DARLISSON DE ALEXANDRIA SANTOS

**Produção de celulasas por fungos de ambiente marinho e terrestre
para uso na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e produção de 2,3-
butanodiol pela bactéria *Serratia marcescens* a partir de glicose e
glicerol**

São Carlos

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Darlisson de Alexandria Santos

**Produção de celulases por fungos de ambiente marinho e terrestre
para uso na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e produção de 2,3-
butanodiol pela bactéria *Serratia marcescens* a partir de glicose e
glicerol**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
como pré-requisito para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientador: André Luiz Meleiro Porto

Co-orientador: Luis Joaquim Pina da Fonseca

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2017

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade da vida e de novas descobertas a cada dia me ajudando a me conhecer como ser humano.

Aos meus pais, Josefa de Alexandria (Trindade) e José Aparecido (Zé Binha) ao meu irmão Diego de Alexandria. Muito obrigado pela educação que me concederam, me conferindo valores morais que durarão por toda a minha vida, por partilharem comigo cada sonho e principalmente por todo amor que me deram a cada dia ao longo desses 4 anos distante de casa. Aos demais familiares que também me acompanharam à distância e sempre torceram por mim.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, pela orientação profissional, pelas palavras de encorajamento e pela oportunidade de realizar o doutorado sob sua supervisão, o qual será uma referência na minha atuação profissional pela maneira como trata a todos os seus alunos e demais funcionários do IQSC.

Ao Prof. Dr. Luis Joaquim Pina da Fonseca, pela orientação durante o ano em que fiquei em seu laboratório no Instituto Superior Técnico e pela total liberdade para que eu aprendesse novas técnicas.

Ao Prof. Dr. Antonio Aprígio da Silva Curvelo, pela parceria na coleta e tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, abrindo as portas do seu laboratório para que realizasse todos os experimentos necessários.

Aos colegas/amigos do laboratório LQOB durante todo o tempo de pesquisa, Aline, Ana Maria, Charlene, David, Iara, Irlon, Lenilson, Lucas, Marylyn, Natália, Paulo, Samuel, Sandra (*in memoriam*), Rafaely e Willian, bem como à técnica do laboratório Marília, sempre prestativa a nos ajudar. Todos vocês contribuíram de alguma forma para meu crescimento.

Aos colegas/amigos adquiridos em Portugal, Ana Catarina, Ana Pfluck, Ângela, Flávio, Inês, Ivo, João, Marcel, Patrícia, Petar e Samuel. Muito obrigado, vocês foram responsáveis por um ano de muita aventura em terras lusitanas e espero que a vida nos dê a chance de nos reencontrarmos.

Aos muitos amigos conquistados em São Carlos fora do meio acadêmico. Com vocês eu passei os melhores fins de semana, sem contar as inúmeras vezes que nos víamos durante a semana. Não citarei o nome de todos por faltar espaço.

Agradeço especialmente a Lucas Samorano, Liane Barostochi e Rafael Barostichi, os quais deixaram de ser amigos e se tornaram família. Apreendi muito

convivendo com vocês e tenho certeza que continuarei aprendendo com a convivência que teremos durante o futuro que nos aguarda.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP), incluindo aqui todos os funcionários que contribuíram em algum aspecto da minha formação.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse projeto.

RESUMO GERAL

O Capítulo 1 descreve a produção de celulases por 4 linhagens fúngicas de ambiente marinho (*Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Mucor racemosus* CBMAI 847) e uma linhagem de ambiente terrestre (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198) cultivados em meio sólido composto por farelo de trigo (5 g) e solução de peptona ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$) enriquecida com sais inorgânicos. Foram realizadas otimizações da temperatura, pH inicial e umidade do meio de cultura das linhagens obtendo-se maiores atividades celulolíticas na faixa de temperatura entre 25-35 °C, com exceção do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 que foi de 40 °C, e valores diferentes de pH ótimo, desde condições acídicas até alcalinas, bem como valores diferentes de teor de umidade ótima. Quando avaliou-se a influência do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático durante a hidrólise do papel de filtro cada conjunto de celulases produzidas apresentou pontos ótimos diferentes entre elas, e em alguns casos, dois valores ótimos de pH e temperatura. As celulases produzidas nas condições ótimas determinadas foram aplicadas na hidrólise da celulose do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado usando-se 10 U FPU/g de bagaço de cana-de-açúcar. As celulases dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *A. sydowii* CBMAI 934 apresentaram a maior capacidade para hidrolisar o bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado, 75% e 78% de degradação do material lignocelulósico, respectivamente. No Capítulo 2 foi avaliada a capacidade de 6 bactérias isoladas de turfeira (*Bacillus subtilis* LQOB-SE1, *B. coagulans* LQOB-SE2, *B. pumilus* LQOB-SE3, *Brevibacillus brevis* LQOB-SE4, *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5 e *Serratia marcescens* LQOB-SE6) em produzir 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicerol e a bactéria que apresentou tal capacidade (*S. marcescens* LQOB-SE6) foi usada para produzir 2,3-butanodiol também a partir da fermentação de glicose visando o reaproveitamento dos resíduos gerados na produção de biodiesel e de etanol. As melhores condições para o uso do glicerol foram: pH inicial 7, *Caldo nutriente* 8 g.L^{-1} , concentração inicial de glicerol 50 g.L^{-1} e tempo de cultivo de 7 dias. Foram obtidos bons rendimento ($0,30 \text{ g.g}^{-1}$), produtividade ($0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e concentração máxima de 2,3-butanodiol ($22,4 \text{ g.L}^{-1}$). As melhores condições para a fermentação da glicose foram: pH inicial 7, *Caldo nutriente* 8 g.L^{-1} , concentração inicial de glicose 75 g.L^{-1} e tempo de cultivo de 5 dias. Obteve-se um rendimento de $0,42 \text{ g.g}^{-1}$ em 5 dias de fermentação, produtividade de $0,45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ após 2 dias e concentração máxima de 2,3-butanodiol de $31,2 \text{ g.L}^{-1}$. A produção de 2,3-butanodiol a partir do hidrolisado gerado na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelas celulases do fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 não foi observada devido à baixa concentração de açúcares no hidrolisado. Os resultados obtidos nesta tese mostram o potencial biotecnológico da microbiota fúngica e bacteriana isoladas de diferentes biomas brasileiros.

GENERAL ABSTRACT

In Chapter 1 it is reported the cellulase production by 4 marine-derived fungi strains (*Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 and *Mucor racemosus* CBMAI 847) and 1 terrestrial fungi strain (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198). They were grown in solid state fermentation using wheat straw as substrate (5 g) and with addition of peptone solution (0,75 g.L⁻¹) enriched with inorganic salts. It was performed the enhancement of the growth conditions by changing the temperature, initial pH and moisture. The optimum temperature for all strains varied between 25-35 °C but *A. sydowii* CBMAI 935 with 40 °C. The optimum pH was different for each strain, varying from acidic to alkaline conditions. The optimum moisture content also varied accordingly the studied strain. In order enhance the cellulose hydrolysis performed by the produced cellulases, it was varied the pH, temperature and amount of the crude cellulase extract during the filter paper hydrolysis reaction. The obtained optimum values were different among strains and, in some cases, there were two optimum pH and temperature for the hydrolysis of the filter paper. Then, the obtained cellulases, using the best conditions for hydrolysis, were used in the sugarcane bagasse hydrolysis (10 FPU/g of sugarcane bagasse). The cellulases from the strains *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 and *A. sydowii* CBMAI 934 were capable of degrading 75% and 78% of the sugarcane bagasse, respectively, generating reducing sugars. In Chapter 2, the capability of 6 strains (*Bacillus subtilis* LQOB-SE1, *B. coagulans* LQOB-SE2, *B. pumillus* LQOB-SE3, *Brevibacillus brevis* LQOB-SE4, *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5 and *Serratia marcescens* LQOB-SE6), isolated from peat soil, of producing 2,3-butanediol from glycerol fermentation. The only strain that produced 2,3-butanediol was *S. marcescens* LQOB-SE6, which was also applied in 2,3-butanediol production from glucose fermentation. Therefore, wastes from biodiesel and bioethanol production can be reused in industrial scale. The best conditions for glycerol fermentation: initial pH 7, *Nutrient Broth* (8 g.L⁻¹), initial glycerol concentration (50 g.L⁻¹) and fermentation time of 7 days. It were obtained good yield (0.30 g.g⁻¹), productivity (0.13 g.L⁻¹.h⁻¹) and 2,3-butanediol concentration (22.4 g.L⁻¹). The best conditions for glucose fermentation: initial pH 7, *Nutrient Broth* (8 g.L⁻¹), initial glucose concentration (75 g.L⁻¹) and fermentation time of 5 days. It were also obtained good yield (0.42 g.g⁻¹) and 2,3-butanediol concentration (31.2 g.L⁻¹) after 5 days and productivity (0.45 g.L⁻¹.h⁻¹) after 2 days. The 2,3-butanediol production from the hydrolysate of sugarcane bagasse, obtained by using cellulases from *A. sydowii* CBMAI 934, was not observed due the low sugar concentration in the hydrolysate.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Representação química da estrutura molecular da celulose (Adaptado de BUANAFINA & COSGROVE, 2014)	4
Figura 2. Representação estrutural da hemicelulose do tipo arabinoxilana (Adaptado de CORREIA et al., 2011).	5
Figura 3. Representação esquemática da estrutura da hemicelulose (Adaptado de BUANAFINA & COSGROVE, 2014).	6
Figura 4. Representação dos principais precursores da lignina e das estruturas presentes em materiais lignocelulósicos mais macios como grama e cana-de-açúcar (adaptado de ADLER, 1977).	7
Figura 5. Representação esquemática do processo de hidrólise da celulose e a respectiva função das celulasas envolvidas (OGEDA & PETRI).	9
Figura 6. Mecanismos de hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas realizados por enzimas glicosidases com inversão (a) ou retenção (b) de configuração.	11
Figura 7. Esquematização da produção de celulasas por linhagens fúngicas.	38
Figura 8. Equação química da reação de oxirredução entre a glicose e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).	39
Figura 9. Esquematização das etapas de coleta, tratamento, caracterização e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.	47
Figura 10. Atividades enzimáticas celulolíticas de cada fungo determinadas de acordo com o período de cultivo.	51
Figura 11. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.	53
Figura 12. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.	54
Figura 13. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.	55
Figura 14. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em SSF.	56
Figura 15. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.	57
Figura 16. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.	59
Figura 17. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.	60
Figura 18. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.	60

Figura 19. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.	61
Figura 20. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.	62
Figura 21. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.	64
Figura 22. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.	65
Figura 23. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.	66
Figura 24. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.	67
Figura 25. Atividade enzimática determinada para o fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.	68
Figura 26. SDS-PAGE de celulase de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .	74
Figura 27. Separação obtida das proteínas presentes no complexo celulásico comercial de <i>T. longibrachiatum</i> através da focalização isoeletrica.	75
Figura 28. SDS-PAGE das frações de celulasas de <i>T. longibrachiatum</i> obtidas por cromatografia de troca iônica usando as matrizes Q-Sepharose e SP-Sepharose.	76
Figura 29. SDS-PAGE das amostras contendo proteínas obtidas através da separação da formulação celulásica comercial de <i>T. longibrachiatum</i> usando Q-Sepharose.	77
Figura 30. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação da formulação celulásica comercial de <i>T. longibrachiatum</i> por Q-Sepharose usando tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.	79
Figura 31. Cromatograma obtido da purificação de celulasas de <i>T. longibrachiatum</i> usando tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,02 M, pH 6,8) como eluente com adição gradiente de NaCl 0,3 M.	81
Figura 32. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação da formulação celulásica comercial de <i>T. longibrachiatum</i> por Q-Sepharose em larga escala, usando tampão fosfato 0,02 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.	82
Figura 33. SDS-PAGE dos extratos celulásicos produzidos pelos fungos de ambiente marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 cultivados em meio sólido de farelo de trigo.	83

Figura 34. Focalização isoeétrica dos extratos celulásicos produzidos pelos fungos de ambiente marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 cultivados em meio sólido de farelo de trigo.	84
Figura 35. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação do extrato celulásico de <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 por Q-Sepharose usando tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.	86
Figura 36. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação do extrato celulásico de <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 por Q-Sepharose usando tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.	86
Figura 37 - Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) da temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre a atividade das celulasas do fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.	91
Figura 38. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 utilizando papel de filtro como substrato.	93
Figura 39. Efeito do pH na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 utilizando papel de filtro como substrato.	94
Figura 40. Efeito do volume de extrato enzimático na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 utilizando papel de filtro como substrato.	95
Figura 41. Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre as celulasas do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.	98
Figura 42. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 utilizando papel de filtro como substrato.	100
Figura 43. Efeito do pH e do tipo de tampão usado na reação para a liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 utilizando papel de filtro como substrato.	101
Figura 44. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 utilizando papel de filtro como substrato.	102
Figura 45. Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre as celulasas do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.	106
Figura 46. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 utilizando papel de filtro como substrato.	108

Figura 47. Efeito do pH do tampão na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 utilizando papel de filtro como substrato.	109
Figura 48. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 utilizando papel de filtro como substrato.	110
Figura 49. Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre as celulasas do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.	113
Figura 50. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 utilizando papel de filtro como substrato.	114
Figura 51. Efeito do pH do tampão na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 utilizando papel de filtro como substrato.	115
Figura 52. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 utilizando papel de filtro como substrato.	116
Figura 53. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 utilizando papel de filtro como substrato.	117
Figura 54. Efeito do pH do tampão na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 utilizando papel de filtro como substrato.	118
Figura 55. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 utilizando papel de filtro como substrato.	119

Capítulo 2

Figura 1. Estereoisômeros do 2,3-butanodiol.	151
Figura 2. Metabolismo do piruvato da bactéria <i>Lactococcus lactis</i> contendo as rotas metabólicas para a produção de etanol, acetato, formiato, lactato e 2,3-butanodiol (CELINSKA & GRAJEK, 2009).	161
Figura 3. Representação geral da rota metabólica de possíveis produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos (DA SILVA et al., 2009).	163
Figura 4. Proposta de rotas metabólicas para a formação dos estereoisômeros do 2,3-butanodiol por <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. polymyxa</i> (UI et al., 1984 e 1986; JI et al., 2011).	165
Figura 5. Curva analítica usada na quantificação do composto <i>meso</i> -2,3-butanodiol.	171

Figura 6. Curva analítica usada na quantificação do composto <i>quiral-2,3</i> -butanodiol.	171
Figura 7. Cromatograma obtido por CG/DIC a partir da fermentação do glicerol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 após 5 dias de cultivo.	173
Figura 8. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação de glicerol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 usando a concentração de <i>Caldo nutriente</i> de 4 g.L ⁻¹ (vermelho) e 8 g.L ⁻¹ (azul).	175
Figura 9. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação do glicerol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 na presença (vermelho) ou ausência (azul) de sais no meio de cultura.	176
Figura 10. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 frente a variação da concentração inicial de glicerol	177
Figura 11. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação do glicerol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 usando-se as concentrações iniciais de glicerol de 25 g.L ⁻¹ (vermelho) e 75 g.L ⁻¹ (azul).	178
Figura 12. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 frente a variação do pH inicial do meio de fermentação	180
Figura 13. Cromatogramas obtidos por CG/DIC partir da fermentação do glicerol pela bactéria <i>S. marcescens</i> usando diferentes valores de pH inicial.	181
Figura 14. Cromatograma obtido por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 após 5 dias de cultivo (pH 7, 130 rpm, 32 °C).	184
Figura 15. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 frente a variação da concentração inicial de glicose	185
Figura 16. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 usando-se as concentrações iniciais de glicose de 50 g.L ⁻¹ (preto) e 75 g.L ⁻¹ (vermelho).	186
Figura 17. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 variando-se as concentrações iniciais de <i>Caldo nutriente</i> de 2 g.L ⁻¹ (preto), 4 g.L ⁻¹ (azul) e 8 g.L ⁻¹ (vermelho).	188
Figura 18. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 frente a variação da concentração inicial de <i>Caldo nutriente</i>	188
Figura 19. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 frente a variação do pH inicial do meio de fermentação	189
Figura 20. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 usando diferentes valores de pH inicial.	190

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Exemplos de microrganismos produtores de celulases.	16
Tabela 2. Exemplos de microrganismos de ambiente marinho produtores de celulases.	18
Tabela 3. Materiais lignocelulósicos usados na composição dos meios de cultivo SSF para produção de celulases.	20
Tabela 4. Valores de pH e temperatura ótimos para a obtenção da máxima atividade das celulases.	23
Tabela 5. Métodos cromatográficos usados na purificação de celulases.	24
Tabela 6. Tipos de pré-tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos para a remoção de lignina.	26
Tabela 7. Métodos de pré-tratamentos empregados no bagaço de cana-de-açúcar para melhoramento da hidrólise enzimática da celulose.	28
Tabela 8. Celulases microbianas usadas na sacarificação de diferentes materiais lignocelulósicos.	29
Tabela 9. Lista de reagentes utilizados no trabalho.	31
Tabela 10. Percentual de adição do eluente B (NaCl 0,3 M) na fase móvel durante purificação de celulases usando AKTA purifier 100.	41
Tabela 11. Atividades celulolíticas das linhagens fúngicas cultivadas em meio de cultivo em estado sólido (SSF).	49
Tabela 12. Valores das atividades para <i>FPase</i> inicial e final após o melhoramento das condições de cultivo dos fungos visando a produção de celulases.	69
Tabela 13. Relação das atividades <i>FPase</i> produzidas por fungos terrestres descritos na literatura com as atividades enzimáticas obtidas nesse trabalho em meio SSF usando farelo de trigo como substrato.	70
Tabela 14. Extração das celulases remanescentes adsorvidas no farelo de trigo após a primeira extração com tampão acetato.	71
Tabela 15. Atividades <i>FPase</i> , <i>CMCase</i> e <i>Celobiase</i> após o melhoramento das condições de cultivo para a produção de celulases.	73
Tabela 16. Atividade <i>CMCase</i> das amostras obtidas na separação da formulação celulásica comercial de <i>T. longibrachiatum</i> usando Q-Sepharose.	78
Tabela 17. Atividade <i>CMCase</i> das frações obtidas na separação da formulação celulásica comercial de <i>T. longibrachiatum</i> usando Q-Sepharose e NaCl adicionado ao tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8) como eluente.	80

Tabela 18. Níveis reais e codificados das variáveis independentes estudadas no processo de hidrólise da celulose via extrato enzimático dos fungos <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198, <i>A. sydowii</i> CBMAI 934, <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847.	88
Tabela 19. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2 ³ com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 para a determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.	89
Tabela 20. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do extrato enzimático para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198.	90
Tabela 21. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2 ³ com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 para a determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.	96
Tabela 22. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934.	97
Tabela 23. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2 ³ com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 para determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.	104
Tabela 24. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático do fungo <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186. Em vermelho destacam-se os resultados significativos para o estudo, ou seja, variáveis que obtiveram valor-p<0,05.	105
Tabela 25. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2 ³ com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 para determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.	111
Tabela 26. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847. Em vermelho destacam-se os resultados significativos para o estudo, ou seja, variáveis que obtiveram valor-p<0,05.	112
Tabela 27. Valores de pH e temperatura para obtenção de atividade ótima de celulasas produzidas por microrganismos de ambiente marinho.	121
Tabela 28. Rendimentos obtidos para o pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes tempos.	122
Tabela 29. Percentuais dos componentes principais presentes no bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento alcalino com NaOH.	124
Tabela 30. Percentuais de perda de massa (g) dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento alcalino (NaOH).	125

Tabela 31. Percentual de sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar após a hidrólise enzimática com os extratos enzimáticos (1 U <i>FPAse</i>) das linhagens fúngicas.	126
---	-----

Capítulo 2

Tabela 1. Produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicose por diferentes microrganismos.	154
Tabela 2. Produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicerol por diferentes microrganismos.	159
Tabela 3. Rendimento e produtividade obtidos de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 ao longo do tempo de cultivo.	182
Tabela 4. Comparação entre os valores de rendimentos e produtividades obtidos na produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol com resultados descritos na literatura para diferentes microrganismos.	183
Tabela 5. Rendimentos e produtividades obtidos a partir da fermentação da glicose pela bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 ao longo do tempo de cultivo.	191
Tabela 6. Dados de rendimentos e produtividades obtidos na produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose com microrganismos relatados na literatura e com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6.	192

ÍNDICE

Capítulo 1

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Bagaço da cana-de-açúcar	11
1.2. Metodologias usadas para a produção de celulasas	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Microrganismos produtores de celulasas	15
2.1.1. Microrganismos de ambiente marinho produtores de celulasas	16
2.2. Variação da composição do meio de cultivo SSF para fungos	18
2.3. Influência do pH e da temperatura na produção de celulasas	21
2.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática	22
2.5. Purificação de celulasas	23
2.5.1. Cromatografia de troca iônica	24
2.6. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para remoção de lignina	25
2.6.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	27
2.7. Sacarificação de materiais lignocelulósicos usando celulasas	28
3. OBJETIVO	30
3.1. Geral	30
3.2. Metas	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Reagentes, solventes, meios de cultura e enzimas	31
4.2. Fungos de ambiente marinho	32
4.3. Fungos terrestres	32
4.4. Cultivo dos fungos	33
4.4.1. Meio de cultura contendo extrato de malte	33
4.4.2. Preparo da solução de esporos para inóculo das linhagens fúngicas	34
4.4.3. Fermentação em estado sólido (SSF)	34
4.5. Extração do caldo enzimático contendo as celulasas	35

4.6. Determinação da atividade de enzimas celulolíticas	35
4.6.1. Determinação da atividade de celulases totais (<i>FPase</i>)	36
4.6.2. Determinação da atividade das <i>endo</i> -celulases (<i>CMCase</i>)	36
4.6.3. Determinação da atividade das β -glucosidases (<i>Celobiase</i>)	37
4.7. Análise de açúcares redutores pelo método de DNS	38
4.7.1. Preparação do reagente DNS	39
4.7.2. Construção da curva analítica para a quantificação dos açúcares redutores	39
4.8. Purificação das celulases	40
4.8.1. Separação e purificação de celulases em pequena escala	40
4.8.2. Separação e purificação de celulases por AKTA purifier 100	41
4.8.3. Determinação das proteínas totais por BCA	41
4.8.4. Focalização isoeletrica	42
4.8.5. Caracterização proteica por SDS-PAGE	42
4.9. Pré-tratamento da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar	43
4.9.1. Separação de diferentes partes da cana-de-açúcar para pré-tratamento	43
4.9.2. Processo de deslignificação Soda/Antraquinona	43
4.9.3. Caracterização das polpas obtidas por método Klason modificado	44
4.10. Determinação dos teores de açúcares obtidos pelo método Klason modificado por HPLC	45
4.11. Hidrólise das polpas lignocelulósicas obtidas a partir do pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar e do bagaço sem pré-tratamento por extratos enzimáticos fúngicos	46
4.12. Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. <i>Screening</i> para determinação da atividade celulolítica dos fungos	49
5.2. Otimização das condições de cultivo dos fungos para uma maior produção de celulases	50
5.2.1. Curva de crescimento dos fungos	50
5.2.2. Determinação da temperatura ótima para a produção de enzimas celulolíticas (<i>FPase</i>) pelos fungos <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198, <i>A. sydowii</i> CBMAI 934, <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	52
5.2.2.1. <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	52

