



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**PRODUÇÃO DE CELULASES ATRAVES DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SORGO LIGNOCELULOSICO**

**Aluna: Franciane Maria Mantovani Santin**

**Orientador: Emerson Adriano Guarda**

**PALMAS – TO**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**PRODUÇÃO DE CELULASES ATRAVES DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SORGO LIGNOCELULOSICO**

**Aluna: Franciane Maria Mantovani Santin**

**Orientador: Emerson Adriano Guarda**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Agroenergia (Otimização do processo de produção de celulases através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato sorgo lignocelulosico).**

**PALMAS – TO**

**2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- S235p    Santin, Franciane Maria Mantovani.  
          Produção de celulases através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato sorgo lignocelulósico. / Franciane Maria Mantovani Santin. – Palmas, TO, 2014.  
          94 f.  
  
          Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2014.  
          Orientador: Emerson Adriano Guarda  
  
          1. Celulase. 2. Bagaço da cana-de-açúcar. 3. Sorgo lignocelulósico. 4. Enzimas celulolíticas. I. Título

**CDD 333.7**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

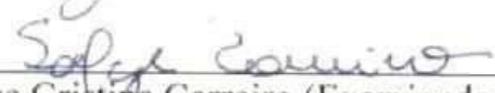
**PRODUÇÃO DE CELULASES ATRAVES DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO  
UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SORGO LIGNOCELULOSICO**

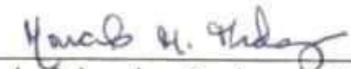
**MESTRANDA: Franciane Maria Mantovani Santin**

**Data da Defesa: 18/06/2014**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGA para o formato da Dissertação foram contempladas

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (Presidente- UFT)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Carreiro (Examinador Interno - UF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Marcelo Mendes Pedroza (Examinador Externo- IFTO

Dedico a minha filha Mariana, razão da minha vida.....

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me guiado e me dado forças para concluir mais esta etapa na minha vida.

À minha família fonte de apoio e segurança em todos os momentos. Minha filha Mariana que dá sentido a minha vida, mesmo pequena sempre compreensiva quando tinha que deixá-la para me deslocar até a Universidade, quando voltava, lá estava ela me esperando com um abraço gostoso cheio de saudades.

Ào meu esposo Márcio sempre do meu lado me amparando com muita paciência e compreensão.

Àos meus pais, Valmir e Marlene, pelo imenso amor dedicado e constante incentivo.

Ào meu irmão Tiago pelo carinho e estímulo durante esta caminhada.

Ào meu irmão Alexandre (*in memoriam*), que há 04 anos nos desolou com sua partida deixando uma falta imensurável, o que me conforta é saber que temos mais um anjo junto ao pai do céu vigiando e iluminando os passos da nossa família.

Àos meus sogros Lourdes e Valdelirio e ao meu cunhado Evandro, sempre presentes me dando apoio e suporte.

Àos meus tios e primos que mesmo distantes, através de bate papo descontraído deixaram meus dias mais felizes.

Ào meu orientador Dr. Emerson Adriano Guarda pela oportunidade concedida, orientação e apoio o que tornou possível a concretização deste projeto.

À colega Fabrícia Vieira Silva pela sabedoria, serenidade e amizade compartilhada imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os técnicos dos Laboratórios de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia e do Laboratório de Pesquisa em Química pelo auxílio e paciência no desenvolvimento do trabalho experimental.

À Universidade Federal do Tocantins pela oportunidade concedida para realização deste projeto de pesquisa.

## RESUMO

Realizou-se o cultivo em estado sólido do fungo filamentososo isolado do ninho de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex balzani*, utilizando como substrato sorgo lignocelulósico visando à máxima produção de celulasas, através da otimização do processo de cultivo, avaliando a influência das variáveis: concentração inicial de inóculo, umidade, tempo, pH e temperatura. Os efeitos das variáveis foram primeiramente avaliados em termos da atividade da enzima FPase, onde a umidade e o tempo mostraram-se estatisticamente significativos a 95%. Em condições de maior tempo e umidade a atividade enzimática diminuí mostrando um efeito negativo. As demais variáveis não apresentaram efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança. As maiores atividades enzimáticas foram proporcionadas pela combinação das variáveis do ensaio 2 que apresenta umidade 60%, pH 4, tempo de incubação de 4 dias, concentração inicial de inóculo de 108 e temperatura de 40°C. As variáveis significativas foram subsequentemente otimizadas. Na segunda parte do experimento a atividade da enzima FPase apresentou melhor resposta com o teor de umidade de 60 e 75%, e o tempo de incubação 4 a 6 dias, com produtividade máxima de 4,1 UI/g. A atividade CMCase apresentou máxima atividade entre 55 e 65% de umidade e com o tempo de incubação de 5 a 8 dias, alcançando uma atividade enzimática de 4,1 UI/g. Já para atividade Avicelase a maior produção foi com o teor de umidade em torno de 65 e 80% e com o tempo de incubação de 2 a 5 dias, alcançando uma atividade enzimática de 3,8 U/g. As atividades apresentadas demonstram expressiva capacidade celulolítica do fungo estudado, frente ao sorgo lignocelulósico.

**Palavras-chave:** Celulase; Bagaço da cana-de-açúcar; sorgo lignocelulósico, enzimas celulolíticas.

## ABSTRACT

The solid state cultivation of the filamentous fungus isolated from the nest of leaf-cutting ants of the species *Acromyrmex balzani* was carried out, using lignocellulosic sorghum as a substrate aiming at the maximum production of cellulases, through the optimization of the cultivation process, evaluating the influence of the variables: initial concentration inoculum, humidity, time, pH and temperature. The effects of the variables were first evaluated in terms of the activity of the FPase enzyme, where humidity and time were statistically significant at 95%. In conditions of greater time and humidity, the enzymatic activity decreases showing a negative effect. The other variables did not show a statistically significant effect at 95% confidence. The greatest enzymatic activities were provided by the combination of the variables of test 2, which presents humidity 60%, pH 4, incubation time of 4 days, initial inoculum concentration of 108 and temperature of 40°C. The significant variables were subsequently optimized. In the second part of the experiment, the activity of the FPase enzyme showed the best response with the moisture content of 60 and 75%, and the incubation time 4 to 6 days, with a maximum productivity of 4.1 IU / g. The CMCCase activity showed maximum activity between 55 and 65% humidity and with an incubation time of 5 to 8 days, reaching an enzymatic activity of 4.1 IU / g. As for Avicelase activity, the highest production was with the moisture content around 65 and 80% and with the incubation time of 2 to 5 days, reaching an enzymatic activity of 3.8 U / g. The activities presented demonstrate an expressive cellulolytic capacity of the studied fungus, compared to lignocellulosic sorghum.

**Keywords:** Cellulase; Sugarcane bagasse; lignocellulosic sorghum, cellulolytic enzymes.

## SUMÁRIO

### Capítulo I: Fundamentação Teórica

1. Contexto energético atual	11
2. Sorgo Lignocelulosico	12
3. Celulose	13
4. Hemicelulose	14
5. Lignina	14
6. Pré-tratamento da biomassa e Hidrólise enzimática da celulose	15
7. Pré-Tratamento	15
8. Hidrólise da celulose	17
9. 4. Classificação e mecanismo de ação das celulasas	19
10. 4.1. Endoglucanases	19
11. 4.2 Exoglucanases	20
12. $\beta$ -glicosidases	20
13. Fungos	20
14. 6. Fermentação em estado sólido (FES)	22
15. Fatores que influenciam a produção de enzimas por FES	23
16. 6.1.1 Umidade	24
17. 6.1.2. Temperatura	24
18. 6.1.3. pH	25
19. 6.1.4. Tempo de incubação	25
20. 6.1.5. Concentração inicial de Inóculo	25
21. 7. Referencias Bibliográficas	26

### Capítulo II: Otimização do processo de produção de celulasas através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato sorgo lignocelulosico

22. Página Título - World Journal of Microbiology and Biotechnology	34
23. Resumo	36
24. Introdução	37
25. Materiais e Métodos	37
26. Preparo do Inóculo	36
27. Preparo do Substrato	38
28. Fermentação em Estado Sólido	38
29. Extrações das Enzimas	38
30. Determinação da atividade de enzimas celulolíticas	38
31. Determinação da atividade de FPAase	38
32. Determinação da atividade de CMCase	39
33. Determinação da atividade de Avicelase	39
34. Planejamento experimental – Delineamento Composto Central Rotacional $2^{5-1}$ e análise estatística dos dados	39
35. Resultados & Discussão Planejamento fatorial $2^{5-1}$	39
36. Atividade enzimática da FPase pelo planejamento fatorial $2^{5-1}$	42
37. Atividade enzimática da CMCase pelo planejamento fatorial $2^{5-1}$	44
38. Atividade enzimática da Avicelase pelo planejamento fatorial $2^{5-1}$	44
39. Estudo da influência do tempo e da umidade na atividade celulásica	46
40. Atividade enzimática da FPase pelo planejamento fatorial $2^{2-1}$	46
41. Atividade enzimática da CMCase pelo planejamento fatorial $2^{2-1}$	47
42. Atividade enzimática da Avicelase pelo planejamento fatorial $2^{2-1}$	50
43. Referências Bibliográficas	52
44. Anexo A - Manuscript Submission: Instructions for Authors - World Journal of Microbiology and Biotechnology	56

## INTRODUÇÃO

Diante da crescente demanda por energia e da necessidade de geração de uma nova matriz energética sustentável no mundo atual, tem-se intensificado as pesquisas por fontes renováveis de energia. Mas apesar do aumento de fontes alternativas, os combustíveis fósseis continuam a ser a principal fonte energética. Além disto, a demanda global por energia tende a crescer mais de um terço até 2035, com a China, Índia e Oriente Médio responsável por 60% desse aumento (EPE, 2013).

A bioenergia vem conquistando espaço no setor de desenvolvimento tecnológico mundial, apresentando características econômicas e operacionais vantajosas em relação aos processos químicos convencionais (Maciel, 2006). A possibilidade de produção de combustíveis derivados da biomassa lignocelulósica, maior fonte de carbono existente no planeta, instigou grandes investimentos na indústria de biocombustíveis (Bansal *et al.*, 2009).

O etanol, proveniente de biomassas lignocelulósicas, apresenta-se como uma alternativa promissora, considerando-se que a matéria-prima é abundante e barata além de reduzir os riscos ambientais. A biomassa proveniente do sorgo lignoceluloso apresenta grande potencial energético. Trata-se de uma cultura que se adaptada a diversas condições edafoclimáticas e diferentes estresses bióticos e abióticos. Semelhante a toda a biomassa, o sorgo lignoceluloso é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina.

A biomassa lignocelulósica precisa ser hidrolisada em açúcar fermentável para conversão em etanol. Este processo ainda é tecnicamente problemático porque a digestibilidade de celulose é dificultada pela sua composição físico-química e estrutural. Assim, o pré-tratamento é necessário antes do processo de hidrólise a fim de remover ou alterar as estruturas da lignina, aumentando a acessibilidade à celulose.

As enzimas fúngicas hidrolíticas podem ser induzidas por diferentes substratos, e apresentar diferenças significativas em relação à quantidade, propriedades e padrão de ação. Dentre os microrganismos produtores de enzimas, os fungos se destacam como os mais promissores, em razão da variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permitem aos mesmos,

maior penetração

no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima, o que aumenta o contato, a assimilação e metabolização dos nutrientes (Pinto, 2003).

As celulasas são usualmente uma mistura de diversas enzimas envolvidas na degradação da celulose. Os três principais grupos de celulasas que estão incluídas no processo de hidrólise são: endoglucanases (EG); exoglucanases ou celobiohidrolase (CBH) e  $\beta$ -glucosidase (Sun & Cheng, 2002). A viabilidade econômica e comercial é o principal gargalo para o uso das celulasas em biorrefinaria. A estratégia de viabilização inclui o aumento do volume de produção, com substratos mais baratos e produção de preparados enzimáticos com maior estabilidade para cada processo específico e maior atividade específica sobre substratos.

O método de produção enzimática por fermentação em estado sólido se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para aumentar a produção de enzimas. Trata-se de uma técnica em que o processo fermentativo ocorre na ausência de água livre e visa à produção de vários metabólitos, com amplo potencial de crescimento, sendo utilizada na obtenção de diversos produtos com grande importância comercial (Galembeck *et al.*, 2009).

Considerando que os processos fermentativos abrangem um conjunto de variáveis e são afetados por diversos fatores do meio, este estudo teve como objetivo demonstrar a utilização do fungo filamentoso isolado do ninho de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex balzani* para produção de enzimas celulolíticas em processo de fermentação em estado sólido e avaliar a influência das variáveis: concentração inicial de inóculo, umidade, tempo, pH e temperatura no processo. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta em um planejamento fatorial com três repetições no ponto central, com a finalidade de determinar as melhores faixas das condições do processo de fermentação em estado sólido.

A fim de proporcionar uma exposição mais ordenada, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos. O capítulo I apresenta um levantamento bibliográfico das principais características e aplicações do tema. O capítulo II, em formato de artigo científico, traz os materiais e metodologias empregadas neste trabalho, bem como os dados obtidos experimentalmente.

## **Capítulo I**

### **Fundamentação Teórica**

## 1. Contexto energético atual

O suprimento da demanda por energia em meio às ações por mitigações dos efeitos das mudanças climáticas, e ao esgotamento dos combustíveis fósseis entre outros fatores, colocam o Brasil em destaque como alternativa para esses requerimentos através da produção de etanol.

O País vem utilizando o etanol em automóveis desde a década de 1920, mas a indústria somente ganhou um grande impulso de produção a partir dos anos 70, com a introdução do programa federal de estímulo à produção e uso de etanol, o Proálcool, criado em razão da crise mundial do petróleo e que fez o etanol integrar a matriz energética brasileira. O etanol torna-se um produto estratégico para o País, diminuindo a necessidade de importação de gasolina, contribuindo para que o Brasil tenha a matriz energética mais “limpa” do mundo, gerando emprego e renda no setor agrícola nacional, além do desenvolvimento tecnológico e contribuição para a indústria química (Souza, 2013).

Nos últimos anos a produção vem se consolidando, com forte expansão em razão da nova tecnologia que disponibilizou motores *flex fuel* (utilizam gasolina e/ou etanol) para os veículos nacionais, ampliando o número de consumidores de etanol. Esses consumidores tornam-se efetivos sempre que a relação de preço entre o etanol e a gasolina for favorável à sua substituição.

Outros países também estão usando etanol misturado à gasolina, para reduzir o consumo de petróleo e também por questões ambientais. Este aumento no consumo proporciona ao etanol maior relevância como “*commodity*” internacional, aumentando a demanda externa para o Brasil, que é um país exportador desse produto.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de cana-de-açúcar, principal fonte de matéria-prima para produção de etanol, no ano de 2012, alcançou 593,6 milhões de toneladas, sendo 4,9% superior ao registrado em 2011, quando foram moídos 565,8 milhões de toneladas. Houve um crescimento de 2,4% na produção de etanol (EPE, 2013).

