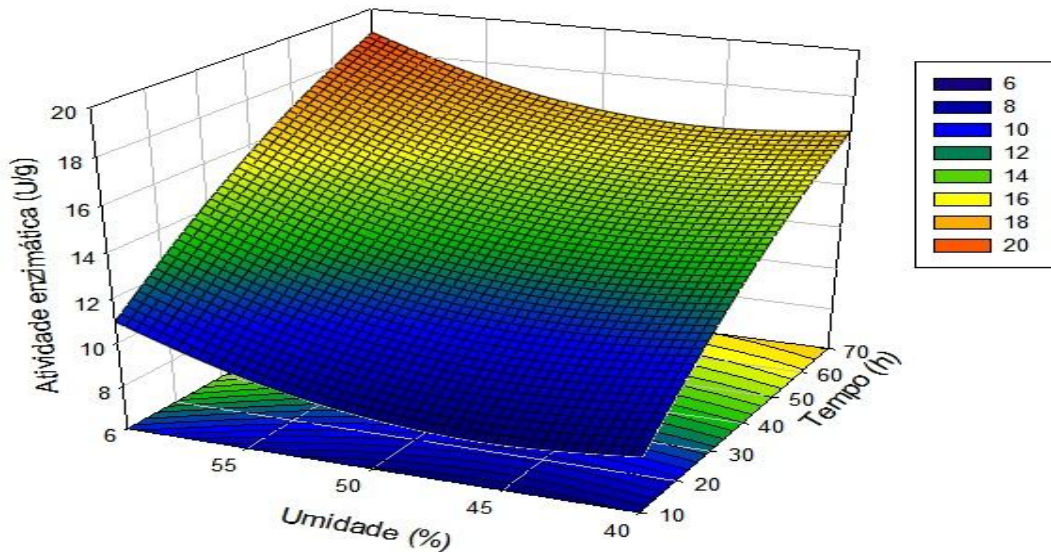
$$\begin{aligned} \text{Ativ}(Xil) = & -55,70875 - 1,61831Um + 0,19626Tem + 7,14126T \\ & + 0,01110UmTem + 0,01409Um^2 - 0,00079577Tem^2 - 0,13485T^2 \end{aligned}$$

Equação 13 Modelo ajustado da atividade de Xilanase pelo fungo *Aspergillus oryzae*

A atividade da xilanase começou a aumentar nas primeiras 20 horas de fermentação, momento em que a quantidade de AR chegou ao seu menor nível que foi de 6%. A ação da xilanase é na quebra da xilana que fica na hemicelulose, facilitando assim a ação das enzimas celulolíticas na quebra da celulose que fica envolvida pela

hemicelulose. A maior produção da xilanase ocorreu entre 60 e 70 horas onde a atividade chegou a 20U/g com 60% de umidade do substrato (Figura 22).

Figura 22 – Atividade da xilanase produzida pelo *Aspergillus oryzae*



4.4.4 Atividade de Lacase

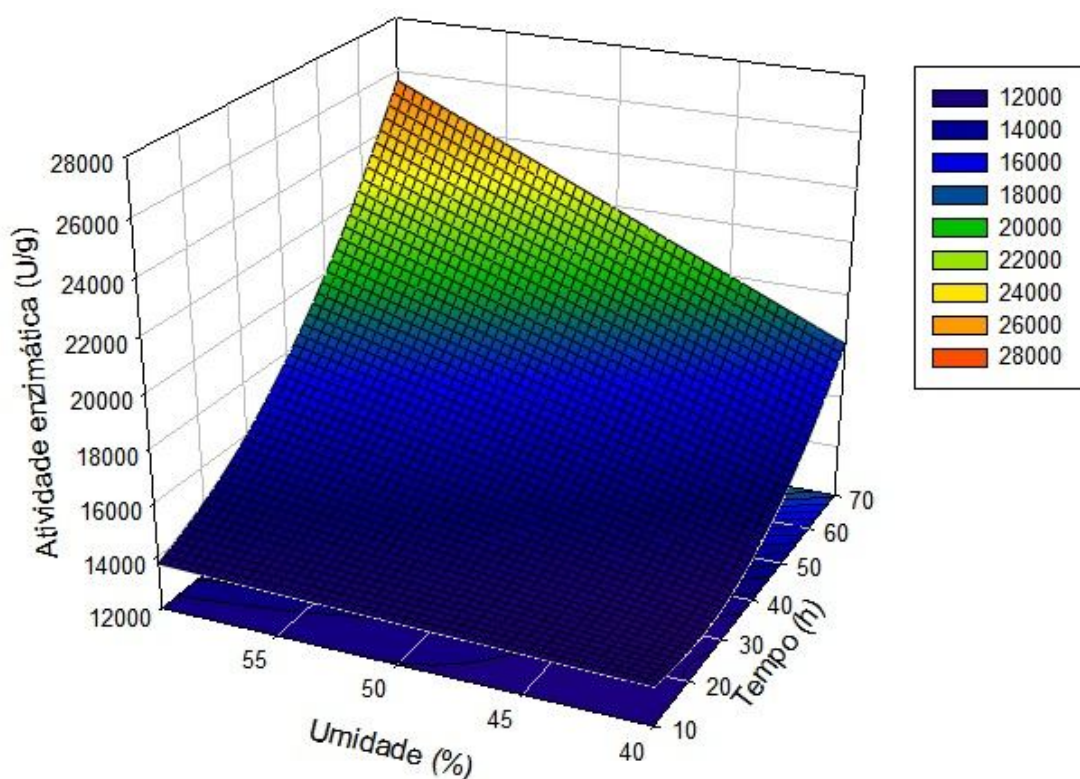
A Equação 14 é o modelo reduzido da atividade enzimática em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned} \text{Ativ}(\text{Lac}) = & 86471 - 47,00860Um - 1437,67795Tem - 2346,83727T \\ & + 6,04701UmTem + 36,70939TemT + 2,15100Tem^2 \end{aligned}$$