5.2.2.2. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	53
5.2.2.3. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	54
5.2.2.4. <i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	55
5.2.2.5. <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	56
5.2.3. Determinação do valor de pH ótimo para a produção de enzimas celulolíticas (FPase) pelos fungos <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198, <i>A.</i> <i>sydowii</i> CBMAI 934, <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, <i>P. citrinum</i> CBMAI 1186 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	58
5.2.3.1. <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	58
5.2.3.2. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	59
5.2.3.3. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	60
5.2.3.4. <i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	61
5.2.3.5. <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	61
5.2.4. Determinação do volume de solução de peptona no meio de cultivo durante a produção de enzimas celulolíticas (FPase)	63
5.2.4.1. <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	64
5.2.4.2. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	64
5.2.4.3. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	65
5.2.4.4. <i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	66
5.2.4.5. <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	67
5.2.5. Produção de celulasas usando os valores ótimos das variáveis temperatura, pH e umidade obtidos durante melhoramento do cultivo fúngico	69
5.2.6. Determinação da atividade enzimática remanescente no meio de cultura através de uma segunda extração enzimática	71
5.2.7. Determinação das atividades <i>CMCase</i> e <i>Celobiase</i> presentes nos extratos fúngicos	72
5.3. Purificação de celulasas por cromatografia de troca iônica	73
5.3.1. SDS-PAGE da celulase comercial de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	73
5.3.2. Determinação do ponto isoelétrico das celulasas	74
5.3.3. Separação das proteínas da formulação celulásica comercial de <i>T.</i> <i>longibrachiatum</i> por cromatografia de troca iônica	75
5.3.3.1. Separação usando variação de pH	75
5.3.3.2. Separação usando adição de NaCl	78

5.3.4. Purificação em larga escala usando Akta purifier 100	80
5.3.5. SDS-PAGE dos extratos celulásicos dos fungos de ambiente marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	82
5.3.6. Purificação das celulases presentes nos extratos celulásicos dos fungos de ambiente marinho <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 e <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	85
5.4. Determinação das melhores condições experimentais para a liberação de açúcares redutores pelas celulases presentes no extrato enzimático das linhagens estudadas através de experimentação convencional e planejamento experimental	87
5.4.1. <i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	88
5.4.1.1. Planejamento fatorial 2^3	88
5.4.1.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente	92
5.4.1.2.1. Temperatura	92
5.4.1.2.2. pH do tampão da reação	93
5.4.1.2.3. Volume de extrato enzimático	94
5.4.2. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	95
5.4.2.1. Planejamento fatorial 2^3	95
5.4.2.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente	99
5.4.2.2.1. Temperatura	99
5.4.2.2.2. pH do tampão da reação	100
5.4.2.2.3. Volume de extrato enzimático	102
5.4.3. <i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	101
5.4.3.1. Planejamento fatorial 2^3	101
5.4.3.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente	107
5.4.3.2.1. Temperatura	107
5.4.3.2.2. pH do tampão da reação	108
5.4.3.2.3. Volume de extrato enzimático	109
5.4.4. <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	110
5.4.4.1. Planejamento fatorial 2^3	110
5.4.4.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente	114
5.4.4.2.1. Temperatura	114

5.4.4.2.2 pH do tampão da reação	115
5.4.4.2.3. Volume de extrato enzimático	116
5.4.5. <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	116
5.4.5.1. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente	117
5.4.5.1.1. Temperatura	117
5.4.5.1.2. pH do tampão da reação	118
5.4.5.1.3. Volume de extrato enzimático	119
5.5. Pré-tratamento básico (Soda/Antraquinona) do bagaço de cana-de-açúcar	121
5.6. Hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar	125
6. CONCLUSÃO	130
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

Capítulo 2

RESUMO	149
ABSTRACT	150
1. INTRODUÇÃO	151
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	153
2.1. Microrganismos usados na produção de 2,3-butanodiol	153
2.2. Substratos usados na produção de 2,3-butanodiol	155
2.2.1. Resíduos da indústria alimentícia	155
2.2.2. Açúcares obtidos a partir de materiais lignocelulósicos	157
2.2.3. Glicerol	158
2.3. Rotas metabólicas para a produção de 2,3-butanodiol	160
2.3.1. Rota a partir da glicose	160
2.3.2. Rota a partir do glicerol	162
2.3.3. Rotas de produção dos estereoisômeros	164
3. OBJETIVOS	166
3.1. Gerais	166
3.2. Metas	166
4. MATERIAIS E MÉTODOS	167

4.1. Reagentes e solventes	167
4.2. Linhagens de bactérias usadas nas fermentações	167
4.3. Meio de cultura	167
4.4. Fermentação em meio líquido	168
4.5. Variação das condições de cultivo durante o processo de fermentação com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	168
4.5.1. Composição do meio de cultura	168
4.5.2. pH de cultivo	168
4.5.3. Concentração dos substratos e tempo de cultivo	169
4.6. Produção de 2,3-butanodiol a partir de açúcares liberados a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	169
4.7 Análises da produção de 2,3-butanodiol	169
4.7.1. Centrifugação	170
4.7.2 Análise da concentração de 2,3-butanodiol por cromatografia gasosa (CG/DIC)	170
4.7.3. Quantificação de 2,3-butanodiol por CG/DIC	170
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	172
5.1 <i>Screening</i> das bactérias isoladas de turfeira capazes de produzir o 2,3-butanodiol	172
5.2. Melhoramento da produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol pela variação das condições de cultivo da bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	173
5.2.1. Influência da composição do meio de cultura na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	174
5.2.2. Influência da concentração inicial de glicerol na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	176
5.2.3. Influência do pH inicial do meio de cultura durante a produção de 2,3-butanodiol a partir do glicerol na presença da bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	179
5.2.4. Influência do tempo de fermentação do glicerol na produção de 2,3-butanodiol na presença da bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	181
5.3. Melhoramento da produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose pela variação das condições de cultivo da bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	184
5.3.1. Influência da concentração inicial de glicose na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6	185

5.3.2. Influência da composição do meio de cultura na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 na presença de glicose	186
5.3.3. Influência do pH inicial do meio de cultura durante a produção de 2,3-butanodiol com a bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 na presença de glicose	189
5.3.4. Influência do tempo de fermentação da bactéria <i>S. marcescens</i> LQOB-SE6 na presença de glicose visando a produção de 2,3-butanodiol	191
5.4. Produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação dos açúcares liberados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934	192
6. CONCLUSÃO	194
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS DE AMBIENTE MARINHO E TERRESTRE VISANDO A HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

Neste trabalho foi realizada uma triagem com 10 fungos de ambiente marinho e 2 de ambiente terrestre com o objetivo de avaliar o potencial dessas linhagens em degradar celulose para posterior aplicação na hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar. Para tanto, os mesmos foram cultivados em meio de cultura sólido composto por farelo de trigo (5 g) e solução de peptona ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$) enriquecida com sais inorgânicos. O teste de atividade foi realizado após a extração das enzimas extracelulares com 50 mL de tampão acetato 50 mM (pH 4,5) usando como substrato o papel de filtro Whatman Nº 1 (1 x 6 cm), 1 mL do extrato enzimático e 2 mL de tampão citrato 50 mM (pH 4,8). Dentre as linhagens avaliadas, 5 foram selecionados para a continuação do trabalho por apresentarem as maiores atividades celulolíticas. Foram de ambiente marinho os fungos *A. sydowii* CBMAI 934 ($0,08 \text{ U.mL}^{-1}$), *A. sydowii* CBMAI 935 ($0,06 \text{ U.mL}^{-1}$), *P. citrinum* CBMAI 1186 ($0,12 \text{ U.mL}^{-1}$) e *M. racemosus* CBMAI 847 ($0,06 \text{ U.mL}^{-1}$) e de ambiente terrestre o *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 ($0,08 \text{ U.mL}^{-1}$). Foram realizadas otimizações dos principais parâmetros de cultivo das linhagens obtendo-se maiores atividades celulolíticas na faixa de temperatura entre 25-35 °C, com exceção do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 que foi em 40 °C. A variação do pH (3-8) e do teor de umidade foram avaliadas observando-se que cada linhagem fúngica apresentou valores de pH ótimo diferentes, os quais foram desde condições acídicas até alcalinas, bem como teor de umidade ótima. Quando avaliada a influência do pH, da temperatura e da concentração de enzimas durante a hidrólise do papel de filtro notou-se que cada conjunto de celulasas produzidas apresentou pontos ótimos diferentes das demais, inclusive com algumas apresentando 2 valores de pH e temperatura ótimos. Esses mesmos parâmetros foram avaliados por planejamento experimental, sem, contudo, obter bons ajustes ao modelo matemático para cada uma das celulasas. Por fim foi testada a capacidade hidrolítica das enzimas celulásicas presentes no extrato enzimático dos fungos, usando as condições ótimas determinadas, para a hidrólise de celulose frente ao bagaço da cana-de-açúcar, o qual foi submetido a um processo de pré-tratamento alcalino, usando-se 10 U FPU/g de bagaço de cana-de-açúcar. Observou-se que o fungo terrestre *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e o fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 produziram as celulasas com maior capacidade de hidrolisar o bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado, 75% e 78% de degradação do material lignocelulósico, respectivamente, e a capacidade de hidrolisar o bagaço não tratado foi de 4% e 21%, respectivamente.

ABSTRACT

In this work, the potential of 10 marine-derived and 2 terrestrial fungi strains in degrading cellulose was studied, aiming the application in the hydrolysis of sugarcane bagasse. The fungi were grown in solid state fermentation using wheat straw (5 g) and peptone solution (0.75 g.L⁻¹) enriched with inorganic salts. The cellulase activity was determined after the enzyme extraction (50 mL of acetate buffer 50 mM, pH 4.5, stirring for 1 h) using filter paper Whatman N° 1 (1 x 6 cm) as substrate, 1 mL of crude enzyme extract and 2 mL of citrate buffer 50 mM (pH 4.8). Five strains were selected for the next steps of this work due showing the highest activities among the 12 strains screened: the marine-derived *A. sydowii* CBMAI 934 (0,08 U.mL⁻¹), *A. sydowii* CBMAI 935 (0,06 U.mL⁻¹), *P. citrinum* CBMAI 1186 (0,12 U.mL⁻¹) and *M. racemosus* CBMAI 847 (0,06 U.mL⁻¹) and the terrestrial *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 (0,08 U.mL⁻¹). The optimization of the cultivation parameters (temperature, pH and moisture) showed that the best activities were achieved in temperatures varying between 25-35 °C, excepting the strain *A. sydowii* CBMAI 935 (40 °C), and the optimum pH and moisture were different for all the 5 strains, with pH varying from acidic to alkaline conditions. It was also performed the enhancement of the cellulose hydrolysis reaction, by determining the optimum temperature, pH and crude extract volume for filter paper hydrolysis using the produced cellulases. It was noticed that the strains produce cellulases with optimal conditions distinct from each other. This reaction was also studied by factorial design, but the obtained factorial models did not show good adjust with the experiments. After the improvement of the hydrolysis reaction conditions, the cellulases were applied in the hydrolysis of sugarcane bagasse, pretreated in alkaline conditions (NaOH 2%), using 10 U FPU/g of bagasse. The cellulases produced by the terrestrial strain *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 and the marine-derived strain *A. sydowii* CBMAI 934 showed the highest hydrolysis of the pretreated sugarcane bagasse, 75% and 78%, respectively, and the percentage of hydrolysis of the untreated bagasse was 4% and 21%, respectively.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por energia tem aumentado rapidamente nas últimas décadas, visto que a população mundial tem crescido e muitos países estão se tornando industrializados. No entanto, a produção de petróleo, a principal fonte de energia, segue no caminho inverso, pois, segundo previsões, a produção mundial declinará, a partir de 2002, em 20 bilhões de barris até 2050 (SUN & CHENG, 2002). Sendo assim, o uso de combustíveis de fontes renováveis ganhou maior destaque tendo em vista que podem ajudar a suprir a demanda mundial por energia, e estabelecer condições ambientais favoráveis além de uma economia sustentável (DAMARTZIS & ZABANIOTOU, 2011).

Deste modo o bioetanol ganhou destaque como combustível de fonte renovável, sendo o mesmo produzido no Brasil principalmente a partir da cana-de-açúcar, e, nos Estados Unidos da América, principalmente a partir do milho (MOHAMMADI et al., 2011).

Aproximadamente 90% dos automóveis produzidos atualmente no Brasil podem ser movidos a etanol ou gasolina ou mesmo pela mistura de ambos os combustíveis em qualquer proporção, os denominados *flexfuel*. O bioetanol passou a ser usado como combustível para veículos leves no Brasil em 1979 e, a partir de então, este biocombustível ganhou notoriedade no exterior, sendo que a produção mundial foi de 98,3 bilhões de litros em 2015 (WALKER, 2010; REN21, 2016).

Além do Brasil, outros países também produzem bioetanol a partir da cana-de-açúcar, como a China e a Índia. A beterraba, o trigo e o sorgo sacarino são outros exemplos de fontes primárias para a produção de bioetanol (WALKER, 2010).

Quando comparadas as duas principais fontes primárias, cana-de-açúcar e milho para a produção do etanol, a primeira apresenta menor custo de produção, maior redução de poluentes na atmosfera, melhor balanço energético, além de maior produtividade por hectare (POPPE & PERICO, 2009).

A tecnologia empregada para a produção de bioetanol é bem estabelecida, sendo ainda um desafio aumentar a produção usando a mesma área cultivada. Assim, novas tecnologias precisam ser desenvolvidas fazendo com que outras fontes de carboidratos destas culturas possam ser aproveitadas.

A produção de bioetanol no Brasil (2014) foi em torno de 27 bilhões de litros. Devido aos acordos internacionais para a redução de CO₂ e ao alto preço do petróleo, a

demanda mundial por este biocombustível aumentou nesse período. A estimativa de produção no Brasil para 2025 é de 43 bilhões de litros, o que torna necessária a duplicação da área plantada de cana-de-açúcar. Assim, os combustíveis de segunda geração, tais como os obtidos a partir de biomassa, passaram a ser alternativas para a produção de combustíveis líquidos. Dentre esses resíduos, o bagaço da cana-de-açúcar no Brasil é promissor, pois o mesmo é um subproduto da produção de bioetanol de primeira geração e é produzido em grande quantidade nas usinas sucroalcoleiras (LIMA et al., 2015).

Dentre toda a biomassa existente, os materiais lignocelulósicos destacam-se como os mais expressivos, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar, que pode ser usado para a obtenção de carboidratos (glicose, celobiose, xilose, arabinose), e, assim como toda a biomassa lignocelulósica, é constituída por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose compõem mais que dois terços dos resíduos lignocelulósicos (CANILHA et al., 2010).

A celulose é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas, sendo o polissacarídeo mais abundante na natureza e é encontrada majoritariamente nas paredes celulares de plantas e algas (SANTOS, 2008; CANILHA et al., 2010; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). O grau de solubilização da celulose é reduzido drasticamente com o aumento do grau de polimerização da cadeia, devido às ligações hidrogênio que ligam 36 unidades de glucanas (nome dado ao polissacarídeo composto por monômeros de D-glicose), e cada uma dessas unidades de glucana pode ser composta de até 15000 unidades de D-glicose unidas através de ligações β -1,4-glicosídicas (ROCHA, 2011; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016; BUANAFINA & COSGROVE, 2014). A celulose não apresenta ramificações em sua estrutura e sua unidade de repetição consiste do dímero de D-glicose denominado como celobiose (Figura 1).

Figura 1. Representação química da estrutura molecular da celulose (Adaptado de BUANAFINA & COSGROVE, 2014).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo, a qual é composta por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glicurônico e ácido 4-*O*-metilglicurônico em diferentes proporções, de acordo com a sua fonte (LAINE, 2005). Possui ramificações e seu grau de polimerização é inferior a 200 (CANILHA et al., 2010). Essas ramificações ligam-se facilmente à celulose conferindo estabilidade e flexibilidade. Devido apresentar composições diferentes para cada tipo de material lignocelulósico, a hemicelulose pode ser definida não como um componente químico específico, mas como um conjunto de polissacarídeos com características peculiares, uma vez que diferentes estruturas moleculares de hemicelulose são conhecidas e nomeadas como glucomananas, arabinoglucuronoxilanas, xiloglucanas, xilanas, arabinoxilanas, dentre outras denominações. (ROCHA, 2011; LAINE, 2005).

Na cana-de-açúcar, a hemicelulose mais comum é a arabinoxilana, constituída de uma cadeia principal composta por unidades de xilose, ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, apresentando ramificações com moléculas de arabinose, ácido ferúlico (ferulato) e ácido 4-*O*- α -D-metilglicurônico, e pode apresentar hidroxilas acetiladas em sua estrutura (Figura 2).

Figura 2. Representação estrutural da hemicelulose do tipo arabinoxilana (Adaptado de CORREIA et al., 2011).

Ace: acetato

Araf: α -L-arabinofuranose

Fae: Ferulato

Xylp: β -D-xilopirranose

4-O-MeGlcA: ácido 4-*O*- α -D-metilglicurônico

As cadeias de arabinoxilanas estão ligadas umas às outras por meio de ligações covalentes realizadas pelas moléculas de ácido ferúlico (ferulato) presentes na estrutura. O ácido ferúlico é também o responsável pela ligação entre a hemicelulose e outro componente importante dos materiais lignocelulósicos: a lignina. Essas ligações ocorrem através de reações de esterificação (BUANAFINA & COSGROVE, 2014). A Figura 3 mostra uma representação esquemática das ligações formadas na estrutura da hemicelulose.

Figura 3. Representação esquemática da estrutura da hemicelulose (Adaptado de BUANAFINA & COSGROVE, 2014).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante nos materiais lignocelulósicos. É uma estrutura complexa com um sistema heterogêneo e ramificado, sem uma estrutura repetidora definida, formada pela polimerização radicalar de unidades de fenilpropanoides (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico, álcool sinapílico, coniferaldeído e aceto de sinapila); e, junto com a celulose e a hemicelulose, forma uma matriz complexa, sendo a lignina responsável pela proteção à degradação química e/ou biológica e que propicia rigidez ao material lignocelulósico (ROCHA, 2011; CANILHA et al., 2010). A Figura 4 apresenta os principais precursores da lignina e de parte das

estruturas químicas presentes em materiais lignocelulósicos mais macios, como grama e cana-de-açúcar.

Figura 4. Representação dos principais precursores da lignina e das estruturas presentes em materiais lignocelulósicos mais macios como grama e cana-de-açúcar (adaptado de ADLER, 1977).

Devido à associação intra e intermolecular entre os três principais componentes dos materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), surgem dificuldades para a extração e aproveitamento dos açúcares que constituem a celulose e a hemicelulose na forma de monômeros com elevado grau de pureza, e são esses açúcares o alvo para a produção do etanol de segunda geração. Desta forma torna-se necessário o uso de técnicas de pré-tratamento da fração lignocelulósica (CANILHA et al., 2010).

Os processos de pré-tratamentos podem ser térmicos, químicos, físicos e/ou biológicos, sendo que devem idealmente:

- a) maximizar a digestibilidade enzimática;
- b) minimizar a perda de açúcares;
- c) otimizar a produção de subprodutos (ex. lignina);
- d) não requerer a adição de reagentes que venham a inibir as enzimas hidrolíticas e os microrganismos fermentativos;
- e) minimizar o uso de energia, reagentes e equipamentos;
- f) permitir a transposição para escala industrial (CANILHA *et al.*, 2010).

As metodologias mais estudadas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos são a hidrólise ácida e a enzimática (BINOD *et al.*, 2011).

Existem duas formas de hidrólise ácida: com *ácido concentrado* e com *ácido diluído*. Na hidrólise com *ácido concentrado* há uma ruptura das ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias de celulose, transformando-a em celulose amorfa. Uma vez desfeita a cristalinidade, a celulose se “transforma em uma gelatina homogênea” na presença do ácido, que quando diluída em água ocasiona a hidrólise nos respectivos monômeros de glicose. Embora esta técnica resulte na liberação dos monômeros dos açúcares, sabe-se que a mesma é tóxica e corrosiva, requerendo equipamentos resistentes à corrosão, o que torna o processo pouco viável economicamente. Além disso, uma grande quantidade de subprodutos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) é formada a partir da degradação dos monômeros dos açúcares obtidos, o que pode inibir a atividade enzimática no processo fermentativo (BINOD *et al.*, 2011).

A hidrólise com *ácido diluído* é uma alternativa ao uso de ácidos concentrados e a mesma está bem desenvolvida em termos de metodologia para aplicação em processos de pré-tratamento anteriores à hidrólise enzimática. Em geral, essa técnica consiste no emprego de ácido sulfúrico com concentração abaixo de 4%, o qual hidrolisa a xilana a xilose. Esse processo requer altas temperaturas (100-200 °C) e possui custos elevados, visto que promove apenas a hidrólise da fração hemicelulósica (BINOD *et al.*, 2011; SUN & CHENG, 2002).

Para o *processo enzimático* é necessário realizar um pré-tratamento da biomassa lignocelulósica a fim de permitir maior acessibilidade à celulose. A hidrólise enzimática

é realizada por enzimas celulasas, as quais possuem especificidade, sendo que as condições reacionais são mais brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45-50°C) que as condições com ácidos inorgânicos. Devido ao fato das condições serem brandas, uma menor quantidade de subprodutos é liberada. A maior limitação dessa metodologia é a necessidade de usar grandes quantidades de enzimas, o que encarece muito o processo enzimático (BINOD et al., 2011).

As celulasas, responsáveis pela hidrólise enzimática da celulose, são um complexo enzimático composto por endocelulasas e exocelulasas:

- a) *endo*-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4) que hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória;
- b) *exo*-1,4- β -D-glucanases (glucano-hidrolase EC 3.2.1.74 e celobio-hidrolase EC 3.2.1.91) que hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses;
- c) 1,4- β -D-glicosidasas (EC 3.2.1.21) que promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuloligossacarídeos.

A Figura 5 tem representada a função de cada uma dessas enzimas durante o processo de hidrólise da celulose até a liberação dos monômeros de glicose.

Figura 5. Representação esquemática do processo de hidrólise da celulose e a respectiva função das celulasas envolvidas (OGEDA & PETRI).

A ação conjunta dessas enzimas permite a degradação de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996). As celulasas possuem outras aplicações além da hidrólise da celulose, sendo aplicadas nas indústrias têxtil, para remoção de fios de celulose, de alimentos, usadas na extração e clareamento de sucos de frutos e de vegetais, de detergentes, para favorecer a remoção de manchas profundas nas roupas, de alimentação animal, para realizar a hidrólise parcial da celulose e da hemicelulose à fim de favorecer uma rápida absorção, e na remoção de biofilme bacteriano, através da degradação dos polissacarídeos extracelulares presentes no biofilme, dentre outras aplicações (JUTURU & WU et al., 2014).

Na literatura são descritos dois mecanismos gerais de hidrólise realizado por glicosidases, os quais representam o mecanismo de hidrólise das celulasas. Para que essa reação ocorra estão presentes no sítio ativo da enzima dois resíduos ácidos de aminoácidos (aspartato e glutamato), em que um deles está na sua forma iônica e o outro está em sua forma neutra (GLOSTER et al., 2008).

No primeiro mecanismo (Figura 6a), ocorre a hidrólise da ligação β -1,4-glicosídica com inversão da configuração, uma vez que o substituinte da posição 1 do anel glicosídico inicialmente está na posição equatorial e após a hidrólise ocupa a posição axial do anel.

O segundo mecanismo retém a configuração, visto que a reação ocorre em duas etapas: a primeira delas é a etapa de glicosilação que consiste na realização da ligação covalente entre o oxigênio do sítio ativo da enzima e a posição 1 do anel glicosídico, e a segunda etapa consiste na etapa de desglicosilação do sítio ativo através da adição de um grupo hidroxila (Figura 6b).

Figura 6. Mecanismos de hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas realizados por enzimas glicosidases com inversão (a) ou retenção (b) de configuração (Adaptado de GLOSTER et al., 2008).

1.1. Bagaço da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta originalmente da Índia e conhecida há 2500 anos. Foi também na Índia e na China que o açúcar comercial foi produzido a partir da cana-de-açúcar, passando a ser largamente usado na Europa no início do século XVIII (JAMES, 2004). A cana-de-açúcar foi trazida para o Brasil pelos portugueses em 1532, sendo Pernambuco o principal produtor na época (DINARDO-MIRANDA et al., 2008). No entanto, a região que hoje se destaca pela cultura da cana-de-açúcar é a Centro-Sul do país, e o estado de São Paulo é responsável por 53,4% de toda a produção nacional na safra 2015/2016 (POPPE & PERICO, 2009; UNICA, 2016).