A previsão de crescimento nacional é de 45% da demanda por etanol até 2020. A necessidade de atendimento desta demanda é ressaltada se considerarmos que a meta de consumo de biocombustíveis nos Estados Unidos até 2022 é de 36 bilhões de galões, sendo que o milho usado na produção de etanol no país terá um teto de 15

bilhões, já a partir de 2015, além dos mercados europeus e asiáticos com suas respectivas demandas (EPE, 2011).

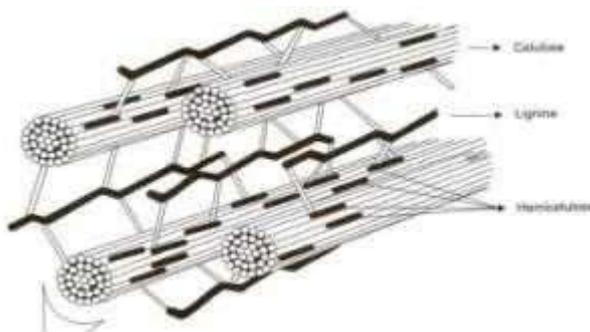
Uma forte alternativa para o suprimento desta demanda vista pelos mercados globais é o etanol de segunda geração, onde a obtenção do mesmo ocorre através do processo de hidrólise da lignocelulose (Souza, 2013). Para a produção em escala comercial de etanol lignocelulósico é preciso, principalmente, melhorar as tecnologias do processo produtivo, além de ter matéria prima disponível e viável para utilização.

## 2. Sorgo lignocelulósico

A biomassa vegetal precisa passar pelo processo de hidrólise para tornar os açúcares fermentescíveis. Por se tratar de uma nova tecnologia de produção de biocombustível, é necessário avaliar e caracterizar biomassas vegetais visando o fornecimento sustentável de matéria-prima para a produção de biocombustível lignocelulósico.

A Embrapa Milho e Sorgo está desenvolvendo cultivares de sorgo com alta produtividade de biomassa e qualidade visando o fornecimento de matéria-prima para a produção de etanol lignocelulósico. Foram desenvolvidos novos híbridos que estão em processo de avaliação, conhecidos como sorgo lignocelulósico ou sorgo energético (May *et. al.*, 2011).

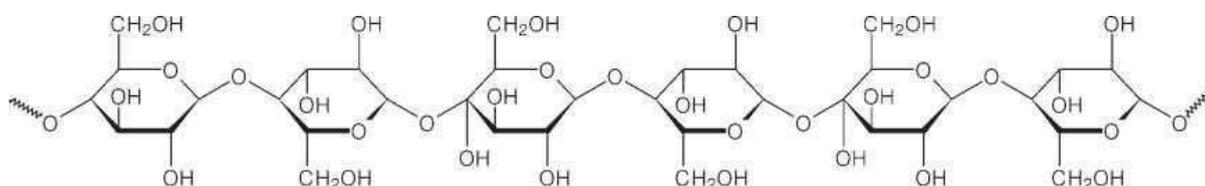
Estas novas variedades podem alcançar até 5-6 m de altura, com grande eficiência hídrica e alto rendimento em biomassa (conteúdo de matéria seca). Apresentam estabelecimento e crescimento rápido, e não exigem grandes quantidades de fertilizantes, pesticidas e irrigação, possuem alta eficiência fotossintética e grande potencial de produção de massa. As cultivares de sorgo lignocelulósico são capazes de produzir até 50 toneladas de massa seca por hectare/ano (May *et. al.*, 2011). Como toda biomassa vegetal, é formado por estruturas rígidas e fibrosas, compostas em grande parte pelos polissacarídeos celulose, hemicelulose e lignina (figura 01).



**Figura 01.** Esquema da estrutura lignocelulosica (Murphy & Mccarthy, 2005).

## 2.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo de ocorrência natural, corresponde a aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, sendo a principal fonte de carbono, elemento base dos componentes orgânicos. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99% (Rabelo, 2007). É responsável por cerca de 23% a 50% da composição da matéria seca da biomassa lignocelulósica. Constituída por unidades de  $\beta$ -D-glicoses ligadas entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, carbono-carbono e por ligações de hidrogênio (figura 02), que são as ligações entre as unidades de glicose da mesma molécula e intermoleculares, com ligações entre unidades de glicose de moléculas adjacentes (Arantes & Saddler, 2010).



**Figura 02.** Estrutura de uma cadeia de celulose (Santos, 2001).

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez, e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, que são estruturas ordenadas que se associam formando as fibras de celulose com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão ligadas paralelamente, até as regiões amorfas (Vásquez *et. al.*, 2007).

O grau de cristalinidade e o índice de polimerização são propriedades importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O índice de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas. Pode ser determinado com base na média do número de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o grau de cristalinidade está associado à reatividade do substrato (D'Almeida, 1988).

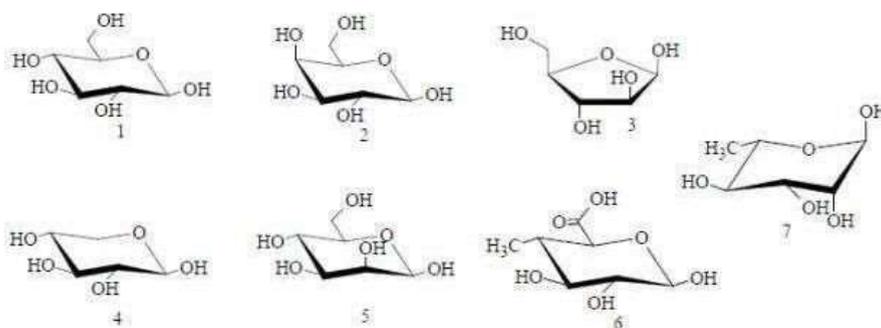
Esses fatores, mais o envoltório de lignina, proporcionam à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, que é considerado o maior desafio para a

utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (Arantes & Saddler, 2010).

## 2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, presente na parede celular vegetal, compõem de 15% a 45% do material lignocelulósico seco. Consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula também é formada por ácidos hexurônicos, ácidos  $\beta$ -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e  $\beta$ -D-galacturânico, e deoxiexoses. A quantidade de ligações, ramificações e a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes formações (Kootstra *et. al.*, 2009).

A hemicelulose apresenta baixa massa molecular e não contém regiões cristalinas, sendo assim, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (Sun & Cheng, 2005).



**Figura 03:** Representação dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (1) D-glicose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-O-metil-D-glucurônico; (7) L-ramnose (Martins, 2005).

## 2.3 Lignina

A lignina destaca-se como grande fonte para produção de valiosos insumos para a indústria química. Um dos polímeros mais abundantes e importantes da natureza, representa um dos maiores estoques de carbono/energia sendo o maior depósito de estruturas químicas aromáticas.



A lignificação é uma das etapas finais da diferenciação de células do xilema, onde a lignina é depositada juntamente com os carboidratos, formando ligações covalentes com unidades monossacarídeas da hemicelulose. A estrutura bioquímica da fração lignina comporta 10% a 30% da matéria seca da biomassa lignocelulósica, age como um adesivo agente enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e ou microbiana da parede celular (Fengel & Wegener, 1989).

A lignina não é relacionada a moléculas simples de açúcar, por isso não é utilizada para a produção de bioetanol por rotas fermentativas, mas desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose. A lignina apresenta estrutura tridimensional formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si.

### **3. Pré-tratamento da biomassa e Hidrólise enzimática da celulose**

A conversão inicial da biomassa em açúcares é o principal gargalo no processo de produção de biocombustíveis a partir de fontes lignocelulósicas. São necessárias novas soluções tecnológicas para melhorar sua eficiência, e reduzir o custo da produção de etanol lignocelulosico (Bon *et. al.*, 2008).

Há vários anos vem sendo desenvolvidas extensas pesquisas com objetivo de converter o material lignocelulosico em etanol. Neste processo são necessárias duas etapas: a hidrólise ácida ou enzimática desse material em açúcares redutores fermentáveis e a fermentação desses açúcares. Na hidrólise ácida a quebra das moléculas de celulose se dá por meio da adição de ácido. No caso da hidrólise enzimática utilizam-se enzimas produzidas por micro-organismos lignocelulolíticos (Oliveira & Vasconcelos, 2006).

A hidrólise enzimática pode ser afetada por muitos fatores, como o acesso a área de superfície devido à porosidade do material, presença de fibras cristalinas na celulose e presença de lignina e hemicelulose, as quais dificultam o acesso da enzima à celulose, diminuindo a eficiência do processo de hidrólise (Sun & Cheng, 2002).

No processo de hidrólise, ocorrem basicamente os seguintes fenômenos: a adsorção das celulasas aos sítios disponíveis no substrato celulósico; formação de um complexo ativo celulasas-substrato; hidrólise das ligações glicosídicas do polímero



celulósico; e dessorção do complexo celulósico da biomassa hidrolisada (Zhang & Lynd, 2006).

A degradação microbiana da celulose é o resultado da ação de um conjunto de enzimas, principalmente das celulases, que são produzidas por vários micro-organismos e incluem diferentes classificações enzimáticas. O maior desafio desse processo de conversão do material lignocelulósico em etanol está em alcançar rendimentos que tornem seu custo competitivo aos combustíveis fósseis (Sukumaran, *et. al.*, 2005). Com o passar dos anos e o avanço das pesquisas, surgiram várias metodologias para hidrólise lignocelulósica, destacando-se o uso da hidrólise enzimática do material pré-tratado.

### **3.1 Pré-Tratamento**

O pré-tratamento é realizado na maioria dos materiais lignocelulósicos antes do processo de hidrólise com o objetivo de remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais, bem como, evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os micro-organismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes (Sun & Cheng, 2005).

No contexto da produção de etanol lignocelulósico baseado na tecnologia de conversão enzimática, para maior produção de hidrolisados de açúcares de forma economicamente viável, as enzimas hidrolíticas precisam ter acesso livre à celulose e à hemicelulose. No entanto, as plantas possuem uma parede celular com uma série de características que a tornam um substrato extremamente recalcitrante, dificultando o acesso das enzimas hidrolíticas e, por isso, impedindo uma hidrólise eficiente da biomassa.

As características estruturais e físico-químicas do substrato que diminuem a digestibilidade enzimática, em grande parte, estão geralmente associadas com a estrutura porosa da parede celular e ao tamanho de partícula da biomassa (Zadrazil & Puniya, 1995). Em uma pequena escala, essas características estão associadas à cristalinidade e ao grau de polimerização da celulose (FAN, *et. al.*, 1987), às ramificações das cadeias laterais da hemicelulose, à composição da lignina e às ligações da lignina com a hemicelulose (Besle, *et. al.*, 1994).

As formas de pré-tratamento podem ter efeitos opostos. Caso o pré-tratamento

seja muito drástico, ocorre à degradação da fração celulósica levando á formação de

inibidores na fermentação e se for muito brando, o acesso à enzima continuará sendo limitado (Sendelius, 2005). Também considerada uma importante etapa operacional em termos Econômicos, apresenta grande influência nos custos das etapas anteriores e subsequentes do processo. Um bom pré-tratamento deve ser eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade para garantir acessibilidade à celulose. Também deve ser um processo simples, seguro, higiênico, que não ofereça riscos ambientais, com consumo reduzido de insumos químicos e energia, e com pouca ou nenhuma produção de compostos inibidores aos micro-organismos usados nos cultivos e às enzimas (Baudel, 2006).

O pré-tratamento pode ser físico, químico, biológico ou a combinação desses. A escolha dessas condições dependerá de uma avaliação do sistema de produção, rendimento e manutenção da integridade do produto final (Galbe & Zachi, 2002). Segundo Lynd et. al. (2002), o pré-tratamento ideal deve produzir, fibras reativas, pentoses em formas não degradáveis, evitar a produção de compostos que inibem significativamente o cultivo, produzir resíduos sólidos, ser um processo simples e eficiente.

Há uma série de pré-tratamentos ou combinações de métodos disponíveis para melhorar a acessibilidade da biomassa. O pré-tratamento físico diminui o tamanho das fibras através da moagem ou do processamento aquoso/vapor, por exemplo, a explosão a vapor. Já os tratamentos biológicos são usados mais raramente e em combinação com tratamentos químicos para solubilizar a lignina a fim de deixar a celulose mais acessível à hidrólise e à fermentação.

Há também atualmente uma série de tratamentos químicos sendo estudados, os mais conhecidos são: álcali, ácido diluído, amônia, dióxido de enxofre, solvente orgânico, dióxido de carbono, dentre outros. No processo de pré-tratamento alcalino sua ação se dá através do inchaço da biomassa, a superfície é aumentada favorecendo a penetração da água no material. Uma vez dentro da biomassa, a água rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina-carboidrato (Balat et. al.,2008). O efeito é a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina. Esse sistema de pré-tratamento destaca-se pelo fato do processo poder ser realizado em condições mais amenas próximo à temperatura ambiente, e a remoção da lignina acontece sem a degradação dos outros componentes importantes (Balat et. al.,2008).

É importante ressaltar que existe uma variedade de matérias-primas que apresentam potencial para a produção de etanol de segunda geração. Porém, nem

sempre o pré-tratamento utilizado em uma determinada biomassa poderá ser utilizada

em outra com a mesma eficiência. Uma metodologia de tratamento pode ser eficiente para um tipo de biomassa e não funcionar em outro material.

### **3.2 Hidrólise da celulose**

As enzimas celulolíticas constituem um complexo capaz de hidrolisar a biomassa lignocelulósica. São enzimas biocatalisadoras específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, onde a glicose possui maior interesse comercial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Tolan, 2003).

Existe na natureza uma grande variedade de microrganismos capazes de degradar celulose cristalina, que secretam sistemas de celulases complexos. Estes sistemas são compostos por uma grande variedade de enzimas específicas com modo de ação distinta, os quais agem em sinergia hidrolisando a celulose. Dois tipos distintos de mecanismos controlam a síntese e secreção de celulases. Em grande parte dos microrganismos, a produção de celulases é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolizáveis. Em alguns sistemas, a síntese de celulase é regulada pela celobiose, que são geradas a partir da degradação da celulose por pequenas quantidades de celulases constitutivas (Béguin & Aubert, 1994).

