

CO-CULTIVO DE *ASPERGILLUS NIGER* E *CERIPORIOPSIS SUBVERMISPORA* PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E AÇÚCARES REDUTORES

CO-CULTIVATION OF *ASPERGILLUS NIGER* AND *CERIPORIOPSIS SUBVERMISPORA* TO PRODUCE LIGNOCELLULOLYTIC ENZYMES AND REDUCING SUGARS

Priscilla Maria Magri¹
Sandra de Cássia Dias²

Resumo: Etanol de segunda-geração pode ser produzido a partir de resíduos agrícolas tais como bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho. Para disponibilizar os açúcares fermentáveis da biomassa lignocelulósica para a fermentação alcoólica é necessário o pré-tratamento seguido da hidrólise enzimática da celulose. Os custos envolvidos com a hidrólise enzimática são elevados e muitas vezes inviabilizam a aplicação em escala industrial. Esse trabalho avaliou o co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispota* (em fermentação em estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho) para a produção de enzimas lignocelulolíticas e açúcares redutores. O planejamento fatorial 2² foi usado e as variáveis analisadas foram o pré-tratamento alcalino e o pré-tratamento microbiológico (co-cultivo), nos níveis máximos (+) e mínimos (-). A metodologia aplicada consistiu na fermentação em estado sólido seguida de determinações das atividades enzimáticas e dos açúcares redutores. Para o bagaço de cana-de-açúcar o co-cultivo não foi favorável para a produção das enzimas FPase (celulases totais) e açúcares redutores, porém foi a condição que mais favoreceu a produção de CMCase (endoglicanases). A melhor condição para a produção de FPase e açúcares redutores foi o mono-cultivo de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Para a palha de milho, a associação do pré-tratamento alcalino com o co-cultivo dos micro-organismos favoreceu a produção de FPase e açúcares redutores. Já a produção de CMCase foi maior nos ensaios nos quais a matéria-prima não foi tratada e ocorreu o co-cultivo. Portanto, para a produção de CMCase, o co-cultivo foi a melhor condição para os dois resíduos agrícolas e dispensa o uso do tratamento químico, diminuindo assim os custos com o processo.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*. *Ceriporiopsis subvermispota*. Co-cultivo. Fermentação em estado sólido. Enzimas lignocelulolíticas. Açúcares fermentáveis.

Abstract: Second-generation ethanol can be produced from agricultural waste like sugarcane bagasse and corn stover. Pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of cellulose is necessary for fermentable sugars from lignocellulosic biomass to become available. The costs involved in the enzymatic hydrolysis are high and can make the process economically unfeasible. This study evaluated the co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Ceriporiopsis subvermispota* (in solid state fermentation (SSF) using sugarcane bagasse and corn stover) in producing lignocellulolytic enzymes and reducing sugars. The factorial design 2² was used and

¹ Bacharel em Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Alto Paraopeba. priscilla.magri@hotmail.com

² Doutora em Biotecnologia, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Alto Paraopeba. sandra@ufsj.edu.br

the variables analyzed were the alkaline pretreatment and microbiological pre-treatment (co-cultivation), in their high (+) and low (-) levels. The methodologies used were SSF and determinations of enzyme activities and reducing sugars. For sugarcane bagasse, co-cultivation was not favorable for the production of FPase (total cellulase) and reducing sugars, but it had favored the production of CMCase (endoglucanases). The best condition for the production of reducing sugars and FPase was pretreatment and mono-cultivation. For corn stover, the association of alkaline pretreatment with the co-cultivation of microorganisms favored the production of FPase and reducing sugars. CMCase production was higher when corn stover was not treated and in co-cultivation. Therefore, co-cultivation was the best condition for the production of CMCase to both agricultural waste and it eliminates the need for chemical treatment, reducing the costs of the process.

Keywords: *Aspergillus niger*. *Ceriporiopsis subvermispota*. Co-cultivation. Solid-state fermentation. Lignocellulolytic enzymes. Fermentable sugars.

1 INTRODUÇÃO

O elevado uso de combustíveis fósseis vem causando graves impactos ambientais. No Brasil, uma alternativa viável para a substituição destes combustíveis fósseis é a utilização de subprodutos agrícolas lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração (VILELA, 2013).

Os materiais lignocelulósicos precisam ser hidrolisados para disponibilizar açúcares fermentáveis para a fermentação alcoólica. A hidrólise pode ocorrer pela associação de pré-tratamentos químicos a tratamentos microbiológicos e/ou enzimáticos. Os pré-tratamentos químicos apresentam como inconvenientes o uso de produtos químicos e a alta geração de efluente. A hidrólise enzimática, apesar de sua eficiência e especificidade, apresenta problemas de custo e disponibilidade quando aplicada em escala industrial (NASCIMENTO, 2011; BANSAL et al., 2012).

Uma alternativa para substituir o uso de enzimas purificadas é o uso de micro-organismos que produzem essas enzimas (WILSON, 2011). O fungo *Aspergillus niger* é conhecido por ser um bom produtor de exo e endoglucanases e está entre as espécies de fungos produtores de celulases mais estudadas (BANSAL et al., 2012; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Já o fungo *Ceriporiopsis subvermispota* é conhecido como sendo um fungo degradador de lignina (GUERRA, 2002).

O co-cultivo destes dois micro-organismos para produção de enzimas capazes de degradar e hidrolisar, respectivamente, a lignina e a celulose de

resíduos agrícolas lignocelulósicos (bagaço de cana-de-açúcar e a palha de milho), dispensando assim o uso de tratamentos químicos, foi o objeto de estudo deste trabalho.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e a palha de milho (PM) são materiais promissores para serem empregados na produção de etanol de segunda geração, pois são subprodutos produzidos em grandes quantidades e possuem alta concentração de açúcares fermentáveis (SANTOS, 2012), como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química dos resíduos lignocelulósicos.

Resíduo	Hexoses (%)	Pentoses (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29
Palha de milho	38	26	19
Palha de trigo	30	24	18
Talos de soja	34	25	20

Fonte: adaptado de LAL et al., 2011.

Para remover a porção recalcitrante da biomassa, formada pela lignina, e tornar o material mais acessível para as enzimas hidrolíticas, faz-se necessário o pré-tratamento do material (SRIARIYANUN et al., 2016). Visando substituir os pré-tratamentos químicos por processos menos agressivos, pode-se utilizar micro-organismos envolvidos na deslignificação de materiais lignocelulósicos.

O fungo da podridão branca, *Ceriporiopsis subvermispora*, é um micro-organismo conhecido por produzir e secretar enzimas envolvidas na degradação da lignina (lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, lacases, xilanases, peroxidases versáteis, oxidases) e por isso pode ser aplicado na deslignificação (pré-tratamento) de materiais lignocelulósicos (MENDES, 2008). A Tabela 2 apresenta estudos nos quais o fungo da podridão branca foi cultivado em material lignocelulósico, as enzimas determinadas e as condições de cultivo aplicadas por cada autor.