Em 2009 a produção mundial de cana-de-açúcar foi de 1661 Mton, ocupando 1,5% da área agricultável do planeta e, em geral, de cada tonelada de cana processada é obtido 260 kg de bagaço, e este contendo 50% de umidade. As usinas passaram a usar o bagaço como fonte de energia através da queima do mesmo em grandes caldeiras,

uma vez que cada tonelada de bagaço produz 2 ton de vapor, sendo que 5 ton de vapor produzem 1 MWh de eletricidade (ISABIRYE et al., 2015).

A alta produção de bagaço de cana-de-açúcar por hectare (80 ton/ha) é um fator que torna o seu uso para a produção de etanol de segunda geração ainda mais promissor, quando comparado com trigo (1 ton/ha), outras gramíneas (2 ton/ha) e árvores superiores (20 ton/ha). O bagaço de cana-de-açúcar também se caracteriza por apresentar boas concentrações de celulose (~50%) e de hemicelulose (~25%) em sua composição, e o percentual restante corresponde a lignina e material inorgânico (cinzas) (BASSO et al., 2015).

Analisando a composição do bagaço da cana-de-açúcar e fazendo uso das tecnologias e dos processos de hidrólise já disponíveis é possível obter cerca de 69 litros de etanol por tonelada de bagaço. Contudo, esta produção de etanol poderá ser aumentada, uma vez que é possível melhorar os processos de sacarificação e de fermentação das hexoses bem como também reaproveitar as pentoses oriundas da hemicelulose. Estima-se que cerca de 130-150 L de etanol possam ser produzidos a partir de uma tonelada de bagaço, após a otimização de todo o processo para obtenção de rendimentos próximos de 95% (POPPE & PERICO, 2009).

Muito embora atualmente seja possível produzir bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, esse processo ainda não é economicamente viável quando comparado com o ganho obtido da queima do mesmo para geração de energia, fazendo-se necessário o desenvolvimento de tecnologias e metodologias mais eficientes.

Atualmente existem centros de pesquisa produzindo bioetanol em escala piloto a partir do bagaço de cana-de-açúcar onde são feitos melhoramentos desse processo. Um exemplo é o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba, (São Paulo) cujo processo de produção é dividido em duas etapas:

- a) pré-tratamento por explosão a vapor, a fim de aumentar a acessibilidade às fibras de celulose e também promovendo a hidrólise da hemicelulose;
- b) a fração sólida de celulose e lignina é submetida à hidrólise produzindo um licor rico em hexoses (composto principalmente por glicose, manose e galactose).

O licor produzido é então misturado ao melaço de cana e fermentado por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando a mesma estrutura aplicada na produção do etanol de primeira geração (BASSO et al., 2015).

1.2. Metodologias usadas para a produção de celulasas

As duas principais metodologias de cultivo de microrganismos para a produção de enzimas lignocelulolíticas são a fermentação submersa (SmF – *Submerged Fermentation*) e a fermentação em estado sólido (SSF – *Solid State Fermentation*), que podem ser usadas também para a produção de lipases, invertases, esterases, etc. (SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012).

A SmF é mais comumente usada em escala industrial, pois possui equipamentos e técnicas melhor desenvolvidas, sendo que cerca de 75% dos processos industriais que envolvem o cultivo de microrganismos usam essa metodologia. Outra vantagem da SmF é a facilidade na extração e purificação dos produtos, pois são utilizados substratos líquidos como melaços, açúcares, sais solúveis, etc., sem a presença de sólidos no meio de cultura. Na SmF os substratos são consumidos mais rapidamente, fazendo-se necessária a reposição contínua de nutrientes, sendo requerido o uso de grandes volumes de água, de energia e de espaço físico. Em geral, o uso de meio líquido torna essa metodologia especialmente favorável para o cultivo de bactérias (SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012; JAIN et al., 2013).

A SSF consiste no uso de substratos sólidos, tais como farelo de trigo, palha de arroz, feno, polpa de celulose, bagaço de cana, palha de milho, dentre outros, sendo esta uma das metodologias mais empregadas na produção de celulasas relatadas na literatura (DAVE et al., 2013; NARRA et al., 2012; BANSAL et al., 2012; LIU et al., 2011). O principal desafio, para implementação em escala industrial, é o aumento da escala de produção, por requerer equipamentos específicos. No entanto, possui como vantagens uma maior produção enzimática, menor risco de contaminação, uso de pouca quantidade de água, não há necessidade de reposição contínua de nutrientes por longos períodos e menor uso de espaço físico. A SSF é mais indicada para fungos filamentosos (SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012; JAIN et al., 2013).

Diversos microrganismos, como bactérias e fungos, podem produzir enzimas lignocelulolíticas. Dentre as bactérias podem ser destacados os gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetivibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces* (SUN & CHENG, 2002; YANG et al. 2011).

Os fungos são os microrganismos mais empregados na produção dessas enzimas, devido à sua capacidade de degradar materiais lignocelulósicos. Os fungos pertencentes

aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais extensivamente estudados (SUN & CHENG, 2002; VALENCIA & CHAMBERGO, 2013).

Quando se trata de microrganismos marinhos o número de espécies utilizadas é inferior, uma vez que a maior parte dos microrganismos estudados são isolados de ambientes terrestres (RICHARDS et al., 2011). Há relatos na literatura do emprego de bactérias e fungos de ambiente marinho como produtores de celulasas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos produtores de celulases

Existe uma vasta gama de microrganismos capazes de produzir celulases, sendo as bactérias os principais produtores. Isso pode ser exemplificada pelo fato de que em um *database* de genomas de bactérias (CAZy), o genoma de 38% delas contém ao menos uma enzima do complexo celulásico (JUTURU & WU et al., 2014).

Dentre as bactérias descritas como produtoras de celulases, as pertencentes ao gênero *Bacillus* foram as mais estudadas e descritas na literatura. As linhagens da espécie *Bacillus subtilis* IND19 e SU40 foram descritas como produtoras de celulases com tempo ótimo para produção de celulases de 72 h (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016b; ASHA & SAKTHIVEL, 2014). O que as diferiu foi o tipo de fermentação utilizada: *Bacillus subtilis* IND19 foi cultivada em SSF e *Bacillus subtilis* SU40 foi cultivada em SmF. No entanto, essa diferenciação na fermentação mostrou que, mesmo que a fermentação SmF seja a mais indicada para o cultivo de bactérias, devido ao fato de precisarem de mais umidade e nutrientes, a SSF também pode ser aplicada no cultivo desse tipo de microrganismo (SUBRAMANIAM & VIMALA, 2012).

A diferenciação nos tipos de fermentação para a produção de enzimas pode ser distinta para cada linhagem, como por exemplo, no estudo realizado com o fungo *Aspergillus flavus* BS1 (SAJITH et al., 2014). Foi feita uma comparação entre os meios de cultivo SmF e SSF obtendo-se a produção de celulases em ambos os meios de fermentação. Contudo, a SSF mostrou-se mais promissora pelo fato de produzir uma maior atividade enzimática ao longo do processo. Nesse mesmo trabalho, além de produzir maior atividade, no meio SSF obteve-se a máxima atividade após 72 h, enquanto que no meio SmF a máxima atividade foi obtida após 120 h de cultivo (SAJITH et al., 2014).

A influência do tempo de cultivo para a produção de celulases também varia com a linhagem, não apenas pela mudança do tipo de meio e a metodologia para a fermentação. Tal influência pode ser observada na Tabela 1 por comparação entre as espécies bacterianas, por exemplo, *Bacillus vallismortis* RG-07, *Clostridium thermocellum* DSMZ 1237 e *Streptomyces griseorubens* JS D-1, as quais mesmo quando cultivadas em meio SmF apresentaram atividade ótima em tempos de cultivo distintos entre si (GAUR & TIWARI, 2015; MOREAU et al., 2015; ZHANG et al.,

2016). As espécies fúngicas de *Melanoporia* sp. CCT 7736, *Aspergillus oryzae* NRRL 3484, *Trichoderma asperellum* RCK2011 que foram cultivadas em meio SSF apresentaram variações de tempo ótimo de cultivo ainda maiores que aqueles obtidas com as bactérias, cujos valores variaram de 24 até 168 h (Tabela 1) (De OLIVEIRA et al., 2016; EL-GHONEMY et al., 2014; RAGHUWANSHI et al., 2014). Houve também variações do tempo de cultivo quando o meio de cultura para as linhagens fúngicas foi o SmF (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de microrganismos produtores de celulases.

Microrganismos	Metodologia de fermentação	Tempo de cultivo (h)	Atividade enzimática	Referências da literatura
Bactérias				
<i>Bacillus subtilis</i> IND19	SSF	72	CMCase 473,01 U/gds	Vijayaraghavan et al. (2016b)
<i>Bacillus subtilis</i> SU40	SmF	72	CMCase 0,484 U/mg	Asha & Sakthivel (2014)
<i>Bacillus vallismortis</i> RG-07	SmF	48	CMCase 4105 U/mL	Gaur & Tiwari (2015)
<i>Clostridium thermocellum</i> DSMZ 1237	SmF	72	CMCase 0,25 U/mL	Moreau et al. (2015)
<i>Streptomyces griseorubens</i> JS D-1	SmF	120	CMCase 114,38 U/mL FPase 40,11 U/mL	Zhang et al. (2016)
Fungos				
<i>Melanoporia</i> sp. CCT 7736	SSF	24	CMCase 2,8 U/gds FPase 3,05 U/gds	De Oliveira et al. (2016)
<i>Sporothrix carnis</i>	SmF	96	CMCase 285,7 U/mL	Olajuyigbe & Ogunyewo (2016)
<i>Aspergillus terreus</i> UniMAP AA-6	SmF	96	FPase 0,0625 U/mL	Gunny et al. (2015)
<i>Aspergillus flavus</i> BS1	SmF	120	CMCase 2,793 U/mL	Sajith et al. (2014)
<i>Aspergillus flavus</i> BS1	SSF	72	CMCase 5,408 U/gds	Sajith et al. (2014)
<i>Trichoderma</i> sp.	SmF	240	CMCase 22,12 U/mg	Smichi et al. (2014)
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3484	SSF	168	FPase 578 U/gds	El-Ghonemy et al. (2014)
<i>Trichoderma asperellum</i> RCK2011 (Wild)	SSF	96	CMCase 10,25 U/gds FPase 1,60 U/gds	Raghuwanshi et al. (2014)

2.1.1. Microrganismos de ambiente marinho produtores de celulases

A maioria dos microrganismos descritos na literatura como produtores de celulases são de ambiente terrestre, principalmente pelo fato de estarem com frequência expostos ao contato com materiais lignocelulósicos usando-os muitas vezes como fonte de carbono. No entanto, espécies de bactérias e fungos isolados de ambiente marinho

também têm sido descritas como produtores de celulases. Devido à predisposição genética dos microrganismos de ambiente marinho de adaptar-se às condições extremas do ambiente marinho, tais como altas pressões e salinidade, as enzimas produzidas por tais microrganismos podem apresentar características distintas daquelas produzidas pelos microrganismos de ambiente terrestre, como por exemplo tolerância à salinidade (TRIVEDI et al., 2016).

Dentre as espécies bacterianas de ambiente marinho as mais estudadas são as do gênero *Bacillus*. Por exemplo, Kim et al. (2009) purificaram e caracterizaram carboximetilcelulase de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53, uma bactéria de ambiente marinho. Harshvardhan et al. (2013) também purificaram e caracterizaram celulases da bactéria de ambiente marinho *Bacillus* sp. H1666 (KIM et al., 2009; HARSHVARDHAN et al., 2013). Outros estudos também relataram a produção de celulases a partir de espécies de bactérias de ambiente marinho, tais como *Bacillus licheniformis* AU01, *Clostridium phytofermentans*, *Bacillus carboniphilus* CAS 3, *Bacillus pumilus*, *Bacillus aquimaris*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1, *Mesorhizobium* sp. e *Pseudoalteromonas* sp. (JAIN et al., 2013; TRIVEDI et al., 2013; SETHI et al., 2013; ANNAMALAI et al., 2012; TRIVEDI et al., 2011; ANNAMALAI et al. 2011; HUNG et al., 2011).

Quanto aos fungos de ambiente marinho não há um gênero com destaque na produção de celulases, sendo possível encontrar uma maior variabilidade de gênero se comparado com as bactérias. Hong et al. (2015) avaliaram 50 espécies fúngicas de ambiente marinho de diferentes gêneros, cujo estudo determinou que o fungo *Arthrimum saccharicola* foi o que mostrou melhor capacidade para a produção de celulases (FPase – Filter Paper Activity 0,39 U/mL) (HONG et al., 2015).

Outras espécies de fungos de ambiente marinho também foram relatadas como produtoras de celulases, tais como *Aureobasidium pullulans*, isolado de sedimentos de mares profundos, *Aspergillus terreus* e *Mucor plumbeus*, isolados de água marinha, *Chaetomium globosum*, isolado de madeira de manguezais, *Cladosporium sphaerospermum*, isolado de algas marinhas, *Alternaria alternata*, isolado de madeira de barcos de pesca velhos apodrecidos, dentre outras (RAVINDRAN et al., 2011; CHI et al., 2009; PADMAVATHI et al., 2012; XUE et al. 2012; EL-BONDKLY & EL-GENDY, 2012; TRIVEDI et al., 2015; XUE et al., 2015; SETHI et al., 2013; FATEN & EL ATY ABEER, 2013).

Assim como para os microrganismos de ambiente terrestre, o tipo do meio de cultivo é importante para a produção de celulases. Contudo, não há nenhuma descrição na literatura de cultivo de bactérias de ambiente marinho em meio SSF, sendo cultivadas apenas em meio SmF. Já para as linhagens fúngicas há relatos de uso dos dois tipos de meios fermentativos e com maiores valores de atividade enzimática obtidos em SSF (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos de microrganismos de ambiente marinho produtores de celulases.

Microrganismos	Metodologia de fermentação	Tempo (h) de cultivo	Atividade enzimática	Referências da literatura
Bactérias				
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> A-53	SmF	72	CMCase 108,5 U/mg	Kim et al. (2009)
<i>Bacillus licheniformis</i> AU01	SmF	48	CMCase 146,2 U/mg	Annamalai et al. (2012)
<i>Bacillus carboniphilus</i> CAS 3	SmF	60	CMCase 168 U/mg	Annamalai et al. (2014)
<i>Bacillus</i> sp. VITRKHB	SmF	24	CMCase 1,22 U/mg	Singh et al. (2014)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	SmF	72	CMCase 138,46 U/mg	Trivedi et al. (2013)
Fungos				
<i>Aureobasidium pullulans</i> 98	SmF	24	CMCase 4,51 U/mg FPase 4,75 U/mg	Chi et al. (2009)
<i>Arthrinium saccharicola</i> KUC21221	SmF	168	FPase 0,39 U/mL CMCase 0,38 U/mL β -glucosidase 1,04 U/mL	Hong et al. (2015)
<i>Pestalotiopsis</i> sp. J63	SmF	120	FPase 0,11 U/mL	Chen et al. (2011)
<i>Aspergillus sydowii</i> BTMFS 55	SSF	72	β -glucosidase (86 U/mg)	Madhu et al. (2009)
<i>Alternaria alternata</i>	SSF	240	CMCase 9,68 U/gds	Faten & El Aty Abeer (2013)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	SSF	144	FPase 9,60 U/gds CMCase 10,20 U/gds	Trivedi et al. (2015)

2.2. Variação da composição do meio de cultivo SSF para fungos

Como descrito na Seção 1.2 o meio fermentativo SSF induz uma maior produção de celulases. Portanto, o material lignocelulósico usado em sua composição é importante, pois é a principal fonte de carbono para o crescimento microbiano.

São muitos os materiais lignocelulósicos que podem ser usados na indução da produção de celulasas, sendo a maioria deles oriunda de resíduos da agricultura como a palha de milho, o bagaço de cana-de-açúcar, o farelo e a palha de trigo, a casca e a palha de arroz, a casca de coco, dentre outros (ANAMALAI et al., 2012; GAO et al., 2008; KANG et al., 2004; SUKUMARAN et al., 2009; De OLIVEIRA et al., 2016; MEMBRILLO et al., 2008; KALOGERIS et al., 2003).

A influência da composição do meio SSF sobre a produção das celulasas ficou evidente nos resultados de *FPase* obtidos para o fungo *Aspergillus niger* NRRL 567 quando da adição de mais um componente. Inicialmente a atividade para *FPase* foi de 133,7 U/gds (gds – grama de substrato) quando os materiais lignocelulósicos usados no cultivo do microrganismo foram o bagaço de maçã e a casca de arroz (DHILLON et al., 2012b). No entanto, a atividade para *FPase* aumentou para 383,7 U/gds quando foi adicionado soro de leite ao meio de cultura (DHILLON et al., 2012a). O soro de leite serviu como fonte de aminoácidos influenciando favoravelmente a atividade de *FPase*.

No entanto, a depender da composição do material lignocelulósico, a mudança do substrato pode não afetar significativamente a produção de celulasas. Por exemplo, o fungo *Trichoderma reesei* RUT C30 produziu a atividade *FPase* de 22,8 U/gds quando o substrato utilizado foi o farelo de trigo e de 25,1 U/gds quando o substrato foi o bagaço de cana-de-açúcar (SUKUMARAN et al., 2009; MEKALA et al., 2008). A provável explicação para a produção de celulasas semelhante é que o percentual de celulose e hemicelulose de ambos materiais são também semelhantes (farelo de trigo: 41,6% de celulose e 28,3% de hemicelulose – bagaço de cana-de-açúcar: 41,5% de celulose e 24,2% de hemicelulose), diferindo apenas no percentual de lignina, 12,5% e 23,0% para farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente (LIU et al., 2017; JAFFAR et al., 2016).

Estes estudos mostraram que a produção de celulasas sofre interferência direta da origem, da estrutura e da composição do material lignocelulósico usado no meio de cultura. Portanto, inúmeros estudos podem ser feitos e otimizados para alcançar níveis de produção de celulasas adequados a cada microrganismo.

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de fungos cultivados em SSF bem como os materiais lignocelulósicos usados na composição dos meios de cultivo, sendo que a maioria dos fungos descritos pertencem aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*.

Tabela 3. Materiais lignocelulósicos usados na composição dos meios de cultivo SSF para produção de celulasas.

Fungos	Substratos ^a	<i>FPase</i> (U/gds)	Referências da literatura
<i>Myceliophthora</i> sp.	FT	0,74	Badhan et al. (2007)
<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	FT	3,49	Deswal et al. (2011)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	FT	4,6	Sukumaran et al. (2009)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	FT	22,8	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> F-119	FT	59,2	Fadel (2000)
<i>Trichoderma asperellum</i> RCK2011	FT	1,6	Raghuwanshi et al. (2014)
<i>Melanoporia</i> sp. CCT 7736	FT + CCP	3,05	De Oliveira et al. (2016)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	PT	5,5	Kalogeris et al. (2003)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	BC	25,1	Mekala et al. (2008)
<i>Pleurotus ostreatus</i> IE8	BC	0,013	Membrillo et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> KK2	PA	19,5	Kang et al. (2004)
<i>Penicillium citrinum</i> YS40-5	FA	3,8	Ng et al. (2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	PM	144,6	Liu et al. (2011)
<i>Aspergillus terreus</i> M11	PM	231	Gao et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 567	BM + CA + SL	383,7	Dhillon et al. (2012a)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2001	BM + CA + SL	401,0	Dhillon et al. (2012a)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 567	BM + CA	133,7	Dhillon et al. (2012b)
<i>Aspergillus niger</i>	Serragem	2,4	Narasimha et al. (2006)

^a Abreviações: FT: farelo de trigo; BC: bagaço de cana-de-açúcar; PT: palha de trigo; PM: palha de milho; PA: palha de arroz; FA: farelo de arroz; BM: bagaço de maçã; CA: casca de arroz; SL: soro de leite; CCP: casca de coco em pó.

Outra variável importante na composição do meio de cultura é a umidade, que está relacionada ao volume de água adicionado ao meio. O teor de umidade no meio SSF afeta o desenvolvimento da biomassa, as reações metabólicas e os processos de transferência de massa. O teor de umidade pode variar de acordo com a linhagem de microrganismo usado. Em um trabalho realizado por Raghuwanshi et al. (2014) a melhor proporção entre massa de material lignocelulósico e volume de água para a produção de celulasas (determinada por *FPase*) pelo fungo *Trichoderma asperellum* RCK2011 foi de 1:2,5 (m:v) (RAGHUWANSI et al., 2014). Bansal et al. (2012) encontraram que a melhor proporção para a produção de *FPase* pelo fungo *Aspergillus niger* NS-2 foi de 1:1,5 e 1:2,75 (BANSAL et al., 2012).

2.3. Influência do pH e da temperatura na produção de celulases

O pH e a temperatura usados durante o cultivo dos microrganismos são tão importantes quanto a composição do meio de cultura na produção de celulases. Vários estudos na literatura mostram a influência destes parâmetros na atividade enzimática para diversos microrganismos.

El-Ghonemy et al. (2014) estudaram o melhoramento da produção de celulases pelo fungo *Aspergillus oryzae* NRRL 3484 em SSF. Os autores relataram que a atividade ótima das celulases foi alcançada quando o cultivo foi realizado em meio de cultura com pH inicial de 5,5, com valores 2,5 vezes superiores àqueles obtidos quando o fungo foi cultivado em valores de pH 3,0 ou 8,0 (EL-GHONEMY et al., 2014). Liu et al. (2011) também obtiveram valores de pH ótimos mais acídicos (4,0) para o cultivo do fungo *Aspergillus fumigatus* Z5 em SSF (LIU et al., 2011). No entanto, o valor de pH ótimo na produção de celulases não é necessariamente ácido para todas as linhagens. Pode-se citar como exemplo o estudo realizado por Raghuwanshi et al. (2014) no qual a atividade máxima para *FPase* foi obtida quando o fungo *Trichoderma asperellum* RCK2011 foi cultivado em pH 9,0 (RAGHUWANSHI et al., 2014). Enquanto no trabalho reportado por Bansal et al. (2012) a atividade máxima para *FPase* foi obtida quando o fungo *Aspergillus niger* NS-2 foi cultivado em pH 7,0 (BANSAL et al., 2012).

Também é possível observar variações dos valores de temperatura ótima para a produção de celulases pelo cultivo de espécies fúngicas em SSF. No entanto, muitas das linhagens fúngicas apresentam valores mais próximos de 30 °C, por exemplo, *Trichoderma viride* TL-124, *Aspergillus niger* NS-2 e *Penicillium* sp. (XU et al., 2011; BANSAL et al., 2012; PRASANNA et al., 2016). Valores de temperatura acima e abaixo de 30 °C já foram descritas como temperaturas ótimas para a produção de celulases, por exemplo, a produção de celulases pelos fungos *Aspergillus fumigatus* Z5 (50 °C) e *Trichoderma asperellum* RCK2011 (20 °C) (LIU et al., 2011; RAGHUWANSHI et al., 2014).

Contudo, destaca-se que a produção de enzimas em temperaturas próximas à ambiente, bem como valores de acidez e basicidade próximos à neutralidade tornam-se interessantes devido às facilidades de cultivo dos microrganismos. Mas, isso depende em muito do tipo de enzima, bem como da sua atividade ótima, bem como a origem de onde foi obtido e cultivado o microrganismo.

2.4. Fatores que influenciam a atividade enzimática de celulasas

De acordo com o protocolo experimental para testes de atividade enzimática para celulasas, descrito pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e determinados para enzimas puras, a temperatura ideal a ser usada durante a hidrólise da celulose é de 50 °C e o pH ideal é de 4,8 (GHOSE, 1987). No entanto, estudos na literatura mostram que as atividades das celulasas produzidas por diversas espécies de microrganismos apresentaram valores ótimos de pH e temperatura diferentes dos estabelecidos pela IUPAC (Tabela 4).