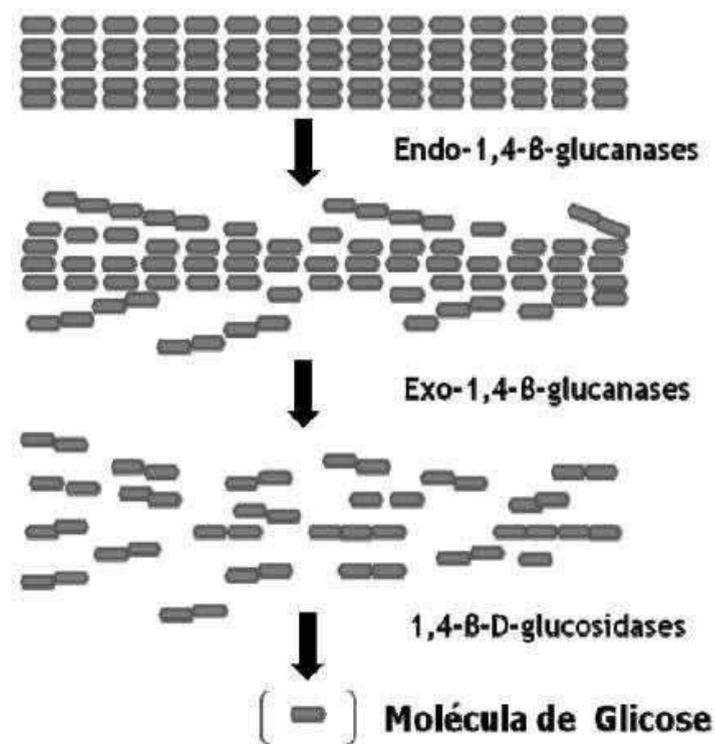
Com a presença de diferentes enzimas pode se obter uma degradação mais eficiente da celulose. A maioria das celulases possui uma estrutura formada por um domínio catalítico, ligado a um ou mais domínios de ligação à celulose, com mesma especificidade pelas ligações  $\beta - 1,4 -$  glicosídicas, que são hidrolisadas levando a inversão ou a retenção da configuração do carbono anomérico (Tomme *et. al.*, 1995).

As celulases podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias. No início do século XXI foram realizados grandes investimentos na produção de celulases, especialmente voltadas para produção de etanol combustível, tendo como maiores problemas o alto custo e o baixo rendimento das enzimas para a aplicação industrial (Kang *et. al.*, 2004). No entanto, os estudos vêm mostrando a habilidade de cepas de diferentes micro-organismos hidrolisarem celulose e hemicelulose utilizando substratos disponíveis e a preços acessíveis. Os três maiores grupos de celulases que estão no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e betaglucosidases (Sun & Cheng, 2002).

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização e criando, então, novas extremidades de

cadeia. Exoglucanases (celobiohidrolases) agem em sequência em tais extremidades,

ou seja, são capazes de se ligar aos domínios cristalinos e liberar celobiose ou glicoses das extremidades. A hidrólise completa da celulose ocorre, então, pela ação das  $\beta$ -glicosidases, as quais hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas solúveis em glicose (Muñoz *et. al.*, 2001). O mecanismo de reação das celulases está esquematizado na figura 03.



**Figura 04:** Esquema de degradação da celulose

## 4. Classificação e mecanismo de ação das celulases

### 4.1. Endoglucanases

As endoglucanases formam um complexo enzimático responsável por iniciar a hidrólise. Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses solúveis, como a carboximetilcelulose (CMC). A celulose cristalina e o algodão, são substratos com elevado grau de cristalinidade, são mais dificilmente hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular. As regiões menos organizadas são frequentemente mais atacadas, pois são formadas por cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, por esta razão ocorre uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (Martins, 2005).

Uma enzima endoglucanase típica é capaz de clivar as ligações ao longo da fibra de celulose, diminuindo rapidamente o grau de polimerização do substrato. Em razão das cadeias de glicana ainda estarem associadas ao resto da fibra depois da



quebra de uma ligação, um ataque do tipo endo- leva um tempo maior para a geração de produtos solúveis. A atividade das endoglucanases pode atuar na redução da força das fibras de celulose (Guimarães *et. al.*, 2002).

#### **4.2 Exoglucanases**

As exoglucanases ou celobiohidrolases são enzimas que desempenham uma função importante na degradação da celulose em razão da sua estrutura tridimensional específica. O sítio ativo destas enzimas é envolto por uma extensão de peptídeos que cobre os resíduos catalíticos e gera uma estrutura semelhante a um túnel. Conseqüentemente, só as extremidades das cadeias de celulose podem ser alcançadas pelo sítio ativo da enzima. Elas podem atacar as regiões cristalinas da celulose, produzindo celobiose e reduzindo lentamente o grau de polimerização do substrato (Davies & Henrissat, 1995). Essas enzimas participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela ruptura física do substrato, provocando o aumento da hidrólise da celulose por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (Zhang & Lynd, 2006).

#### **4.3 $\beta$ -glicosidases**

As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose, prevenindo o acúmulo desse dissacarídeo que é inibidor da atividade das exoglucanases. Acredita-se também que essas hidrolisam oligossacarídeos em glicose. A secreção de  $\beta$ -glicosidases é altamente dependente do meio de cultivo, sendo que um pH relativamente alto pode aumentar a produção da mesma (Juha'Sz *et. al.*, 2005)..

### **5. Fungos**

Microrganismos com grande destaque na produção de enzimas (Menezes, 1997), os fungos são seres eucariontes, uni ou pluricelulares, heterotróficos, quimiorganotraficos, aeróbios ou microaerófilos, alguns possuem parede celular constituída de quitina ou quitina e celulose. Os fungos filamentosos microscópicos são predominantemente pluricelulares, apresentam micélio aéreo, possuem reprodução sexuada ou assexuada. Sua estrutura morfológica fundamental é a hifa, que pode ser uni ou multinucleada, septada ou cenocítica, sendo que seu conjunto constitui o que denominamos de micélio. Seus esporos ou conídeos, estruturas reprodutivas de origem sexuada ou assexuada respectivamente, são oriundos da especialização de seu micélio em órgãos ou sistemas reprodutivos, podendo ser endógeno ou exógeno

(Lacaz, 1992).

Os fungos filamentosos são responsáveis por um grande número de produtos metabólicos de importância industrial, tais como, enzimas, álcoois, ácidos, pigmentos, corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas (penicilina, notatina, flavicina) e algumas bastante complexas como a ergotina (Carvalho, 1999).

De acordo com Conney (1981), o crescimento de um micro-organismo, assim como a formação de um produto, ocorre como resposta às condições ambientais, e deste modo é essencial à compreensão da relação que existe entre a regulação do metabolismo microbiano e seu ambiente físico e químico.

Segundo Montegut *et al.* (1991), os fungos são agentes bem conhecidos da decomposição de compostos orgânicos, material vegetal em geral e de substratos celulósicos, em particular. No entanto tem-se atualmente pouca informação sobre os substratos de crescimento utilizados por esses fungos, uma vez que, ao contrário da maioria dos microrganismos, a taxonomia fúngica é baseada principalmente na morfologia de micélios e estruturas reprodutivas, em vez da capacidade de utilização de substratos. Deste modo, a caracterização sistemática de substratos de crescimento não foi realizada para muitas espécies fúngicas descritas e não está claro a amplitude da capacidade celulolítica do mundo fúngico. No entanto, algumas generalizações podem ser feitas a respeito da distribuição da capacidade celulolítica entre estes organismos (Lynd *et al.*, 2002).

Um grande número de espécies do grupo de fungos mais primitivo existente, os anaeróbios Chytridomycetes, são bem conhecidos pela sua capacidade de degradar celulose no trato gastrointestinal de ruminantes. A capacidade celulolítica é também bem representada entre as subdivisões dos fungos aeróbicos, Ascomycetes, Basidiomycetes, e Deuteromycetes, que contêm grande número de espécies celulolíticas. Nos Zigomicetos, apenas alguns membros do gênero *Mucor* demonstraram atividade celulolítica significativa. Alguns gêneros têm recebido atenção e estudo considerável no que diz respeito à suas capacidades celulolíticas como: *Bulgaria*, *Chaetomium*, e *Helotium* (Ascomycetes); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* e *Serpula* (Basidiomycetes); e *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Deuteromycetes) (Lynd *et al.*, 2002).

Uma das maneiras de se obter alta atividade enzimática e produção em escala industrial é através do aproveitamento dessa capacidade de produção de enzimas microbianas, isolando e selecionando linhagens de microrganismos com tal

capacidade. Os fungos filamentosos são microrganismos com um potencial

enzimático considerável. Polizeli et al, (2006), testaram 40 isolados de fungos filamentosos obtidos a partir do solo, humus, plantas e bagaço de cana de diferentes regiões do estado de São Paulo, quanto a produção de enzimas e verificaram que 23 desses isolados exibiram potencial enzimático para usos industriais.

## **6. Fermentação em estado sólido (FES)**

A fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação em meio semi-sólido pode ser definido pelo cultivo de micro-organismos em um suporte sólido úmido que podem ser usados como fonte de carbono e fonte de energia. Aproximando do ambiente natural do micro-organismo, o substrato deve possuir umidade suficiente para dar suporte ao crescimento e ao metabolismo do micro-organismo (Singhania *et. al.*, 2009).

Este tipo de processo fermentativo tem chamado a atenção em razão da grande quantidade de enzimas extracelulares produzidas durante o processo, dentre outros metabólitos. O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato ou sobre a superfície do mesmo, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (Mitchell *et. al.*, 2006).

A fermentação em estado semi-sólido pode ser classificada em duas maneiras: as condições para o crescimento do micro-organismo fermentador são propiciadas pelo próprio substrato, ou o crescimento do micro-organismo ocorre em um suporte inerte. Em ambos os casos é preciso selecionar a matéria prima, a preparação de um inóculo específico, a fermentação propriamente dita e o controle da mesma, bem como a extração e a purificação dos produtos finais desejados.

Neste processo, deve-se identificar a necessidade da utilização de pré-tratamentos do substrato e da intervenção de fatores físico-químicos e bioquímicos como a temperatura de incubação, transferência de massa (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) e de energia (calor produzido na fermentação), suplementação de nutrientes ao substrato (N, C, P), aeração, umidade relativa do sistema, entre outros (Pandey, 2003)

Vale ressaltar que a fermentação em estado sólido apresenta algumas características de cultivo, como o crescimento e a formação de produto que ocorrem principalmente na superfície sólida; o calor gerado durante o crescimento e metabolismo do micro-organismo eleva a temperatura do leito de substrato, causa a redução da umidade do meio; o cultivo é geralmente estacionário, devido à dificuldade de agitação do meio (Bianchi *et.al.*, 2001; Sato & Sudo, 1999).



Algumas vantagens apresentadas nesse processo são a utilização de substratos com baixo valor agregado, a adição de nutrientes suplementares ao substrato sólido, redução do volume do meio reacional, reduzindo o investimento capital em biorreatores, os esporos dos micro-organismos podem ser utilizados diretamente na inoculação evitando etapas prévias, como pré-cultivos que envolvem grandes volumes de meio e tanques para seu desenvolvimento, o desenvolvimento dos fungos ocorre em condições similares às do seu habitat natural, a baixa atividade de água do meio de cultivo reduz o problema de contaminações, altos rendimentos quanto à formação de metabólitos e simplicidade nas etapas de purificação, pois os produtos estarão concentrados no líquido da extração. (Sato & Sudo, 1999; Palma *et al.*, 2000; Germano, 2000; Bianchi *et al.*, 2001; Pandey & Soccol, 2001; Gervais & Molin, 2003):

Os processos de cultivo em estado sólido apresentam elevado potencial econômico na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Além disso, este processo é de interesse, principalmente para países com abundância de resíduos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (Castilho *et al.*, 2000; Pandey, 1992, citados por Maciel, 2006).

Os relatos de estudos publicados despertaram interesse para utilização do cultivo no estado sólido em escala industrial, em razão dos produtos gerados e pelas características do processo. Em alguns casos foi observado que, essa prática, apresentou aumento de produtividade, diminuindo os custos operacionais e o investimento inicial, obtendo-se produtos com maior atividade do que a de cultivo submerso (Lekha & Lonsane, 1994; Viniestra-González *et al.*, 2003; Pandey & Soccol, 2001).

Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando aumento da produção quando comparada a prática de cultivo submerso. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (Hölker *et al.*, 2004).

## **6.1 Fatores que influenciam a produção de enzimas por FES**

O estabelecimento das relações entre a fisiologia dos micro-organismos e os fatores físico-químicos é o objetivo para a otimização do processo. Esses fatores



incluem temperatura, tempo, pH, aeração, concentração de inóculo, atividade de água e umidade, as propriedades do meio, natureza do substrato sólido empregado, etc (Doelle *et al.*, 1992).

### **6.1.1 Umidade**

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia o cultivo em estado sólido. As características do substrato, as necessidades do micro-organismo utilizado e o produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá apresentar (Paris, 2008).

Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e a elevação da temperatura interna do meio fermentado. Isso pode facilitar a contaminação bacteriana. Vale ressaltar que, substratos com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando uma menor produção do produto desejado. A umidade no cultivo sólido pode variar de 18 a 85%, variando em função da capacidade de absorção do meio de cultivo utilizado (Bianchi, *et al.*, 2001, citado por LIMA, *et al.*, 2001).

### **6.1.2 Temperatura**

A temperatura é outro fator que interfere no cultivo em estado sólido. O calor gerado durante o crescimento microbiano deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos micro-organismos.

A remoção do calor é uma das grandes dificuldades dos processos de FES, em razão da baixa condutividade térmica da matéria fermentada. O problema é maior para a FES em larga escala, tendo em vista que os equipamentos para refrigeração mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico (Hasan, 2002).

Embora FES seja uma alternativa para a maioria dos processos convencionais de cultivo líquido, manter a temperatura adequada em escala industrial é um grande problema a ser resolvido. Industrialmente, este problema pode ser contornado pela introdução de ar comprimido no meio de cultura, controle de temperatura da sala ou

do equipamento onde ocorre o cultivo, ou com trocadores de calor encamisando o fermentador com circulação de água refrigerante (Schmidell *et. al.*, 2001).

### **6.2.3 pH**

O controle do pH durante o processo de FES, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e consistência do material. Para tentar amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (Schmidell *et. al.*, 2001).

### **6.2.4 Tempo de incubação**

O tempo de cultivo pode influenciar o nível de produção de enzimas, pois a produção enzimática esta diretamente associada ao estado fisiológico em que o fungo se encontra e a quantidade de microrganismos presentes (Brumano *et. al.*, 1993). Geralmente, observa-se um tempo ótimo de cultivo específico para cada microrganismo, no qual se obtém maior produção de enzimas. Após este intervalo de tempo, nota-se uma estabilização ou diminuição na atividade enzimática. Este declínio pode estar relacionado ao consumo de algum composto essencial, aparecimento de um metabólito inibidor ou á própria desnaturação das enzimas já sintetizadas (Barnby; Morpeth; Pyle, 1990).

### **6.2.5 Concentração inicial de inóculo**

A concentração inicial de inóculo é considerada um importante fator biológico, que determina a biomassa produzida pela fermentação (Sandhya *et. al.*, 2005). Uyar & Baysal (2003), avaliaram a importância do fator concentração de inóculo na produção de protease alcalina por *Bacillus* sp. concluíram que o aumento do nível de inóculo, variando entre 10 e 35%, diminuiu a produção de enzimas, devido à exaustão dos nutrientes presentes no meio fermentativo. A concentração de inóculo adequada em relação à quantidade de substrato utilizado se faz necessária, para garantir a total fermentação do meio e, sem esgotar precocemente as fontes de nutrientes necessárias para o desenvolvimento microbiano.