Equação 14 Modelo ajustado da atividade de Lacase pelo fungo *Aspergillus oryzae*

Pode-se verificar na Figura 23, que a maior atividade enzimática da lacase estava próxima à 28000U/g em 70 horas e 60% de umidade. A atividade desta enzima aumentou a partir das 50 horas de fermentação, podendo indicar que esta enzima contribuiu no aumento da produção de açúcares redutores, uma vez que neste mesmo tempo a porcentagem destes começou a aumentar.

Figura 23 – Atividade de Lacase do *Aspergillus oryzae*



No trabalho realizado por Alexandrino *et al.* (2007) o tempo de melhor produção foi de 15 dias com o fungo *Pleurotus ostreatus* e Erden *et al.* (2009) alcançou em 7 dias utilizando diferentes fungos. Já Carvalho *et al.* (2012) chegou a sua atividade ótima em 72 horas. Provavelmente, com tempo e umidade maior é possível descobrir qual valor máximo de produção desta enzima e chegar aos pontos ótimos de atividade.

4.4.5 Atividade de peroxidase

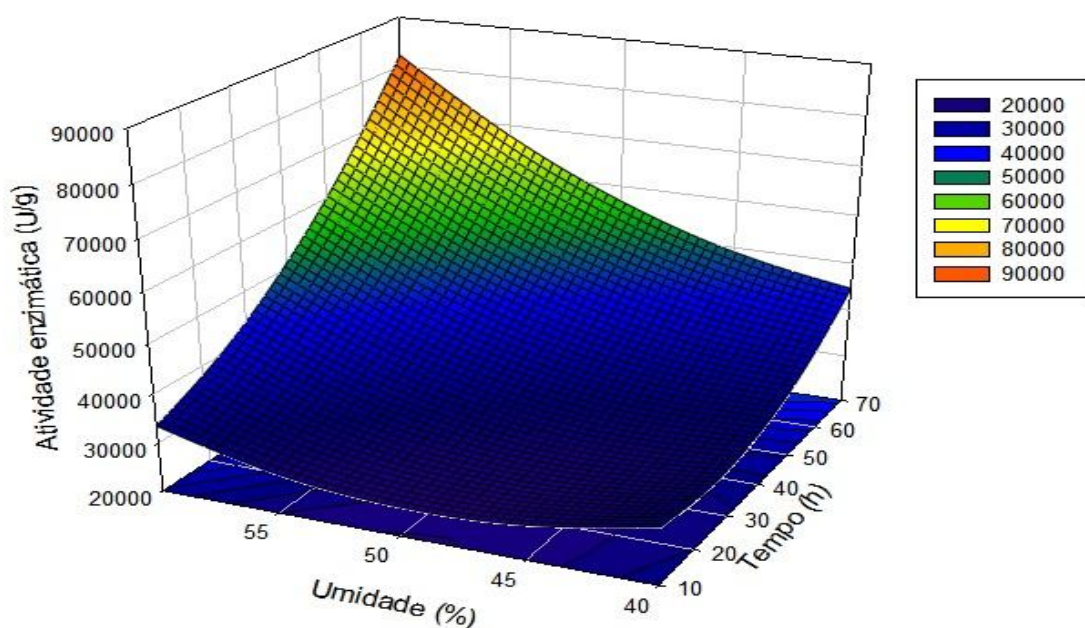
O modelo reduzido da atividade enzimática está descrito na Equação 15, em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned}
 Ativ(Per) = & -245544 - 8909,43292Um - 2876,50503Tem + 36812T \\
 & + 29,52570UmTem + 70,57825UmT + 43,83977TemT \\
 & + 65,99153Um^2 + 7,50097Tem^2 - 721,29470T^2
 \end{aligned}$$

Equação 15 Modelo ajustado da atividade de peroxidase pelo fungo *Aspergillus oryzae*

De acordo com o que se pode observar na Figura 24, a atividade da peroxidase foi mais 80000U/g com a umidade variando de 55 à 60% e com o tempo entre 60 e 70 horas. Como a atividade enzimática aumentou a partir das 40 horas de fermentação, provavelmente neste momento a lignina começou a ser quebrada, contribuindo para a formação de mais açúcares redutores.