As maiores diferenças de atividade enzimática para os valores de pH estão entre as celulasas produzidas por bactérias, os quais tanto podem ser em meio básico, em meio ácido ou neutro (Tabela 4). Embora os valores de pH ótimos para as celulasas produzidas por fungos estejam próximos do valor indicado pela IUPAC, existe uma peculiaridade para as celulasas parcialmente purificadas produzidas pelo fungo *Aspergillus ellipticus*, as quais apresentam dois valores de pH ótimo, sendo um ácido e outro básico (Tabela 4). Segundo Ackarya et al. (2010) isso pode ocorrer devido à presença de iso-enzimas ou subunidades que apresentam valores de pH diferentes um do outro (ACHARYA et al., 2010). Desta forma o uso de um mesmo extrato celulásico pode ser aplicado em duas condições reacionais diferentes mantendo a mesma atividade.

Quanto aos valores de temperatura ótima, as variações observadas na literatura também foram significativas (Tabela 4). Por exemplo, a bactéria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* e o fungo *Sporothrix carnis*, que são microrganismos mesófilos, cultivados a 30 °C durante a produção das celulasas, apresentaram o maior valor de atividade enzimática na temperatura ótima de 80 °C (PARK et al., 2011; OLAJUYIGBE & OGUNYEW, 2016). Essas diferenças nos valores de temperatura ótima permitem selecionar o microrganismo que produz as celulasas que mais adequam-se ao processo em que serão utilizadas. Portanto, o uso de enzimas microbianas torna os processos enzimáticos bastante versáteis.

Tabela 4. Valores de pH e temperatura ótimos para a obtenção da atividade máxima das celulasas.

Microrganismos	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Referências da literatura
Produzidas por bactérias			
<i>Bacillus</i> sp. MSL2*	50	6,0	Sriariyanun et al. (2016)
<i>Bacillus halodurans</i> IND18	60	8,0	Vijayaraghavan et al. (2016a)
<i>Bacillus subtilis</i> G ₂	45	7,0	Vaid & Bajaj (2016)
<i>Geobacillus</i> sp. T1*	70	6,5	Assareh et al. (2012)
<i>Cellulomonas</i> sp. YJ5*	60	7,0	Yin et al. (2010)
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> *	80	4,7	Park et al. (2011)
Produzidas por fungos			
<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	60	5,0	Ang et al. (2013)
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	50	5,0	Liu et al. (2011)
<i>Aspergillus ellipticus</i> *	60	4,0 e 9,0	Acharya et al. (2010)
<i>Chrysosporthe cubensis</i> LPF-1	55	4,0	Falkosky et al. (2013)
<i>Penicillium citrinum</i> YS40-5	70	5,0	Ng et al. (2010)
<i>Sporothrix carnis</i>	80	5,0	Olajuyigbe & Ogunyewo (2016)
<i>Trichoderma viride</i> AS 3.3711	50	5,0	Li et al. (2010)
<i>Trichoderma harzianum</i> ETS 323*	50	4,5	Liu et al. (2010)

* Enzima purificada

2.5. Purificação de celulasas

A purificação das celulasas a partir do extrato enzimático bruto ajuda a diminuir a presença de interferentes no processo de hidrólise da celulose. Para tanto, existem técnicas de purificação bem estabelecidas na literatura que podem ser aplicadas (ZING *et al.*, 2014; BALASUBRAMANIAN & SIMÕES, 2014).

Antes da purificação é necessário realizar a extração das enzimas que é feita geralmente através de agitação em tampão adequado ao ponto isoelétrico da enzima e do substrato, obtendo-se um extrato que pode ser concentrado por evaporação ou por ultrafiltração ou mesmo por precipitação usando solvente orgânico ou adicionando sais (HIROSE, 2012).

Dentre os métodos de purificação de enzimas destacam-se os baseados em cromatografia, uma vez que são os mais extensamente utilizados, tais como, as cromatografias de troca iônica, de interação hidrofóbica, em fase reversa e por afinidade e filtração em gel (HIROSE, 2012).

Na purificação de celulasas muitos trabalhos na literatura utilizam duas ou mais técnicas cromatográficas. As mais utilizadas são cromatografia de troca iônica (CTI) e a cromatografia de filtração em gel (CFG) (Tabela 5), cujo uso mostrou-se efetivo na purificação de celulasas, sobretudo de carboximetilcelulasas (SMIRITI & SANWAL,

1999; THONGEKKAEW *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; ZING *et al.*, 2014; BALASUBRAMANIAN & SIMÕES, 2014).

Tabela 5. Métodos cromatográficos usados na purificação de celulases.

Microrganismos	Enzimas purificadas	Metodologias	Referências da literatura
<i>Bacillus</i> sp. MSL2	Carboximetilcelulase	CFG	Sriariyanun et al. (2016)
<i>Bacillus</i> sp. H1666	Celulase	CTI + CFG	Harshvardhan et al. (2013)
<i>Bacillus amyoliquefaciens</i> DL-3	Celulase	CTI	Lee et al. (2008)
<i>Bacillus licheniformis</i> AU01	Celulase	CTI + CFG	Annamalai et al. (2012)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> A-53	Carboximetilcelulase	CTI	Kim et al. (2009)
<i>Bacillus subtilis</i> SU40	Celulase	CFG	Asha & Sakthivel (2014)
<i>Bacillus vallismortis</i> RG-07	Celulase	CTI	Gaur & Tiwari (2015)
<i>Salinivibrio</i> sp. NTU-05	Celulase	CTI + CFG	Wang et al. (2009)
<i>Penicillium piceum</i>	β -Glucosidase	CFG	Gao et al. (2013b)
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i> TP-02	Celulase	CFG	Tang et al. (2012)
<i>Trichoderma harzianum</i> ETS 323	Endoglucanase + Exoglucanase	CFG + CTI	Liu et al. (2010)

CTI: cromatografia de troca iônica

CFG: cromatografia de filtração em gel

2.5.1. Cromatografia de troca iônica

Para realizar a purificação de proteínas por cromatografia de troca iônica é preciso considerar os tipos de matrizes usadas como adsorventes, as quais podem realizar troca aniônica ou catiônica. O ponto isoelétrico (PI) da proteína é o valor de pH em que a proteína tem uma carga global igual a zero. Assim, as estratégias a serem usadas para a separação das mesmas por cromatografia de troca iônica dependem dos grupos funcionais da matriz e da solução tampão (KUMPALUME & GHOSE, 2003).

Desta forma, a cromatografia de troca iônica pode ser realizada por duas abordagens diferentes, seja pela mudança do valor de pH da solução tampão usada como eluente ou através da adição de sais na solução tampão a ser usada (KUMPALUME & GHOSE, 2003).

Para as variações de pH em matrizes carregadas positivamente (cromatografia de troca aniônica) os valores de pH acima do PI da proteína favorecem a adsorção da mesma na matriz, enquanto que valores de pH abaixo do PI permite que a proteína possa eluir com a fase móvel. Na cromatografia de troca catiônica (matrizes carregadas negativamente) os valores abaixo do PI da proteína é o que favorece a sua adsorção na matriz. Há que se considerar que as proteínas podem ficar adsorvidas na matriz caso existam outras interações eletrônicas de partes da sua estrutura com a matriz, mesmo que a carga global da proteína seja igual à da matriz (KUMPALUME & GHOSE, 2003).

Muito embora a variação de pH seja uma metodologia útil na separação de proteínas por essa técnica cromatográfica, a eluição com sais é a metodologia mais comumente usada, pois permite uma melhor resolução na separação. Essa metodologia consiste na adição de sais, geralmente NaCl, KCl ou NH₄Cl no eluente (solução tampão). A adição gradativa do sal permite que as proteínas mais fortemente adsorvidas na matriz sejam eluídas mais lentamente que àquelas cujas adsorções sejam mais fracas, obtendo-se assim a separação (GRANT, 2016).

2.6. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para remoção de lignina

A lignina presente nos materiais lignocelulósicos é um interferente importante no reaproveitamento desses materiais para a produção de açúcares fermentescíveis usados na produção de combustíveis (SAINI et al., 2016). A remoção, total ou parcial dos materiais lignocelulósicos favorece o aumento do rendimento na hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose presentes nesses materiais (ZENG et al., 2014).

Embora não seja possível determinar exatamente como ocorre a inibição, visto que a estrutura da lignina não é uniforme em todos os materiais lignocelulósicos e devido à sua elevada complexidade estrutural, sabe-se que uma das possíveis formas de inibição da atividade das celulasas ocorre por adsorção das enzimas irreversivelmente à lignina (SAINI et al., 2016; ZHENG et al., 2016; PAREEK et al., 2013).

Com o objetivo de remover a lignina ou mesmo reduzir o seu percentual na composição dos materiais lignocelulósicos, diversos métodos de pré-tratamentos têm sido desenvolvidos e aplicados, os quais podem ser físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). A escolha da metodologia a ser empregada pode variar de acordo com o material lignocelulósico usado e em qual etapa

do processo será empregada. Na Tabela 6 estão descritos alguns materiais usados bem como o tipo de tratamento empregado.

É possível observar que em alguns tipos de pré-tratamento há uma remoção substancial da lignina, enquanto que em outros a remoção é menor ou pouco eficiente. Alguns métodos de pré-tratamento, além da remoção da lignina, podem também ser aplicados para a obtenção de celulose amorfa, de modo a facilitar a posterior hidrólise enzimática (SAINI et al., 2016).

Por exemplo, quando lascas de madeira de faia (*Fagus* sp.) são pré-tratadas com líquido iônico obtém-se uma pequena redução do percentual de lignina de 21,8% para 20,3% (Tabela 6). Porém, após ser realizada a hidrólise enzimática por 72 h obteve-se 90,2 % da celulose convertida em glicose e celobiose (VIELL et al., 2013). Desta forma, torna-se evidente que mesmo não ocorrendo a remoção da lignina, o pré-tratamento pode facilitar a hidrólise da celulose através da sua modificação.

Dos métodos de pré-tratamento descritos na Tabela 6, nota-se que o mais comum é o uso de solução alcalina (NaOH), combinada com altas temperaturas, cuja metodologia é aplicada para diversos materiais lignocelulósicos obtendo-se maiores reduções do teor de lignina. No entanto, o uso de outros tipos de pré-tratamento, tais como explosão a vapor, uso de líquidos iônicos, microrganismos ou enzimas lignolíticas, já foram descritos, obtendo-se modificações na estrutura dos materiais lignocelulósicos, permitindo maiores percentuais de hidrólise.

Tabela 6. Tipos de pré-tratamento aplicados em materiais lignocelulósicos para a remoção de lignina.

Tipos de tratamento	Substrato	Lignina inicial (%)	Lignina final (%)	Referência
Solução alcalina (NaOH)	Compostagem para cultivo de cogumelos	34,5	7,4	Wu et al. (2013)
Solução alcalina (NaOH)	Bagaço de cana-de-açúcar	23,6	8,5	Gao et al. (2013a)
Solução alcalina (NaOH)	Palha de trigo + galhos de algodão	18,9	10,2	Sharma et al. (2016)
Solução alcalina (NaOH) + explosão a vapor	Palha de milho	12,0	2,6	Guo et al. (2013)
Explosão a vapor	Cana de junco	21,2	12,5	Jin et al. (2016)
Líquido iônico	Lascas de madeira	21,8	20,3	Viell et al. (2013)
Microbiano	Galhos de algodão	-	-	Shi et al. (2008)
Microbiano	Palha de trigo	20,0	13,0	Dias et al. (2010)
Extrato bruto de enzimas lignolíticas	Bagaço de milho	-	-	Wang et al. (2013)

2.6.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Em geral, como descrito acima, diversos métodos de pré-tratamento podem ser empregados na remoção da lignina presente nos materiais lignocelulósicos, sabendo-se que, no bagaço de cana-de-açúcar, esse percentual está em torno de 20% (Tabela 7).

Os métodos mais empregados no pré-tratamento do bagaço são químicos, os quais apresentam uma boa remoção da lignina. Dentre os métodos químicos, o uso de solução alcalina é o mais usado, obtendo-se um percentual final de lignina abaixo ou próximo de 10% (Tabela 7).

Destaca-se que os menores percentuais de lignina foram obtidos quando se usou o tratamento químico contendo uma solução alcalina (NaOH) associada ao método físico por ultrassom (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Um outro resultado interessante na extração da lignina foi o uso de H_2O_2 (5% de lignina remanescente), uma vez que, como visto na Tabela 6, a solução alcalina mais usada é o NaOH (BRIENZO et al., 2009).

Quando se utilizou o método físico-químico por explosão a vapor, em trabalho descrito por Biswas et al. (2014), o percentual final de lignina foi superior após o pré-tratamento (Tabela 7). Esse aumento no percentual ocorreu devido à remoção da fração hemicelulósica do bagaço ou mesmo devido à hidrólise das regiões amorfas da celulose (MENEGOL et al., 2016). Mesmo com o aumento do percentual de lignina, quando se realizou a hidrólise do material pré-tratado obteve-se 87,4% de hidrólise – valor superior ao obtido quando o pré-tratamento foi realizado com uma solução alcalina de NaOH (BISWAS et al., 2014). Esse resultado mostrou que apenas a quebra da estrutura do material lignocelulósico foi capaz de permitir uma boa hidrólise do mesmo. Contudo, tal característica pode ser muito específica do tipo de biomassa a ser pré-tratada, bem como do coquetel de enzima utilizado nesse processo.

A melhor hidrólise (92,6%) foi obtida através da combinação dos métodos químicos com solução alcalina de $NH_4OH-H_2O_2$ seguido de tratamento com líquido iônico (cloreto de 1-alil-3-metilimidazol ([Amim]Cl)) (Tabela 7). As mudanças de alguns parâmetros no pré-tratamento mostraram ser suficientes para melhorar consideravelmente a etapa da hidrólise enzimática (ZHU et al., 2012).

Tabela 7. Métodos de pré-tratamento empregados no bagaço de cana-de-açúcar para melhoramento da hidrólise enzimática da celulose.

Pré-tratamento	Lignina inicial (%)	Lignina final (%)	Hidrólise (%)	Referência
Explosão a vapor (185 °C, 10 min)	23,9	28,4	87,4 ^a	Biswas et al. (2014)
Ultrassom + amônia 10% (80 °C, 45 min, razão líquido-sólido 1:10 (g/mL))	27,0	18,2	78,6 ^b	Ramadoss & Muthukumar (2014)
Álcali (NaOH 2%, 50 °C, 20 min, razão líquido-sólido 1:20 (g/mL)) assistida por ultrassom	17,1	5,26	69,2 ^b	Velmurugan & Muthukumar (2011)
Álcali (H ₂ O ₂ 6%, 20 °C, 4 h, MgSO ₄ 0,5%)	19,6	5,0	-	Brienzo et al. (2009)
Tween-80 3% + NH ₄ OH (razão bagaço-NH ₄ OH-água 1:0,5:20, 160 °C, 1h)	22,7	14,4	66,0 ^a	Cao & Aita (2013)
Álcali (NaOH 1N, 100 °C, 0,5 h, razão líquido-sólido 1:12 (g/mL))	17,5	7,2	-	Maryana et al. (2014)
Álcali (NaOH 0,8%, 121 °C, 1 h, razão líquido-sólido 1:10 (g/mL))	23,4	10,2	-	Khuong et al. (2014)
Líquido iônico (bagaço pré-tratado com NH ₄ OH-H ₂ O ₂ , cloreto de 1-alil-3-metilimidazol ([Amim]Cl), 140 °C, 1 h)	10,1	6,0	92,6 ^a	Zhu et al. (2012)

^a Hidrólise enzimática; ^b Hidrólise ácida

2.7. Sacarificação de materiais lignocelulósicos usando celulasas

Diversos trabalhos na literatura têm reportado a sacarificação de materiais lignocelulósicos pré-tratados usando celulasas (Tabela 8). Essas celulasas podem ser comerciais, purificadas ou presentes em extratos enzimáticos (LI et al., 2016; XU et al., 2015; ALRUMMAN, 2016).

Uma variedade de materiais (biomassa) foi usada para a obtenção de açúcares, bem como diversas enzimas, sendo a maioria delas comerciais (Tabela 8).

É interessante observar que, para obter melhores resultados, alguns trabalhos reportam a suplementação de celulasas comerciais com *β-glucosidases* comerciais (XU et al., 2015; MUND et al., 2016). Essa suplementação foi realizada para evitar que a celobiose seja um dos principais produtos obtidos da hidrólise, uma vez que a função da *β-glucosidase* é a produção de glicose a partir de celobiose (YOON et al., 2014).

Da Silva et al. (2016) realizaram uma mistura contendo enzimas provenientes de extratos celulósicos de *Trichoderma reesei* Rut C-30 e *Aspergillus awamori* (TrAa) obtendo-se melhores resultados de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar em comparação ao uso dos extratos em separado (Da SILVA et al., 2016).

Tabela 8. Celulases microbianas usadas na sacarificação de diferentes materiais lignocelulósicos.

Substratos	Fontes das enzimas	Referências da literatura
Serragem	Enzima purificada de <i>T. viride</i> CIT 626	Li et al. (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	Celulase comercial (Prozyn®, São Paulo, Brazil)	Perrone et al. (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	Blenda de extrato celulásicos de <i>T. reesei</i> Rut C-30 e <i>Aspergillus awamori</i> (TrAa)	Da Silva et al. (2016)
Palha de milho	β -glucosidase comercial (Novozyme 188) Celulase comercial (Celluclast, Sigma-Aldrich)	Xu et al. (2015)
Biomassa de <i>Senna siamea</i>	Celulase comercial de <i>T. reesei</i> e β -glucosidase comercial (Sigma-Aldrich)	Mund et al. (2016)
Alga <i>Macrocystis pyrifera</i>	Celulase comercial (Celluclast, Sigma-Aldrich)	Ravanal et al. (2016)
Casca de castanha (<i>Castanea sativa</i>)	Celulase comercial (Spezyme CP cellulase, Sigma-Aldrich)	He et al. (2016)
Resíduo celulósico de tamareira	Extrato de celulase <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Y-1	Alrumman (2016)
Haste de algodão	Celulase comercial (Shanghai Boao Biotech. Corp.)	Du et al. (2016)
Palha de arroz	Celulase commercial (Cellic Ctec2, Novozyme)	Phitsuwan et al. (2016)
Casca de broto de bambu	Celulase comercial (Accellerase 1500, Genencor)	Qing et al. (2016)

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Selecionar microrganismos de ambiente marinho e terrestre produtores de celulasas para hidrolisar parcialmente ou totalmente polissacarídeos de origem natural como a celulose.

3.2. Metas

- Selecionar os microrganismos produtores de celulasas;
- Selecionar as melhores condições de cultivo para a produção das celulasas;
- Avaliar as melhores condições reacionais na hidrólise enzimática da celulose;
- Avaliar a capacidade dos microrganismos em biodegradar lignocelulose do bagaço da cana-de-açúcar;
- Avaliar a influência do pré-tratamento na hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes, solventes, meios de cultura e enzimas

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos junto às empresas Sigma Aldrich, Synth, e Acros Organics e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Lista de reagentes utilizados no trabalho.

Nome	Fórmula molecular	Fabricante
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	$C_7H_4N_2O_7$	Sigma-Aldrich
Ácido acético	(CH_3COOH)	Sigma-Aldrich
Ácido bórico	H_3BO_3	Vetec
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	Acros Organics
Ágar	-	Acumedia
Albumina de soro bovino	-	Sigma-Aldrich
Antraquinona	$C_{14}H_8O_2$	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	Vetec
Brometo de potássio	KBr	Vetec
Carboximetilcelulose	-	Sigma-Aldrich
Celobiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma-Aldrich
Celulase de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	Sigma-Aldrich
Citrato de sódio	$Na_3C_6H_5O_7$	Acros Organics
Cloreto de cálcio diidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Vetec
Cloreto de cobalto hexaidratado	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Vetec
Cloreto de estrôncio hexaidratado	$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	Vetec
Cloreto de potássio	KCl	Vetec
Cloreto de sódio	$NaCl$	Vetec
Extrato de malte	-	Acumedia
Farelo de trigo	-	Mercado local
Fosfato dissódico	Na_2HPO_4	Vetec
Fosfato monopotássico	KH_2PO_4	Vetec
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich
Peptona	-	Acumedia
Sulfato dissódico	Na_2SO_4	Vetec
Sulfato de amônio	$(NH_4)_2SO_4$	Vetec
Sulfato de ferro (II) heptaidratado	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Vetec
Sulfato de magnésio heptaidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Vetec
Sulfato de magnésio hexaidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Vetec
Sulfato de manganês pentaidratado	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	Vetec
Sulfato de zinco	$ZnSO_4$	Vetec
Tartarato duplo de sódio e potássio	$(KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O)$	Sigma-Aldrich
Ureia	CH_4N_2O	Vetec

4.2. Fungos de ambiente marinho

No laboratório existem linhagens de fungos de ambiente marinho dentre as quais 10 foram selecionadas para avaliar a capacidade de biodegradação da celulose. Os fungos foram isolados pelo grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (IQSC/USP), os quais foram gentilmente cedidos ao Grupo de Química Orgânica e Biocatálise coordenado pelo Prof. Dr. André L. M. Porto para estudos de biocatálise, biotransformação e biodegradação.

Os fungos *Penicillium miczynskii* CBMAI 930 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 foram isolados da esponja marinha *Geodia corticostylifera*. *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 e *Bionectria* sp. CBMAI 936 foram isolados da esponja marinha *Chelonaplysilla erecta*. As linhagens de fungos *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Beauveria felina* CBMAI 738 foram isoladas da alga marinha *Caulerpa* sp. Os fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 foram isolados de espécies de *Cnidarian* genuinamente brasileira, como *Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* e *Mussismilia hispida*, respectivamente, coletadas em São Sebastião, São Paulo. Os fungos isolados foram identificados utilizando métodos convencionais e de biologia molecular no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA / UNICAMP) (<http://www.cpqba.unicamp.br/>).

4.3. Fungos terrestres

Rhizopus sp. CBMAI 1458 – Esse fungo apresentou colônias cotonosas de cor branca, circular, com centro ligeiramente mais elevado. A coloração do reverso da placa mostrou-se branca, mas, em alguns casos, pode ser escuro (marrom avermelhado) no centro. O fungo *Rhizopus* sp. Cs1 foi isolado da semente de *Chorisia speciosa* (paineira) (MELGAR et al., 2013).

Aspergillus sp. CBMAI 1198 – As colônias desse fungo apresentaram aspecto irregular que se formou por toda a superfície da placa. Foram observadas hifas brancas ralas na parte inferior e hastes com pontos pretos na parte superior. O reverso da placa apresentou coloração marrom clara. O fungo foi isolado da semente de *Peltophorum dubium* (canafístula) (MELGAR et al., 2013).

Trichoderma reesei RUT C-30 – Essa é uma linhagem mutante que foi usada apenas para fins de comparação com artigos que reportam o seu uso, sendo manipulada no *Bioengineering Department* do *Institute for Bioengineering and Bioscience* – IST-*University of Lisbon*, Portugal, sob supervisão do Prof. Dr. Luis Joaquim Pina da Fonseca.

4.4. Cultivo dos fungos

4.4.1. Meio de cultura contendo extrato de malte

O crescimento em extrato de malte foi utilizado para a obtenção das colônias puras dos fungos marinhos e terrestres. O meio sólido foi preparado utilizando-se extrato de malte (30 g.L⁻¹) e ágar (15 g.L⁻¹) em água do mar artificial (1 L). O pH do meio foi ajustado com auxílio de um potenciômetro (Qualxtron modelo 8010) previamente calibrado utilizando soluções de HCl 0,5 mol.L⁻¹ ou NaOH 0,7 mol.L⁻¹. Posteriormente a solução foi esterilizada em autoclave (Phoenix) a 120 °C durante 20 min. Foram vertidos 25 mL de meio em cada placa de Petri previamente esterilizada em autoclave. As placas foram vedadas com parafilme e mantidas durante 24 h em estufa a 32 °C (Tecnal modelo TE-2005) para verificar se estavam adequados para uso e posterior inóculo dos microrganismos.