## 7. Referencias Bibliográficas

ARANTES V, SADDLER J N; **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** Biotechnology for Biofuels. Disponível em <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4>. Acesso em Março de 2013.

BALAT M, BALAT H, OZ C; **Progress in bioethanol processing.** Progress of Energy Combined Science, v. 34, p. 551-573, 2008.

BANSAL P, HALL M, REALFF M J, LEE J H, BOMMARIUS A S; **Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates.** Biotechnology Advances, v.27, p.833–848, 2009.

BASNBY F M, MORPETH F F, PYLE D L, **Endopolygalacturonase production from Kluyveromyces marxianus, I., resolution, purification and partial characterization of the enzyme.** Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 12, n. 11, p 891-897, 1990.

BAUDEL H M; **Pré-tratamento e hidrólise.** III Workshop tecnológico sobre Hidrólise para a produção de etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol, São Paulo, 2006.

BÉGUIN P, AUBERT J-P; **The biological degradation of cellulose.** Microbiology Reviews Vol. 13, p. 25-58. 1994.

BESLE J M A, CORNU, JOUANY J P; **Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion.** J. Sci. Food. Agricul., 64: p. 171-190, 1994.

BIANCHI V L D, MORAES I O, CAPALBO D M F; **Fermentação em estado sólido, Biotecnologia Industrial** – Engenharia Bioquímica, 1ª edição, Ed. Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 247-276, 2001.

BON E P S, FERRARA M A, CORVO M L; **Enzimas em biotecnologia – produção,**

**aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 506, 2008.

BRUMANO M H N; **Production of pectin lyase by penicillium griseorosum as a function of de inoculum and culture conditions.** Microbiology Biotechnology, Oxford, v. 9, n. 2, p. 225-228, 1993.

CARVALHO S M S; Análises das Enzimas Amiolíticas Produzidas por Microrganismos Isolados do Tarubá. UFAM, Dissertação em Ciência de Alimentos. Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, 1990.

CASTILHO L R, POLATO C M S, BARUQUE E A, JR G L S; **Economic analysis of lipase production by Penicillium restrictumin solid-state and submerged fermentations.** Biochemical Engineering Journal, v.4, p.239-247, 2000.

CONNEY C L; **Growth of Microorganism.** In Byotecnology, I, Microbial Fundamentals, H. J. Rehm e G Red, Florida. V. 2, p. 73-112, 1981.

D'ALMEIDA M L O; **Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica.** Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT-, 2º Edição, v. 1, Capítulo III, p. 45-106, 1988.

DAVIES G, HENRISSAT B; **Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.** p. 853-859, 1995.

DILLON, A.J.P., Celulases, In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. Editora Legis Summa, p. 243-249, 2004.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE **Balanco energético nacional**, Ano base 2012, p. 14-15. 2013.

Empresa de Pesquisa Energética – EPE. **Balanco Energético Nacional**, Brasília, 2011.

FAN L T, GHARPURAY M M, LEE Y H; **Cellulose hydrolysis**. Springer -Verlag. New York, v. 3, 1987.

FENGEL D, WEGENER G; **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 613, 1989.

GALBE M, ZACCHI, G; **A review of the production of ethanol from softwood**. Applied Microbiology Biotechnology. p. 618-628, 2002.

GALEMBECK F, BARBOSA C A S, SOUSA R A; **Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química**. Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 571-581, 2009.

GERMANO S; **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e purificação de proteases de Penicillium sp, por fermentação no estado sólido**. Tese de Doutorado. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

GERVAIS P, MOLIN P; **The role of water in solid-state fermentation**. Biochem. Eng. J., v. 13, p. 85-101, 2003.

GUIMARÃES B G, SOUCHON H, LYTLE B L, WU J H D, ALZARI P M; **The structure and catalytic mechanism of cellobiohydrolases CelS, the major enzymatic component of the Clostridium thermocellum cellulosome**. Journal of Molecular Biology.230, 587 –596, 2002.

HASAN S D M; **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de Drechslera (Helminthosporium) monóceras obtida por fermentação em estado sólido**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

HÖLKER U, HÖFER M, LENZ J; **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.64, Issue 2, p.175-186, 2004.



JUHA'SZ T, SZENGYEL Z, RE'CZEY, SIIKA-AHO M, VIKARI L; **Characterization of cellulases and hemicellulases produce by Trichoderma reesei on various carbon sources.** Process Biochemistry, Londres, v.40, p.3519-3525,2005.

KANG S W, PARK Y S, LEE J S, HONG S I, KIM S W; **Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology. Vol. 91, p.153-156, 2004.

KOOTSTRA A M J, BEEFTINK H H, SCOTT E L, SANDERS J P M; **Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. Biotechnology for Biofuels,** v. 2, n. 31, 2009. Disponível em [www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1](http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1). Acesso em março de 2013.

LACAZ C S; **Micologia médica.** 7 Edição, São Paulo, p.557- 568, 1992.

LEKHA P K, LONSANE B K; **Comparative titers, location and properties of tanninacyl-hydrolase produced by Aspergillus niger PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations.** Proc Biochem. v.29 p.497–503, 1994.

LIMA U A, AQUARONE E, BORZANI W, SCHMIDELL W; **Biotecnologia industrial – vol.3.** São Paulo, 2001.

LYND L R, WEIMER P J, ZYL W H, PRETORIUS I S; **Microbial Cellulose Utilization. Fundamentals and Biotechnology.** Microbiology And Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 506–577. 2002.

MACIEL G M; **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Dissertação (Mestrado). Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MARTINS, L F; **Caracterização do complexo celulásico de Penicillium echinulatum.** Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Paraná, p 121, 2005.



MAY A, FILHO M R A, RODRIGUES J A S, LANDAU E C, PARRELA R A C, MASSAFERA R; **Cultivares de sorgo para o mercado brasileiro na safra 2011/2012**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. P. 20-21. 2011.

MENEZES T J B; **Os fungos na indústria. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., **Solid-state fermentation bioreactors**. Springer-Verlag, Berlin, 2006.

MUÑOZ I G, UBHAYASEKERA W, HENRIKSSON H, SZABO I, PETTERSSON G, JOHANSSON G, MOWBRAY S L, STAHLBERG J; **Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporim*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lysozymes**. Journal of Molecular Biology, v. 314, p. 1097–1111, 2001

MURPHY J D, MCCARTHY K; **Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland**. Applied Energy, 2005.

OLIVEIRA M, VASCONCELOS Y; **Revolução no canavial: novas usinas, variedades mais produtivas e pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool**. Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo, n. 122, 2006.

PALMA M B, PINTO A L, GOMBERT A K, SEITZ K H, KIVATINITZ S C, CASTILHO L R, FREIRE D M G; **Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate**. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 84-86, p.1137-1145, 2000.

PALMQVIST E, HAHN-HARGERDAL B; **Fermentation of lignocellulose hydrolysates, inhibition and mechanism of inhibition**. Bioresource Technology, v.74, p.25-33, 2000.

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



PANDEY A, SOCCOL C R; **Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. Londres, Asiatec Publishers, p. 221, 2001.

PARIS L D; **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólidos das sojas orgânica, transgênicas e convencional**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Departamento de Engenharia Química, Paraná, 2008.

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

RABELO S C; **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SANDHYA C, SUMANTHA A, SZAKACS G, PANDEY A; **Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation**. Process Biochemistry, v.40, p.2689–2694, 2005.

SANTOS C P; REIS L N; MOREIRA J E B; BRASILEIRO L B; **Papel como se Fabrica**. Química Nova Na Escola, N° 14, Novembro 2001.

SATO K, SUDO S; **Small scale solid state fermentations**. In: **Manual os industrial Microbiology and Biotechnology**, 2nd Edn; Demain, A. L, Davies. J. E., Eds.: ASM Press: Washington, DC,p. 61-79,1999.

SCHMIDELL W, FACCIOTTI M C R; **Biorreatores e processos fermentativos**. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnology Industrial V. 2: Engenharia Bioquímica**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo,. p.179-192, 2001.

SENDELIUS J; **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production**. Master of Science - Department of Chemical Engineering, Lund University. 2005.

SINGHANIA R, PATEL A K, SOCCOL C R, PANDEY A; **Recent advances in solid-state fermentation**. Biochemical Engineering Journal., v. 44, p. 13–18, 2009.

SOUZA L G A; **Redes de inovação de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. p. 27, 2013.

SUKUMARAN R K, SINGHANIA R R, PANDEY A, **Microbial cellulases Production, applications and challenges**. Journal of Scientific & Industrial Research. Vol. 64, p. 832-844. 2005.

SUN Y, CHENG J; **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production**. Bioresource Technology, v. 83, n. 1, p. 1-11. 2002.

SUN Y, CHENG J J; **Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production**. Bioresource Technology, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

TOLAN J S; **Clean Technol. Environ**. 2003.

TOMME P, WARREN R A, GILKES N R. **Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi**. Adv. Microb. Physiol. 37: 1-81, 1995.

UYAR F, BAYSAL Z; **Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated Bacillus sp. under solid state fermentation**. Process Biochemistry, v.39, p.1893-1898, 2003.

VÁSQUEZ M P, DA SILVA J N C, DE SOUZA M B, PEREIRA N; **Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 137-140, 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ G, FAVELA-TORRES E, AGUILAR C N, RÓMERO-GOMEZ S J, DÍAZ-GODÍNEZ G, AUGUR C; **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems.** Biochemical Engineering Journal v.13 p.157–67, 2003.

ZADRAZIL F, PUNIYA A; **Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi.** Bioresource Technology, v. 54, n. 1, p. 85-87, 1995.

ZHANG Y H P, LYND L R; **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** Biotechnology and Bioengineering, v.88, p.797-824, 2006.

## **Capitulo II**

### **PRODUÇÃO DE CELULASES ATRAVES DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO COMO SUBSTRATO SORGO LIGNOCELULOSICO**

World Journal of Microbiology and Biotechnology

**Produção de celulasas através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato sorgo lignocelulósico.**

Franciane Maria Mantovani Santin<sup>1</sup> Emerson Adriano Guarda<sup>2</sup>,

1. *Engenheira Agrônoma. Mestranda em Agroenergia. Laboratório Microbiologia Ambiental e Biotecnologia - Universidade Federal do Tocantins. E-mail: franciane.agro@gmail.com;*

2. *Químico. Doutor em Química Orgânica. Laboratório de Química - Universidade Federal do Tocantins. E-mail: emersonprof@uft.edu.br;.*

*Endereço: Universidade Federal do Tocantins - UFT, Avenida NS 15, ALCNO 14, 109 NORTE s/n. Área experimental. Bloco de Agroenergia. Laboratório de Biotecnologia. Palmas-TO. CEP 77001-090.*

Fone: (63) 3232-8007.

Fax: (63) 3232-8058.

E-mail: franciane.agro@gmail.com

## Resumo

Realizou-se o cultivo em estado sólido do fungo filamentosso isolado do ninho de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex balzani*, utilizando como substrato sorgo lignocelulosico visando à máxima produção de celulasas, através da avaliação do processo de cultivo, avaliando a influência das variáveis: concentração inicial de inóculo, umidade, tempo, pH e temperatura. Os efeitos das variáveis foram primeiramente avaliados em termos da atividade da enzima FPase, onde a umidade e o tempo mostraram-se estatisticamente significativos a 95%. Em condições de maior tempo e umidade a atividade enzimática diminuí mostrando um efeito negativo. As demais variáveis não apresentaram efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança. As maiores atividades enzimáticas foram proporcionadas pela combinação das variáveis do ensaio 2 que apresenta umidade 60%, pH 4, tempo de incubação de 4 dias, concentração inicial de inóculo de  $10^8$  e temperatura de 40°C. As variáveis significativas foram subsequentemente otimizadas. Na segunda parte do experimento a atividade da enzima FPase apresentou melhor resposta com o teor de umidade de 60 e 75%, e o tempo de incubação 4 a 6 dias, com produtividade máxima de 4,1 UI/g. A atividade CMCase apresentou máxima atividade em torno de 55 e 65% de umidade e com o tempo de incubação de 5 a 8 dias, alcançando uma atividade enzimática de 4,1 UI/g. Já para atividade Avicelase a maior produção foi com o teor de umidade em torno de 65 e 80% e com o tempo de incubação de 2 a 5 dias, alcançando uma atividade enzimática de 3,8 U/g. As atividades apresentadas demonstram expressiva capacidade celulolítica do fungo estudado frente ao sorgo lignocelulósico.

Palavras chave: Celulasas; Atividade Enzimática; Sorgo lignocelulósico

## INTRODUÇÃO

A necessidade de aumentar a produção e a capacidade produtiva de etanol impulsionam as pesquisas, a busca de matéria prima alternativa e o aperfeiçoamento do processo produtivo. Para atender esta demanda, a produção de etanol de segunda geração a partir de matérias primas lignocelulósicas tem chamado atenção por vários motivos. Um deles é a grande disponibilidade de matéria-prima, dentre as quais podemos destacar o sorgo lignoceluloso, que vem apresentando alto potencial de produção de matéria seca, sendo uma cultura versátil, adaptando-se facilmente a diferentes sistemas de produção e condições climáticas.

O processo de produção do etanol lignoceluloso envolve diversas etapas, tais como, pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica. A hidrólise enzimática é uma rota tecnológica promissora para a bioconversão lignocelulósica, no entanto, atualmente é limitada pelo alto custo das celulasas, enzimas usadas na hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis (Siqueira *et. al.*, 2010).

Este problema pode ser reduzido através do melhoramento genético dos microrganismos e do uso de matéria prima específica, com consequente aumento da produtividade enzimática (Singh *et. al.*, 2009; Castro *et. al.*, 2010). Além disso, o uso de técnicas alternativas no processo, como a Fermentação em Estado Sólido (FES), tem sido bastante debatido, visando aumentar a produtividade enzimática e reduzir os custos de produção (Singhania *et al.*, 2010; Siqueira *et. al.*, 2010).

No método da FES o crescimento de microrganismos ocorre na ausência de água livre (Rahardjo *et. al.*, 2006). Esse sistema simula o hábitat natural de microrganismos (Hölker *et. al.*, 2004), proporcionando maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações do meio de cultivo (Singhania *et. al.*, 2010).

A produtividade enzimática na FES é definida pelo microrganismo e pelas condições de cultivo. Os fungos filamentosos são bons produtores de celulasas o que representa uma vantagem no processo de sacarificação da biomassa (Singh *et. al.*, 2009; Castro *et. al.*, 2010). Parâmetros como temperatura, concentração inicial de inóculo, tempo, pH e umidade representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação.

Baseado neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a possibilidade de aproveitamento do sorgo lignocelulósico através do processo de fermentação em estado sólido, utilizando uma cepa de fungo filamentoso isolado de ninhos de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) e avaliar fatores importantes deste processo fermentativo usando os delineamentos experimentais associados à metodologia de superfície de resposta.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia e no Laboratório de Pesquisa em Química, ambos da Universidade Federal do Tocantins (UFT). O fungo filamentoso utilizado neste trabalho faz parte da micoteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, isolado do ninho de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex balzani*. Tal cepa foi escolhida por ter apresentado alta capacidade celulítica em trabalho realizado anteriormente (Silva, 2011).