Tabela 2 - Enzimas lignocelulolíticas determinadas por diferentes autores em cultivos de *C. subvermispora* em diferentes condições.

Autores	Substrato	Temperatura (°C)	Suplementação	Tempo de cultivo	Enzimas determinadas
BABIČ et al. (2012)	Madeira	30	Glicose + tartarato de amônio + polisorbato 80	≈ 2 e 3 semanas	Lacase e manganês-peroxidase
TANAKA et al. (2009)	Madeira	28	Meio ágar basal + glicose	≈ 3 a 10 semanas	Lacase, manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e endoglicanases
MENDES (2008)	Madeira	27±2	-	≈ 4 semanas	Endoglicanases, xilanases, manganês-peroxidase e lacase

Após o pré-tratamento, a celulose está disponível para a hidrólise. A hidrólise da celulose pode acontecer por métodos químicos e enzimáticos. A hidrólise enzimática é a mais utilizada pois os métodos químicos geralmente utilizam altas concentrações dos reagentes, condições extremas de temperatura e pH e envolvem a formação de inibidores da fermentação, de compostos poluentes e um alto investimento em equipamentos resistentes à corrosão (SINGH et al., 2009; LIU et al., 2011).

A hidrólise enzimática é realizada pelo consórcio de enzimas denominado celulasas. As celulasas são formadas pelas enzimas endoglicanases, exoglicanases (celobiohidrolases e glicanohidrolases) e β -glicosidases (LIU et al., 2011; AGUIAR, 2010).

De acordo com a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), a grande questão para a produção industrial de etanol celulósico, seja de bagaço de cana-de-açúcar, de palha de milho ou de outra biomassa, está na produção das enzimas celulasas. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando o aumento da eficiência na produção em escala industrial e até mesmo o reaproveitamento das enzimas nos processos através da sua imobilização.

As celulasas podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES) e por fermentação submersa (FS). Na fermentação em estado sólido o teor de água livre é minimizado ou quase inexistente. O baixo teor de água na fermentação pode apresentar diversas vantagens, tais como a baixa diluição das enzimas produzidas e em alguns casos não é necessária esterilização prévia (CASTRO et al., 2010).

Usualmente, resíduos agrícolas são usados como fonte de carbono para FES, com o objetivo de disponibilizar açúcares fermentáveis através da ação de complexos de enzimas lignocelulolíticas. Esses complexos são eficientes e economicamente viáveis e podem ser produzidos por fungos da espécie *Aspergillus niger* (NEE'NIGAM; PANDEY, 2009).

Nos cultivos de *A. niger* podem ser utilizados diversos resíduos e a produção enzimática tem seus maiores rendimentos em diferentes condições de temperatura e tempo de fermentação. A Tabela 3 mostra o tempo de fermentação e a temperatura ótimos determinados em alguns estudos.

Tabela 3 - Tempo e temperatura de fermentação ótimos para a produção de enzimas celulolíticas obtido por diferentes autores em cultivos de *Aspergillus niger*.

Autores	Substrato	Tempo de fermentação	Temperatura de Fermentação
AGUIAR (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar	7 dias	30
BANSAL et al. (2012)	Bagaço de cana-de-açúcar	96 horas	30
GHORI et al. (2013)	Palha de milho	96 horas	30
RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al. (2011)	Bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo	72 horas	32

A Tabela 4 apresenta uma comparação das atividades de enzimas celulolíticas determinadas em cultivos de *A. niger* e *C. subvermispota* em FES.

Tabela 4 - Comparação das atividades enzimáticas determinadas em diferentes estudos.

Autores	Substrato	Micro-organismo	Atividade de endoglicanases	Atividade de celulasas totais
RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al. (2011)	Bagaço de cana-de-açúcar + farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>	21 UI g ⁻¹	0,4 UI g ⁻¹
BANSAL et al. (2012)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Aspergillus niger</i>	5 UI g ⁻¹	1,5 UI g ⁻¹
MENDES (2008)	Madeira	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	0,046 UI g ⁻¹	0,0124 UI g ⁻¹

O co-cultivo ou cultivo misto consiste no cultivo simultâneo de dois micro-organismos que tenham semelhantes necessidades nutricionais e condições de cultivo. A vantagem econômica do co-cultivo está na redução do custo geral de produção (MARQUES, 2013). O co-cultivo de fungos em FES, por exemplo, pode ser usado para aumentar a capacidade de produção de diferentes enzimas em escala industrial (HU et al., 2011; MARQUES, 2013).

O planejamento fatorial é utilizado para fornecer relações entre as variáveis de um sistema, analisar os efeitos causados pelos diferentes níveis das variáveis e os efeitos causados pela interação dos diferentes níveis das variáveis (CUNICO et al., 2008). Para execução de um planejamento fatorial é preciso especificar os níveis do fator de estudo. Um planejamento fatorial completo inclui todas as combinações dos níveis do fator e a partir das respostas registradas é possível avaliar o efeito destas combinações. Os fatores são as variáveis controladas do sistema e o um planejamento fatorial 2² é aquele que apresenta duas variáveis controladas (NETO et al., 2010).

Para o planejamento fatorial 2², o nível superior da variável é identificado pelo sinal (+) e o nível inferior pelo sinal (-) (NETO et al., 2010). O efeito principal de uma variável é dado pela diferença média da resposta para uma variação do nível (CUNICO et al., 2008). A equação 1 é usada para o cálculo do efeito principal.

$$\text{Efeito principal} = \frac{2(\sum y^+ - \sum y^-)}{b} \quad (\text{Eq. 1})$$

y: média dos efeitos individuais da medida;

b: número de experimentos do planejamento (CUNICO et al., 2008).

Para o planejamento fatorial 2², a equação 1 pode ser escrita da seguinte forma.

$$\text{Efeito principal} = \frac{(\sum y^+ - \sum y^-)}{2} \quad (\text{Eq. 2})$$

O efeito de interação entre as variáveis é calculado como sendo a metade da diferença entre os efeitos principais de uma variável nos níveis da outra variável (CUNICO et al., 2008). Para melhor interpretação dos efeitos

calculados é comum o uso de representações geométricas das respostas em função das variáveis (CUNICO et al., 2008; NETO *et al.*, 2010).

2.2 Materiais e Métodos

Foram realizados dois planejamentos experimentais 2², um para o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e outro para a palha de milho (PM). As variáveis analisadas foram o tratamento químico e o tratamento microbiológico recebido pelas duas diferentes matérias-primas, como mostra a Tabela 5. Os efeitos foram calculados utilizando a equação 2.