Figura 24 – Atividade de Peroxidase do *Aspergillus oryzae*



A melhor produção de Carvalho *et al.* (2012) para esta enzima ocorreu em 96 horas e a de Silva *et al.* (2011) em cinco dias. O tempo foi o fator mais importante na produção dos trabalhos citados, fato que corrobora com esta pesquisa.

4.4.6 Atividade de manganês peroxidase

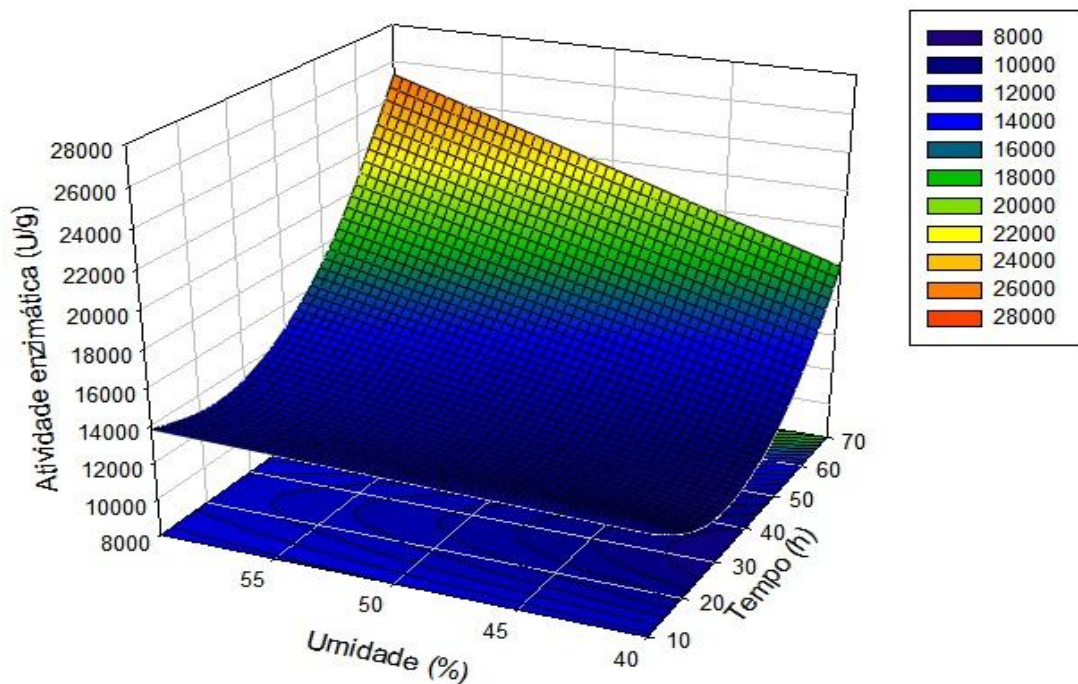
A Equação 16 representa o modelo reduzido da atividade enzimática, em termos de valores não codificados.

$$\begin{aligned}
 \text{Ativ}(\text{MnP}) = & -165633 - 36,49750Um - 975,81796Tem + 13403T \\
 & + 5,80780UmTem + 12,86123TemT + 5,40782Tem^2 - 239,54859T^2
 \end{aligned}$$

Equação 16 Modelo ajustado da atividade de Manganês peroxidase pelo fungo *Aspergillus oryzae*

É possível verificar na Figura 25 que a atividade enzimática chegou próximo a 28000U/g com 70 horas de fermentação e umidade de 60% e a tendência era de uma atividade maior se aumentasse tanto o tempo quanto a umidade. Como as demais enzimas lignolíticas estudadas, o nível da atividade de manganês peroxidase aumentou ao mesmo tempo em que a produção de açúcar redutor começou a subir, possivelmente essa enzima contribuiu para elevar a concentração desses açúcares.

Figura 25 – Atividade de manganês peroxidase do *Aspergillus oryzae*



Alexandrino *et al.* (2007) conseguiu sua maior produção em 30 dias de fermentação, enquanto Carvalho *et al.* (2012) alcançou em aproximadamente 72 horas, o que corrobora com o resultado encontrado neste trabalho, sendo o tempo um dos fatores que mais influenciou.

4.5 Quantificação da produção de açúcares redutores em resíduo pré-tratado para retirada dos açúcares redutores

Para avaliar se os fungos realmente conseguiam produzir açúcares redutores quebrando carboidratos polissacarídeos como a celulose, uma parte do resíduo passou por um pré-tratamento onde todo o açúcar redutor foi retirado lavado com água fervente. Depois que o resíduo passou novamente pela estufa de secagem, foi fermentado e submetido às mesmas condições em que ocorreram as outras fermentações para avaliar se havia produzido AR. Modelos significativos foram elaborados a partir de dados experimentais com ajuda do teste de Fisher (F), a significância da regressão, a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla (R²), além de realizar a análise de variância (ANOVA, Tabela 6) para testar os fatores tempo, umidade e temperatura. Nesta avaliação, os modelos completos de segunda ordem (modelos com todas as interações de parâmetros) que não foram aceitos a partir dos testes mencionados, foram eliminados para melhorar os termos do modelo até que as condições determinadas foram preenchidas. Os fatores não significativos em 10% foram reunidos para o termo de erro e um novo modelo reduzido foi obtido para as variáveis de resposta por análise de regressão usando apenas os fatores significativos.