### Preparo do inóculo

O fungo foi repicado em placas contendo meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar), e acondicionado na incubadora por 07 dias para produção de esporos. Em seguida, determinou-se o número de esporos em



suspensão na solução, utilizando contagem em microscópio óptico com aumento de 400x e Câmara de Neubauer (Raimbault & Alazard, 1980, Hasan, 1998).

### **Preparo dos substratos**

Na realização do experimento foi utilizado o substrato composto pela planta inteira do sorgo-lignocelulósico sem a panícula. A planta foi colhida em ponto de maturação da semente, seca em temperatura ambiente e fragmentada. Em seguida, o substrato foi moído e peneirado usando peneiras de 20 mesh. Esse material foi pré-tratado usando uma solução de hidróxido de sódio 4%, em autoclave a 121 °C. Foram utilizadas as seguintes condições de reação: 100g sorgo (base seca), volume da solução conforme a relação sólido/líquido de 1:10 (m/v) com tempo de reação de 15 minutos. O sorgo obtido, foi levado a um pH de 2,0 utilizando ácido fosfórico (p.a.) por 30 min e logo neutralizado com hidróxido de sódio. O sorgo recuperado por filtração foi então seco em estufa a 65 °C até massa constante.

### **Fermentação em estado sólido (FES)**

Os ensaios de FES foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 0,5 g de sorgo, e solução de sais, que foi utilizada para o ajuste do teor de umidade e pH, de acordo com cada delineamento experimental proposto. Os frascos contendo o material preparado foram esterilizados em autoclave a 121°C, e tiveram a solução de esporos adicionada de acordo com as quantidades especificadas em cada experimento. Os frascos foram acondicionados em incubadoras estacionárias com as respectivas temperaturas, sendo o tempo de reação estimado de acordo com as condições de cada experimento.

### **Extrações das enzimas**

Após o término da fermentação, realizou-se a extração das enzimas contidas no sólido fermentado. À amostra sólida, foi adicionado 50 mL solução-tampão pH 4,8. Em seguida, os frascos contendo o sólido e a solução-tampão foram acondicionados em incubadora *shaker* (Hydrosan) por 1h, a 60°C e agitação de 150 rpm. O extrato enzimático foi obtido por processo de filtração em papel filtro. Após, armazenou-se o extrato em frascos plásticos a -20 °C para posterior análise das atividades enzimáticas.

### **Determinação da atividade de enzimas celulolíticas**

Para todas as atividades enzimáticas, celulase total (FPAse), endoglucanase (CMCase) e Avicelase conduziram-se controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima) e do substrato (branco da reação), separadamente, nos valores de absorbância obtidos. Os valores das absorbâncias a (540nm) foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose, mediante curva padrão previamente estabelecida (Ghose 1987). Para conversão dos valores de quantidade equivalente de glicose em valores de atividade enzimática, considerou-se que 1 Unidade Internacional (UI) equivale a 1 µmol de glicose liberada por minuto.

### **Determinação da atividade de FPAase**

Para esta análise foi utilizado procedimento recomendado por Ghose (1987), utilizando como substrato papel de filtro cortado em tiras de 1x6 cm (correspondendo à aproximadamente 50 mg). Aos tubos com capacidade de 25 mL foram adicionados, além do papel filtro, 1 mL de tampão citrato 0,05M (pH=4,8) e 0,5mL do

extrato enzimático. A reação enzimática foi mantida por 30 minutos em banho térmico a 50°C. O processo foi

interrompido pela imersão dos tubos em banho de gelo. Ao meio reacional foram adicionados 2 ml de DNS e a mistura fervida por 5 minutos. Foram acrescentados 10 mL de água destilada e as absorbâncias avaliadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540nm (Miller 1959).

#### **Determinação da atividade de CMCase**

Em tubos com capacidade de 25 mL, foram incubados 0,5 mL de uma solução de CMC a 2% em tampão citrato com 0,5 mL do extrato enzimático. Após a reação enzimática de hidrólise (a 50°C por 30 minutos), o processo foi interrompido em banho de gelo. Ao tubo foram acrescentados 2 ml de DNS e a mistura foi fervida por 5 minutos, após fervura foram somados ao tubo mais 10 mL de água destilada. As absorbâncias foram avaliadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540nm (Miller 1959).

#### **Determinação da atividade de Avicelase**

Foram adicionados, em tubos de 25 mL, 0,5 mL do extrato enzimático bruto mais 1 mL da solução de 1% de Celulose Microcristalina (Avicel) em tampão citrato 0,05M, pH 4,8, a mistura incubada a 50°C, por 30 minutos. O processo foi interrompido em banho de gelo. Ao tubo foram acrescentados 2 ml de DNS e a mistura foi fervida por 5 minutos, após fervura foram somados ao tubo mais 10 mL de água destilada. As absorbâncias foram avaliadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro a 540nm (Miller 1959).

#### **Planejamento experimental – Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>5-1</sup> e análise estatística dos dados**

Em uma primeira etapa, foi feito um planejamento fatorial fracionado com 19 ensaios, 3 repetições no ponto central, para verificação das variáveis mais significativas para o processo. Na sequência, empregou-se um planejamento com 11 ensaios, também com três repetições no ponto central. O planejamento experimental realizado neste trabalho teve por objetivo definir as melhores condições de operação para as cinco variáveis de interesse a partir de faixas pré-definidas com base em estudos já realizados (Silva, 2011), visando maximizar a produção de enzimas celulolíticas e, conseqüentemente, detecção de maiores níveis de atividade FPase, CMCCase e B-glicosidase para o complexo produzido.

O modelo matemático utilizado foi à regressão linear múltipla. A determinação dos efeitos das variáveis sobre os resultados foram obtidos pelo software STATISTICA (versão 8.0, da StatSoft, Inc).

## **RESULTADOS & DISCUSSÃO**

#### **Planejamento Fatorial Fracionado 2<sup>5-1</sup>**

Através desse planejamento inicial foi possível identificar algumas variáveis significativas que foram subsequentemente otimizadas utilizando um delineamento composto central rotacional. Os valores codificados empregados no fatorial 2<sup>5-1</sup> e os resultados obtidos para atividades de FPase, CMCCase e Avicelase, são apresentados na tabela 01.

Constatou-se que durante o processo fermentativo, as maiores atividades enzimáticas foram proporcionadas pela combinação das variáveis do ensaio 2 que apresenta umidade 60%, pH 4, tempo de incubação de 4 dias, concentração inicial de inoculo de 10<sup>6</sup> e temperatura de 40°C (tabela 01).

Pode ser observado ainda que as combinações de maior umidade (80%) e tempo (12 dias) provocam a redução da atividade enzimática, fato que, pode estar relacionado com a inibição do fungo marcado pela extrapolção do nível de água e do tempo ideal para o desenvolvimento da linhagem. O nível de umidade



adequado na fermentação em estado sólido é variável e dependente da natureza do material, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (Pandey *et al.*, 2000; Hölker *et al.*, 2004).

A redução ou a estabilidade da atividade enzimática em função do aumento do tempo de fermentação pode ser possivelmente atribuída ao esgotamento de nutrientes, ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática ou do crescimento celular. Os produtos finais de uma dada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *feedback* negativo ou auto alimentação (Whitaker, 1994).

Biazus *et al.*, (2006), trabalhando com malte de milho, observaram que a produção de enzima, a princípio, é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo. A partir daí, a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas seja inibida e sua atividade reduza a um valor constante, resultados semelhantes podem ser observados neste trabalho (tabela 1). Assim, o tempo de incubação ótimo para a produção máxima da enzima depende do tipo de material, a taxa de crescimento do microrganismo em particular, fonte de carbono e o seu padrão de produção de enzima.

Um aumento no número de esporos do inóculo tem a pretensão de assegurar a rápida proliferação do microrganismo, mas também pode aumentar o teor de umidade e levar a uma diminuição no crescimento e produção de enzima, sendo que um menor tamanho de inóculo pode exigir mais tempo para a fermentação de modo a formar o produto desejado (Baysol *et al.*, 2003). Estudo realizado por Grover *et al.*, (2013) mostrou que a concentração de inóculo de  $1 \times 10^7$  esporos / mL, foi ótima para a atividade enzimática. Resultados semelhantes foram relatados por Murthy *et al.*, (2009) onde a máxima atividade de alfa-amilase foi obtido usando como substrato polpa de café com uma suspensão de  $1 \times 10^7$  esporos / ml.

A temperatura de incubação tem um papel importante nas atividades metabólicas de um microrganismo. Asquiere e Park (1992) constataram que a temperatura ideal para a produção de CMCase por *Aspergillus sp.* foi de 37°C, enquanto que a produção máxima de celulase foi observado a 40 °C por *Aspergillus terreus* QTC 828 (Ali *et al.*, 1991). Em geral, a temperatura depende da cinética de crescimento do microrganismo utilizado (Lonsane *et al.*, 1985).

Em estudo feito por Grover *et al.*, (2013), o pH ótimo para a atividade celulolítica foi de 5,5 e a sua atividade reduzida para 50% quando o pH foi aumentado de 5,5 a 6,0. Variação do pH a partir do ideal para níveis extremos resulta em inativação das enzimas dos organismos que impedem a sacarificação do substrato.

Resultados semelhantes foram relatados por Silva *et al.*, (2005) onde o pH ótimo para a produção de CMCase foi de 5,5 e a sua atividade caiu para 50% quando o pH foi aumentado para 6,5. Gomes *et al.*, (1994), também relataram que o pH ideal para a produção de CMCase bruto foi de 5,5. De acordo com estudo realizado por Moreira *et al.*, (1999), as atividades enzimáticas ótimas foram encontradas em valores de pH entre 4,5 e 6,0 e foram estáveis abaixo da faixa de pH 4,0 e acima de 7,0.

Ensaio	Temperatura °C	Umidade %	pH	Tempo dias	C.inóculo esporos / mL	FPase (UI/g)	CMCase (UI/g)	Avicelase (UI/g)
1	-1 (30)	-1 (60)	-1 (4)	-1 (4)	+ 1 (10 <sup>8</sup> )	2,5	4,5	4,8
2	1 (40)	-1 (60)	-1 (4)	-1 (4)	-1 (10 <sup>6</sup> )	4,2	9,2	8,4
3	-1 (30)	+1 (80)	-1 (4)	-1 (4)	-1 (10 <sup>8</sup> )	2,5	5,3	4,5
4	+1 (40)	+1 (80)	-1 (4)	-1 (4)	+ 1 (10 <sup>6</sup> )	3,1	5,3	4,6
5	-1 (30)	-1 (60)	+1 (8)	-1 (4)	-1 (10 <sup>6</sup> )	2,8	4,4	6,4
6	+1 (40)	-1 (60)	+1 (8)	-1 (4)	+1 (10 <sup>8</sup> )	3,3	4,1	3,7
7	-1 (30)	+1 (80)	+1 (8)	-1 (4)	+1 (10 <sup>8</sup> )	2,9	4,6	2,2
8	+1 (40)	+1 (80)	+1 (8)	-1 (4)	-1 (10 <sup>6</sup> )	2,3	5,4	4,5
9	-1 (30)	-1 (60)	-1 (4)	+1(12)	-1 (10 <sup>6</sup> )	2,4	4,0	4,7
10	+1 (40)	-1 (60)	-1 (4)	+1(12)	+1 (10 <sup>8</sup> )	3,5	5,4	4,2
11	-1 (30)	+1 (80)	-1 (4)	+1(12)	+1 (10 <sup>8</sup> )	2,3	3,2	2,7
12	+1 (40)	+1 (80)	-1 (4)	+1(12)	-1 (10 <sup>6</sup> )	2,3	3,0	2,2
13	-1 (30)	-1 (60)	+1 (8)	+1(12)	+1 (10 <sup>8</sup> )	3,1	2,3	2,8
14	+1 (40)	-1 (60)	+1 (8)	+1(12)	-1 (10 <sup>6</sup> )	2,5	4,6	5,6
15	-1 (30)	+1 (80)	+1 (8)	+1(12)	-1 (10 <sup>6</sup> )	2,3	4,2	3,4
16	+1 (40)	+1 (80)	+1 (8)	+1(12)	+1 (10 <sup>8</sup> )	2,2	3,1	6,5
17	0 (35)	0 (70)	0 (6)	0 (8)	0 (10 <sup>7</sup> )	2,9	2,8	1,8
18	0 (35)	0 (70)	0 (6)	0 (8)	0 (10 <sup>7</sup> )	3,3	2,2	2,3
19	0 (35)	0 (70)	0 (6)	0 (8)	0 (10 <sup>7</sup> )	2,8	4,6	3,5

**Tabela 01.** Matriz codificada e com os valores reais do planejamento delineamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup>, com três pontos centrais.

Estudos realizados com diferentes linhagens fúngicas apresentam variação nos valores de atividade enzimática devido a algumas características do próprio fungo filamentososo ou bem como características do processo de FES. A tabela 02 compara dados de produção da FPase e CMCase, por processo de FES por fungos filamentosos. Os valores para algumas linhagens modificadas foram superiores aos encontrados no presente estudo. Para as linhagens não modificadas geneticamente, como é caso da utilizada no presente trabalho, os valores encontrados na literatura foram semelhantes ou inferiores, mostrando boa capacidade celulolítica do fungo estudado neste trabalho.



<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
<i>T. reesei</i> LM-UC4	Bagaço de cana	CMCase: 18,8 UI/g	Correia <i>et. al.</i> , (1998)
<i>T. sp</i> 32942	Farelo de trigo e casca de arroz	CMCase: 13,9 UI/g	Zhao <i>et al.</i> , (2010)
<b>Fungo filamentoso</b>	<b>Sorgo lignocelulosico</b>	<b>CMCase 9,2 UI/g</b>	<b>Presente Estudo</b>
<b>Fungo filamentoso</b>	<b>Sorgo lignocelulosico</b>	<b>Avicelase 8,4 UI/g</b>	<b>Presente Estudo</b>
<i>T. reesei</i> QM 9414	Bagaço de cana	CMCase 5,4 UI/g	Basso <i>et. al.</i> , (2010)
<b>Fungo filamentoso</b>	<b>Sorgo lignocelulosico</b>	<b>FPase: 4,2 UI/g</b>	<b>Presente Estudo</b>
<i>A. niger</i>	Palha de arroz	FPase: 2,29 UI/ml	Kang <i>et. al.</i> , (2004)
<i>A. fumigatus</i>	Bagaço de cana	FPase: 0,14	Soni <i>et. al.</i> , (2010)
<i>A. niger</i>	Farelo de soja e bagaço de cana	CMCase: 2,2 UI/g	Zúñiga <i>et. al.</i> ,(2011)
<i>T. reesei</i> QM9414	Farelo De arroz	FPase: 1,2 UI/g	Latifian <i>et. al.</i> , (2007)
<i>A. fumigatus</i>	Resíduos lig. e palha de arroz	Avicelase 1,7 UI/g	Sherief <i>et. al.</i> , (2010)
<i>A. awamori</i>	Farelo de trigo	CMCase: 0,42	Gottschalk <i>et. al</i> (2010)
<i>A. niger</i> MS 82	Bagaço de cana	CMCase: 0,35	Sohail <i>et al.</i> (2009)

**Tabela 02.** Comparação nos valores de atividade enzimática de diferentes microorganismos em FES.

#### **Atividade enzimática da FPase pelo planejamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup>**

Os efeitos das variáveis independentes foram primeiramente avaliados em termos da atividade da enzima FPase. Os termos concentração inicial de inóculo, temperatura e pH, não apresentaram efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança. Já os parâmetros de umidade e tempo avaliados mostraram-se estatisticamente significativos a 95%. A melhor resposta foi apresentada no ensaio 2 com as condições de temperatura a 40°C, umidade 60%, pH 4, tempo 04 dias e concentração inicial de inóculo 10<sup>6</sup> com produtividade 4,2 UI/g. Dos resultados apresentados na Tabela 1, a atividade da enzima FPase varia de 2,2 a 4,2 UI/g, o que significa que as variações estudadas tem certa influencia na atividade enzimática.