Tabela 5 - Planejamento fatorial 2² para a produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores. Variável 1 é o tratamento microbiológico e a variável 2 é o tratamento químico.

Ensaio	Variável 1	Nível	Variável 2	Nível
1	<i>A. niger</i> e <i>C. subvermispota</i>	+	Tratamento químico básico	+
2	<i>A. niger</i>	-	Tratamento químico básico	+
3	<i>A. niger</i> e <i>C. subvermispota</i>	+	Sem tratamento químico básico	-
4	<i>A. niger</i>	-	Sem tratamento químico básico	-

O BCA e a PM foram trituradas em liquidificador e levadas para análise granulométrica. A proporção da mistura de palha de milho utilizada foi 42% (m/m) com tamanho médio de 1,4 mm, 33% (m/m) com tamanho médio 3,35 mm e 25% (m/m) com tamanho médio 500 µm. Para o bagaço de cana-de-açúcar a proporção da mistura utilizada foi 34% (m/m) com 150 µm, 33% (m/m) com tamanho inferior a 100 µm e 33% (m/m) com tamanho médio de 300 µm.

Para o tratamento químico básico utilizou-se a metodologia descrita em Sharma et al. (2012, p. 468-469), na qual utiliza-se hidróxido de sódio 1% (m/v) a temperatura ambiente durante duas horas, seguido de lavagem do material. O material tratado e o material que não foi submetido ao tratamento básico foram levados para secagem em estufa a 80 °C, até obtenção de massa constante.

O fungo basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispota*, cepa L1487-SS3, foi plaqueado em meio contendo 2% (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de ágar. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C

durante 7 dias. Para a produção do inóculo, 4 círculos de 1,6 cm de diâmetro de meio de cultivo com o micro-organismo foram adicionadas a um erlenmeyer de 1 L de volume contendo 100 mL do meio autoclavado. O meio foi preparado com 2 % (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 0,96 g.L⁻¹ de glicose. Os erlenmeyers foram mantidos estáticos em estufa bacteriológica a 28 °C, durante 12 dias. Após 12 dias, os micélios foram recuperados utilizando um funil de Buchner e lavados com água destilada estéril. Em seguida foram trituradas com água destilada em liquidificador de alumínio, ambos estéreis, por 3 vezes durante 20 segundos cada. Esta metodologia foi adaptada de Mendes (2008, p.33).

A determinação da massa seca de células foi obtida filtrando-se 10 mL da suspensão em filtro de papel qualitativo previamente pesado e seco em estufa a 105°C, durante 1 hora. O papel de filtro contendo as células foi seco a 105 °C até obtenção de massa constante. A concentração na suspensão foi de 7,59 mg/mL.

Aspergillus niger, ATCC® 9642™ – Lote T19/3/E, foi plaqueado em Meio Riviere's Medium adaptado de Sharma et al. (2012, p. 468), com composição de NaNO₃ (1 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,62 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,9 g.L⁻¹), MgSO₄. 7 H₂O (0,5 g.L⁻¹), KCl (0,5 g.L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹), celulose microcristalina (10 g.L⁻¹), ágar (20 g.L⁻¹). As placas foram mantidas estáticas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C durante 7 dias.

Para o preparo da suspensão de *A. niger*, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril em cada placa contendo o micro-organismo crescido. As placas foram agitadas e as células retiradas com o auxílio de uma alça de platina. A determinação da massa seca de células foi obtida a partir da mesma metodologia utilizada para *C. subvermispora*. A concentração da suspensão foi de 1,65 mg/mL.

Erlenmeyers de 250 mL contendo 1,65 g (base seca) de BCA ou PM, tratados ou não tratados quimicamente, foram autoclavados a 121 °C durante 30 minutos. Aos erlenmeyers foram adicionados 3 mL de meio BSM (basal salt médium - autoclavado) adaptado de Sharma et al. (2012, p. 469), com a seguinte composição: Na₂HPO₄ (6 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹), NaCl (0,5 g.L⁻¹),

ureia (2% m/v), extrato de levedura (1% m/v), peptona (0,1% m/v), NaNO₃ (0,1% m/v), CoCl₂ 1 M (0,2 mL.L⁻¹), MgSO₄. 7 H₂O 1 M (2 mL.L⁻¹) e CaCl₂.2 H₂O 1 M (0,1 mL.L⁻¹). Para o preparo do meio as soluções de MgSO₄ e CaCl₂ foram autoclavadas separadamente e após autoclavadas foram adicionadas aos outros constituintes do meio BSM.

Todas as amostras foram inoculadas com 1 mL da suspensão de *A. niger*. Os ensaios com nível de tratamento biológico (+) (ensaios 1 e 3, tabela 5) também foram inoculados com 1 mL da suspensão de *C. subvermispora*. Todos os procedimentos foram realizados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar. Os erlenmeyers contendo os cultivos foram mantidos estáticos em estufa bacteriológica a 28 °C durante 15 dias.

Após o término do cultivo, para a extração das enzimas, utilizou-se uma adaptação do método descrito em Mendes (2008, p. 34). Adicionou-se aos cultivos contendo palha de milho 10 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,5) acrescido de 0,01% (v/v) de Tween 20. Às amostras contendo bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente, foram adicionados 20 mL de tampão, e às amostras com bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento químico 30 mL do tampão. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação (120 rpm) durante 5 horas a temperatura ambiente. Os caldos enzimáticos foram recuperados por filtração em papel filtro qualitativo 80g e usados para as determinações das atividades enzimáticas.

A determinação das celulases totais foi realizada de acordo com o método descrito em Vilela (2013, p. 27) e para quantificar a atividade de carboximetilcelulase (CMCase) utilizou-se o método adaptado de Reese e Mandel descrito em Sharma et al. (2012, p. 469-470). Para os cálculos das atividades enzimáticas baseou-se na equação apresentada em Aguiar (2010, p.54).

As metodologias descritas em Mendes (2008, p. 34-35) foram utilizadas nas determinações de manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e lacase. Na determinação da atividade da manganês-peroxidase utilizou-se a oxidação por vermelho de fenol. A oxidação de ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6)-sulfônico) foi usada para a determinação da Lacase. O

corante azul de metileno foi utilizado para a determinação da atividade da lignina-peroxidase.

Para a construção da curva padrão de glicose utilizada nas determinações enzimáticas baseou-se na metodologia descrita em Vilela (2013, p. 28). Na quantificação dos açúcares redutores totais presentes no caldo enzimático, utilizou-se a metodologia estabelecida pela Embrapa Agroindústria Tropical descrita em Vasconcelos et al. (2013, p. 10-13).