Tabela 6 – Análise de variância da quantificação do açúcar redutor produzido pelos fungos *Rhizopus* sp. E *Aspergillus oryzae*.

<i>Rhizopus</i> sp.					
FV	GL	SQ	QM	F	Prob
Modelo	7	47,23563	6,74795	9,15	0,0012
Erro	10	7,37880	0,73788		
Total	17	54,61444			
R2	0,8649				
<i>Aspergillus oryzae</i>					
FV	GL	SQ	QM	F	Prob
Modelo	4	4,20161	1,05040	6,08	0,0055
Erro	13	2,24417	0,17263		
Total	17	6,44578			

O resultado da análise de variância está representado num diagrama de Pareto (Figuras 26 e 27, *Rhizopus* sp e *Aspergillus oryzae* respectivamente), em que o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado estimada (o efeito estimativa dividida pelo erro padrão) de cada elemento é traçado em ordem decrescente, com 90% de confiança ($p = 0,10$). Através deste gráfico é possível observar quais os fatores que mais influenciaram na formação de açúcares redutores pelos fungos. As equações dos modelos ajustados estão apresentados na Tabela 7.

Figura 26-Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo *Rhizopus* sp.

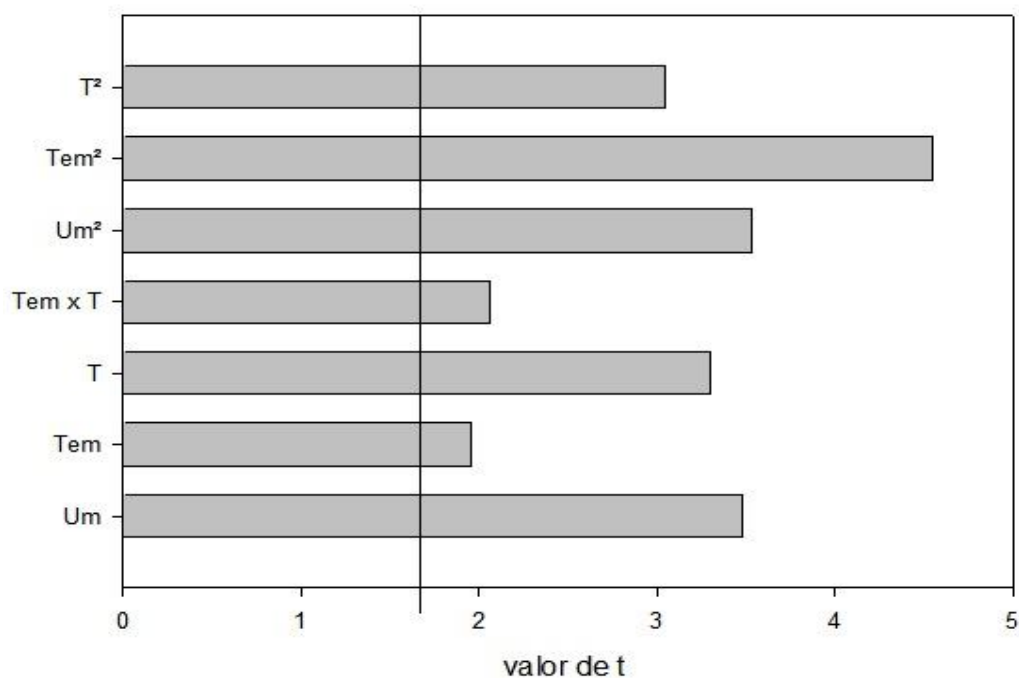


Figura 27 - Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis sobre a produção de açúcares redutores pelo fungo *Aspergillus oryzae* no resíduo tratado