Maurya *et. al.*, (2012) estudando o processo de otimização das condições de fermentação em estado sólido para produção de celulase com *Trichoderma reesei* obteve rendimento máximo da enzima 2,29 UI/ml com umidade de 70%. Kang *et. al.*, (2004), encontraram maior atividade celulase após 6 dias de fermentação por *A. niger* em palha de arroz. Em cultivo em estado sólido de *Fusarium solani* em diferentes substratos, como farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de grama verde, farelo de grama preta e farelo de milho, a atividade máxima da enzima foi conseguida com o período de incubação ideal de 5 dias (Bhatti *et. al.*, 2006).

A capacidade celulolítica do microorganismo estudado neste trabalho fica evidente quando comparada com outros trabalhos similares. Farzaneh *et. al.*, (2011) observaram atividades celulásicas de 0,21 UI/g após três dias de cultivo de *Acidothermus cellulolyticus*, em fermentação em estado sólido. Latifian *et. al.*, (2007), ao trabalhar com *T. reesei* QM9414, obtiveram atividade máxima de 1,2 UI/g após oito dias, com uso de farelo de arroz como substrato. Basso *et. al.*, (2010) observaram atividade de 2,3 UI/ g no 15º dia de incubação, com bagaço de cana-



de-açúcar como substrato. Singhania *et al.* (2007) ao utilizar *T. reesei* RUT C30 em farelo de trigo, obtiveram atividade de celulase total de 0,17 UI/g com 5 dias de cultivo. Valor bem superior foi encontrado no presente trabalho e com tempo de encubação relativamente menor, fato que pode estar relacionado ao substrato de sorgo lignocelulósico ou ainda a grande capacidade celulítica do microrganismo estudado.

**Variáveis      Efeito                      Erro padrão p-valor**

**Tabela 03.** Estimativa dos efeitos para a atividade FPase. Variáveis significativas a 95% de significância.

A Tabela 03 apresenta a estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos para o planejamento fatorial  $2^{5-1}$  para atividade enzimática FPase. Os parâmetros umidade, tempo e a interação entre as variáveis (em negrito) foram significativos ( $p < 0,05$ ) dentro da faixa estudada, indicando que os efeitos de um fator são modificados quando estudados nos níveis de outro fator. As variáveis atuam dependentemente uma das outras como pode ser visualizado na Tabela 3 e no gráfico de Pareto (figura 1). Observou-se no gráfico de Pareto que a umidade e o tempo apresentaram maior influência na produção de celulase total. Sendo que em condições de maior umidade e maior tempo o efeito é negativo, indicando que os melhores resultados são obtidos com os níveis mais baixos dessas variáveis.



				Lim. coef. - 95 %	Lim. coef. + 95 %
<b>Média</b>	<b>2,829803</b>	<b>0,055344</b>	<b>0,000016</b>	<b>2,653675</b>	<b>3,005931</b>
Temperatura	0,380934	0,119830	0,050134	-0,000418	0,762286
<b>Umidade</b>	<b>-0,475170</b>	<b>0,123054</b>	<b>0,030703</b>	<b>-0,866784</b>	<b>-0,083556</b>
pH	-0,130186	0,119830	0,356786	-0,511538	0,251166

<b>Tempo</b>	<b>-0,447928</b>	<b>0,122958</b>	<b>0,035668</b>	<b>-0,839235</b>	<b>-0,056621</b>
C. Inoculo	0,029306	0,116886	0,818220	-0,342677	0,401289

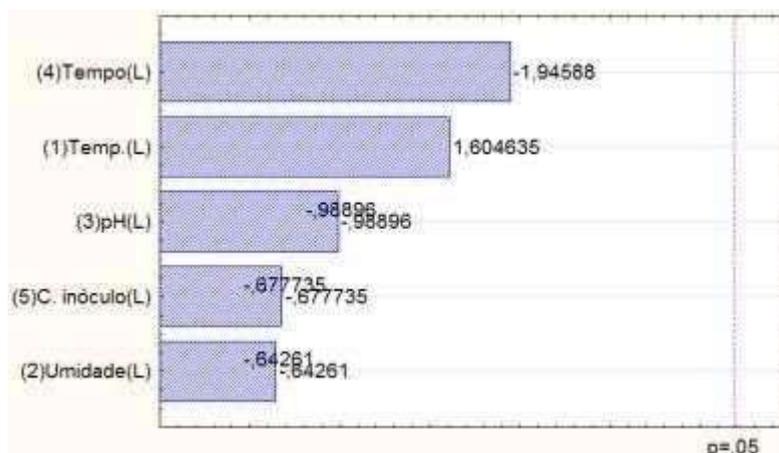
---

**Figura 01.** Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis umidade, tempo, concentração inicial de inóculo, temperatura e pH para atividade FPase.

Com esses dois fatores predominantes que afetam o processo, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para aprofundar a avaliação das variáveis significativas tempo e umidade.

### Atividade enzimática da CMCCase pelo planejamento fatorial 2<sup>5-1</sup> completo

Observou-se que os níveis estudados de pH, tempo, temperatura, concentração inicial de inóculo e umidade não apresentaram influência na produção de endoglucanases. Pode ser visualizado na Figura 2 que as variáveis estudadas neste processo não se mostraram estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança.



**Figura 02.** Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis umidade, tempo, concentração inicial de inóculo, temperatura e pH para atividade CMCCase.

A tabela 04 mostra o efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança apenas para interação entre as variáveis (em negrito), os demais parâmetros estudados não apresentaram efeito significativo na produção enzimática, indicando que os efeitos de um fator não são modificados quando estudados nos níveis de outro fator. As variáveis atuam independentemente uma das outras.

Vaiáveis	Efeito	Erro padrão	p-valor
----------	--------	-------------	---------

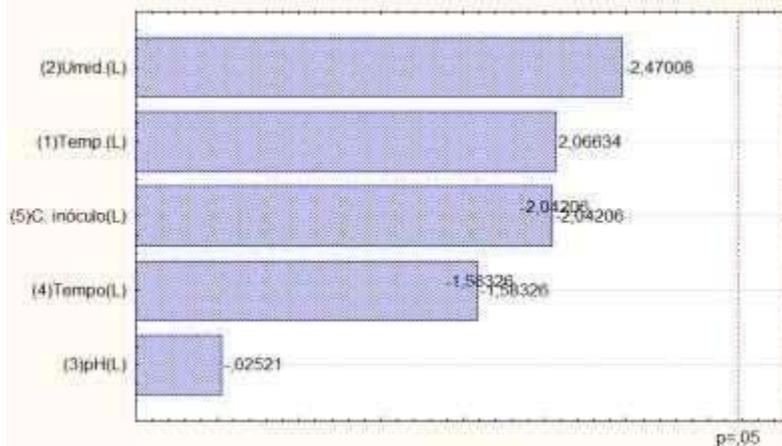
**Tabela 04.** Estimativa dos efeitos para a atividade CMCCase. Variáveis significativas a 95% de significância.

Zúñiga *et. al.*,(2011) avaliando a produção de celulasas por *Aspergillus niger* em substrato de farelo de soja e de bagaço de cana-de-açúcar atingiu atividades de endoglucanase de 2,2 UI/g. Segundo estudos realizados por Sun *et. al.*, (2010), a produção enzimática de CMCCase atingiu valores de 6,2 UI/g em 8 dias, enquanto estudos realizados por Basso *et. al.*, (2010) obtiveram 5,4 UI/g em 9 dias de processo. Nota-se, portanto, que os valores máximos obtidos da cinética de produção são valores aproximados ou superiores aos encontrados na literatura e com um tempo menor de fermentação.

### Atividade enzimática da Avicelase pelo planejamento fatorial 2<sup>5-1</sup>



A atividade Avicelase também foi bem considerável alcançando de 8,4 UI/g, no ensaio 2 e 6,5; 6,2 e 5,6 UI/g nos ensaios 16, 14 e 4 respectivamente. A tabela 4 mostra o efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança apenas para interação entre as variáveis (em negrito). Os demais parâmetros estudados, assim como para atividade da CMCase, não apresentaram efeito significativo na produção enzimática, indicando que os efeitos de um fator não são modificados quando estudados nos níveis de outro fator. As variáveis atuam independentemente uma das outras. Sherief *et. al.*, (2010) estudando *Aspergillus fumigatus*, observou máxima atividade de 1,7 UI/g e 0,93 UI/g de Avicelase. Sales *et. al.*, (2010) obteve o valor mais alto de Avicelase 0,17 UI/mL estudando *Aspergillus aculeatus*.



				Lim. coef. - 95 %	Lim. coef. + 95 %
<b>Média</b>	<b>108,3110</b>	<b>8,10751</b>	<b>0,000907</b>	<b>82,5093</b>	<b>134,1127</b>
Temperatura	28,1683	17,55435	0,206916	-27,6975	84,0341
Umidade	-11,5841	18,02672	0,566214	-68,9532	45,7849
pH	-17,3605	17,55435	0,395592	-73,2263	38,5052
Tempo	-35,0504	18,01258	0,146864	-92,3745	22,2737
C. Inoculo	-11,6049	17,12308	0,546529	-66,0982	42,8884

**Figura 03.** Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis umidade, tempo, concentração inicial de inoculo, temperatura e pH para atividade Avicelase.

A tabela 05 apresenta a estimativa dos efeitos e testes de hipóteses para os resultados obtidos para o planejamento fatorial  $2^{5-1}$  fracionado para atividade enzimática Avicelase. A partir das análises do gráfico de Pareto e dos efeitos dos níveis estudados na tabela de regressão obtidos no planejamento fatorial  $2^{5-1}$  foi possível identificar as variáveis significativas estatisticamente com p-valor menores que 5% ( $p < 0,05$ ) para as atividades FPase, CMCCase e B-glicosidase.

**Tabela 05.** Estimativa dos efeitos para a atividade Avicelase. Variáveis significativas a 95% de significância.

## Estudo da influência do tempo e da umidade na atividade celulásica

Para determinar o tempo e a umidade ótimos para a reação enzimática, bem como avaliar o efeito das variáveis e a interação entre essas na produção enzimática. Foram fixadas as variáveis que não foram significativas estatisticamente no primeiro estudo. A temperatura utilizada foi a que apresentou maior produtividade enzimática no primeiro ensaio com 40°C, concentração inicial de inoculo de  $10^6$  e o pH de acordo com a solução de sais que foi de 5,7.

Ensaio <sup>(1)</sup>	Tempo dias	Umidade %	Fpase (UI/g)	CMCase (UI/g)	Avicelase (UI/g)
1	-1 (4)	-1 (50)	1,7	1,8	2,0
2	+1 (8)	-1 (50)	1,7	2,5	2,2
3	-1 (4)	1 (70)	3,8	3,0	3,5
4	+1 (8)	1 (70)	2,3	2,5	1,4
5	-1,41 (2)	0 (60)	2,9	2,4	2,0
6	+1,41 (10)	0 (60)	1,8	2,7	2,5
7	0 (6)	-1,41 (40)	1,8	1,3	1,3
8	0 (6)	+1,41 (80)	2,7	1,5	1,3
9	0 (6)	0 (60)	4,1	3,8	3,8
10	0 (6)	0 (60)	3,4	3,6	2,5
11	0 (6)	0 (60)	3,2	3,0	2,4

**Tabela 06.** Matriz codificada e com os valores reais do planejamento delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$ , com três pontos centrais. (1) Temperatura = 40°C; pH = 5,7; concentração inicial de inoculo =  $1 \times 10^8$ .

Kathiresan & Manivannan (2006) descobriram que a temperatura ótima para a produção máxima de celulase por *Aspergillus terreus* QTC 828 foi observada a 40°C. Em geral, a temperatura mantida no sistema de FES em torno de 25 a 35°C, depende da cinética de crescimento do microorganismo, e não da enzima produzida (Lonsane *et. al.*, 1985). Santana, (2012) trabalhando com *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp* atingiram a maior produção enzimática com umidade do substrato de 65%. Shaktimay *et. al.*, 2010 afirmam que acima de 60% de capacidade de retenção de umidade houve decréscimo da atividade de *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cultivada em FES utilizando resíduo fibroso de mandioca.

Observa-se na tabela 06, a matriz do planejamento composto central rotacional  $2^2$  em termos de suas variáveis codificadas e reais, bem como os resultados de atividade enzimática. Os ensaios 3, 9 e 10, o ensaio 09 com 6 dias de fermentação e 60% de umidade alcançou os níveis máximo de FPase, CMCase e Avicelase, com 4,1, 3,8 e 3,8 UI/g respectivamente. O menor índice de FPase foi com as condições dos ensaios 1 e 2 com 4 e 8 dias de incubação e 50% de umidade, ambas com 1,7 UI/g. Já para CMCase foi o ensaio 7 com 6 dias de fermentação e umidade de 40%, atingindo apenas 1,3 UI/g. A atividade Avicelase foi menor nos níveis 7 e 8, com 6 dias de encubação e níveis de umidade de 40 e 80% respectivamente, ambas com 1,3 UI/g

## Atividade enzimática da FPase pelo delineamento composto central rotacional $2^2$

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes FPase estão apresentadas na tabela 07. Os parâmetros umidade e tempo não foram significativos estatisticamente com p-

valor menores que 5% ( $p < 0,05$ ), apenas a interação entre as variáveis foi significativa (em negrito) como podem ser visualizados na tabela 06 e no gráfico de Pareto (figura 04).