Em seguida os fungos (terrestres e marinhos) foram inoculados nos meios de cultura de extrato de malte e incubados em estufa à temperatura de 32 °C.

A água do mar artificial foi preparada usando os seguintes sais: CaCl₂.2H₂O (1,36 g.L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (9,68 g.L⁻¹), KCl (0,61 g.L⁻¹), NaCl (30,00 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,14 g.L⁻¹), Na₂SO₄ (3,47 g.L⁻¹), NaHCO₃ (0,17 g.L⁻¹), KBr (0,10 g.L⁻¹), SrCl₂.6H₂O (0,04 g.L⁻¹), H₃BO₃ (0,03 g.L⁻¹).

O meio de cultura sólido de extrato de malte foi preparado para obter as colônias puras dos fungos. O meio de cultura dos fungos terrestres também foi preparado em água do mar artificial devido à presença de vários sais que favorecem o crescimento microbiano.

Todas as manipulações dos meios de cultura e dos microrganismos foram realizadas em cabine de fluxo laminar (Veco) previamente limpa e esterilizada com etanol 70%, hipoclorito de sódio 2% e lâmpada germicida de UV-254.

4.4.2. Preparo da solução de esporos para inóculo das linhagens fúngicas

As linhagens fúngicas foram cultivadas a 32 °C em tubos de ensaio contendo 8 mL de meio de cultura contendo malte 2,0% e ágar 1,5% por 5 dias. Em seguida foram adicionados 5,0 mL de uma solução de Tween 80 (0,5%) em cada tubo de ensaio contendo os fungos. Com o auxílio de agulha de inóculo, os esporos foram coletados do meio de cultura sólido sendo transferidos para a solução de Tween. As soluções de Tween contendo os esporos e micélios fúngicos foram filtradas em sistema de funil, contendo lã de vidro como o agente filtrante, acoplado a tubos Falcon (15 mL). Em cada tubo Falcon foi adicionado 5,0 mL da solução filtrada e 5,0 mL de água destilada esterilizada.

A solução foi então agitada e em seguida centrifugada em centrífuga da marca Hermle Z 200 A (6 min, 6000 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Essa etapa de lavagem da solução para remoção completa do Tween 80 foi repetida quatro vezes. Após a lavagem, a suspensão de esporos foi transferida para a Câmara de Neubauer da marca HBG e a seguir coberta com lamínula de vidro. A contagem foi realizada no laboratório da Prof. Dra. Márcia Nitschke (IQSC-USP) usando microscópio óptico da marca Zeiss modelo Primo-Star.

4.4.3. Fermentação em estado sólido

O crescimento dos fungos em meio sólido com farelo de trigo foi utilizado para induzir a produção de celulasas. O meio sólido foi preparado pela adição de farelo de trigo (5,0 g) e 10 mL de uma solução aquosa contendo ureia (0,30 g.L⁻¹), peptona (0,75 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1,40 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (2 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,30 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,40 g.L⁻¹), ZnSO₄ (1,40 mg.L⁻¹), FeSO₂.7H₂O (5,00 mg.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (2,00 mg.L⁻¹) e MnSO₄.5H₂O (1,60 mg.L⁻¹) em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O pH da solução foi ajustado antes de cada experimento com auxílio de um potenciômetro, previamente calibrado, utilizando soluções de HCl (0,5 mol.L⁻¹) ou NaOH (0,7 mol.L⁻¹). Posteriormente o meio foi esterilizado em autoclave à temperatura de 120 °C durante 20 min.

Em seguida os fungos foram inoculados nos meios de cultura contendo farelo de trigo através de solução de esporos, na concentração de 5.10⁵ esporos/grama de substrato e incubados em estufa em diferentes períodos de tempo (2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias) e diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8) e de temperatura (25, 30, 32, 40 e 45 °C).

4.5. Extração do caldo enzimático contendo as celulasas

Após o período de crescimento dos fungos foi realizada a extração das enzimas totais adicionando-se aos frascos Erlenmeyer de 125mL tampão acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$, 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,5) na relação 10 mL de tampão para 1 g de substrato (farelo de trigo). Em seguida, utilizando-se um agitador magnético de bancada a solução foi agitada vigorosamente durante 60 min.

Após 60 min a mistura foi filtrada a vácuo para a retirada do material sólido e centrifugados (centrífuga da Hermle Z 200 A) por 10 min a 6000 rpm para a remoção completa das partículas sólidas. A solução resultante foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e usada posteriormente para avaliação da atividade celulolítica do extrato enzimático. A avaliação da atividade foi realizada logo após a obtenção do extrato enzimático.

Uma segunda extração foi realizada para verificar o percentual de atividade celulolítica remanescente nas celulasas adsorvidas no farelo de trigo após a primeira extração.

4.6. Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

A fórmula geral (Equação 1) utilizada para a determinação das atividades (*FPAse*, *CMCase* e *Celobiase*) foi adaptada de Ghose (1987).

Equação 1. Determinação das atividades celulolíticas.

$$\text{Atividade} = ART \times \frac{V_t}{0,18 \cdot V_e \cdot t} \quad (\text{Eq. 1})$$

ART: açúcares redutores totais;

V_t: volume total do ensaio;

V_e: volume de extrato enzimático usado;

0,18: massa referente a 1 μmol de glicose;

t: tempo de reação (min).

4.6.1. Determinação da atividade de celulases totais (*FPase*)

Este método é utilizado para determinar a atividade total de celulases presentes no meio de cultura. Para obtenção da atividade é necessário determinar a concentração de açúcares redutores totais liberados durante o processo de degradação do substrato. Neste caso o substrato utilizado foi uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 de 1 cm x 6 cm (SALLES et al., 2010; MILLER, 1959; BIAZUS et al., 2007).

A tira de papel foi enrolada em formato espiral e colocada dentro de tubos de ensaio com 2 mL de tampão citrato de sódio ($C_6H_8O_7/Na_3C_6H_5O_7$, 50 mmol.L⁻¹, pH 4,8). Em seguida adicionou-se 1 mL do extrato enzimático ao tubo de ensaio. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em banho termostatizado (50 °C) durante o período de 60 min para que a reação ocorresse. Posteriormente, os tubos foram resfriados e retiradas alíquotas de 1 mL da solução e a essa adicionou-se 3 mL de DNS e 1 mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho maria (água em ebulição) por 5 min. Em seguida a solução foi resfriada e analisada em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, GENESYS™ 10S Bio) no comprimento de onda de 575 nm.

O branco ou controle dos experimentos foi feito sem a presença do papel de filtro mas usando-se as mesmas condições reacionais (1 mL de extrato enzimático + 2 mL de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8).

4.6.2. Determinação da atividade das endo-celulases (*CMCase*)

Para a determinação da *CMCase* foi adicionado 1 mL de solução de carboximetilcelulose (1%), preparada usando tampão citrato ($C_6H_8O_7/Na_3C_6H_5O_7$, 0,05 M, pH 4,8), a um tubo de ensaio contendo 1 mL de extrato celulásico. A mistura foi mantida à temperatura de 50 °C por 30 min. Posteriormente, os tubos foram resfriados e retiradas alíquotas de 1 mL da solução e a essa adicionou-se 3 mL de DNS e 1 mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho maria (água em ebulição) por 5 min. Em seguida a solução foi resfriada e analisada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 575 nm (adaptado de GHOSE, 1987).

O branco ou controle dos experimentos foi feito substituindo a solução de carboximetilcelulose (1%) por tampão citrato (0,05 M, pH 4,8).

4.6.3. Determinação da atividade das β -glucosidases (*Celobiase*)

Para a determinação da *Celobiase* foi adicionado 1 mL de solução de celobiose (15 mM), preparada usando tampão citrato (0,05 M, pH 4,8), a um tubo de ensaio contendo 1 mL de extrato celulásico. A mistura foi mantida à temperatura de 50 °C por 30 min. Em seguida foi retirada uma alíquota de 100 μ L a qual foi adicionada 100 μ L de DNS, cuja mistura foi submetida ao aquecimento em banho maria (água em ebulição) por 5 min. Em seguida foi adicionado 500 μ L de água destilada e realizou-se a análise em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 575 nm (Thermo Scientific, GENESYS™ 10S Bio) (adaptado de GHOSE, 1987).

O branco ou controle dos experimentos foi feito substituindo a solução de celobiose (1%) por tampão citrato (0,05 M, pH 4,8). Foi preparado um segundo controle contendo apenas a solução de celobiose e tampão citrato (0,05 M, pH 4,8).

A esquematização da produção de celulasas usadas neste trabalho encontra-se na Figura 7.

Figura 7. Esquematização da produção de celulases por linhagens fúngicas.

4.7. Análise de açúcares redutores pelo método de DNS

Os açúcares redutores quando em meio alcalino com aquecimento (100 °C) formam enedióis, os quais atuam como doadores de elétrons que são capturados pelo reagente 3,5-dinitro-salicilato (amarelo) reduzindo-os para 3-amino-5-nitro-salicilato (laranja avermelhado) (Figura 8) (SALLES et al., 2010; MILLER, 1959).

Figura 8. Equação química da reação de oxirredução entre a glicose e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

4.7.1. Preparação do reagente DNS

Para o preparo do reagente DNS foram pesados 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sal de Rochelle). Para o preparo do reagente foram feitas duas soluções:

Solução A - Em um béquer dissolveu-se 10 g de DNS em 200 mL de $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ (2 mol.L⁻¹).

Solução B - Em outro béquer contendo 500 mL de água destilada foi adicionado o Sal de Rochelle. Para a dissolução completa a solução foi mantida em agitação magnética à temperatura ambiente.

Em seguida as soluções A e B foram misturadas e o volume final completado para 1 L. Devido à solução ser fotossensível esta foi armazenada em um recipiente envolvido por papel alumínio e mantida em refrigeração à temperatura de 4 °C por um período de até 60 dias (SALLES et al., 2010; MILLER, 1959).

4.7.2. Construção da curva analítica para a quantificação dos açúcares redutores

Para construção da curva analítica foram utilizadas soluções de glicose com concentrações 0,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 90,0 e 100,0 mg.dL⁻¹ (BIAZUS et al., 2007). Para a obtenção da curva foi adicionado 1 mL de amostra-padrão (de 0 – 100 mg.dL⁻¹ de glicose) a 3 mL do reagente DNS e 1 mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho-maria (água em ebulição) por 5 min, e em seguida resfriada à temperatura ambiente para posterior análise em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 575 nm (Thermo Scientific,

GENESYS™ 10S Bio). O branco/controle das análises consistiu de 2 mL de água destilada e 3 mL de DNS.

4.8. Purificação das celulasas

Os estudos de separação e purificação de proteínas foram realizados no Bioengineering Department do Institute for Bioengineering and Bioscience – IST-University of Lisbon, Portugal, sob supervisão do Prof. Dr. Luis Joaquim Pina da Fonseca.

4.8.1. Separação e purificação de celulasas em pequena escala

As proteínas presentes nos extratos enzimáticos dos fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847 foram precipitadas pela adição de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até obter 80% de saturação. O precipitado coletado após a centrifugação não apresentou atividade. Portanto, tal metodologia não foi usada nos experimentos posteriores.

O complexo celulásico obtido de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma Aldrich, ~1 U.mg de sólido) foi a formulação comercial usada para desenvolver a metodologia de purificação das enzimas.

Utilizaram-se 10 mg de proteína as quais foram dissolvidas em 5 mL de solução tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) ou citrato ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7/\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) (0,05 M, pH 8,0) e adicionadas à coluna de troca iônica Q-Sepharose ou SP-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suécia), com volume de resina de 10 mL, previamente condicionadas e lavadas com o tampão utilizado como o eluente inicial (50 mL), com fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A eluição das enzimas foi realizada usando variações no pH (4-8). Para a coluna Q-Sepharose o tampão inicial foi o fosfato cujo valor de pH variou em ordem decrescente de acidez entre pH 8-6, e em seguida mudando o tampão para citrato, variando-se o pH em ordem decrescente de acidez entre pH 6-4. Para a coluna SP-Sepharose a ordem dos tampões foi trocada, uma vez que possui carga oposta à coluna Q-Sepharose. Iniciou-se a separação usando tampão citrato, variando-se o pH em ordem crescente de acidez entre pH 4-6, sendo posteriormente trocado para tampão fosfato, cuja variação crescente de pH foi entre 6-8. Foram coletadas 4 frações por valor de pH utilizado e cada fração com volume médio de 5 mL.

Também foi feita a separação das enzimas através da adição de NaCl no tampão fosfato (0,05 M, pH 6,8) variando a concentração do mesmo a cada 0,03 M, no intervalo de 0-0,3 M. Foram coletadas 4 frações por valor de concentração utilizado e cada fração com volume médio de 5 mL.

4.8.2. Separação e purificação de celulasas por AKTA purifier 100

Foram utilizadas 500 mg da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* dissolvidas em 1000 mL de solução tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 20 mM, pH 6,8) e adicionadas à coluna de troca iônica Q-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suécia) com volume de resina de 400 mL, previamente condicionada e lavada com o tampão fosfato (1500 mL) com fluxo de $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A eluição das enzimas foi feita pela adição gradiente de solução de NaCl 0,3 M (Tabela 10).

Tabela 10. Percentual de adição do eluente B (NaCl 0,3 M) na fase móvel durante purificação de celulasas usando AKTA purifier 100

% B	Volume gradiente ^a (mL)	Volume isocrático ^b (mL)
0	-	2000
20	500	500
60	1000	500
100	900	900

^a: volume de eluente em que ocorreu a mudança do percentual da solução de NaCl

^b: volume de eluente em que não houve variação da concentração de NaCl

A entrada da coluna estava conectada ao sistema de bombas do AKTA purifier 100 (GE Healthcare) e a saída estava conectada ao detector ultravioleta – UV (280 nm). A presença de proteínas na fase móvel foi controlada pelo espectro de UV obtido no software Unicorn 5.0, as quais foram coletadas em diferentes frascos de acordo com sua eluição.

4.8.3. Determinação das proteínas totais por BCA

A determinação das proteínas totais foi realizada usando o kit comercial Pierce[®] BCA Protein Assay (Thermo Scientific). A curva analítica foi obtida usando albumina de soro bovina – BSA nas concentrações de 0,00 0,025, 0,125, 0,250, 0,500, 0,750, 1,00, 1,50, 2,00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (ChemCruz). Para cada 25 μL de amostra foram adicionados 200 μL da solução de BCA, sendo a solução final incubada em estufa por 30 min a 37 °C. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 562 nm em um leitor de

microplacas (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH) para a quantificação das proteínas totais.

4.8.4. Focalização isoeletrica

A focalização isoeletrica (FI) foi usada na determinação do ponto isoeletrico da formulação celulásica comercial de *Trichoderma longibrachiatum* e das proteínas presentes nos extratos fúngicos (*A. sydowii* CBMAI 935 e *M. racemosus* CBMAI 847). Para a FI das amostras protéicas foi usado PhastGel® IEF 3-9 (50 x 46 x 0,45 mm) (GE Healthcare) e o equipamento Pharmacia PhastSystem Separation. Cada análise durou cerca de 40 minutos. As amostras utilizadas continham aproximadamente 2 mg.mL⁻¹ de proteína. Os marcadores do ponto isoeletrico usados foram Broad pI Kit, pH 3-10 (GE Healthcare), composto por amiloglucosidase (pI=3,50); vermelho de metila (pI=3,75); inibidor de tripsina (pI=4,55); β-lactoglobulina A (pI=5,20); anidrase carbônica bovina B (pI=5,85); anidrase carbônica humana B (pI=6,55); mioglobina, banda ácida (pI=6,85); mioglobina, banda básica (pI=7,35); lecitina de lentilha, ácida (pI=8,15); lecitina de lentilha, média (pI=8,45); lecitina de lentilha, básica (pI=8,65) e tripsinogênio (pI=9,30). Os geis foram corados com nitrato de prata (AZEVEDO *et al.*, 2010).

4.8.5. Caracterização protéica por SDS-PAGE

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) foi realizado a fim de avaliar o perfil protéico obtido durante a separação das celulases e dos extratos celulásicos dos fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847. Os marcadores utilizados foram os presentes no Kit Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad).

O tampão de amostra utilizado foi preparado com 62,5 mM Tris–HCl pH 6,2, SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v) e glicerol 10% (v/v). Em seguida, as proteínas presentes nas amostras foram desnaturadas em condições redutoras através da adição de ditioneitol (C₄H₁₀O₂S₂) 100 mM e aquecidas a 100 °C por 5-10 minutos. Posteriormente, 20 µL de cada amostra foram carregados no gel de acrilamida 12%, o qual foi preparado usando solução estoque 40% de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) (Bio-Rad). A separação foi realizada a 90 mV usando um tampão de corrida composto por glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1% pH 8,3. Os geis foram corados com Coomassie PhastGel (Pharmacia AB Laboratory Separations®) (AZEVEDO *et al.*,

2010). A descoloração foi realizada usando uma solução de etanol/ácido acético (30%/10%, v/v). Os géis com bandas de baixa intensidade foram em seguida corados com nitrato de prata (AgNO_3).

4.9. Pré-tratamento da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar

A etapa de pré-tratamento da biomassa (bagaço da cana-de-açúcar) foi realizada em colaboração com o Grupo de Físico-Química Orgânica no Instituto de Química de São Carlos-USP com a supervisão do Prof. Dr. Antônio Aprígio da Silva Curvelo.

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado na Usina de álcool Iacanga localizada na cidade de Iacanga, SP, no início de 2014, referente à safra 2013/2014. O bagaço foi coletado direto da linha de produção de álcool. A fim de remover os açúcares ainda remanescentes no mesmo foi feita uma extração com água em extrator tipo Soxhlet por aproximadamente 8 ciclos de refluxo até que não houvesse mais açúcar adsorvido no bagaço. O bagaço foi colocado para secar em estufa com fluxo de ar, com temperatura de 40 °C (2 dias) até que o mesmo apresentasse uma porcentagem de umidade relativa abaixo de 10% em massa. Posteriormente o bagaço foi armazenado à temperatura ambiente. Os teores de umidade foram aferidos utilizando-se uma termobalança “BEL Engineering” da série “TopRay”.

4.9.1. Separação de diferentes partes da cana-de-açúcar para pré-tratamento

Para avaliação da susceptibilidade das diferentes partes do bagaço da cana-de-açúcar frente à hidrólise enzimática foi feita a separação manual da medula (parte interna no colmo) e da casca diretamente da cana-de-açúcar íntegra. A medula e a casca também passaram pelo mesmo processo de remoção de açúcares e de secagem como descrito para o bagaço da cana-de-açúcar.

4.9.2. Processo de deslignificação soda/antraquinona

Para os experimentos de deslignificação dos materiais lignocelulósicos foram utilizados reatores com tampa de rosca de aço 304 inoxidável, de volume de 195 cm³ (5,0 x 4,0 x 15,5 cm), os quais estavam equipados com “o-rings” de politetrafluoroetileno (PTFE) como sistema de vedação. A polpação soda/antraquinona consistiu no uso de 10 g de material seco (bagaço, medula e casca) com solução 16% de

Na₂O equivalente a 2,06 g de NaOH e 0,15% de antraquinona, com razão sólido-líquido 1:10 (NOVO, 2012).

O aquecimento foi feito utilizando-se banho termostatzado contendo glicerina como fluido de aquecimento, com controle digital de temperatura, sendo os reatores imersos no banho somente quando o fluido alcançou a temperatura desejada (160 °C). As reações foram finalizadas após os tempos determinados (bagaço: 20, 40, 60, 80 e 100 min; medula e casca: 100 min) quando os reatores foram colocados imediatamente em banho de água com gelo. Após o resfriamento dos reatores foi feita a separação das polpas dos licores (líquido rico em xilose, glicose e outros derivados da hidrólise/degradação dos materiais lignocelulósicos) gerados no processo por filtração à pressão atmosférica.

As polpas foram submetidas a um procedimento de desfibramento utilizando um desfibrador de pás de 3 L, por cerca de 2 min, com adição de ~150 mL de água para remoção dos fragmentos de lignina adsorvidos nas fibras do bagaço. Em seguida as polpas foram filtradas sob pressão reduzida e lavadas com água destilada até a obtenção de um filtrado com pH neutro. Posteriormente, as polpas foram secas à temperatura ambiente e, após pesagem e determinação da umidade (analisador de umidade OHAUS, modelo MB200), passaram por um moinho de facas “Solab” SL31 equipado com uma tela de 40 mesh e armazenadas à temperatura ambiente.

4.9.3. Caracterização das polpas obtidas por método Klason modificado

No método Klason modificado (NOVO, 2012) utilizou-se massa seca de 800 mg de material lignocelulósico, pré-tratado e não pré-tratado, moído a cerca de 40 mesh. O material seco foi transferido para um tubo de ensaio com tampa rosqueável e autoclavável com capacidade de 500 mL. Em seguida foi adicionada uma solução 72% em massa de ácido sulfúrico à massa de material lignocelulósico e mantendo em agitação magnética constante por 2 h. Ao fim do período reacional adicionou-se 450 mL de água ao tubo que foi fechado e autoclavado à temperatura de 120 °C com pressão interna de 2 bar, por uma hora.

Para a remoção do sólido residual ao fim do período em autoclave a solução foi filtrada utilizando-se um funil com placa sinterizada ASTM 10-15 calcinado e tarado. O sólido resultante foi lavado com água destilada. O volume final da solução filtrada foi aferido utilizando-se um balão volumétrico de 500 mL. O funil de placa sinterizada contendo a lignina foi então seco à temperatura de 90-100 °C em uma estufa por um

período de 12 h, transferido para um dessecador e pesado até obter uma massa constante. O sólido resultante correspondeu à lignina insolúvel mais os sais inorgânicos presentes no bagaço da cana-de-açúcar após a polpação.

Com o objetivo de obter a massa real de lignina insolúvel o funil de placa sinterizada contendo os sólidos resultantes da filtração foi calcinado em uma mufla “EDG” à temperatura de 525 °C por 4 h com rampa de aquecimento de 100 °C.h⁻¹, obtendo as cinzas e, por diferença de massa, obteve-se a quantidade de lignina insolúvel.

A quantidade de lignina solúvel nas reações Klason foi determinada através da absorbância no UV-Vis da solução aferida para 500 mL (Equação 2). Para a obtenção dos espectros de UV-Vis foi utilizado um aparelho Espectrofotômetro de UV-Vis “Hach” DR-5000 usando uma cela de quartzo polido de 10 mm de caminho óptico, cuja leitura foi realizada no intervalo de 190-320 nm.

Equação 2. Determinação do teor de lignina solúvel no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

$$Lignina\ solúvel\ (\%) = \frac{(4,53 \times A_{215} - A_{280}) \times V_f \times \text{Fator de diluição}}{3 \times massa\ da\ biomassa} \quad (Eq. 2)$$

A₂₁₅: absorbância em 215 nm;

A₂₈₀: absorbância em 280 nm;

V_f: volume aferido da solução ácida da reação Klason em L;

Fator de diluição: a diluição da solução na qual foi registrado o espectro;

Massa de biomassa: massa seca de biomassa usado na reação Klason.

4.10. Determinação dos teores de açúcares obtidos pelo método Klason modificado por HPLC

Esta etapa também foi realizada em colaboração com o Grupo de Físico-Química Orgânica coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Aprígio da Silva Curvelo (IQSC-USP).

A determinação dos teores de celulose e hemicelulose das polpas obtidas no pré-tratamento foi realizada através da análise dos licores obtidos na determinação de lignina Klason por cromatografia líquida de alta eficiência. Para tanto foram analisadas as concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, presentes nos licores.