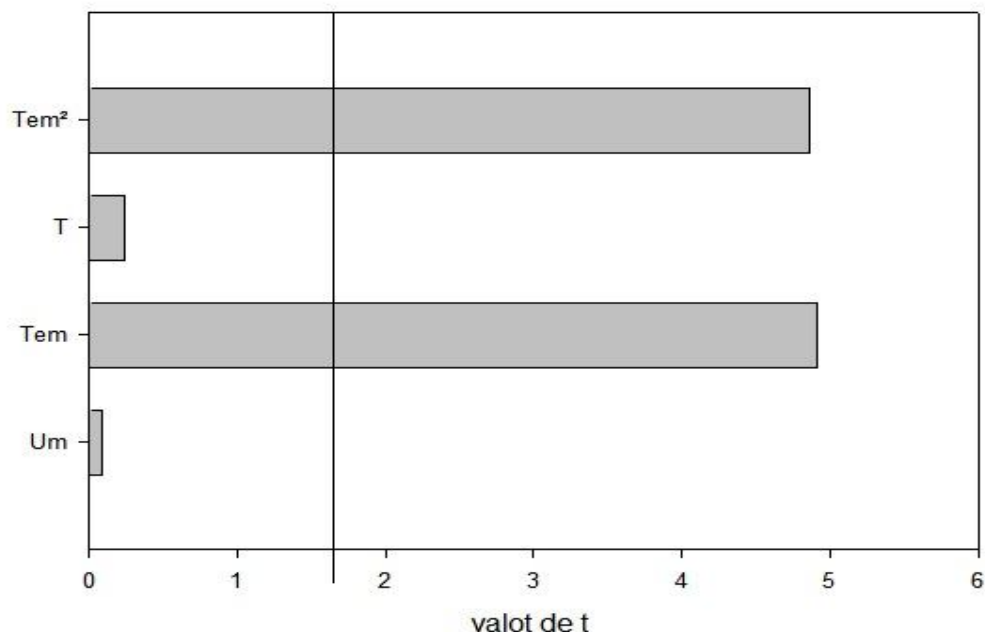
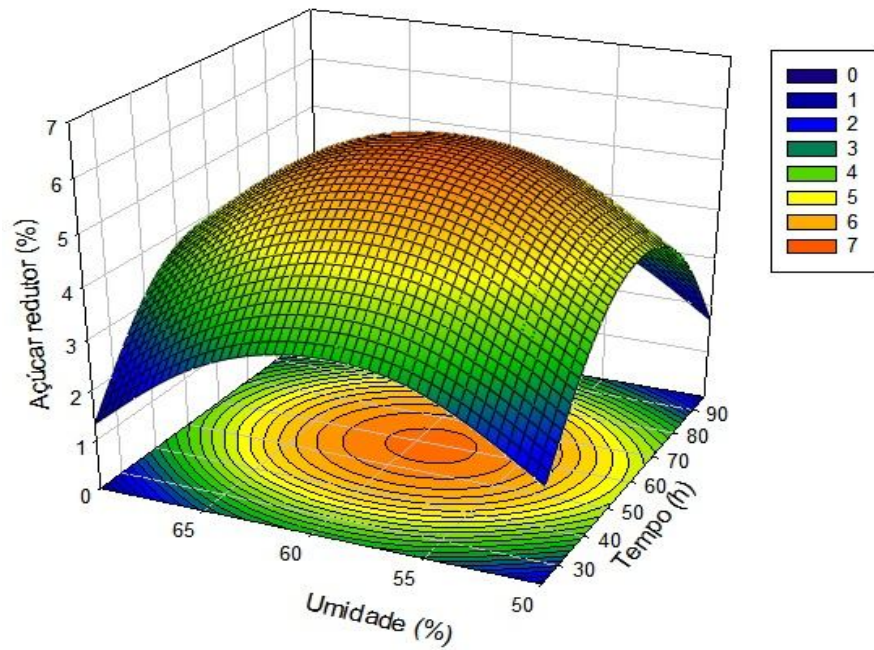


Tabela 7 – Modelos reduzidos da produção de açúcar redutor pelos fungos *Rhizopus* sp e *Aspergillus oryzae*, em termos de valores não codificados.

Equações	
E1 =	$0,57580 + 2,18158Um + 0,14463Tem - 4,15565T + 0,00345TemT - 0,01841Um^2 - 0,00209Tem^2 + 0,06375T^2$
E2 =	$1,09216 - 0,00117Um + 0,08872Tem - 0,00642T - 0,00106Tem^2$
E1 = equação da produção de AR pelo <i>Rhizopus</i> sp. e E2 = Produção de AR pelo <i>Aspergillus oryzae</i> ; Um = Umidade (%), Tem = Tempo (h) e T = Temperatura (°C)	

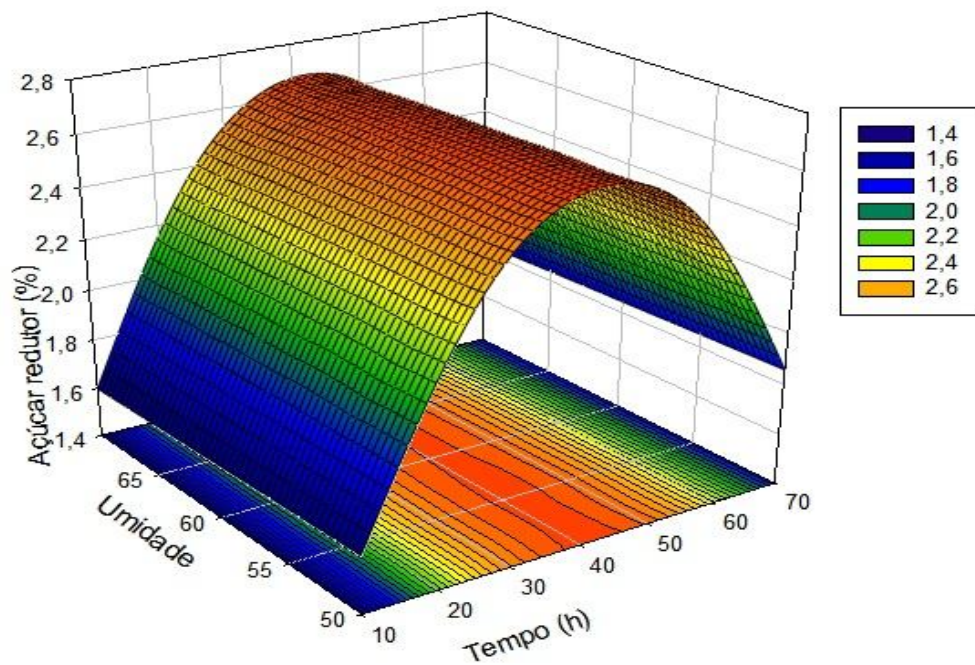
Pode-se comprovar que os fungos realmente produziram açúcares como é possível analisar nas Figuras 28 e 29, pois o AR inicial do resíduo era 0 devido ao tratamento submetido. A produção do *Rhizopus* sp chegou a 7% de AR em 60 horas com 60% de umidade (Figura 28), alcançando neste ponto sua melhor produção.