**Vaiáveis      Efeito                      Erro padrão   p-valor**

**Tabela 06.** Estimativa dos efeitos para a atividade FPase. Variáveis significativas a 95% de significância.



Vaiáveis	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p-valor	Lim. coef. - 95 %	Lim. coef. + 95 %
<b>Média</b>	<b>4,13237</b>	<b>0,255009</b>	<b>0,000511</b>	<b>3,32082</b>	<b>4,943927</b>
Temperatura	1,14092	0,552144	0,130699	-0,61625	2,898088
Umidade	-1,40054	0,567002	0,090058	-3,20499	0,403916
pH	-0,01392	0,552144	0,981471	-1,77109	1,743251
Tempo	-0,89701	0,566558	0,211522	-2,70005	0,906032
C. Inoculo	-1,09981	0,538579	0,133782	-2,81381	0,614190
<b>Média</b>	<b>3,56645</b>	<b>0,283686</b>	<b>0,006268</b>	<b>2,34585</b>	<b>4,787050</b>
(1) Tempo (L)	-0,79755	0,347965	0,148959	-2,29472	0,699618
Tempo (Q)	-1,17629	0,415213	0,105286	-2,96280	0,610229

(2) Umdade (L)	0,97031	0,347965	0,108139	-0,52686	2,467485
Umidade (Q)	-1,32054	0,415213	0,086264	-3,10705	0,465980
1L x 2L	-0,71233	0,491364	0,284187	-2,82650	1,401839

**Figura 04.** Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis umidade e tempo para atividade FPase, com  $p \leq 0,05$ .

A tabela 08 mostra a análise de variância dos fatores estudados e descreve os dados de acordo com o modelo quadrático. Assim sendo,  $F_{calc} < F_{tab}$ , logo, o modelo não é válido para prever o comportamento do processo. Entretanto as superfícies de resposta podem ser usadas no sentido de verificar os pontos de otimização do processo (Scheufele *et al.*, 2012). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi de 90,0%.

Fonte de	Soma de	Graus de	Quadrado	F-calculado	F-tabelado
----------	---------	----------	----------	-------------	------------

**Tabela 08.** Análise de variância (ANOVA) das respostas da proporção tempo e umidade para atividade FPase.

#### Atividade enzimática da CMCase pelo planejamento DCCR 2<sup>2</sup>

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes CMCase estão apresentadas na Tabela 08. Os valores destacados em negrito indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). O parâmetro umidade e a interação entre as variáveis foram significativos, como pode ser visualizado na Tabela 09 e no gráfico de Pareto (Figura 05)

A umidade apresentou efeito negativo na resposta, indicando que o aumento dessa variável pode levar ao decréscimo na produção de enzima. O fator tempo não foi estatisticamente significativo dentro da faixa estudada.

**Vaiáveis**      **Efeito**                      **Erro padrão-valor**

**Tabela 09.** Estimativa dos efeitos para a atividade CMCase. Variáveis significativas a 95% de significância.



Varição	Quadrados	Liberdade	Médio	Lim. coef. - 95 %	Lim. coef. + 95 %
Regressão	0,238491	3	0,079497	0,32926	8,33
Resíduo	0,482877	2	0,241439		
Total	7,775494	10			
<b>Média</b>	<b>3,48058</b>	<b>0,241539</b>	<b>0,004781</b>	<b>2,44132</b>	<b>4,519837</b>
(1) Tempo (L)	0,15938	0,296268	0,644453	-1,11535	1,434122
Tempo	-0,65963	0,353525	0,203050	-2,18072	0,861470

(Q)					
(2) Umidade (L)	0,36313	0,296268	0,345063	-0,91161	1,637866
<b>Umidade (Q)</b>	<b>-1,86015</b>	<b>0,353525</b>	<b>0,034273</b>	<b>-3,38125</b>	<b>-0,339057</b>
1L x 2L	-0,63061	0,418363	0,270725	-2,43068	1,169456

**Figura 05.** Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis umidade e tempo significativas com  $p \leq 0,05$ , para atividade CMCCase.

A tabela 10. mostra a análise de variância dos fatores estudados e descreve os dados de acordo com o modelo quadrático. Na análise de umidade quadrática o  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ , F para um intervalo de confiança de 95% , o modelo proposto pelo tipo de planejamento usado é válido. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi 85,0%.

**F-calculado**

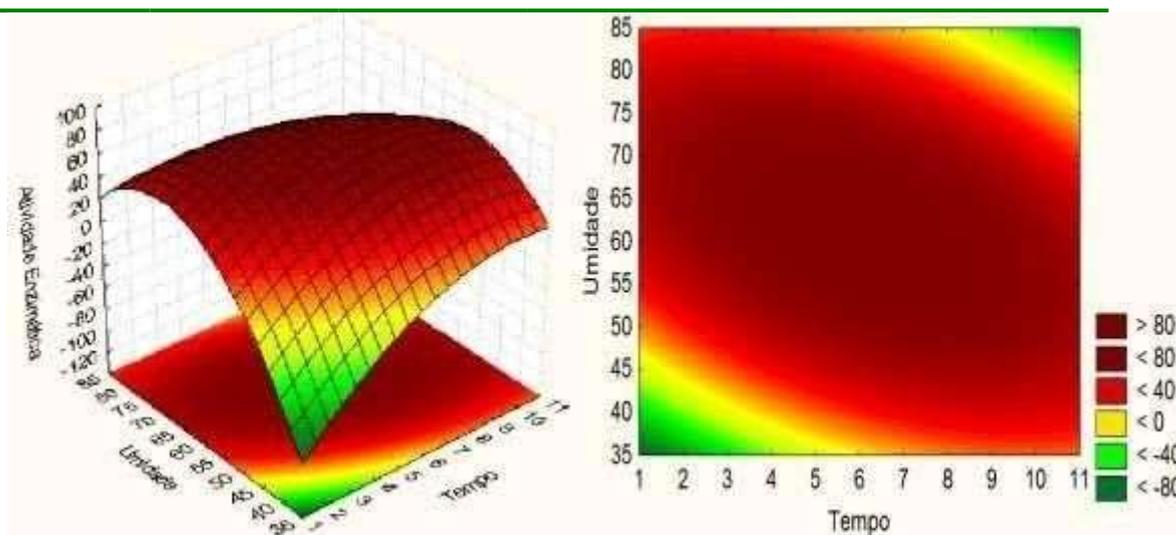
**F-tabelado**

**Tabela 10.** Análise de variância (ANOVA) das respostas da proporção tempo e umidade.  $R^2 = 85,0\%$ .

As curvas de contorno mostram que a máxima atividade CMCase está em torno de 55 e 65% de umidade e com o tempo de incubação de 5 a 8 dias, alcançando uma atividade enzimática de 4,1 UI/g. O teor de umidade também apresentou maior atividade enzimática no primeiro planejamento experimental, com produtividade de 9,2 UI/g. Para ambos os experimentos a melhor produção enzimática ocorreu quando se utilizou um teor de umidade em torno de 60%. Pode-se observar também que nos dois pontos extremos 40 e 80 % de umidade e de 2 e 10 dias de incubação a atividade enzimática foi menor 1,3 UI/g e 1,5 UI/g respectivamente.

Sherief *et. al.*, (2010) produziram celulase empregando *Aspergillus fumigatus*, cultivado em palha de arroz e farelo de trigo, observando pico de produção de celulase com 75% de umidade. Valores acima (80%) e abaixo (66%) resultaram na diminuição do nível de produção enzimática. A queda para altas umidades foi atribuída à redução da oxigenação devida à diminuição da porosidade do substrato e para baixas umidades ocorreu redução da solubilidade de nutrientes e proteínas (Gervais & Molin, 2003).

Em trabalho realizado por (Florencio C., 2011) utilizando FES com gênero *Trichoderma* em concentração do inóculo de  $10^7$ , umidade de 60%, proporção de 50% bagaço de cana-de-açúcar (BC) e 50% farelo de trigo (FT), totalizando 5g de massa seca de substrato incubadas por 10 dias a 30°C, o pico de produção foi alcançado em 8 dias, com produção 5,95 UI/g de CMCase. Em estudo realizado por Basso *et. al.*, (2010) obtiveram 5,4 UI/g em 9 dias de processo. Nota-se, portanto, que os valores máximos obtidos da cinética de produção são valores aproximados ou superiores aos encontrados na literatura.



Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
Média	246,261	3	82,087	0,76295	8,33
Umidade (Q)	4,845767	1	4,845767	27,68579	18,51

Resíduo	215,183	2	107,591
Total	4021,764	10	

---

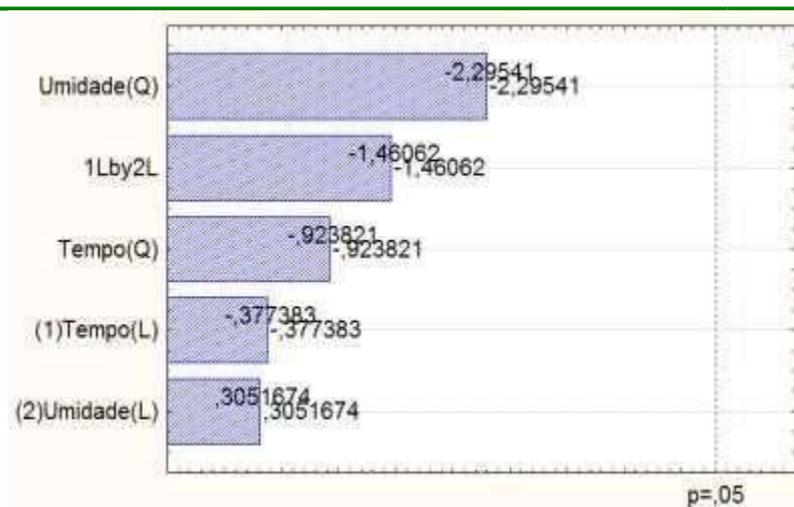
**Figura 06.** Gráficos de contorno mostrando as regiões ótimas para umidade e tempo.

### Atividade enzimática da Avicelase planejamento DCCR 2<sup>2</sup>

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis para o planejamento, referentes Avicelase estão apresentadas na tabela 11. Os níveis avaliados não foram significativos ao nível de 95%, apenas a interação entre as variáveis apresentou-se significativa (em negrito) observados na tabela 10 e no gráfico de Pareto (figura 08).

**Vaiáveis      Efeito                      Erro padrão-valor**

**Tabela 11.** Estimativa dos efeitos para a atividade Avicelase. Variáveis significativas a 95% de significância ( $p < 0,05$ ).



				Lim. coef. - 95 %	Lim. coef. + 95 %
<b>Média</b>	<b>2,87350</b>	<b>0,392058</b>	<b>0,018111</b>	<b>1,18661</b>	<b>4,560389</b>
(1) Tempo (L)	-0,16652	0,441246	0,742172	-2,06505	1,732011
Tempo (Q)	-0,32141	0,347917	0,453106	-1,81838	1,175552
(2) Umdade (L)	0,13465	0,441246	0,789069	-1,76388	2,033184
Umidade (Q)	-0,79861	0,347917	0,148615	-2,29558	0,698353
1L x 2L	-1,11629	0,764261	0,281573	-4,40464	2,172058

**Figura 07.** Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis umidade e tempo significativas com  $p \leq 0,05$  para atividade Avicelase.

A Tabela 12. mostra a análise de variância dos fatores estudados e descreve os dados de acordo com o modelo quadrático. Assim sendo,  $F_{calc} < F_{tab}$ , logo, o modelo não é valido para predizer o comportamento do processo. Entretanto as superfícies de resposta podem ser usadas no sentido de verificar os pontos de otimização do processo (Scheufele *et al.*, 2012). O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi de 67,0%, valor considerado baixo explicado pela elevada heterogeneidade dos resultados.

Apenas a variável umidade foi significativa, interferindo negativamente atividade de CMCase, as demais variáveis estudadas não influenciaram nas atividades enzimáticas. Observou-se que o teor de umidade reflete em uma melhor utilização do substrato pelo microrganismo e a eficiência ou a quantidade depende das características do substrato.

**Tabela 12.** Análise de variância (ANOVA) das respostas da proporção tempo e umidade.  $R^2 = 67,0\%$ .

Thanapimmetha *et. al.*, (2011) obtiveram os melhores resultados com *T. harzianum* em substrato de sorgo com teor de umidade inicial de 77,5%. Em trabalho realizado por Santos *et. al.*, (2012) com substrato de farelo de cacau o teor de água de 50% foi à ideal para a obtenção das enzimas estudadas. Paris *et. al.*, (2012) estudando a produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido obteve os melhores resultados também com umidade de 50%. A umidade considerada significativa para a maior produção enzimática foi de 65%, devido a maior afinidade dos fungos filamentosos por baixos valores de umidade (Santana, 2012). Almeida, (2012) estudando a indução de celulasas e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* a partir de substratos lignocelulósicos, a melhor umidade, dentre as testadas, para o crescimento do fungo e expressão das celulasas foi de 70 %, já Florencio (2011) trabalhando com isolados de *Trichoderma* spp observou-se que a produção de CMCase foi melhor para umidade inicial do substrato em 80%.

Houve um decréscimo da atividade enzimática na segunda parte do experimento. Esta é uma situação realmente isolada, indicando um possível problema experimental, que pode ter sido causado pela heterogeneidade do substrato ou pelo próprio desempenho do microrganismo, pois outros trabalhos encontrados na literatura demonstraram resultados positivos de aumento da enzima quando realizado este procedimento experimental.

Contudo, os resultados indicaram a potencialidade do emprego de sorgo lignocelulosico na indução da produção enzimática, com valores de atividades que equivalem ou superam muitos trabalhos realizados. Dentro dos limites das variáveis estudadas pode se concluir que a concentração inicial de inoculo, pH e temperatura não influenciaram ao nível de 95% de significância no desempenho do microrganismo, e que a máxima atividade enzimática pode ser alcançada com teor de umidade de 65%, com período de fermentação de 5 dias. Observa-se também que o microrganismo estudado apresenta potencial na produção de enzimas celulolíticas e que estudos futuros poderão possibilitar o aproveitamento deste potencial na indústria bioenergética.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali S, Sayed A, Sarker RI, (1991) Alam R Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. World J. Microbiol. Biotechnol, v. 7, p. 62-661.
- Asquiere ER, Park YK (1992) Production and characterization of extracellular cellulases from a thermostable *Aspergillus* sp. Rev. Microbiol 23.
- Basso T P, Gallo C R, Basso L C (2010) Atividade celulolíticas de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289.
- Baysol Z, Uyar F, Aytakin C (2003) Solid state fermentation for production of alpha amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot spring water. Process Biochem v. 38.
- Bhatti HN, Rashid MH, Nawaz R, Ashger M, Parveen R, Jabbar A (2006) Optimization of media for enhanced glucoamylase production in solid state fermentation by *Fusarium solani*. Food Technol Biotechnol v. 45.
- Biazus JPM, Souza RR, Santana JCC, Tambourgi EB (2006) Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.26, n.4, p.787-792.
- Castro AM, Pereira Júnior N (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, v.33, p.181-188.
- Farzaneh R, Lawrence J, Hiroyuki K, Amitha R, Jean V (2011) Selection of conditions for cellulase and xylanase extraction from switchgrass colonized by *Acidothermus cellulolyticus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.164, p.793-803.
- Florencio C (2011) Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos.
- Galbe M, Zacchi G (2002) A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology Biotechnology. p. 618-628.
- Gervais P, Molin P, (2003) The role of water in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. v. 13, n. 1, p. 85-1.
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, v.59, p.257-268.
- Gomes DJ, Gomes J, Steiner W (1994) Production of highly thermostable xylanase by wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. J Biotechnol v. 37.
- Gottschalk LMF, Oliveira RA, Bom EPS (2010) Cellulases, xylanases, -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. Biochemistry Engineering Journal.
- Grover A, Maninder A, Sarao LK (2013) Production of fungal amylase and cellulase enzymes via solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*. International Journal of Advancements in Research & Technology, v. 2.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, v.64, p.175-186.
- Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI, Kim SW (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 91, p. 153-156.
- Kathiresan K, Manivannan S (2006) Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove rhizosphere soil. Res. J. Microbiol.,
- Khan MH, Ali S, Fakhru'l-Razi A, Alam Z (2007) Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulose enzyme. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v.42, p.381-386.