Os cálculos dos efeitos do planejamento fatorial 2² foram realizados de acordo com a metodologia descrita em CUNICO et al., 2008. As representações geométricas foram feitas com o auxílio do software Microsoft Power Point (2010).

O planejamento experimental foi desenvolvido e analisado utilizando a metodologia descrita por Barros et al. (20013, p. 101-115). A ANOVA foi realizada utilizando o software Microsoft Excel (2010).

2.3 Resultados e Discussão

A partir das determinações das atividades enzimáticas, as celulasas foram as principais enzimas presentes em todos os cultivos. Não foi possível detectar, em nenhuma condição dos planejamentos fatoriais, a presença das enzimas relacionadas à atividade lignolítica produzidas por *C. subvermispora* (manganês-peroxidase, lignina-peroxidase, fenol-oxidases e lacase). Porém, era esperada a produção destas enzimas devido a relatos da literatura de diferentes autores que determinaram estas enzimas em cultivo deste micro-organismo (tabela 2).

Portanto, as condições do co-cultivo do presente estudo não foram favoráveis para o desenvolvimento e produção de enzimas lignolíticas pelo fungo *C. subvermispora*. Uma das causas pode ter sido o tempo de fermentação, que foi inferior ao descrito nos estudos citados na Tabela 2. O uso de resíduos agrícolas como substrato da fermentação também pode ter desfavorecido a produção destas enzimas, já que na literatura *C. subvermispora* é mais empregado na biodegradação de madeiras. De acordo

com a Tabela 2, nos estudos realizados por Babič et al. (2012) e Tanaka et al. (2009), ocorreu suplementação do meio de cultivo com glicose, o que pode ter influenciado a produção de algumas destas enzimas entre a segunda e a terceira semana de cultivo. A umidade relativa do meio também pode ter sido um fator limitante, pois em FES teores altos e baixos de umidade podem interferir na produtividade (BANSAL et al., 2012).

2.3.1 Planejamento fatorial para o bagaço de cana-de-açúcar

Os valores de atividade enzimática (UI/g de substrato) e concentração de açúcares redutores médios determinados no planejamento fatorial para o bagaço de cana-de-açúcar estão apresentados na Tabela 6. A partir da análise de variância foi possível concluir que entre os ensaios para dosagem de FPase e Açúcares Redutores totais houve diferença significativa com erro alfa = 0,05. Já para os ensaios para dosagem de CMCase não houve diferença significativa entre as amostras.

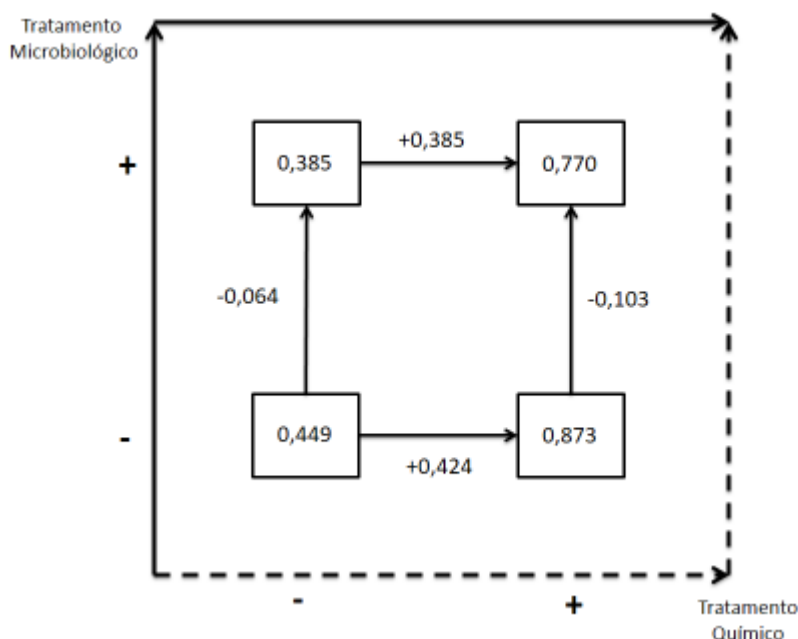
Tabela 6 - Resultados do planejamento Fatorial 2² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	Trat. Microbiológico	Trat. químico	Trat. M. X Trat. Q.	FPase/g (UFP/g)	CMCase/g (UCMC/g)	Açúcares redutores totais (mg/mL)
1	-	+	-	0,873±0,037	2,497±0,309	1,134±0,107
2	+	+	+	0,770±0,015	1,956±0,617	1,037±0,004
3	-	-	+	0,449±0,107	3,387±0,583	0,359±0,009
4	+	-	-	0,385±0,024	4,567±0,825	0,536±0,015

No tratamento microbiológico (-) significa que apenas o micro-organismo *Aspergillus niger* foi utilizado e (+) que se utilizou a associação dos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermispota*. Para o tratamento químico (+) significa tratado e (-) significa não tratado.

A resposta FPase/g foi representada num sistema cartesiano, com um eixo para cada variável (Tratamento químico e Tratamento microbiológico), como apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de FPase utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: UFP/g].



A partir das informações contidas na Figura 1 é possível observar que nos ensaios em que ocorreu o tratamento químico (1 e 2), o tratamento microbiológico fez com que a produção de enzimas Fpase diminuísse em 0,103 UFP/g ($+0,873-0,770$). Nos ensaios nos quais o tratamento químico não foi aplicado (3 e 4), o tratamento microbiológico fez com que a produção de enzimas Fpase diminuísse em 0,064 UFP/g ($+0,985-1,796$). O efeito global apresentado pela variável tratamento microbiológico pôde ser obtido pela média dos efeitos citados $[(-0,103-0,064) / 2] = -0,084$.