Figura 28 – Produção de AR pelo *Rhizopus* sp no resíduo com 0% de açúcar inicial



O fungo *Aspergillus oryzae* também produziu açúcar redutor chegando a concentração de 2,6% (Figura 29), em 40 horas de fermentação em todas as umidades testadas.

Figura 29 – Produção de AR pelo *Aspergillus oryzae* no resíduo com 0% de açúcar inicial



Comparando os dois fungos, o *Rhizopus* sp produziu mais açúcar que o *Aspergillus oryzae*. É provável que o primeiro tenha um metabolismo mais acelerado e precisa de mais açúcar para manter suas funções. Porém o mais importante é verificar que os dois conseguiram produzir açúcar redutor a partir da degradação do complexo lignocelulósicos.

5 CONCLUSÃO

- Os fungos estudados *Rhizopus sp* e o *Aspergillus oryzae* foram eficientes para elevar a produção de açúcares redutores do resíduo que são de interesse de algumas indústrias, como para a produção de bioetanol, por exemplo;
- Durante o processo de quebra do complexo lignocelulósico, os fungos liberaram diversas enzimas de interesse industrial e ao produzi-las através da FES utilizando resíduos como substrato, o custo de produção é reduzido;
- Ao aproveitar resíduos agroindustriais, estes se tornarão mais uma fonte de renda para os produtores, além de evitar que estes sejam descartados no meio ambiente poluindo água e solo.
- A superfície de resposta ajudou a analisar melhor os fatores que influenciaram na produção dos açúcares e das enzimas.

6REFERENCIAS

AGUIAR, C. M. de;Hidrólise Enzimática de Resíduos Lignocelulósicos Utilizando Celulases Produzidas pelo Fungo *Aspergillus niger*. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste Centro de Engenharias e Ciências Exatas. 2010.

ALBUQUERQUE, E. M. B. de; OLIVEIRA, E. N. A. de; SANTOS, D. da C.; ALMEIDA, F. de A. C. e GOMES, J. P.; Comportamento dos Açúcares Redutores em Manga in natura Armazenada em Atmosfera Modificada. *Tecnol. &Ciên. Agropec.*, João Pessoa, v.4, n.3, p.27-31, set. 2010.

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 *Pleurotostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007.

AMORIM, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - Campus de Itapetinga. 2011.

ANASTASI A., COPPOLA T., PRIGIONE V., VARESE G. C. Pyrene Degradation and Detoxification in Soil by a Consortium of Basidiomycetes Isolated from Compost: role of Laccases and Peroxidases. *Journal of Harzardous Materials*, 165(1), p. 1229-1233. 2009.

ANUPAMA, R.P. – Value-added food: single cell protein – *Biotechnology Advances*, 18, 459-479, 2000.

ARAÚJO, L. F. Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida.Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2004.

ARCHIBALD F. S. A New Assay for Lignin-type Peroxidases Employing the dye Azure B, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), p. 3110-3116. 1992

ASGHER, M.; BHATII, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R.L. – Recent Developments in Biodegration of Industrial Pollutants by White Rot Fungi and their enzyme system. *Biodegration*, 19, 771-783, 2008.

ASPERGILLUS. Disponível em: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=89>. Acesso em: 17/10/2012.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C.; Atividade Celulolítica de Fungos Isolados de Bagaço de Cana-de-açúcar e Madeira em Decomposição.*Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BIOMASSA.Biomassa oriunda de madeira e resíduos vegetais pode gerar biocombustível. Disponível em:

http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_news/lqes_news_cit/lqes_news_2008/lqes_news_novidades_1224.html. Acesso em: 09 de outubro de 2012

BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 2008.