Para a análise dos teores de glicose, xilose, arabinose e ácido acético a solução foi filtrada em membrana SEP PAK C18 (Waters) para a retenção da lignina solúvel e demais subprodutos do pré-tratamento que pudessem danificar a coluna, sendo posteriormente filtrada com membrana de 0,45 µm. O cromatógrafo usado foi um SHIMADZU (CR 7A) equipado com coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) e detector de Índice de Refração SHIMADZU (RID 20 A). O eluente utilizado foi H₂SO₄ 5 mM com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ à temperatura de 45 °C. O volume de injeção foi 20 µL e o tempo total de análise foi de 18 min.

Para a análise dos teores de furfural e hidroximetilfurfural a solução obtida na hidrólise foi filtrada com membrana de 0,45µm. O cromatógrafo usado foi um SHIMADZU (CR 7A) equipado com coluna u-Bondapack C18 Waters e detector UV-274 nm. O eluente utilizado foi água/acetonitrila/ácido acético (800/100/9 mL) com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ à temperatura de 45 °C. O volume de injeção foi 20 µL e o tempo total de análise foi de 8 min.

4.11. Hidrólise das polpas lignocelulósicas obtidas a partir do pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar e do bagaço sem pré-tratamento por extratos enzimáticos fúngicos

O bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento e sem pré-tratamento foi submetido à reação de hidrólise enzimática por um período de 72 h. A reação foi realizada em frascos Erlenmeyer (125 mL) em agitação orbital (130 rpm) à temperatura de 50 °C em tampão citrato 0,05 M. Utilizou-se 100 mg de material lignocelulósico seco e 1 U *FPase* de caldo enzimático dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 11886 e *M. racemosus* CBMAI 847 para cada uma das amostras de bagaço de cana-de-açúcar obtidas neste trabalho, sendo o volume total do meio reacional de 50 mL.

Ao fim da reação (72 h) as soluções foram filtradas a vácuo e o hidrolisado obtido foi analisado pelo método DNS (Seção 4.7) para determinação dos açúcares redutores totais. O sólido remanescente da reação foi seco em estufa com fluxo de ar à temperatura de 30 °C por 7 dias, sendo em seguida determinada a massa.

Na figura 9 encontram-se esquematizadas as etapas de todo o processo de tratamento e hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 9. Esquematização das etapas de coleta, tratamento, caracterização e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

4.12. Análise estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através de planejamento fatorial completo 2^2 e 2^3 de acordo com os experimentos usando o programa *Statistica for Windows* versão 7.0 da *StatSoft* (1984-2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Screening para determinação da atividade celulolítica dos fungos

Dentre as doze linhagens fúngicas avaliadas, sete apresentaram atividade celulolítica e dessas foram selecionadas cinco para continuidade dos estudos. Foi selecionada a linhagem de ambiente terrestre que apresentou atividade, *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, para fins de comparação com as 4 linhagens de ambiente marinho selecionadas (*A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e *Mucor racemosus* CBMAI 847). A Tabela 11 apresenta os valores de atividade celulolítica frente ao ensaio realizado com papel de filtro para cada uma das linhagens avaliadas após 48 h de cultivo em meio SSF.

Tabela 11. Atividades celulolíticas das linhagens fúngicas cultivadas em meio de cultivo em estado sólido (SSF).

Linhagem	FPAse (FPU.g ⁻¹) ^a
<i>Rhizopus</i> sp. CBMAI 1458*	0,00
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198*	0,80
<i>Penicillium miczynskii</i> CBMAI 930	0,00
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932	0,30
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	0,80
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	0,60
<i>Bionectria</i> sp. CBMAI 936	0,00
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	1,20
<i>Beauveria felina</i> CBMAI 738	0,00
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> CBMAI 849	0,30
<i>Cladosporium cladosporioides</i> CBMAI 857	0,00
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	0,60

* Fungos terrestres.

As espécies selecionadas para a continuação dos estudos já foram reportadas na literatura como produtoras de celulasas, porém são pertencentes a outras linhagens fúngicas.

Aspergillus sydowii foi reportado como produtor de celulase em meio SmF por Sales et al. (2011) onde foram estudadas 9 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* que foram capazes de produzir celulasas e xilanases (SALES et al., 2011). Também foi reportada a otimização da produção de celulasas por essa mesma espécie através da variação dos parâmetros usados no meio de cultivo, tais como a fonte de carbono, pH, temperatura, dentre outros (MATKAR et al., 2013). Até mesmo uma linhagem de *A. sydowii* isolada de ambiente marinho já foi reportada como produtora de β -glucosidase

quando cultivada em SSF usando farelo de trigo e casca de arroz como substratos (MADHU et al., 2009).

A otimização da produção de celulasas pela espécie fúngica *Penicillium citrinum* foi reportada por Dutta et al. (2008). Nesse estudo foi utilizada a linhagem *P. citrinum* MTCC 6489 cultivada em meio SSF usando farelo de trigo, farelo de arroz e palha de arroz como substratos (DUTTA et al., 2008). Ng et al. (2010) também relataram a produção de β -glucosidase a partir da linhagem fúngica *P. citrinum* YS40-5 em SSF usando farelo de arroz como substrato (NG et al., 2010).

A produção de celulasas pela espécie fúngica *Mucor racemosus* relatada por El Bergadi et al. (2014). Nesse trabalho foi avaliada a capacidade deste fungo em degradar o papel de filtro (EL BERGADI et al., 2014).

Desta forma, pelos dados e informações da literatura, as espécies fúngicas de *P. citrinum*, *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* já são conhecidas como produtoras de celulasas. Portanto, o estudo de novas linhagens propostas no presente trabalho, sobretudo aquelas isoladas de ambiente marinho, configura-se como uma importante contribuição no conhecimento acerca da produção de celulasas por essas espécies.

5.2. Otimização das condições de cultivo dos fungos para uma maior produção de celulasas

5.2.1 Curva de atividade enzimática dos fungos

Com o objetivo de avaliar o tempo ótimo de cultivo microbiano para uma maior produção de enzimas celulolíticas os fungos *P. citrinum* CBMAI 1186, *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935 e *M. racemosus* CBMAI 847 foram cultivados por um período de crescimento de até 7 dias, sendo as atividades enzimáticas determinadas a cada 24 h. A Figura 10 mostra os valores das atividades celulolíticas obtidas para cada microrganismo de acordo com o tempo de crescimento.

Figura 10. Atividades enzimáticas celulolíticas de cada fungo determinadas de acordo com o período de cultivo em SSF.

O tempo de cultivo de 72 h (3 dias) foi o que apresentou melhor atividade celulolítica para quatro dos cinco fungos estudados, tendo como provável explicação da diminuição da atividade com o tempo a presença de proteases no meio fermentativo, causando assim a degradação das celulasas durante a fase estacionária de crescimento do fungo. O fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi a exceção pois produziu maior atividade ($0,13 \text{ U.mL}^{-1}$) somente no período de 7 dias de cultivo. Dessa forma ficou estabelecido para as etapas posteriores que o tempo de cultivo a ser utilizado fosse de 3 dias.

Este tempo pode ser considerado satisfatório para produção de celulasas se comparado com o tempo obtido para a maioria dos fungos cultivados em meio SSF que estão descritos na literatura, os quais variam de 72-240 h, cuja variação pode ser notada dentro de um mesmo gênero. Por exemplo, para *Aspergillus*, no estudo publicado por Sajith et al. (2014) com o fungo *A. flavus* BS1 com maior produção de celulase após 72 h e no estudo publicado por El-Ghonemy et al. (2014) em que a linhagem *A. oryzae* NRRL 3484 foi usada e apresentou maior atividade após 120 h de cultivo (SAJITH et al., 2014; EL-GHONEMY et al., 2014; FATEN & EL ATY ABEER, 2013; MADHU et al., 2009; TRIVEDI et al., 2015).

5.2.2. Determinação da temperatura ótima para a produção de enzimas celulolíticas (FPase) pelos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847

Tendo em vista a otimização das condições de cultivo dos microrganismos foi avaliada a influência da temperatura na atividade celulolítica apresentada pelos fungos selecionados. A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam o crescimento fúngico e consequentemente a produção enzimática (PRASANNA et al., 2016; GUOWEI et al., 2011; HUI et al., 2010). Realizou-se o crescimento dos fungos na faixa de temperatura de 25-45 °C num intervalo de 5 °C e também em 32 °C, que é a temperatura padrão adotada em outros estudos no cultivo desses microrganismos no laboratório. Na temperatura de 45 °C não foi observado o crescimento de nenhum dos fungos estudados, pois são todos microrganismos mesofílicos.

As atividades relatadas a partir dessa etapa do trabalho foram expressas como atividade relativa, com a maior atividade obtida expressa como 100% e as demais expressas em percentual relativo através de normalização.

Nos experimentos objetivando a produção de celulases através do controle da temperatura foram realizados experimentos em triplicatas com os 5 fungos selecionados de ambiente marinho e terrestre.

5.2.2.1. *Aspergillus* sp. CBMAI 1198

O fungo de ambiente terrestre *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 apresentou atividade ótima à temperatura padrão para cultivos microbianos do laboratório (32 °C). No entanto, não foi observada uma variação significativa entre os valores de atividade para as demais temperaturas avaliadas, sendo que os menores valores de atividade foram cerca de 85% da atividade ótima quando cultivados nas temperaturas de 35 e 40 °C (Figura 11).

Esse estudo mostrou que essa linhagem fúngica teve uma boa adaptabilidade na faixa de temperatura de cultivo estudada, sendo esta uma importante característica uma vez que prováveis variações não controladas de temperatura durante o cultivo não interferem significativamente no processo de produção de celulases.

A Figura 11 mostra as atividades relativas (%) obtidas para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 em cada uma das temperaturas avaliadas.

Figura 11. Atividade enzimática determinada para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.2.2. *Aspergillus sydowii* CBMAI 934

O fungo *A. sydowii* CBMAI 934 apresentou perdas significativas de atividade enzimática com a variação de temperatura. Obteve-se valor máximo de atividade quando foi cultivado à temperatura de 30 °C e o seu mínimo, aproximadamente 25%, quando a temperatura foi de 40 °C (Figura 12). Essa perda de 75% de atividade enzimática com o aumento de 10 °C mostra que o complexo celulásico produzido por essa linhagem foi sensível à variação de temperatura. Observou-se também uma perda superior a 40% da atividade quando a temperatura de cultivo foi de 25 °C.

Desta forma, para a linhagem fúngica *A. sydowii* CBMAI 934 torna-se necessário um controle mais rigoroso da temperatura ótima de cultivo (30 °C) em meio SSF, pois uma pequena variação de temperatura pode promover uma perda significativa de atividade.

Figura 12. Atividade enzimática determinada para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.2.3. *Aspergillus sydowii* CBMAI 935

O fungo *A. sydowii* CBMAI 935 apresentou atividade ótima quando a temperatura de cultivo foi de 40 °C, sendo esta a linhagem que melhor se adaptou à temperatura mais elevada em que se realizou o crescimento fúngico. Porém não ocorreu crescimento fúngico a 45 °C. Contudo, foi possível observar que nas temperaturas de 25 °C e 30 °C a perda de atividade foi de 20%, enquanto que, quando cultivado nas temperaturas de 32 °C e 35 °C a perda de atividade foi de 50%.

Ficou evidente que essa linhagem pode se adaptar em diferentes condições de cultivo mas com elevadas perdas de atividade (50%) para alguns valores de temperatura (30 °C e 32 °C), sendo, portanto, necessário um bom controle da temperatura durante o cultivo fúngico.

Esse perfil de atividade enzimática observado na Figura 13 pode estar relacionado com a variação da disponibilidade da fonte de carbono no meio de cultivo e como o microrganismo se adapta em tais condições.

Figura 13. Atividade enzimática determinada para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.2.4. *Penicillium citrinum* CBMAI 1186

A temperatura ótima para a obtenção da melhor atividade enzimática para o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi de 25 °C, ou seja, a menor temperatura avaliada. Essa foi a única linhagem que apresentou maior atividade enzimática com esse valor de temperatura ótima. A menor atividade enzimática obtida foi na temperatura de 32 °C com uma perda de mais de 40% de atividade em relação à temperatura de cultivo de 25 °C (Figura 14).

Assim, como obtido para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935, observou-se um aumento da atividade enzimática, quando o crescimento fúngico foi realizado na temperatura de 35 °C, evidenciando uma adaptação do microrganismo a alguns valores de temperatura de cultivo. Contudo, torna-se necessário um controle da temperatura para evitar perdas significativas de atividade enzimática durante a etapa de cultivo.

Figura 14. Atividade enzimática determinada para o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em SSF.

5.2.2.5. *Mucor racemosus* CBMAI 847

O fungo *M. racemosus* CBMAI 847 apresentou maior atividade enzimática quando foi cultivado à temperatura de 35 °C. Também apresentou a maior perda de atividade enzimática entre todas as linhagens avaliadas quando foi cultivado à temperatura de 40 °C (~80 %). A segunda melhor temperatura de cultivo foi em 25 °C com atividade enzimática inferior a 70 % em relação ao cultivo na temperatura de 35 °C. Quando o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 foi cultivado à temperatura de 30 °C ou de 32 °C a perda de atividade foi de aproximadamente 60 % (Figura 15).

Desta forma foi possível observar que a temperatura de cultivo ideal para a produção de uma maior atividade celulolítica para essa linhagem foi de 35 °C, uma vez que variações de 5 °C durante o cultivo acarretou em perdas significativas de atividade enzimática.

Figura 15. Atividade enzimática determinada para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 variando-se a temperatura com 72 h de cultivo em meio SSF.

Dentre as cinco linhagens de fungos estudadas observou-se que cada uma delas apresentou uma temperatura ótima de crescimento: *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 (32 °C), *A. sydowii* CBMAI 934 (30 °C), *A. sydowii* CBMAI 935 (40 °C), *P. citrinum* CBMAI 1186 (25 °C) e *M. racemosus* CBMAI 847 (35 °C).

O fungo de ambiente marinho *Aspergillus* ZJUBE-1 reportado na literatura foi cultivado em palha de trigo e apresentou maior atividade *CMCase* quando cultivado a 37 °C (LIU et al., 2012). Sasi et al. (2012) também reportaram a produção de celulases usando o fungo de ambiente marinho *Aspergillus flavus*, que apresentou maior atividade quando cultivado em farelo de trigo a 30 °C (SASI et al., 2012). Cultivo em temperatura ainda mais baixa foi reportado por Trivedi et al. (2015), em cujo trabalho o fungo de ambiente marinho *Cladosporium sphaerospermum* produziu a maior atividade enzimática quando cultivado em SSF, usando como substrato alga marinha seca e moída, a 25 °C (TRIVEDI et al., 2015). Verificou-se, portanto, que os valores de temperatura para produção de maior atividade enzimática descritas no presente trabalho para os fungos tanto de ambiente marinho como para a linhagem terrestre (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198) foram semelhantes àsquelas descritas na literatura.

Para a linhagem de ambiente terrestre podemos ainda tomar como exemplo o trabalho publicado por Bansal et al. (2012), no qual descreveram que a melhor temperatura de cultivo para o fungo *A. niger* NS-2 em farelo de trigo foi de 30 °C.

Resultado idêntico foi obtido por Deswal et al. (2011) que mostraram que a melhor temperatura para o cultivo do fungo terrestre *Fomitopsis* sp. RCK2010 também foi de 30 °C. Comparando esses resultados com os obtidos neste trabalho, pode-se observar que os fungos filamentosos com capacidade celulolítica apresentam melhor atividade *FPase* em temperaturas próximas ou iguais a 30 °C.

A diferença de temperatura observada para maior produção de celulasas entre as linhagens de ambiente marinho, permite que o microrganismo a ser usado seja escolhido de acordo com o processo em que se deseja aplicá-lo. Também é possível que o conjunto de celulasas seja distinto em cada condição de cultivo, o que possibilita fazer um estudo da associação destas enzimas para obtenção de um melhor rendimento de biodegradação da biomassa celulósica.

5.2.3. Determinação do valor de pH ótimo para a produção de enzimas celulolíticas (*FPase*) pelos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847

O valor de pH inicial do meio de cultura fúngico é um fator importante na produção e secreção de enzimas extracelulares como as celulasas (RAGHUWANSHI et al., 2014; EL-GHONEMY et al., 2014; VAID & BAJAJ, 2016). Desta forma, foi estudada a influência do valor de pH inicial do meio de cultura para as cinco linhagens selecionadas frente à produção de enzimas celulasas. Neste trabalho os valores de pH inicial de cultivo variaram entre 3 a 8, empregando um intervalo de uma unidade na faixa estudada. A temperatura de cultivo usada foi a temperatura ótima determinada para cada uma das linhagens.

Nos experimentos objetivando a produção de celulasas através do controle de pH foram realizados experimentos em triplicatas com os 5 fungos selecionados de ambiente marinho e terrestre.

5.2.3.1. *Aspergillus* sp. CBMAI 1198

O fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 não apresentou variação significativa de atividade enzimática para *FPases* ao longo de toda a faixa de pH estudada, como pode ser observado na Figura 16. No ponto de pH ótimo (pH 7) um desvio padrão significativo ocorreu, equivalente a 20 % da atividade relativa para *FPase*.

A capacidade de adaptação dessa linhagem em todos os valores de pH inicial usados é uma característica importante, uma vez que, se aplicado em processos industriais não sofrerá inibição na produção de celulases caso ocorra alguma variação de pH durante o cultivo. Em geral, sabe-se que a mudança de pH durante o cultivo de microrganismos é comum devido a produção de metabólitos e do consumo das fontes de carbono presente no meio de cultura (THOMAS et al., 2002).

Figura 16. Atividade enzimática determinada para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.3.2. *Aspergillus sydowii* CBMAI 934

A produção de celulases pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 sofreu alterações durante a variação do pH inicial. O valor de pH ótimo foi de 3, o menor valor avaliado, enquanto que entre o pH 5 e o pH 8 não houve alteração significativa da atividade para *FPases*, com queda de 40 % da mesma quando comparada ao pH ótimo (Figura 17).

Mesmo com valores significativos de desvio padrão obteve-se uma produção de celulases em valores de pH mais ácidos (3 e 4). A maior atividade celulolítica em valores de pH inicial mais ácidos é uma característica importante dessa linhagem, considerando que a mesma pode ser aplicada em processos que requeiram condições de cultivo em condições acídicas, podendo inclusive ser cultivada em materiais lignocelulósicos contaminado por ácidos oriundos de algum processo industrial.

Figura 17. Atividade enzimática determinada para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.3.3. *Aspergillus sydowii* CBMAI 935

Assim como para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 a variação de pH inicial do meio de cultivo pouco influenciou na produção de celulases pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935. A quase linearidade na produção de celulases pode ser observada na Figura 18, sendo possível verificar um decréscimo na produção de celulases quando o valor de pH inicial se aproximou de 8.

Figura 18. Atividade enzimática determinada para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.3.4. *Penicillium citrinum* CBMAI 1186

O fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentou valor de pH ótimo de 8, sendo este o valor de pH mais elevado avaliado neste trabalho. No entanto, essa linhagem também se adaptou em valores de pH mais ácidos, com atividade enzimática para *FPA*ses correspondendo a 80 % da atividade em relação ao pH ótimo (Figura 19). Os valores de pH 6 e 7 apresentaram perdas de 50 % da atividade em relação ao pH ótimo.

O perfil de produção de celulases obtido na Figura 19 foi semelhante ao observado para o efeito da variação da temperatura de cultivo dessa linhagem (Figura 15). Uma provável causa dessa perda de atividade em valores intermediários de pH é a mesma que a descrita nos estudos de variação da temperatura, ou seja, a variação da disponibilidade da fonte de carbono oriunda, por exemplo, da produção de metabólitos bem como por morte celular ou expressão de diferentes enzimas.

Figura 19. Atividade enzimática determinada para o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.

5.2.3.5. *Mucor racemosus* CBMAI 847

Para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 foram registrados também ocorreu um decréscimo da atividade enzimática entre os dois melhores valores de pHs obtidos. A maior produção de celulases foi obtida para o pH 6 e o segundo melhor resultado, que equivale a 80 % da produção máxima foi em pH 4 (Figura 20). No entanto, a menor produção de celulases foi observada quando o cultivo foi realizado com pH inicial de 5, observando-se diminuição de 60 % da atividade.

Foi interessante observar que a mudança de apenas 1 unidade no valor de pH causou uma alteração significativa na produção de celulases. Assim, diferentemente ao que foi observado para os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *A. sydowii* CBMAI 935, uma pequena variação do pH durante o processo de cultivo do fungo *M. racemosus* CBMAI 847 interferiu significativamente na produção de celulases.

Figura 20. Atividade enzimática determinada para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 variando-se o pH inicial de cultivo com 72 h de cultivo em meio SSF.

Com a variação do pH inicial do meio de cultura observou-se que o pH apresentou uma forte influência na atividade celulolítica e cada linhagem reagindo na hidrólise do papel de filtro de forma diferente. Tomando-se como exemplo para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934, que quanto menor foi o valor de pH (3), maior foi o valor da atividade enzimática para *FPase*. Enquanto que para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 dois valores de pH (4 e 6) apresentaram maior atividade evidenciando que o mesmo apresentou adaptações às mudanças no meio de cultivo. O fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 também apresentou bons resultados em valores de pH mais ácidos, mas a melhor atividade para *FPase* foi obtida em pH 8. Os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *A. sydowii* CBMAI 935 não apresentaram variações significativas de pH em função da atividade enzimática, portanto, possuem maior facilidade de adaptação às mudanças no pH durante o cultivo.

Trivedi et al. (2015) estudaram a produção de celulases pelo fungo de ambiente marinho *Cladosporium sphaerospermum*, cultivado em meio SSF usando alga marinha

seca e moída como substrato e relataram a produção de maior atividade *FPase* quando cultivado em pH 4 (TRIVEDI et al., 2015). Padmavathi et al. (2012) também estudaram a produção de celulase pelo fungo de ambiente marinho *Aspergillus* sp. e obtiveram maior atividade celulolítica quando o fungo foi cultivado em meio ácido (pH 3), usando folhas de lantana como substrato (PADMAVATHI et al., 2012). No entanto, Sasi et al. (2012) relataram a produção de maior atividade pelo fungo de ambiente marinho *Aspergillus flavus* quando cultivado em farelo de trigo em pH 8, demonstrando que os microrganismos de ambiente marinho podem ter preferências de condições de cultivo muito distintas, principalmente quando se trata do pH do meio de cultivo (SASI et al., 2012).

Bansal et al. (2012) e Deswal et al. (2011) também estudaram o efeito do pH no cultivo dos fungos terrestres *A. niger* NS-2 e *Fomitopsis* sp. RCK2010, respectivamente, em farelo de trigo. O fungo *A. niger* NS-2 apresentou pH ótimo para a atividade *FPase* em torno de 7, enquanto que o fungo *Fomitopsis* sp. RCK2010 apresentou pH ótimo em torno de 5,5. Portanto, o pH ótimo para cada espécie fúngica pode ser diferente de espécies mesmo dentro de seu próprio gênero, e a variação também pode ocorrer em linhagens diferentes da mesma espécie, como foi observado neste trabalho para os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *A. sydowii* CBMAI 934 (BANSAL et al., 2012; DESWAL et al., 2011).

Destaca-se que no estudo da variação do pH inicial os valores de desvio padrão obtidos para algumas linhagens (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934 e *A. sydowii* CBMAI 935) foram superiores àqueles obtidos para a variação de temperatura (Seção 5.2.2).

5.2.4. Determinação do volume de solução de peptona no meio de cultivo durante a produção de enzimas celulolíticas (*FPase*)

Trabalhos na literatura relatam que o volume de solução de peptona adicionado ao meio SSF tiveram uma forte relação com a produção de celulasas, podendo influenciar positivamente ou negativamente (RAGHUWANSHI et al., 2014; DAVE et al., 2013; BANSA et al., 2012). Sendo assim, foi realizado um estudo no qual variou-se o volume de solução de peptona adicionado, desde 5,0 até 17,5 mL, em 5 g de farelo de trigo, o qual foi o substrato usado na produção de celulasas neste trabalho. Os valores de pH e de temperatura usados durante o cultivo foram os valores ótimos determinados para cada linhagem.