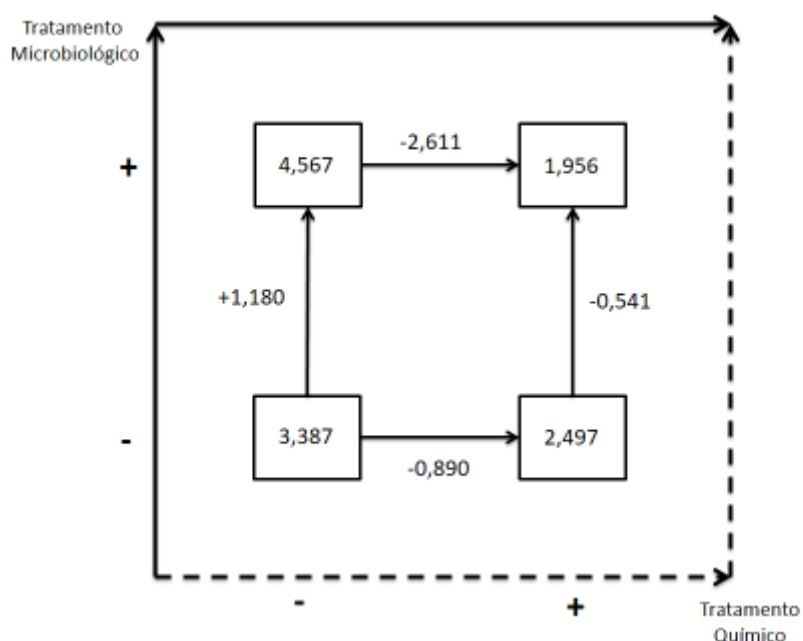
Observa-se que para os ensaios em que o tratamento microbiológico foi aplicado (2 e 4), o tratamento químico proporcionou aumento na produção de FPase de 0,385 UFP/g ($+0,770-0,385$). Já nos ensaios nos quais não ocorreu o tratamento microbiológico (1 e 3), o tratamento químico proporcionou aumento na produção de FPase de 0,424 UFP/g ($-0,449+0,873$). Para a variável tratamento químico o efeito global calculado foi de 0,405 $[(+0,385+0,424) / 2]$.

O efeito de segunda ordem para a associação entre as variáveis tratamento químico e tratamento microbiológico ($-0,020$) mostra que a associação do micro-organismo com o tratamento químico não foi favorável para a produção de FPase. Analisando os efeitos globais para as duas

variáveis nota-se que as duas variáveis influenciaram na produção de enzimas FPase, porém o efeito da variável tratamento químico foi maior. Para a produção de FPase o ensaio que apresentou melhores resultados foi o ensaio 1, no qual apenas ocorreu tratamento químico.

A Figura 2 mostra a representação geométrica para a produção de CMCase (endoglicanases).

Figura 2 - Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de CMCCase utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: UCMC/g].



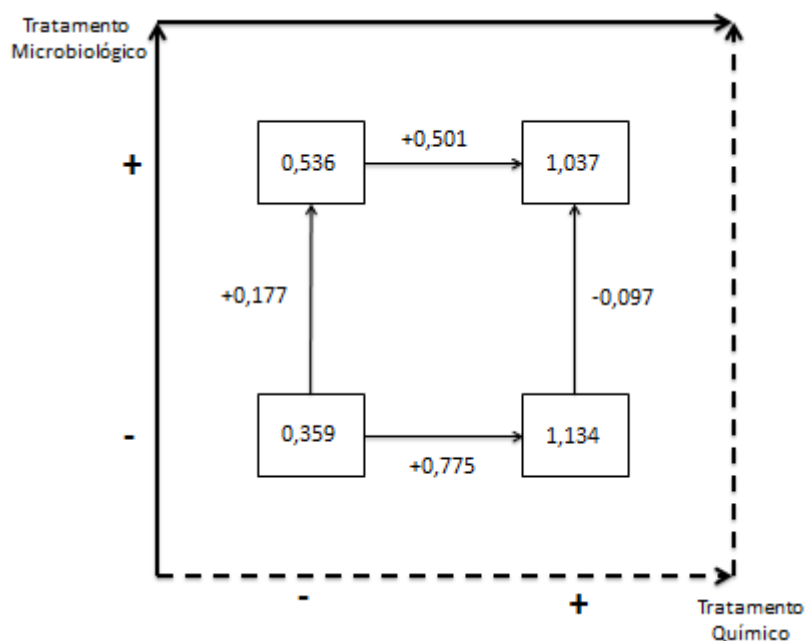
Para a análise da produção de CMCCase, observa-se que para os ensaios 1 e 2, nos quais o tratamento químico foi realizado, o tratamento microbiológico proporcionou uma queda de 0,541 UCMC/g $(-2,497+1,956)$. Nos ensaios 3 e 4 não ocorreu tratamento químico, o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 1,180 UCMC/g $(-3,387+4,567)$. Sendo assim o efeito global da variável tratamento microbiológico na produção de CMCCase foi de 0,320 $[(-0,541+1,180) /2]$.

Nos ensaios 2 e 4, nos quais ocorreu tratamento microbiológico, o tratamento químico fez com que ocorresse uma diminuição de 2,611 UCMC/mL $(-4,567+1,956)$. Nos ensaios 1 e 3, o tratamento químico causou uma diminuição de 0,890 UCMC/mL $(+2,497-3,387)$. O efeito global do tratamento químico foi de -1,751 $[(-2,611-0,890) /2]$.

Analisando o efeito de segunda ordem para a associação dos dois tratamentos (-0,861), conclui-se que a associação não foi favorável para a produção de CMCase. Pela análise dos efeitos globais das duas variáveis, tem-se que o tratamento microbiológico apresentou efeito positivo na produção destas enzimas, e que o tratamento químico apresentou efeito negativo. A melhor condição para a produção de CMCase foi a do ensaio 4, na qual apenas o tratamento microbiológico foi aplicado.

A representação geométrica dos efeitos na produção de açúcares redutores totais esta apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de açúcares redutores totais utilizando bagaço de cana-de-açúcar [resposta: mg/mL].



Analisando a Figura 3, observa-se que nos ensaios nos quais ocorreu tratamento químico (1 e 2), o tratamento microbiológico ocasionou uma diminuição de 0,097 mg/mL na concentração total de açúcares redutores (+1,037-1,134). Nos ensaios 3 e 4, nos quais não ocorreu o tratamento químico, o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 0,177 mg/mL (-0,359+0,536).

Nos ensaios em que não ocorreu tratamento microbiológico (1 e 3), o tratamento químico proporcionou um aumento de 0,775 mg/mL (-0,359+1,134). Nos ensaios 2 e 4 em ocorreu o tratamento microbiológico, o tratamento

químico aumentou em 0,501 mg/mL a produção de açúcares redutores totais (-0,536+1,037).

Analisando os efeitos das variáveis na produção de açúcares redutores totais observa-se um efeito global da variável tratamento microbiológico igual a 0,040 [(-0,097+0,177) /2] e um efeito global da variável tratamento químico de 0,638 [(+0,775+0,501) /2]. Sendo assim as duas variáveis tiveram efeito positivo na produção de açúcares, porém o tratamento químico apresentou maior efeito.

O efeito de segunda ordem mostra que a melhor condição foi a do ensaio 1. Porém, a associação entre os dois tratamentos (ensaio 2) também foi favorável para a produção de açúcares redutores totais, já que a diferença entre o ensaio 1 e 2 (0,097) foi pequena.