CAETANO, P. K.; DAIUTO, É. R.; VIEITES, R. L.; Característica físico-química e sensorial de geleia elaborada com polpa e suco de acerola. Braz. J. Food Technol. [online]. 2012, vol.15, n.3, pp. 191-197. Epub June 26, 2012. ISSN 1981-6723

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; SILVA, F.F.; SILVA, R.R. Desempenho e Digestibilidade de Ovinos Alimentados com Farelo de Cacau (*Theobromacacao L.*) em Diferentes níveis de Substituição – Ciência Animal Brasileira, 7, 115-122, 2006

CARVALHO, T.; FILHO, G.A.; PACHECO, C. S. V.; FERREIRA, A. N.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M.; Produção de Enzimas Hidrolíticas por Fermentação em Estado Sólido da Palma Doce (*Nopaleacoccinellifera*) Utilizando Modelos Estatísticos Significativos. REA – Revista de estudos ambientais (Online) v.14, n.3, p.48-57, jan./jun. 2012.

CASADEI, M. E.; Processos Fermentativos a Partir da Cana-de-Açúcar. Monografia - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba. 2012.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA Jr., N.; Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais – Revisão. Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010

CEPLAC. Características gerais do Cacau. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acessado em 09 de Outubro de 2012

COLEN, G. Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de Lipase. Tese (doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2006

COURI, S.; TERZI, S. da C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. da; Hydrolytic Enzyme Production in Solid-State Fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochemistry Ed. 36 p. 255–261, 2000.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C.; Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004. 25 p.

CUTTER, E. G.; Anatomia Vegetal. Parte 1 – Células e Tecidos. 2ª Ed. Editora Roca. São Paulo. 1986

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. de; Fermentação em Estado Sólido de Diferentes Resíduos para a Obtenção de Lipase Microbiana. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. – Fungos – uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, Caxias do Sul, Editora EDUCS, 2004.

ERDEN, E.; M. UCAR, M. C.; GEZER, T.; PAZARLIOGLU, N. K.; Screening for Ligninolytic Enzymes From Autochthonous Fungi and Applications for Decolorization of Remazole Marine Blue. *BrazilianJournalofMicrobiology*. Pg. 346-353. 2009.

FERNÁNDEZ, D. E. R.; Desenvolvimento de um Bioprocesso por Fermentação em Estado Sólido para Produzir e Recuperar Enzimas de Interesse Comercial. Tese - Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2009.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.85-101, 2003.

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. – Fungal Biotechnology in food and feed processing. *FoodResearchInternational*, 42, 577-587, 2009.

GHOSE T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry*, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R. da; BOSCOLO, M; Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosic Agricultural Residues and their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:31-39, 2009.

GOKHALE, D. U. Xylanase and Betaxylosidase Production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 8, p. 137-138, 1986.

GRANATO D.; RIBEIRO J. C. B.; CASTRO I. A.; MASSON M. L.; Sensory Evaluation and Physicochemical Optimisation of Soy-based Desserts Using Response Surface methodology. *Food Chemistry*, 121(1), p. 899–906. 2010.

G100 – Associação Brasileira das Pequenas e Médias Cooperativas e Empresas de Laticínios. Látceos Seguros - Análises de Rotina do Leite - Parte V. Disponível em: <http://cienciadoleite.com.br/?action=1&type=0&a=198>. Acesso em: 23/05/2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed.p. 49-50. São Paulo: IMESP, 1985.

MACIEL, G. M.; Desenvolvimento de Bioprocessos para Produção de Xilanases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Bagaço de Cana-de-açúcar e Farelo de Soja. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, 2006.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31(1):426-8.

MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. <http://www.agricultura.gov.br/camaras-setoriais-e-tematicas>. Acesso em: 07/02/2013.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre Fermentação no Estado Sólido e Fermentação Submersa para Produção de A-Amilases por *Penicillium Sp.* e Caracterização da Enzima. Revista Eletrônica: Biociências, Biotecnologia e Saúde. Nº1. Jan-Abril, 2011.

OLIVEIRA, L. G. de; MANTOVANI, S. M.; Transformações Biológicas: Contribuições e Perspectivas. Quim. Nova, Vol. 32, No. 3, 742-756, 2009.

PACHECO, C. S. V.; FERREIRA, A. N.; ROCHA, T. J. O.; TAVARES, I. M. de C.; FRANCO, M.; Aproveitamento da Semente da Jaca para a Obtenção de Endoglucanase a partir de *Aspergillus niger* por Fermentação em Estado Sólido. UNOPAR CientCiêncBiolSaúde;14(1):25-9, 2012.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascusaurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 169f. 2003.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. – New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products – Process Biochemistry, 35, 1153-1169, 2000

PARIS, L. D. de; Produção de Enzimas Fúngicas por Fermentação em Estado Sólido das Sojas Orgânica, Transgênica e Convencional. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste Centro De Engenharias e Ciências Exatas. 2008

PINHEIRO, T. da L. F.; Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa Utilizando *Penicilliumverrucosum* como microrganismo. Dissertação (Mestrado de Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, campus de Erechim –2006

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. – Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais – Comunicado Técnico online EMBRAPA, 102, 1-5, 2005.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEI, A. – Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus spp.* Usingoilcakes as substrates – ProcessBiochemistry, 40, 1749-1754, 2004.

REGULY, J.C. – Biotecnologia dos Processos Fermentativos – Volume 3. Pelotas, Editora Universitária da UFPEL, 2000.

ROCHA, C. P. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. Dissertação – Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia – MG, 2010.