Nos experimentos objetivando a produção de celulasas através da adição de peptona foram realizados experimentos em triplicatas com os 5 fungos selecionados de ambiente marinho e terrestre.

5.2.4.1. *Aspergillus* sp. CBMAI 1198

O volume ótimo de solução de peptona adicionado ao meio de cultivo do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 foi de 15,0 mL, o que corresponde ao valor de 3,0 mL de solução para cada 1,0 grama de farelo de trigo (Figura 21). Notou-se que para os demais volumes avaliados a atividade enzimática para *FPAse* foi menor ou igual a 60 %, mostrando que a proporção 3:1 (v/m) foi a mais apropriada para o cultivo desse microrganismo.

A escolha da melhor proporção volume líquido/massa de substrato mostrou-se determinante para a produção de uma maior atividade enzimática das celulasas.

Figura 21. Atividade enzimática determinada para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.

5.2.4.2. *Aspergillus sydowii* CBMAI 934

Para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 não foi observado crescimento fúngico com a adição de 5,0 mL de solução de peptona, porém com a adição de 7,5 mL obteve-se a maior produção de celulasas (Figura 22). A partir da adição de 10,0 mL houve perda de pelo menos 50 % da atividade enzimática. Nesse caso o volume de 7,5 mL de solução de peptona foi ideal para o cultivo dessa linhagem fúngica.

Assim, como para a linhagem *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, a proporção de líquido (solução de peptona) em relação à massa de substrato, foi determinante para o aumento da atividade celulolíticas produzida.

Figura 22. Atividade enzimática determinada para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.

5.2.4.3. *Aspergillus sydowii* CBMAI 935

Assim como no estudo dos valores de pH, a variação do volume de solução de peptona também não afetou a produção de celulases pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935. A variação de atividade para *FPAse* determinada ficou dentro da faixa dos valores de desvio padrão calculados na triplicata (Figura 23).

Assim, esse microrganismo mostrou-se de fácil adaptação a mais uma mudança de variável, permitindo que alterações de pH e umidade possam ser feitas durante o processo de produção de celulases sem que ocorra perda significativa de produtividade e/ou atividade enzimática.

Figura 23. Atividade enzimática determinada para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.

5.2.4.4. *Penicillium citrinum* CBMAI 1186

No estudo da variação do volume de solução de peptona adicionado ao meio de cultivo do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 não foram obtidos bons resultados devido aos altos desvios padrão obtidos para os menores volume de solução de peptona adicionados ao meio de cultivo (Figura 24). No entanto, percebeu-se uma tendência na diminuição da produção de celulasas com o aumento do volume de solução de peptona adicionada.

Figura 24. Atividade enzimática determinada para o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 variando-se o volume de solução de peptona adicionada meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.

5.2.4.5. *Mucor racemosus* CBMAI 847

A maior produção de celulasas obtida pela variação do volume de solução de peptona adicionado ao meio de cultivo para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 foi de 12,5 mL, observando-se uma grande perda de atividade de no mínimo 40% quando se variou o volume para mais ou para menos (Figura 25). Assim, como para os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *A. sydowii* CBMAI 934, ficou evidente que houve um volume de solução de peptona adequado que favoreceu significativamente a produção de celulasas pelo fungo *M. racemosus* CBMAI 847.

Figura 25. Atividade enzimática determinada para o fungo *M. racemosus* CBMAI 847 variando-se o volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultura SSF com 72 h de cultivo.

Notou-se nestes estudos que, assim como para as duas variáveis estudadas anteriormente, temperatura e pH, cada linhagem fúngica apresentou um comportamento diferente frente à variação do volume de solução de peptona adicionada ao meio de cultivo. As linhagens *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847, por exemplo, apresentaram um volume específico de meio de cultura que favoreceu a produção de celulases (15,0, 7,5 e 12,5 mL, respectivamente), enquanto que as linhagens *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. citrinum* CBMAI 1186 se adaptaram melhor às mudanças de volumes de solução de peptona adicionados para os crescimentos fúngicos e a produção de celulases.

O teor de umidade é um fator crucial em qualquer cultivo SSF, pois esta variável influencia o crescimento dos microrganismos e a biossíntese de metabólitos, como por exemplo as enzimas (LEE et al., 2011). A influência do teor de umidade foi avaliada por Raghuwanshi et al. (2014) no cultivo do fungo *T. asperellum* RCK2011 obtendo-se a maior atividade para *FPase* quando foi adicionado cerca de 2,5 mL de solução para cada 1,0 grama de substrato (RAGHUWANSI et al., 2014). Bansal et al. (2012) também estudaram a influência da umidade para o cultivo do fungo *A. niger* NS-2 obtendo-se maior produção de celulases com a adição de 1,5 mL de solução por cada 1,0 grama de substrato usado, mesmo não havendo grande variação da atividade enzimática para *FPase* quando da adição de 2,75 mL/gds (BANSAL et al., 2012). Assim, torna-se evidente que alguns microrganismos podem se adaptar a uma maior

faixa de umidade, enquanto outros apresentam um volume específico para uma maior produção de celulases.

5.2.5. Produção de celulases usando os valores ótimos das variáveis temperatura, pH e umidade obtidos durante melhoramento do cultivo fúngico

Todas as linhagens foram cultivadas usando-se as melhores condições de cultivo determinadas e descritas acima para cada uma das linhagens estudadas, a fim de se verificar o real aumento da atividade *FPase* frente aos valores obtidos no *screening* inicial. Os valores destes estudos foram descritos na Tabela 12 e foram expressos em unidades FPU.g⁻¹.

Tabela 12. Valores das atividades para *FPase* inicial e final após o melhoramento das condições de cultivo dos fungos visando a produção de celulases.

Linhagens fúngicas	<i>FPase_i</i> (FPU.g ⁻¹)	<i>FPase_f</i> (FPU.g ⁻¹)
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 ^a	0,80	2,80
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934 ^b	0,80	1,90
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935 ^c	0,60	0,73
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186 ^d	1,20	1,30
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847 ^e	0,60	2,40

Condições de cultivo das linhagens: ^a 3 dias, 32 °C, pH 7, 3:1 (v/m); ^b 3 dias, 30 °C, pH 3, 1,5:1 (v/m); ^c 3 dias, 40 °C, pH 6, 3:1 (v/m); ^d 3 dias, 25 °C, pH 8, 2:1 (v/m); ^e 3 dias, 35 °C, pH 6, 2,5:1 (v/m).

Foi possível observar nestes estudos que os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *M. racemosus* CBMAI 847 apresentaram os maiores aumentos na produção de celulases, cujos valores foram 3,5 e 4,0 vezes do valor inicial, respectivamente, em relação à condição inicial. O fungo *A. sydowii* CBMAI 934 também apresentou um bom aumento da atividade enzimática para *FPase* correspondendo aproximadamente 2,4 vezes em relação à condição inicial.

Foi observado também nesses estudos que os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentaram as atividades de *FPases* relativamente estáveis na produção de celulases, o que é explicado pela maior adaptação dessas linhagens aos diferentes valores de pH, temperatura e umidade durante o período de cultivo de 72 h em meio SSF.

A linhagem *T. reesei* RUT C-30 é um dos microrganismos mais usados na literatura e apresentou atividade para *FPase* de 22,89 U.g⁻¹ quando cultivado em farelo de trigo, razão de solução de peptona/farelo de trigo de 3:1, temperatura de 30 °C e pH

inicial da solução de peptona não informado (DHILLON et al., 2011). Para fins de comparação foi realizado o cultivo dessa mesma linhagem nas mesmas condições do *screening* inicial deste trabalho (farelo de trigo, razão de solução de peptona/farelo de trigo 2:1, valor de pH inicial 6,0 e temperatura de cultivo de 32 °C) obtendo-se *FPase* de 6,0 U.g⁻¹. Ficou evidente mais uma vez que a variação das condições influenciou significativamente na produção de celulasas.

Os resultados da Tabela 12 foram então comparados com os valores de atividade para *FPase* descritos na literatura, em cujos trabalhos os fungos foram cultivados em meio SSF usando, como substrato, farelo de trigo (Tabela 13).

Tabela 13. Relação das atividades *FPase* produzidas por fungos terrestres descritos na literatura com as atividades enzimáticas obtidas nesse trabalho em meio SSF usando farelo de trigo como substrato.

Linhagens fúngicas	FPU (U.g ⁻¹)	Referências
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	2,52	Falkoski et al. (2013)
<i>Myceliophthora</i> sp.	0,74	Badhan et al. (2007)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	22,89	Dhillon et al. (2011)
<i>Thermoascus auranticus</i>	4,40	Kalogeris et al., (2003)
<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	3,49	Deswal et al. (2011)
<i>Trichoderma asperellum</i> RCK2011	1,60	Raghuwanshi et al. (2014)
<i>Aspergillus niger</i> F-119	59,2	Fadel (2000)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	4,55	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> NS-2	16,8	Bansal et al. (2012)
<i>Penicillium janthinellum</i> NCIM 1171	10,0	Singhvi et al. (2011)
mutant EU2D-21		
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	2,80	Santos (2017)
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	1,90	Santos (2017)
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	0,73	Santos (2017)
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	1,30	Santos (2017)
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	2,40	Santos (2017)

FPU: Filter paper unity (tradução: unidade de papel de filtro)

É possível observar na Tabela 13 que existe uma variação significativa entre as atividades relatadas na literatura, até mesmo com linhagens da mesma espécie fúngica, como por exemplo o fungo *A. niger*, que apresentou variação de 4,55–59,2 U.g⁻¹ (Tabela 13). Quando se observa os resultados exibidos para as linhagens fúngicas deste trabalho com as demais expressas na Tabela 13, nota-se que as mesmas apresentam atividades significativas, mas, que podem ser melhoradas por estudos de novas variáveis

no cultivo, ou até mesmo por mutações genéticas. Raghuwanshi et al. (2014) realizaram a mutação do fungo *Trichoderma asperellum* RCK2011 através da exposição à radiação ultravioleta e obtiveram atividade de 2,2 U.g⁻¹, enquanto que a linhagem não mutante apresentou atividade de 1,6 U.g⁻¹ (RAGHUWANSI et al., 2014).

Destaca-se também que alguns trabalhos relataram espécies que apresentaram atividades enzimáticas inferiores ou iguais às aquelas obtidas neste trabalho. Além disso, complexos celulásicos produzidos por uma espécie fúngica podem ser mais específicos para um determinado substrato que aquelas produzidas por outras espécies fúngicas. Portanto, um valor discreto de *FPase* obtido para um conjunto de enzimas celulases não implica que este complexo enzimático apresente baixos valores de hidrólise para um outro substrato, como por exemplo o bagaço da cana-de-açúcar. Isso é possível de ocorrer devido aos diferentes tipos de celulases produzidas pelas linhagens microbianas.

5.2.6. Determinação da atividade enzimática remanescente no meio de cultura através de uma segunda extração enzimática

O uso de uma única extração enzimática pode não ser suficiente para a remoção das celulases presentes no meio de cultura SSF. Desta forma foi feita uma segunda extração com tampão acetato (pH 4,5, 50 mM) a fim de verificar quanto de celulases restaram adsorvidas no farelo de trigo utilizado como meio de cultivo SSF e assim determinar as suas atividades enzimáticas.

Notou-se através destes estudos que um bom valor de percentual das celulases ficou adsorvido no farelo de trigo após a primeira extração, sobretudo as produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934, cujo percentual de atividade remanescente foi de 60% (Tabela 14). As demais linhagens apresentaram percentuais de atividade enzimática para *FPase* remanescente variando-se entre 25-41% (Tabela 14).

Tabela 14. Extração das celulases remanescentes adsorvidas no farelo de trigo após a primeira extração com tampão acetato.

Linhagem	<i>FPase</i> residual (%) ^a
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	41
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	60
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	37
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	34
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	25

^a Percentual de atividade remanescente relativo às atividades enzimáticas obtidas na primeira extração

Não há na literatura um procedimento que descreva ou recomende a necessidade de realizar mais de uma extração de celulases do meio SSF, mas esses resultados demonstraram que uma parte importante das celulases produzidas nesse tipo de fermentação foi retida no farelo de trigo.

Uma provável solução é o uso de extrações múltiplas e seguidas de uma etapa de concentração do sobrenadante obtido. No entanto, é preciso considerar o aumento dos gastos no processo, visto que a viabilidade econômica é uma das questões a ser considerada antes da implementação das celulases no processo de hidrólise de celulose em escala industrial.

5.2.7. Determinação das atividades *CMCase* e *Celobiase* presentes nos extratos fúngicos

As atividades *CMCase* e *Celobiase* estão diretamente ligadas à presença de *endo*-glucanases e β -glucosidases nos extratos enzimáticos, respectivamente. Na Tabela 15 estão descritos os valores de *FPase* obtidos para ambas as enzimas para cada linhagem fúngica estudada neste trabalho.

A linhagem que apresentou a maior atividade *CMCase* foi extraída do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 (4,36 U.g⁻¹), mas também foi o que apresentou a menor atividade *Celobiase* (0,14 U.g⁻¹) (Tabela 15). Embora o *A. sydowii* CBMAI 935 foi a linhagem que forneceu a menor atividade *FPase* (0,73 U.g⁻¹) ele apresentou a maior atividade *Celobiase* (0,72 U.g⁻¹) além de ter uma boa produção de *CMCase* (3,06 U.g⁻¹) (Tabela 15). Como o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 teve uma boa produção das enzimas *endo*-glucanase e β -glucosidase, a provável razão de apresentar um baixo valor de atividade para celulase (*FPase*) é a baixa produção de *exo*-glucanases, visto que para uma boa produção de açúcares redutores faz-se necessária a ação sinérgica entre as três enzimas.

As linhagens que apresentaram boa produção das três atividades avaliadas, *FPase*, *CMCase* e *Celobiase* foram *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *M. racemosus* CBMAI 847.

Tabela 15. Atividades *FPase*, *CMCase* e *Celobiase* após o melhoramento das condições de cultivo para a produção de celulases.

Linhagens	<i>FPase</i> (U.g ⁻¹)	<i>CMCase</i> (U.g ⁻¹)	<i>Celobiase</i> (U.g ⁻¹)
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198 ^a	2,8	3,89	0,55
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934 ^b	1,9	4,36	0,14
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935 ^c	0,73	3,06	0,72
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186 ^d	1,3	1,93	0,22
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847 ^e	2,4	3,73	0,52

^a 3 dias, 32 °C, pH 7, 3:1 (v/m); ^b 3 dias, 30 °C, pH 3, 1,5:1 (v/m); ^c 3 dias, 40 °C, pH 6, 3:1 (v/m); ^d 3 dias, 25 °C, pH 8, 2:1 (v/m); ^e 3 dias, 35 °C, pH 6, 2,5:1 (v/m).

5.3. Purificação de celulases por cromatografia de troca iônica

5.3.1. SDS-PAGE da celulase comercial de *Trichoderma longibrachiatum*

Para o desenvolvimento do método de separação mais adequado para as celulases foi usada uma formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum*. Além disso, a separação das celulases presentes na formulação comercial teve como objetivo não apenas desenvolver um método de separação, mas também a aplicação das celulases isoladas como catalisadores promíscuos em reações aldólicas, cuja aplicação faz parte da tese de doutorado de Willian Garcia Birolli.

Inicialmente, foi feita uma análise do perfil proteico da formulação comercial a fim de estimar quantas proteínas compunham a formulação celulásica comercial. Para tanto foi realizada a análise SDS-PAGE (Figura 26) usando também marcadores de peso molecular. A revelação dos sinais proteicos foi feita usando o agente revelador Coomassie Brilliant Blue.

Observou-se a presença de sete sinais ou bandas de proteínas presentes na formulação comercial de *T. longibrachiatum*, sendo que os sinais com pesos moleculares de 65 e 55 kDa foram os mais intensos, indicando uma maior concentração dessas proteínas. Contudo, não foi possível nesta etapa constatar se todos os sinais revelados na análise por SDS-PAGE correspondiam às enzimas do complexo celulásico, podendo ser hemicelulases ou outro tipo de enzimas ou até mesmo proteínas.

Figura 26. SDS-PAGE de celulase de *Trichoderma longibrachiatum*.

1- Proteínas da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum*

2- Marcadores de peso molecular de proteínas

Eletroforese realizada a 90 V.

5.3.2. Determinação do ponto isoelétrico das celulasas

Após realizar análise por SDS-PAGE e a determinação do perfil proteico foi realizada a focalização isoelétrica (Figura 27) para a determinação do ponto isoelétrico (pI) das proteínas presentes no complexo celulásico comercial. Esta etapa foi importante a fim de permitir escolher o tampão mais adequado e o tipo de fase estacionária a ser usada na cromatografia de troca iônica para a separação das proteínas de acordo com suas cargas elétricas.

Como se pode observar na Coluna 2 (Figura 27) uma vez que a primeira coluna (Coluna 1, Figura 27) corresponde aos marcadores proteicos, os pIs de todas as proteínas do complexo celulásico comercial de *T. longibrachiatum* foram inferiores a 6,8, atingindo valores inferiores a $pI = 3,5$. Desta forma, o tampão usado deve apresentar uma faixa de atuação próxima dos valores de pIs obtidos.

Figura 27. Separação obtida das proteínas presentes no complexo celulásico comercial de *T. longibrachiatum* através da focalização isoeletrica.

*Ponto isoeletrico das proteínas usadas como marcadores.

1- Marcadores proteicos de ponto isoeletrico.

2- Formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum*

5.3.3. Separação das proteínas da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* por cromatografia de troca iônica

5.3.3.1. Separação usando variação de pH

Através da determinação dos pontos isoeletricos foram selecionados dois tampões que se adequavam ao intervalo desejado: Tampão fosfato 0,1 M (pH 5,7-8,0) e tampão citrato 0,1 M (pH 3,0-6,2). Duas colunas de troca iônica (Q-Sepharose, troca aniônica, e SP-Sepharose, troca catiônica) foram testadas e o valor de pH das soluções tampão variou em 1 unidade na faixa de 3,0-8,0. A Figura 28 apresenta as amostras obtidas nas colunas de troca iônica as quais continham a maior quantidade de proteínas.

Figura 28. SDS-PAGE das frações de celulasas de *T. longibrachiatum* obtidas por cromatografia de troca iônica usando as matrizes Q-Sepharose e SP-Sepharose.

Eletroforese realizada a 90 V.

M- Marcadores de peso molecular; 1- Celulase comercial; 2- Q-Sepharose, pH 8,0, tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), lavagem da coluna após adição das proteínas; 3- Q-Sepharose, pH 7,0, ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$); 4- Q-Sepharose, pH 5,0, tampão citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 5- Q-Sepharose, pH 5,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 6- SP-Sepharose, pH 4,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), lavagem da coluna após adição das proteínas; 7- SP-Sepharose, pH 4,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), lavagem da coluna após adição das proteínas; 8- SP-Sepharose, pH 6,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 9- SP-Sepharose, pH 6,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).

Observou-se que durante o processo de lavagem da coluna com as soluções tamponadas para remoção das proteínas não adsorvidas, em ambas as matrizes, algumas proteínas foram eluídas: frações 2 e 3 para Q-Sepharose e frações 6 e 7 para SP-Sepharose (Figura 28). Uma provável causa é que essas proteínas foram eluídas na lavagem devido à saturação da coluna ou uma menor afinidade com a solução tampão no pH usado para a lavagem.

A melhor separação das proteínas foi obtida usando a coluna Q-Sepharose, uma vez que se observou um sinal intenso na eletroforese SDS-PAGE na fração 5 e também na fração 4 (Figura 28). Porém, a fração 4 também apresentou outros sinais de proteínas com menor intensidade. O sinal revelado com maior intensidade na fração 4 mostra que houve uma concentração dessa proteína, provavelmente uma celulase, usando a coluna Q-Sepharose.

Na coluna SP-Sepharose as frações 8 e 9 não apresentaram separação, isto porque os sinais observados no SDS-PAGE demonstraram que houve apenas uma

diluição das proteínas ao longo da separação. Desta forma, a separação usando Q-Sepharose foi escolhida para a continuidade do processo de separação e purificação das celulasas de *T. longibrachiatum*.

A etapa seguinte foi variar a concentração das soluções-tampão (fosfato e citrato) para 0,05 M, ou seja, a metade da concentração usada inicialmente, visto que uma maior concentração dos sais usados no tampão pode ser responsável pela dessorção de algumas proteínas da matriz. Portanto, a diminuição da concentração do tampão diminui esse efeito sem, contudo, deixar de variar o valor do pH.

A Figura 29 mostra a análise SDS-PAGE de todas as amostras que apresentaram proteínas após a separação da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* usando Q-Sepharose.

Figura 29. SDS-PAGE das amostras contendo proteínas obtidas através da separação da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* usando Q-Sepharose.

Eletroforese realizada a 90 V.

M- Marcadores de peso molecular; 1- pH 8,0, tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), obtido na lavagem das proteínas não adsorvidas; 2- pH 8,0, ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), obtido na lavagem das proteínas não adsorvidas; 3- pH 6,0, ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$); 4- pH 6,0, tampão citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 5- pH 5,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 6- pH 5,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 7- pH 5,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 8- pH 5,0, ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 9- celulase comercial.

A mudança da concentração dos tampões fosfato e citrato mostrou que durante o processo de lavagem da coluna Q-Sepharose para remoção das proteínas não adsorvidas, menos proteínas foram eluídas, evidenciando que a concentração de sais do tampão foi um fator importante para a dessorção das proteínas da matriz. Com a

diminuição da concentração do tampão a variação de pH do eluente passou a ser ainda mais importante no processo de separação das proteínas.

A fim de determinar o perfil enzimático das amostras obtidas na separação das celulasas (Figura 29) analisou-se a atividade para *CMCase* – hidrólise da carboximetilcelulose, solúvel em água e que determina a atividade das *endo*-glucanases. Foi determinada a atividade da amostra em U.mL⁻¹ e a atividade específica em U.mg⁻¹ (U.mg⁻¹ – U/mg de proteína) as quais estão descritas na Tabela 16.

Tabela 16. Atividades *CMCase* das amostras obtidas na separação da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* usando Q-Sepharose.

(CMCase)	Fração 1 ^a	Fração 2	Fração 3	Fração 4	Fração 5	Fração 6	Fração 7	Fração 8
U.mL ⁻¹	0,71	0,62	0,31	0,43	0,26	0,44	1,1	0,71
U.mg ⁻¹	77	14	1,9	22	47	2,2	5,4	222

^a Atividades obtidas para cada fração relacionada com a Figura 29.

Comparando os sinais de proteínas obtidos das frações da Figura 29 com os resultados da Tabela 16 foi possível observar que não houve uma separação da *endo*-glucanase em algumas das frações, uma vez que se obteve atividade *CMCase* em todas as frações com proteínas e os valores de atividade não foram diretamente proporcionais à intensidade a algum dos sinais obtidos no SDS-PAGE. Por exemplo, as frações 1 e 2 da Figura 29 não apresentaram sinais intensos na análise por SDS-PAGE, mas apresentam atividade *CMCase* maior que para a fração 6 que apresentou os sinais mais intensos.

Uma possível explicação para tal comportamento reside no fato de que poderia haver *endo*-glucanase presente em todas as frações, mas a mesma poderia estar sobreposta por algum outro sinal de proteína ou em pequena quantidade impossibilitando a observação o seu sinal no SDS-PAGE.

Mesmo sem poder atribuir algum sinal do SDS-PAGE referente a *endo*-glucanase, observou-se que na Fração 8 (Tabela 16) houve uma maior concentração dessa classe de enzimas, cuja atividade específica foi 2,9 vezes maior que a da Fração 1.