Portanto, de modo geral, o ensaio 1 foi o que apresentou os melhores resultados para a fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Ou seja, a associação dos micro-organismos não foi favorável para a produção de enzimas (FPase) e açúcares redutores, tendo a variável tratamento químico se mostrado mais eficiente neste caso. Este resultado mostra que apenas o fungo *A. niger* foi determinante na produção de FPase e açúcares redutores e que o pré-tratamento alcalino foi eficiente na disponibilização de celulose.

Entretanto para a produção de CMCase o co-cultivo sem o tratamento químico foi a melhor condição, provavelmente devido ao fato de que os dois micro-organismos utilizados são conhecidos por produzirem CMCase em FES. Logo, neste caso, o co-cultivo se mostrou eficiente na redução dos custos de produção, já que o uso do pré-tratamento foi dispensado.

Comparando os valores determinados (tabela 6) com os valores da literatura (tabela 4) observa-se que as condições empregadas não foram vantajosas para a produção das enzimas celulolíticas, pois as atividades enzimáticas obtidas foram inferiores às descritas para mono-cultivo de *A. niger*.

2.3.2 Planejamento fatorial para a palha de milho

Para o planejamento fatorial da palha de milho, os valores de atividade enzimática (UI/g de substrato) e concentração de açúcares redutores médios estão apresentados na Tabela 7. A partir das análises estatísticas foi possível concluir que não houve diferença significativa entre as amostras

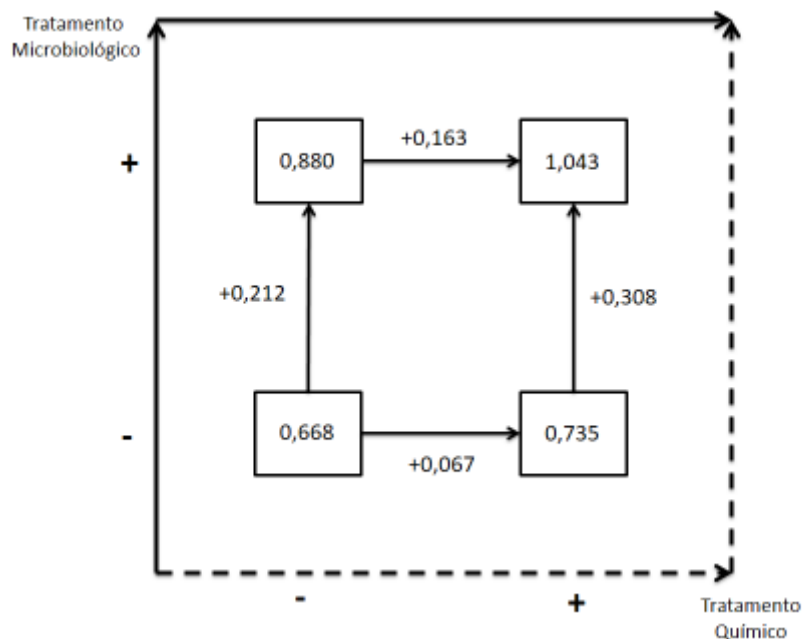
Tabela 7 - Resultados do planejamento Fatorial 2² para estudo dos efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de enzimas celulolíticas e açúcares redutores utilizando palha de milho como fonte de carbono para o cultivo em estado sólido.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	Trat. Microbiológico	Trat. químico	Trat. M. X Trat. Q.	FPase/g (UFP/g)	CMCase/g (UCMC/g)	Açúcares redutores totais (mg/mL)
1	-	+	-	0,735±0,081	7,430±0,247	0,880±0,043
2	+	+	+	1,043±0,111	7,526±0,025	1,127±0,146
3	-	-	+	0,668±0,024	7,484±0,403	0,801±0,074
4	+	-	-	0,880±0,011	7,871±0,966	0,669±0,003

No tratamento microbiológico (-) significa que apenas o micro-organismo *Aspergillus niger* foi utilizado e (+) que se utilizou a associação dos micro-organismos *Aspergillus niger* e *Ceriporiopsis subvermisporea*. Para o tratamento químico (+) significa tratado e (-) significa não tratado.

A Figura 4 apresenta a representação geométrica das respostas e os efeitos do pré-tratamento químico e microbiológico na produção de FPase utilizando a palha de milho.

Figura 4 - Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2² para produção de FPase utilizando palha de milho [resposta: UFP/g].



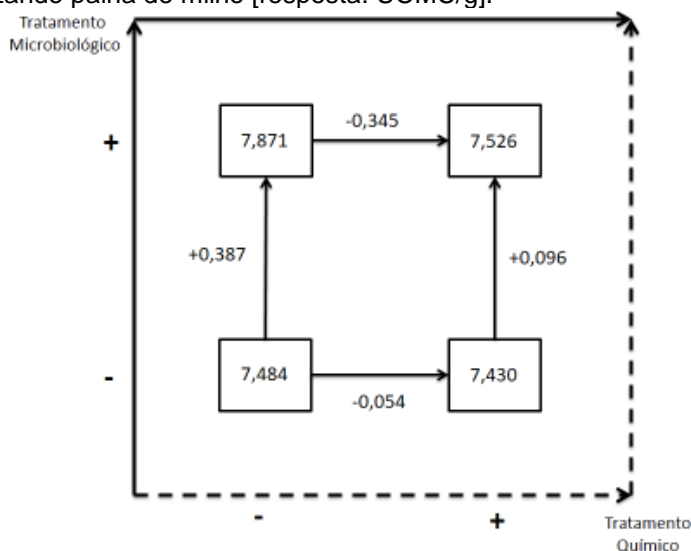
Analisando a Figura 4, é possível observar que nos ensaios em que ocorreu o tratamento químico (1 e 2), o tratamento microbiológico provocou um aumento na produção de Fpase de 0,308 UFP/g $(-0,735+1,043)$. Para os ensaios 3 e 4, nos quais o tratamento químico não foi aplicado, o tratamento microbiológico fez com que a produção de enzimas Fpase aumentasse em 0,212 UFP/g $(+0,880-0,668)$. O efeito global apresentado pela variável tratamento microbiológico foi igual a $0,260 = [(+0,308+0,212) /2]$.

Nos ensaios 2 e 4, nos quais o tratamento microbiológico foi aplicado, o tratamento químico ocasionou aumento na produção de FPase de 0,163 UFP/g $(+1,043-0,880)$. Para os ensaios 1 e 3, nos quais não ocorreu o tratamento microbiológico, o tratamento químico proporcionou aumento na produção de FPase de 0,067 UFP/g $(+0,735-0,668)$. Então, o efeito global calculado para a variável tratamento químico foi de $0,115 [(+0,163+0,067) /2]$.

De acordo com o efeito de segunda ordem para a associação entre as variáveis (0,048), a associação dos micro-organismos com o tratamento químico foi favorável para a produção de FPase. As duas variáveis influenciaram positivamente na produção de FPase. Portanto, a melhor condição para produção de FPase foi o ensaio 2, no qual ocorreu associação entre os microrganismos e o tratamento químico.