SALIBA, E. de O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. de; VELOSO, D. P.; Ligninas – Métodos de Obtenção e Caracterização Química. Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.5, p.917-928, 2001 ISSN 0103-8478

SANTANA, R. S. M. de; Produção de Enzimas Amilolíticas Através da Fermentação em Estado Sólido. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Itapetinga, Bahia. 2012.

SANTINO, M. B. da C.; SCIESSERE, L.; BIANCHINI, I. J.; As Atividades das Enzimas na Decomposição da Matéria Orgânica Particulada em Ambientes Aquáticos Continentais. *Oecol. Bras.*, 12 (1): 30-41, 2008.

SANTOS, A. da S. ;Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante – Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011

SANTOS, I. D.;Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica, contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado. Departamento de Ciências Florestais. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Universidade de Brasília. 2008.

SANTOS, R. R. M. dos; Aproveitamento do Caroço do Açaí como Substrato para a Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido – Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2010

SANTOS, S. F. de M. Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese Doutorado. Universidade Federal do rio Grande do Norte– Natal, RN, 2007

SANTOS, T. C. dos; AMORIM, G. M.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Determinação da Atividade de CMC_{Case} e FPase da Estipe Fúngica *Rhizopus* sp. Através da Bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias Purpurea* L.). *UNOPAR CientCiêncBioSaúde* 2011a;13(3):145-9

SANTOS, T. C. dos; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.12, p.2210-2216, dez, 2011b.

SCHIMITIS, P. G.;Determinação de Açúcares Redutores Totais – ART. Relatório de Atividades. Centro de Ciências Rurais Departamento de Tecnologia dos Alimentos Tecnologia das Bebidas Alcoólicas. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/71830638/Acucares-Redutores>. Acesso em 23/05/2013

SILVA, D.; Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 em fermentação em estado sólido e submersa. Tese – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro – Rio Claro, 2006

SILVA, I. S.; MENEZES, C. R. de.; FRANCISCON, E.; SANTOS, E. da C. dos.; and DURRANT, L. R., Degradation of Lignosulfonic and Tannic Acids by Ligninolytic Soil Fungi Cultivated under Icroaerobic Conditions. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*. Vol.53, n. 3: pp. 693-699, May-June 2010.

SILVA, L.D.S.; EZEQUIEL, J.M.B.; AZEVEDO, P.S.; CATTELAN, J.W.; BARBOSA, J.C.; RESENDE, F.D.; CARMO, F.R.G. – Digestão total e parcial de alguns componentes de dietas contendo diferentes níveis de casca de soja e fonte de nitrogênio em bovinos – *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 31, 1258-1268, 2002.

SILVA, R. da; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E.; Production of Xylanase and Cmcase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus Aurantiacus* Miede. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36:235-241. 2005.

SILVA, R. do N; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R.; Comparação de Métodos para a Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Mel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. vol.23, n.3, pp. 337-341. 2003. ISSN 1678-457X.

SILVA; M.G.; ALMEIDA, D.G.; MIRANDA, R.C.M.; MACIEL, C.C.S.; GUSMÃO, N.B.; Produção da Enzima Lignina Peroxidase por Fungos Filamentosos Utilizando Óleo Diesel como Substrato. *SCIENTIA PLENA VOL. 7, NUM. 10*. 2011.

SILVEIRA, G. G. da; Resíduos Agroindustriais como Potenciais Substratos Para a Produção de Renina Microbiana por *Mucormiehei* Utilizando Fermentação em Estado Sólido. Tese Doutorado (Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências – Rio Claro. 2007

SOCCOI C. R.; VANDENBERGHE L. P. S.; MEDEIROS A. B. P.; KARP S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P. et al. Bioethanol from Lignocelluloses: Status and Perspectives in Brazil. *Bioresour Technol*. 2010.

SOUZA, R. L. A. de; Produção de Pectinases por Fermentação Semi-Sólida Utilizando Resíduo do Maracujá como Substrato. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2008.

SPIER, M.R. - Produção De Enzimas Amilolíticas Fúngicas A-Amilase E Amilogucosidase Por Fermentação no Estado Sólido – Dissertação de Mestrado, Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, Setor de Tecnologia de Alimentos/UFPR, 2005.

SZKLARZ G.; ANTIBUS R. K.; SINSABAUGH R. L.; LINKINS A. E.; Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-rotting Fungi. *Mycologia*. v. 81(1), p. 234-240, 1989.

THAN, N.V.; NOUT, M.J.R. – *Rhizopus oligosporus* biomass, sporangiospore yield and viability as influenced by harvesting age and processing conditions – *Food Microbiology*, 19, 91-96, 2002.

VELOSO, D. P.; Isolamento e Análise Estrutural das Ligninas. *Química Nova*, 435-448, 1993.

ZANELATO, A. I.; Produção de Enzimas Celulolíticas por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Leito Fixo. Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - São José do Rio Preto : [s.n.], 116 f, 2011.

ZUNIGA, U. F. R.; Desenvolvimento de um Bioprocesso para Produção de Celulases Específicas na Cadeia Produtiva do Bioetanol de Segunda Geração. Tese - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.