Latifian M, Hamidi-Esfahini Z, Barzegar M (2007) Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 98, 3634–3637.

Lonsane BK, Ghidyal NP, Budiartman S, Ramakrishna SV (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, p. 258-265.

Lynd L, Weimer PZW, Pretorius I (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 506–577.

Maurya DP, Singh D, Pratap D, Maurya JP (2012) Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Journal of Environmental Biology*, v. 33, p. 5-8.

Miller G L (1959) Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428.

Monte JR, Brienzo M, Milagres AM (2011) Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. Department of Biotechnology, School of Engineering of Lorena, University of São Paulo – USP Applied Energy 88.

Moreira FG, Lima FA, Pedrinho SRF (1999) Production of amylases by *Aspergillus tamari*. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, v.30, n.2 .

Murthy PS, Naidu MM, Pullabhatla S (2009) Production of alpha amylase under solid state fermentation utilizing coffee waste. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 84.

Mushtaq M, Khatoon F, Batool S (2014) Optimization of Culture Conditions for the Production of ndoglucanase from *Aspergillus sydowii* using Corn Cobs. *Pinnacle Biochemistry Research*, V. 1, p. 131, 202-208.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, p.69-80.

Paris LD, Scheufele FB, Júnior AT, Guerreiro TL, Hasan LDM (2012) Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. *Maringá*, v. 34, n. 2, p. 193-200.

Rahardjo YSP, Tramper J, Rinzema A (2006) Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, v.24, p.161-179.

Sales MB, Moura RB, Porto TS, Macedo GR, Porto LF (2010) Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus* Pesquisa Agropecuária Brasileira., Brasília, v.45, n.11, p.1290-1296.

SANTANA RSM (2012) Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. Itapetinga, BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Santos AS (2011) Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante. UFRRJ.

Scheufel FB, Butzke AS, Marra IF, Hasan SDM, Fiorese ML (2012) Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Engvista*, V. 14, n. 3. p. 310-321.

Shaktimay K, Tapan KD, Ramesh CR (2010) Optimization of thermostable  $\alpha$ - amylase production n by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid-state fermentation using cassava fibrous residue. *Braz Arch Biol Technol*.

Sherief AA, Tanash AB, Atia N (2010) Cellulase production by *Aspergillus fumigates* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. *Journal of Microbiology*, p. 199-211.

Silva FV (2011) Avaliação do potencial celulolítico de fungos filamentosos associados a ninhos de formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890). Mestrado em Agroenergia. Universidade Federal do Tocantins - UFT., Palmas-TO.

Silva R, Lago ES, Merheb CW, Macchione MM, Park YK (2005) Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. Braz. J. Microbiol. V. 36, p. 235 - 241.

Singh R, Varma AJ, Laxman S, Rao M (2009) Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. Bioresource Technology, v.100, p.6679-6681.

Singhania RR, Sukumaran RK, Pandey A (2007) Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 142, p. 60–70.

Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology, v.46, p.541-549.

Siqueira FG, Jaramillo PMD, Silveira MHL, Andreus J, Couto FA, Batista LR, Ferreira Filho EX (2010) The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. International Biodeterioration and Biodegradation, v.64, p.20-26, 2010.

Sohail M, Siddiqi R, Ahmad A, Khan S A; Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82, effect of temperature and pH. New Biotechnology, v. 25, p. 437-441.

Soni R, Nazir A, Chadha BS (2010) Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* *fresenius* strain capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse. Industrial crops and Products, v. 31, p 277-283.

Sun H, Ge X, Hao Z, Peng M (2010) Cellulase production by *Trichoderma* sp. On apple pomace under solid state fermentation. African Journal of Biotechnology. v. 9, n. 2, p. 163- 166.

Thanapimmetha A, Luadsongkram A, Titapiwatanakun B, Rinophakun P (2012) Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. Ind. Crops Prod., v. 37, p. 1–5.

Tomme P, Warren R A, Gilkes NR (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv. Microb. Physiol. v. 37, p. 1-81.

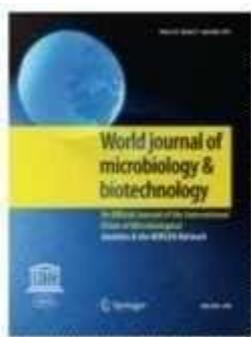
Whitaker JR (1994) Principles of enzymology for the foodsciences. 2nd ed. New York: CRC Press.

Zhao X, Zhou Y, Zheng G (2010) Microwave pretreatment of substrates for cellulase production by solid-state fermentation. Applied Biochem. Biotechnol. v. 160, p. 1557-1571.

Zúñiga FU, Rodríguez F, Farinas CS, Neto VB, Crestana SCS (2011) Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. Pesquisa Agropecuária Brasileira, vol.46 n. 8.

**ANEXO**

## ANEXO A - MANUSCRIPT SUBMISSION: Instructions for Authors - World Journal of Microbiology and Biotechnology



### World Journal of Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: Peter J. Large

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Journal no. 11274



Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio		
Regressão	0,943590	3	0,314530	0,538492	8,33
Resíduo	1,168190	2	0,584095		
Total	6,573130	10			

#### Manuscript Submission

##### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

#### Title page

##### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### Format

Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion; the Discussion section must not recapitulate the Results
- Acknowledgements
- References
- Figure legends
- Figures
- Tables

Results and Discussion should be separated.

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ⌘ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ⌘ Use italics for emphasis.
- ⌘ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ⌘ Do not use field functions.
- ⌘ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ⌘ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ⌘ Use the equation editor or MathType for equations.
- ⌘ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- ⌘ LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

## Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

### • Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

### • Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

### • Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

### • Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

### • Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

### • Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

↗ [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

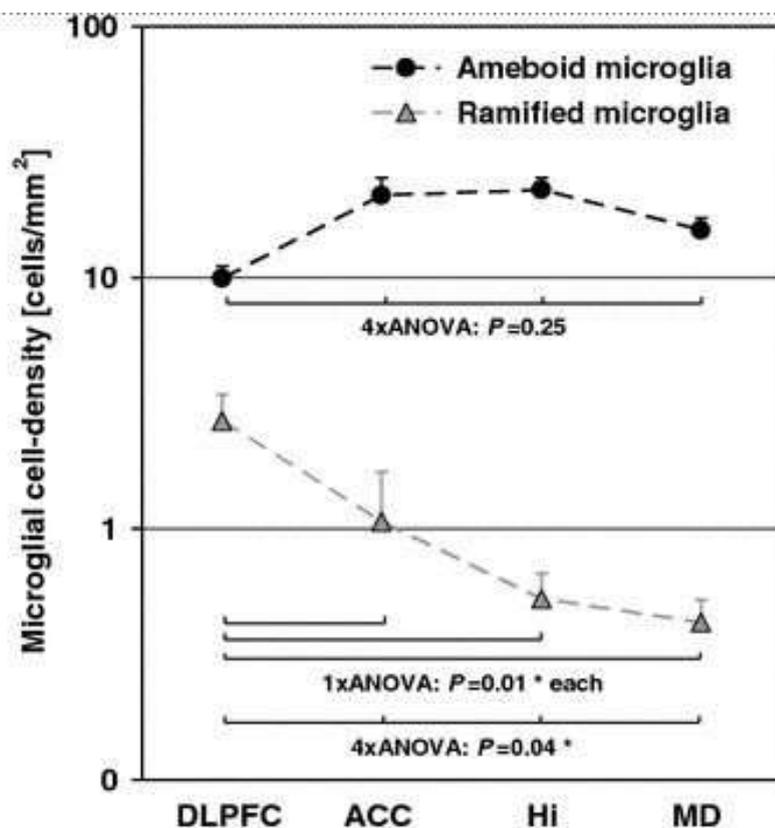
## Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

#### Electronic Figure Submission

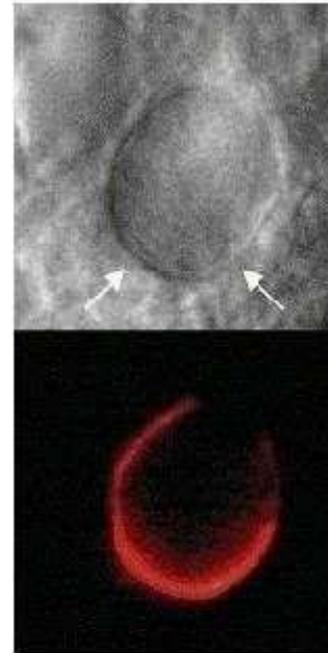
- ✦ Supply all figures electronically.
- ✦ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ✦ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- ✦ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ✦ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.



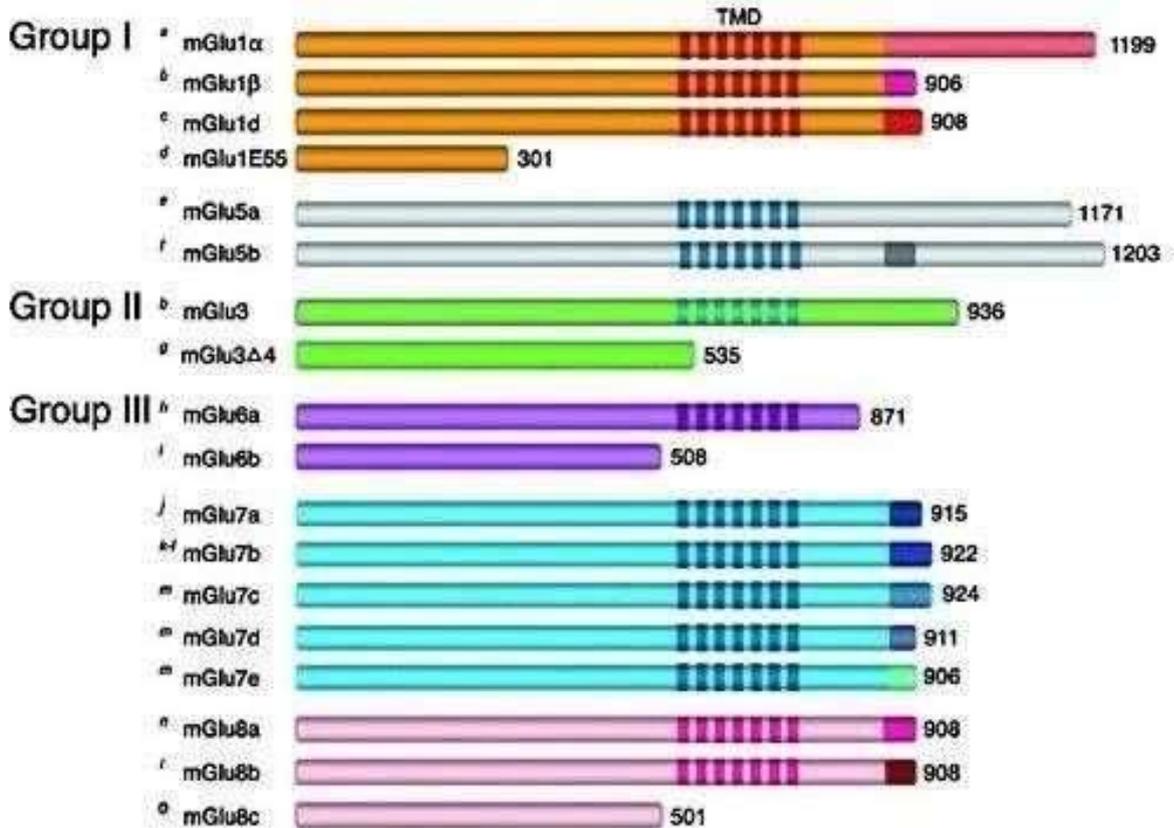
- ✦ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ✦ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ✦ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ✦ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ✦ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

- ☞ In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- ☞ All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- ☞ Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- ☞ Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

### Submission

- ☞ Supply all supplementary material in standard file formats.
- ☞ Please include in each file the following information: article title, journal name, author names, affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- ☞ To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### Audio, Video, and Animations

- ☞ Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### Text and Presentations

- ☞ Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- ☞ A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### Spreadsheets

- ☞ Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- ☞ If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### Specialized Formats

- ☞ Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### Collecting Multiple Files

- ☞ It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### Numbering

- ☞ If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- ☞ Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- ☞ Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

### Captions

- ☞ For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### Availability of Materials

By publishing the authors agree that any microbial strains, plasmids, viruses, and other materials such as prions or cell lines newly described in the articles are available in a timely fashion, free or at reasonable cost, to members of the scientific community for noncommercial purposes, if necessary via an appropriate Materials Transfer Agreement between the interested parties.

We strongly encourage the authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the manuscript. The authors should indicate laboratory strain designations and donor source when the culture or subculture specimen is distributed by individuals.

### Nucleotide and Amino Acid Sequences

Any nucleotide or amino acid sequences that were determined for the first time should be deposited to a public database, such as GenBank, EMBL or DDBJ, and the accession numbers should be included in a separate paragraph in the Materials and Methods section. Sequence data must be publicly available no later than the publication date of the article.

### Conflict of interest and Ethical standards

#### Conflict of interest

When an author or the institution of the author has a relationship, financial or otherwise, with individuals or organizations that could influence the author's work inappropriately, a conflict of interest may exist. Examples of potential conflicts of interest may include but are not limited to academic, personal, or political relationships; employment; consultancies or honoraria; and financial connections such as stock ownership and funding. Although an author may not feel that there are conflicts, disclosure of relationships and interests that could be viewed by others as conflicts of interest affords a more transparent and prudent process. All authors for World Journal of Microbiology and Biotechnology must disclose any actual or potential conflict of interest. The Journal may publish such disclosures if judged to be important to readers.

#### Ethical Standards – Informed consent

Manuscripts containing the results of experimental studies on human participants must disclose in the Methods section whether informed consent was obtained from patients in the study after the nature of the procedure had been fully explained to them. If informed consent was waived by the institutional review board (IRB) for a study, that should be so stated. In addition, a statement affirming approval of the IRB should be included, if approved. The patient's right to privacy should not be infringed. Information that would identify patients should not be published.

#### Ethical Standards – Animal rights

Authors are advised to comply with the guidelines for the care and use of laboratory animals as described by the U.S. National Institutes of Health and to acknowledge their compliance with these guidelines in the Methods section of the manuscript.

## Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

[Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

[Edanz English editing for scientists](#)

## After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

### Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

[Springer Open Choice](#)

### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

**Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

**Color illustrations**

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

**Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

**Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.