Na Figura 5 está apresentada a representação geométrica dos efeitos para produção de CMCase.

Figura 5 - Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2^2 para produção de CMCase utilizando palha de milho [resposta: UCMC/g].



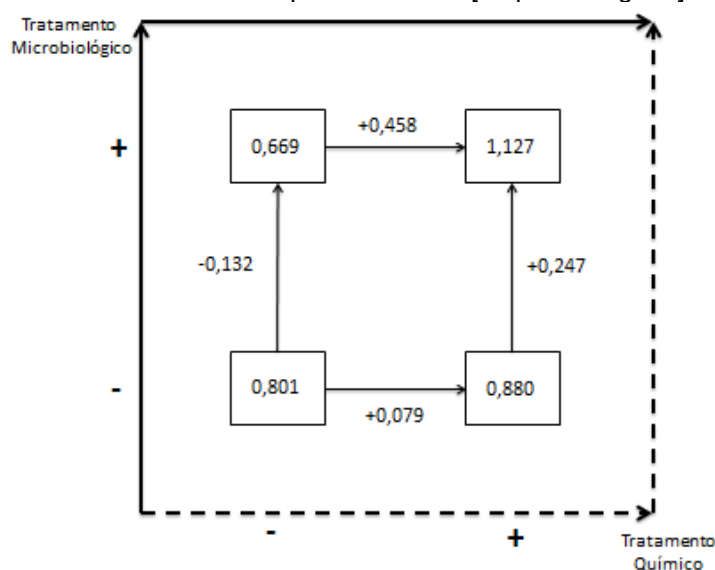
Analisando a produção de CMCase através da representação geométrica da Figura 5, observa-se que para os ensaios nos quais o tratamento químico foi realizado (1 e 2), o tratamento microbiológico fez com que a produção de CMCase aumentasse em 0,096 UCMC/g (+7,526-7,430). Nos ensaios 3 e 4, nos quais não ocorreu tratamento químico, o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 0,387 UCMC/g (+7,871-7,484). Então, o efeito global da variável tratamento microbiológico na produção de CMCase foi de 0,242 [(+0,096+0,387) /2].

Nos ensaios nos quais ocorreu tratamento microbiológico, 2 e 4, o tratamento químico proporcionou uma diminuição de 0,345 UCMC/g (-7,871+7,526). Nos ensaios 1 e 3, o tratamento químico causou uma diminuição de 0,054 UCMC/g (-7,484+7,430). O efeito global do tratamento químico foi de -0,200 [(-0,345-0,054) /2].

O efeito de segunda ordem para a associação dos micro-organismos e do tratamento químico (-0,146) indica que a associação não foi favorável para a produção de CMCase. A partir dos efeitos globais, conclui-se que o tratamento microbiológico foi mais favorável e, portanto, a melhor condição para a produção de CMCase foi a do ensaio 4, na qual apenas o tratamento microbiológico foi aplicado.

Os efeitos na produção de açúcares redutores totais podem ser analisados a partir da representação geométrica da Figura 6.

Figura 6 - Representação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial 2² para produção de açúcares redutores totais utilizando palha de milho [resposta: mg/mL].



Analisando os ensaios 1 e 2, observa-se que o tratamento microbiológico ocasionou um aumento de 0,247 mg/mL na concentração total de açúcares redutores (-0,880+1,127). Já nos ensaios 3 e 4, o tratamento microbiológico ocasionou uma diminuição de 0,132 mg/mL (+0,669-0,801). Então, o efeito global da variável tratamento microbiológico foi igual a 0,058 [(+0,247-0,137) /2].

Nos ensaios 1 e 3, o tratamento químico proporcionou um aumento de 0,079 mg/mL (-0,801+0,880). Nos ensaios 2 e 4, o tratamento químico aumentou em 0,458 mg/mL a produção de açúcares redutores totais (-0,669+1,127). O efeito global da variável tratamento químico foi de 0,269 [(+0,079+0,458) /2].

Portanto as duas variáveis tiveram efeito positivo na produção de açúcares. O efeito de segunda ordem mostra que a associação entre os dois tratamentos também foi favorável para a produção de açúcares redutores totais, sendo a melhor condição a do ensaio 2, no qual os dois tratamentos foram empregados.

Analisando todos os efeitos das diferentes respostas, o ensaio 2 foi o que apresentou os melhores resultados para a fermentação em estado sólido utilizando palha de milho como matéria-prima, pois foi a associação dos micro-organismos com o tratamento químico que proporcionou melhor produção de FPase e açúcares redutores. Sharma et al. (2012) também observaram que o pré-tratamento de biomassa com hidróxido de sódio 1% em condições ambientes aumentou a acessibilidade para as enzimas celulolíticas. Como *C. subvermispota* produz xilanases, a produção destas enzimas pode ter influenciado na concentração de açúcares redutores totais no co-cultivo. A associação dos micro-organismos foi vantajosa para a produção das enzimas, e no caso da CMCase o uso do pré-tratamento alcalino pode ser dispensado. Este resultado foi obtido para as duas matérias-primas, bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho, mostrando que o custo da produção de CMCase pode ser reduzido com o cultivo misto de *C. subvermispota* e *A. niger*.

A Tabela 8 apresenta os valores máximos de atividade enzimática e de concentração de açúcares redutores determinados para os cultivos com bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho.

Tabela 8 - Comparação das atividades enzimáticas máximas e açúcares redutores totais máximos determinadas para os cultivos em BCA e PM.

Biomassa	FPase (UFP/g)	CMCase (UCMC/g)	Açúcares redutores totais (mg/mL)
Bagaço de cana-de-açúcar	0,873±0,037	4,567±0,825	1,134±0,107
Palha de milho	1,043±0,111	7,871±0,988	1,127±0,146

Comparando as duas biomassas utilizadas tem-se que a palha de milho apresentou melhores resultados para a produção das enzimas celulolíticas. O mesmo resultado foi observado por Aguiar (2010), que comparou bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e palha de milho como fonte de carbono na fermentação utilizando *A. niger* e como substrato na hidrólise enzimática e obteve os melhores resultados para a palha de milho. Este resultado pode ser explicado pela composição química do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de milho apresentada na Tabela 1. Como a palha de milho apresenta menor percentual de lignina em sua composição quando comparada ao bagaço de cana-de-açúcar, a sua recalcitrância é menor e portanto a celulose está mais disponível para os micro-organismos. Da mesma forma, como o percentual de hexoses e pentoses da palha (tabela 1) é superior ao do bagaço de cana-de-açúcar, de forma geral, ocorreu maior produção de açúcares redutores nos cultivos nos quais a palha de milho foi utilizada.

Conforme apresentado na Tabela 3, o tempo de fermentação ideal disponível na literatura para cultivos de *A. niger* variou entre 72 horas e 7 dias. Portanto, o elevado tempo de fermentação (15 dias) do presente trabalho pode ter influenciado na baixa produção enzimática por parte do fungo *A. niger*.

O tempo de fermentação ideal deve ser o que satisfaça o crescimento dos dois micro-organismos do co-cultivo. Como estes micro-organismos produzem as enzimas de interesse em tempos diferentes de fermentação, o equilíbrio entre o tempo de inoculação e o de cultivo deve ser estudado.

Sugestões para o aumento da produção das enzimas em trabalhos futuros incluem a variação da temperatura, do tempo de fermentação, do conteúdo de umidade e da quantidade de micro-organismo inoculada (BANSAL et al., 2012). A complementação do material lignocelulósico com farelos também pode aumentar a produção enzimática (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). Para diminuir ainda mais os custos com a produção das enzimas, pode-se testar também a influência da troca do meio BSM (por água ou outros meios) no rendimento do processo. Diferentes granulometrias das matérias-primas podem ser testadas assim como o controle do pH, pois este é um fator determinante no crescimento e produção de enzimas pelos micro-organismos (BANSAL et al., 2012). O uso das matérias-primas sem a secagem prévia em estufa também pode ser uma condição que favoreça a produção enzimática, pois segundo Santi Junior (2011) a secagem reduz o número total de poros do material e um baixo conteúdo de umidade pode ser desfavorável para o crescimento microbiano (BANSAL et al., 2012).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições aplicadas o co-cultivo não foi eficiente na produção de enzimas lignolíticas. Entretanto, enzimas com atividade celulolítica foram determinadas em todas as condições de mono-cultivo e co-cultivo. O pré-tratamento com hidróxido de sódio 1% em condições ambientes foi determinante na produção de FPases e açúcares redutores utilizando o bagaço de cana de açúcar como biomassa, sendo desfavorável o tratamento com *C. subvermispora*. Porém, para a produção de CMCase o co-cultivo apresentou os melhores resultados, dispensando o uso do pré-tratamento alcalino e assim reduzindo os custos de produção. Já para o uso de palha de milho como biomassa, o pré-tratamento alcalino com posterior co-cultivo dos micro-organismos foi a condição que mais favoreceu a produção de FPase e de açúcares redutores. A condição que mais favoreceu a produção de CMCase também foi a ausência do pré-tratamento químico e o co-cultivo. De modo geral, o co-cultivo foi eficiente para produção de enzimas celulolíticas e

disponibilização de açúcares redutores, apresentando melhores resultados para a palha de milho.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010. Disponível em: <<http://200.201.88.199/portaispos/media/File/caroline.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

BABIČ, J.; LIKOZAR, B.; & PAVKO, A. Optimization of ligninolytic enzyme activity and production rate with *Ceriporiopsis subvermispota* for application in bioremediation by varying submerged media composition and growth immobilization support. **International journal of molecular sciences**, vol. 13, n. 9, p. 11365-11384, 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/13/9/11365/htm>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; KUMAR, S. S. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, vol. 32, p. 1341–1346, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X1200089X>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, vol. 33, n. 1, p. 181-188, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, vol. 9, n. 1, jan./jun. 2008.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Etanol 2G depende do aprimoramento de enzimas**, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1917538/etanol-2g-depende-do-aprimoramento-de-enzimas>> Acesso em: 10 ago. 2016.

GHORI, M. I.; AHMED, S.; MALANA, M. A.; JAMIL, A. Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567. **African Journal of Biotechnology**, vol. 10, n. 31, p. 5878-5886, 2013. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/article/article1380901083_Ghori%20et%20al.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

GUERRA, Anderson de Almeida. **Biodegradação de madeira por Ceriporiopsis subvermispora: caracterização dos polímeros residuais**. 2002. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-20022015-135400/pt-br.php>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

HU, H. L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WÖSTEN, H. A. B.; GU, J. D.; & DE VRIES, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 65, n. 1, p. 248-252, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830510002015>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

LAL B.; SARMA P. M. **Wealth from Waste Trends and Technologies**. Third edition. India: The Energy and Resources Institute, 2011.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 65, p. 717-725, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830511000722>> Acesso em: 10 ago. 2016.

MARQUES, N. P. **Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos**. 2013. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013. Disponível em: <<http://acervodigital.unesp.br/handle/11449/88017>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

MENDES, Andre Aguiar. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por Ceriporiopsis subvermispora**. 2008. Tese (Doutorado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-20092012-122707/pt-br.php>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. Disponível: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/4074?show=full>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

NEE'NIGAM, P. S.; PANDEY, A. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. Springer Netherland. p. 197-221, 2009. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-9942-7_10#page-2>. Acesso em: 10 ago. 2016.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª Edição. Bookman, 2010.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, vol. 46, n. 8, p. 912-919, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v46n8/18.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SANTI JUNIOR, Celso. **Distribuição do tamanho de poros e sacarificação enzimática de amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à deslignificação e secagem**. 2012. Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-22082013-162558/en.php>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/etanol-de-2a-geracao-por-zymomonas-mobilis.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SHARMA, N.; KAUSHAL, R.; GUPTA, R., KUMAR, S. A biodegradation study of forest biomass by *Aspergillus niger* F7: Correlation between enzymatic activity, hydrolytic percentage and biodegradation index. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 467-475, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v43n2/06.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SINGH, R.; KUMAR, R. BISHNOI, K.; BISHNOI, N. R. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 48, p. 28–35, 2009. Disponível em: <<http://fulltext.study/preview/pdf/4050.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

SRIARIYANUN, M.; TANTAYOTAI, P.; YASURINC, P.; PORNWONGTHONG, P.; CHEENKACHORN, K. Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus sp.* isolated from rice paddy field soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 19, p. 23–28, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345815001487>>.
Acesso em: 10 ago. 2016.

TANAKA, H.; KOIKE, K.; ITAKURA, S.; ENOKI, A. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 45, n. 5, p. 384-390, 2009. Disponível em:
<<http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Ceriporiopsis.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88** - Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2013. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103342/1/BPD13017.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

VILELA, E. D. S. **Análise da produção de celulases e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces sp.*** 2013. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. Disponível em:
<<https://pos.icb.ufg.br/up/101/o/Elvia.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion Microbiology**, vol. 14, n. 13, 2011. Disponível:
<http://bioenergycenter.org/besc/publications/wilson_microbial.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

Enviado em: 31 ago. 2016
Aceito em: 24 nov. 2016

Editor responsável: Alysson Ramos Artuso