5.3.3.2. Separação usando adição de NaCl

Com o objetivo de obter uma melhor separação das enzimas celulasas de interesse trocou-se o tipo de eluente. Passou-se a utilizar o tampão fosfato 0,05 M com pH fixo em 6,8 ao qual adicionou-se NaCl gradativamente para realizar a separação das

proteínas. O pH selecionado baseou-se nos pontos isoeletricos das proteínas determinados anteriormente, que foram valores inferiores a 6,8. A variação da concentração do NaCl na fase móvel foi feita no intervalo de 0-0,3 M com aumento gradativo a cada 0,03 M. As amostras foram submetidas às análises de proteínas totais e as que apresentaram algum teor proteico foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 30).

Figura 30. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* por Q-Sepharose usando tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.

Eletroforese realizada a 90 V.

M- Marcadores de peso molecular; 1- Celulase comercial; 2- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 3- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 4- NaCl 0,18 M; 5- NaCl 0,18 M; 6- NaCl 0,18 M; 7- NaCl 0,21 M; 8- NaCl 0,21 M; 9- NaCl 0,21 M; 10- NaCl 0,21 M; 11- NaCl 0,21 M; 12- NaCl 0,24 M.

Observou-se que a separação pela adição gradativa de NaCl foi aparentemente mais efetiva que pela variação do pH do eluente. Essa observação pode ser feita devido à presença de um sinal intenso e com poucos sinais minoritários de proteínas nas frações 5-12 (Figura 30), diminuindo a possibilidade de interferência de outras enzimas durante a separação da proteína purificada.

Para que tal observação fosse confirmada foi realizado o teste de atividade *CMCase* (Tabela 17) para todas as frações que apresentaram teor proteico quantificável pelo método BCA.

Tabela 17. Atividade *CMCase* das frações obtidas na separação da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* usando Q-Sepharose e NaCl adicionado ao tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8) como eluente.

(<i>CMCase</i>)	Fração 2 ^a	Fração 3	Fração 4	Fração 5	Fração 6	Fração 7
U.mL ⁻¹	0,22	0,12	nq ^b	nq	nq	nq
U.mg ⁻¹	1,15	2,36	-	-	-	-

(<i>CMCase</i>)	Fração 7	Fração 8	Fração 9	Fração 10	Fração 11	Fração 12
U.mL ⁻¹	nq	Nq	nq	nq	nq	nq
U.mg ⁻¹	-	-	-	-	-	-

^a Número relacionados com os que aparecem na Figura 30.

^b Não-quantificável.

As únicas frações com atividade *CMCase* foram as frações 2 e 3 (Tabela 17), as quais foram obtidas durante a lavagem da coluna com a solução tampão sem adição de NaCl. Este dado mostrou que as *endo*-glucanases presentes na celulase comercial não estavam presentes de forma significativa nas frações seguintes.

Também foi possível observar que mesmo com a presença de sinais de menor intensidade, as frações 5-12 não apresentaram atividade *CMCase*, sendo possível constatar que a proteína purificada não foi uma *endo*-glucanase.

Em análises anteriores do grupo de pesquisa ficou determinado que a formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* não possui atividade para β -glucosidase, quando se usou celobiose como substrato. Sendo assim, provavelmente o sinal mais intenso obtido nas separações poderia corresponder a uma celulase da classe das *exo*-glucanases. Todavia, outros estudos de caracterização serão necessários para confirmar a classe de celulases que estão presentes na amostra comercial de *T. longibrachiatum*, pois não foi possível encontrar uma descrição do fabricante acerca da concentração de celulases na amostra, bem como a concentração de cada uma das enzimas.

5.3.4. Purificação em larga escala usando Akta purifier 100

A fim de obter uma maior quantidade de enzima purificada, o método desenvolvido e acima descrito foi aplicado na purificação usando Akta purifier 100 com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,02 M, pH 6,8) e adição gradiente de NaCl 0,3 M (Seção 4.9.2).

A purificação foi monitorada através de detector UV a 280 nm cujo cromatograma obtido está apresentado na Figura 31.

Figura 31. Cromatograma obtido da purificação de celulasas de *T. longibrachiatum* usando tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,02 M, pH 6,8) como eluente com adição gradiente de NaCl 0,3M.

Os números 1 e 2 correspondem às bandas cromatográficas obtidas na purificação de celulasas de *T. longibrachiatum*.

Observou-se que ocorreu a separação de duas bandas cromatográficas: a *banda 1* menos intensa e mais larga, quando a proporção de NaCl 0,3 M no eluente alcançou 20% (número 1, Figura 31), e a *banda 2* mais intensa e com base mais estreita quando a proporção de NaCl 0,3 M ultrapassou 90% (número 2, Figura 31). A *banda 1* mais alargada sugere uma mistura de proteínas, enquanto a *banda 2* mais estreita sugere a presença de uma única celulase na formulação comercial.

Foi realizada uma análise por SDS-PAGE a fim de verificar se ocorreu a purificação através dos sinais de proteínas no gel de acrilamida (Figura 32). Obteve-se como resultado a purificação da celulase, referente à banda cromatográfica mais estreita da Figura 30 (fração 2, Figura 32) assim como obtido durante a purificação em pequena escala com adição de NaCl no tampão fosfato (seção 5.3.3.2). A fração 1, referente à banda mais larga do cromatograma da Figura 31 apresentou dois sinais de baixa intensidade (Figura 32).

Figura 32. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação da formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* por Q-Sepharose em larga escala, usando tampão fosfato 0,02 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.

Eletroforese realiza a 90 V.

M- Marcadores de peso molecular;

C- Celulase comercial;

1- Proteínas presentes no pico 1 (Figura 30);

2- Celulase purificada (pico 2, Figura 30).

5.3.5. SDS-PAGE dos extratos celulásicos dos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847

A fim de separar também as celulasas produzidas pelos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847 foi obtido inicialmente o perfil proteico dos seus respectivos extratos celulásicos por SDS-PAGE, os quais foram comparados com a formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum* (Figura 33). Destaca-se que essas duas linhagens foram selecionadas, dentre as cinco usados neste trabalho, por serem de ambiente marinho, cuja classe de microrganismos foi o foco deste estudo e também por apresentarem maior atividade para *FPase*.

Figura 33. SDS-PAGE dos extratos celulásicos produzidos pelos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847 cultivados em meio sólido de farelo de trigo.

Eletroforese realizada a 90 V;

1- Marcadores de peso molecular das proteínas;

2- Formulação celulásica comercial de *T. longibrachiatum*;

3- Sinais de proteínas presentes no extrato celulásico do fungo *A. sydowii* CBMAI 934;

4- Sinais de proteínas presentes no extrato celulásico do fungo *M. racemosus* CBMAI 847.

Foi possível nestes estudos observar que houve a produção de inúmeras proteínas durante o crescimento em meio sólido de farelo de trigo para os fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847, o que torna a separação das celulases mais difícil. Ainda foi possível observar que ambos os extratos fúngicos apresentaram sinais de proteínas nas mesmas regiões em que ocorreram os sinais das proteínas da formulação comercial de *Trichoderma longibrachiatum* utilizada como referência no gel de SDS-PAGE.

Aparentemente o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 produziu um maior número de proteínas em relação ao fungo *M. racemosus* CBMAI 847. Quanto maior a quantidade de proteínas maior será a dificuldade na separação e na purificação das celulases. Contudo, deve-se considerar que o pI das proteínas é a variável mais importante na purificação usando cromatografia de troca iônica, pois até mesmo a escolha do pH do tampão pode facilmente remover um considerável número das proteínas indesejadas.

Baseando-se nessas considerações foi feita a focalização isoeletrica dos extratos a fim de se obter os pIs das proteínas presentes nos extratos fúngicos estudados.

A coluna dos marcadores da imagem da eletroforese de focalização isoeletrica não ficou bem definida (Figura 34), mas ainda assim permitiu determinar qual a região da análise que corresponde aos pontos isoeletricos próximos a 7 (neutro) bem como aqueles na região acima e abaixo deste valor (alcalino ou ácido). A concentração dos extratos foi a mesma usada para formulação comercial, 1 mg de proteínas por cada 1 mL de fase estacionária.

Figura 34. Focalização isoeletrica dos extratos celulásicos produzidos pelos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847 cultivados em meio sólido de farelo de trigo.

Observou-se que para o extrato obtido do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 as proteínas estavam distribuídas em todas as regiões da análise de focalização isoeletrica, o que pode facilitar a separação das celulas por cromatografia de troca iônica, que ocorre pela mudança da interação das proteínas com uma matriz carregada negativamente ou positivamente. As proteínas presentes no extrato obtido do fungo *M.*

racemosus CBMAI 847 estavam concentradas na região mais ácida da análise de focalização isoeletrica, podendo tornar mais difícil a separação das proteínas.

É interessante que a análise com SDS-PAGE (Figura 32) indicou que o extrato do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 apresentou mais proteínas o que poderia indicar uma maior dificuldade para a purificação das celulasas. Contudo, a análise de focalização isoeletrica indicou que esse extrato celulásico pode apresentar melhor potencial para a purificação de proteínas devido à maior diferença de pIs entre as proteínas presentes nesse extrato.

5.3.6. Purificação das celulasas presentes nos extratos celulásicos dos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847

Foi realizada a purificação dos extratos celulásicos produzidos pelos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847 por cromatografia de troca iônica usando a resina Q-Sepharose e o tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8) como eluente com adição gradiente de NaCl 0,3 M.

As Figuras 35 e 36 apresentam as análises por SDS-PAGE das amostras obtidas na separação dos extratos celulásicos de *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847, respectivamente. Através das análises SDS-PAGE observou-se que não ocorreu nenhuma purificação das proteínas em ambos os extratos.

Desta forma não foi possível obter a purificação das celulasas produzidas pelos fungos de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 e *M. racemosus* CBMAI 847 por cromatografia de troca iônica usando a resina Q-Sepharose. Uma provável causa seja a diversidade de proteínas produzidas pelas linhagens em estudo, fazendo-se necessário o estudo de novos métodos de purificação de proteínas para obtenção de celulasas a partir dos extratos proteicos.

Figura 35. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação do extrato celulásico de *A. sydowii* CBMAI 934 por Q-Sepharose usando tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.

Eletroforese realizada a 90 V; M- Marcadores de peso molecular; As- Extrato celulásico de *A. sydowii* CBMAI 934; 1- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 2- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 3- NaCl 0,03 M; 4- NaCl 0,03 M; 5- NaCl 0,03 M; 6- NaCl 0,06 M.

Figura 36. SDS-PAGE das amostras obtidas na separação do extrato celulásico de *M. racemosus* CBMAI 847 por Q-Sepharose usando tampão fosfato 0,05 M (pH 6,8) e variando-se a concentração de NaCl.

Eletroforese realizada a 90 V; M- Marcadores de peso molecular; 1- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 2- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 3- NaCl 0,00 M, obtido na lavagem inicial da coluna com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,05 M, pH 6,8); 4- NaCl 0,03 M; 5- NaCl 0,18 M; 6- NaCl 0,18 M; Mr- Extrato celulásico de *M. racemosus* CBMAI 934.

Embora não foi possível purificar as celulasas obtidas pelos fungos de ambiente marinho, os extratos enzimáticos não purificados apresentaram potencial para o uso destas enzimas na biodegradação da biomassa, bem como poderão ser utilizados em estudos de reações promíscuas, como em reações aldólicas.

5.4. Determinação das melhores condições experimentais para a liberação de açúcares redutores pelas celulasas presentes no extrato enzimático das linhagens estudadas através de experimentação convencional e planejamento experimental

As condições padrões estabelecidas pela IUPAC para testes de atividade celulolítica usando papel de filtro são em condição acídica (pH 4,8) e em temperatura elevada (50 °C) (GHOSE, 1987). Contudo, cada microrganismo pode produzir celulasas cujas condições para maior liberação de açúcares redutores sejam diferentes das pré-estabelecidas. Desta forma, foram realizados experimentos a fim de avaliar o efeito da temperatura, o valor de pH e da concentração de enzimas durante o processo de hidrólise da celulose, realizado pelas celulasas presentes nos extratos enzimáticos usando papel de filtro como substrato e o reagente DNS como indicador para açúcares fermentescíveis.

Desta forma os extratos enzimáticos obtidos a partir dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 foram submetidos às mesmas condições para o teste de atividade celulolítica. Foi utilizado como substrato para a hidrólise papel de filtro comercial sendo avaliadas as influências das variáveis pH, temperatura e volume de extrato enzimático (equivalente à variação da concentração de enzimas). Esses mesmos parâmetros foram usados no planejamento fatorial 2³, a fim de verificar a correlação entre as variáveis bem como as suas significâncias.

A variação desses parâmetros pode influenciar na quantidade de açúcares redutores livres obtidos após a hidrólise enzimática da celulose do papel de filtro por uma hora. No entanto, como se trata de um complexo enzimático que atua sinergisticamente, cada enzima que compõe as celulasas pode apresentar comportamento distinto das demais. O estudo da *FPAse* permite conhecer quais são as condições que permitem uma maior liberação dos açúcares redutores, para serem usadas na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

O estudo com cada extrato enzimático iniciou-se pelo planejamento experimental, no qual buscou-se encontrar as correlações existentes entre as variáveis, bem como observar por meio de superfície de resposta quais as tendências para cada variável.

As variáveis independentes utilizadas no planejamento e os seus níveis codificados e decodificados estão apresentados na Tabela 18. O planejamento completo consistiu em 8 experimentos fatoriais e três repetições do ponto central para 2^3 , que corresponde às condições padrões que foram estabelecidas pela IUPAC e testadas neste estudo.

Tabela 18. Níveis reais e codificados das variáveis independentes estudadas no processo de hidrólise da celulose via extrato enzimático dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847.

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
pH	X ₁	3,8	4,8	5,8
Temperatura (°C)	X ₂	40	50	60
Extrato enzimático (mL)	X ₃	0,5	1,0	1,5

5.4.1. *Aspergillus* sp. CBMAI 1198

5.4.1.1. Planejamento fatorial 2^3

O planejamento fatorial 2^3 foi realizado usando o extrato enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 em meio sólido de farelo de trigo no tempo de fermentação de 72 h.

Os resultados obtidos conforme os ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental para a concentração de açúcares redutores são apresentados na Tabela 19.

Nestes estudos observou-se que não houve variações significantes na quantidade de açúcares redutores liberados. Um ponto interessante foi que os melhores resultados foram obtidos no ponto central, mostrando que a combinação usada dos valores padrão das variáveis estabelecidas pela IUPAC foram os melhores para o extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198.

Tabela 19. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 para a determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Temperatura (°C)	E* (mL)	AR** (mg/100mL)
1	-1	-1	-1	3,8	40	0,5	19,1
2	-1	1	-1	3,8	60	0,5	17,6
3	1	-1	-1	5,8	40	0,5	16,9
4	1	1	-1	5,8	60	0,5	14,9
5	-1	-1	1	3,8	40	1,5	20,5
6	-1	1	1	3,8	60	1,5	13,5
7	1	-1	1	5,8	40	1,5	8,6
8	1	1	1	5,8	60	1,5	16,2
9	0	0	0	4,8	50	1,0	19,1
10	0	0	0	4,8	50	1,0	24,1
11	0	0	0	4,8	50	1,0	19,8

* E: Extrato enzimático; ** AR: Açúcares redutores (glicose equivalente).

Para avaliar a qualidade do modelo gerado foi feita a análise de variância (ANOVA), falta de ajuste e coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{adj.}$). Os resultados da ANOVA na Tabela 20 sugerem que o modelo não apresentou grande significância para nenhuma das variáveis, ou seja, a variação dos parâmetros não afetou significativamente o processo de hidrólise da celulose do papel de filtro.

O modelo matemático não apresentou ajuste para o experimento, cujo valor do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi zero, ou seja, nenhuma das variações observadas se ajustou ao modelo matemático. O R^2_{aj} determina qual o percentual dos resultados obtidos é explicado pela ANOVA e, portanto, ajustável ao modelo matemático.

Tabela 20. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do extrato enzimático para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198.

Fator ^a	SQ ^b	GL ^c	MQ ^d	F	Valor-p
X ₂	1,0513 n.s.	1	1,05125	0,143417	0,741329
X ₁	24,8513 n.s.	1	24,85125	3,390348	0,206926
X ₃	11,7613 n.s.	1	11,76125	1,604536	0,332809
X ₁ .X ₂	24,8513 n.s.	1	24,85125	3,390348	0,206926
X ₂ .X ₃	2,1012 n.s.	1	2,10125	0,286664	0,645933
X ₁ .X ₃	2,3113 n.s.	1	2,31125	0,315314	0,630966
Falta de ajuste	84,9725 n.s.	2	42,48625	5,796214	0,147141
Erro Puro	14,6600	2	7,33000		
R ² _{aj}			0		

^aX₁ = pH; X₂ = temperatura (°C); X₃ = extrato enzimático (mL); ^bSQ = soma quadrática; ^cGL = graus de liberdade; ^dMQ = média quadrática; n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Mesmo com a falta de ajuste do modelo foi possível observar as tendências de acréscimo ou decréscimo na concentração de açúcares redutores liberados através da construção de superfícies de resposta (Figura 37). A comparação dessas superfícies somadas à análise dos ensaios individuais (Tabela 19), permitiram observar quais as melhores condições reacionais para uma maior produção de açúcares redutores.

Figura 37 - Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) da temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre a atividade das celulasas do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.

As superfícies de resposta mostraram uma tendência na qual as melhores condições para a liberação de açúcares a partir do papel de filtro foram os baixos valores de pH (3,8), de temperatura (40 °C) e de extrato enzimático (0,5 mL). No entanto, os valores não diferiram significativamente, com exceção do obtido no ensaio 7, que apresentou a menor concentração de açúcares redutores liberados (8,6 mg.100mL⁻¹, Tabela 19).

Mesmo não sendo significantes no nível de confiança de 95%, o pH e a interação pH-temperatura, segundo observado no diagrama de Pareto (Figura 37d) foram as variáveis que mais influenciaram na liberação dos açúcares redutores, com o valor de pH, contribuindo negativamente e o efeito da correlação entre as variáveis pH-

temperatura, contribuindo positivamente, enquanto que a temperatura apresentou menor significância.

A influência do pH ficou evidente ao fazer as comparações entre os ensaios 1 (pH 3,8, 19,1 mg/100mL) e 3 (pH 5,8, 16,9 mg/100mL), 2 (pH 3,8, 17,6 mg/100mL) e 4 (pH 5,8, 14,9 mg/100mL) e 5 (pH 3,8, 20,5 mg/100mL) e 7 (pH 5,8, 8,6 mg/100mL) (Tabela 19). Os ensaios 6 (pH 3,8, 13,5 mg/100mL) e 8 (pH 5,8, 16,2 mg/100mL) não seguiram o padrão de variação, aumento da quantidade de açúcares livres com a diminuição do pH, sendo este resultado uma das possíveis razões do modelo matemático não ser ajustado ao experimento.

No entanto, observando as concentrações de açúcares redutores obtidas para o ponto central (ensaios 9, 10 e 11) verificou-se que ocorreu uma maior hidrólise nas condições usadas para os mesmos (pH 4,8, 50 °C e 1,0 mL de extrato enzimático), corroborando com as condições propostas pela IUPAC (GHOSE, 1987).

5.4.1.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente

Como não foi possível obter a correlação da influência das variações dos parâmetros usados na hidrólise do papel de filtro através do modelo matemático utilizado no planejamento experimental foi realizado o estudo de cada variável separadamente na hidrólise da celulose presente no papel de filtro usando o extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198.

5.4.1.2.1. Temperatura

A variação da temperatura do meio reacional não apresentou mudanças significativas na concentração de açúcares redutores liberados pelas celulasas presentes no extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198. No entanto, observou-se que a temperatura de 50 °C foi a que mais favoreceu a hidrólise da celulose, como esperado pelo protocolo estabelecido pela IUPAC, enquanto que a temperatura mais elevada (70 °C) promoveu a maior redução da atividade enzimática das celulasas (>30%) (Figura 38).

Figura 38. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 utilizando papel de filtro como substrato.

Olajuyigbe & Ogunyewo (2016) ao estudarem a influência da temperatura sobre a atividade das celulasas produzidas pelo fungo *Sporothrix carnis* também relataram que tais celulasas foram capazes de manter suas atividades em uma extensa faixa de temperatura (40-80 °C), sendo, inclusive, a temperatura ótima de 80 °C (OLAJUYIGBE & OGUNYEWO, 2016).

5.4.1.2.2. pH do tampão da reação

O efeito da variação do valor de pH na atividade das celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 mostrou que o tampão citrato com pH 4,8 foi a melhor condição para a liberação de açúcares redutores frente ao uso de papel de filtro. Também foi possível observar que o uso de tampão citrato em pH 3,8 e 5,8 foi melhor que a utilização de tampão de ácido cítrico + Na_2HPO_4 e tampão fosfato, respectivamente (Figura 39). Assim, através deste estudo observou-se que o tipo de tampão pode influenciar a reação de hidrólise do papel de filtro pelas celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198.

Figura 39. Efeito do pH na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 utilizando papel de filtro como substrato.

Sriariyanun et al. (2016) determinaram que o melhor valor de pH para a realização da hidrólise de celulose pela celulase produzida pela bactéria *Bacillus* sp. MSL2 foi entre 4 e 6, como também obtido para as celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 (pH 3,8-5,8). Porém, a diferença foi que, no estudo realizado por Sriariyanun et al. (2016), a maior concentração de açúcares redutores liberados foi obtida com o pH 6 (SRIARIYANUN et al., 2016).

5.4.1.2.3. Volume de extrato enzimático

O volume de extrato enzimático usado também apresentou influência na concentração de açúcares redutores liberados através do uso de papel de filtro como substrato. No entanto, o efeito somente foi verificado quando foi usado 2,0 mL de extrato enzimático, não sendo observada variação significativa quando foram empregados volumes de extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 na faixa de 0,5-1,5 mL (Figura 40).

Figura 40. Efeito do volume de extrato enzimático na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 utilizando papel de filtro como substrato.

É importante observar que no planejamento fatorial 2^3 a influência das variáveis independentes no processo de hidrólise do papel de filtro, medidas através da significância obtida na ANOVA, foi maior para o pH e menor para o volume de extrato enzimático. Esse resultado foi comprovado estudando-se, separadamente, essas variáveis, considerando apenas a faixa de valor das variáveis em que ambos os experimentos coincidiram (pH 3,8-5,8; temperatura 40-60 °C e volume de extrato enzimático 0,5-1,5 mL).

5.4.2. *Aspergillus sydowii* CBMAI 934

5.4.2.1. Planejamento fatorial 2^3

O planejamento fatorial 2^3 foi realizado usando o extrato enzimático obtido a partir do cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 em meio sólido de farelo de trigo com o tempo de fermentação de 72 h.

Os resultados obtidos conforme os ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental para a concentração de açúcares redutores, determinada pelo ensaio com DNS, estão apresentados na Tabela 21.

De acordo com a concentração de açúcares redutores liberados para cada um dos ensaios, utilizando papel de filtro como substrato, observou-se que não houve variação significativa nos resultados, principalmente considerando que, as réplicas do ponto

central (ensaios 9, 10 e 11, Tabela 21) apresentaram uma variabilidade grande (desvio padrão de $\pm 5,3$). No entanto, foi possível observar que o ensaio 8 apresentou o maior rendimento em relação à concentração de açúcares liberados ($51,2 \text{ mg.100mL}^{-1}$), enquanto que o ensaio 5 apresentou a menor concentração de açúcares liberados através do papel de filtro ($25,0 \text{ mg.100mL}^{-1}$).

Tabela 21. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 para a determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Temperatura (°C)	E* (mL)	AR** (mg/100mL)
1	-1	-1	-1	3,8	40	0,5	30,5
2	1	-1	-1	5,8	40	0,5	33,4
3	-1	1	-1	3,8	60	0,5	34,3
4	1	1	-1	5,8	60	0,5	31,4
5	-1	-1	1	3,8	40	1,5	25,0
6	1	-1	1	5,8	40	1,5	31,7
7	-1	1	1	3,8	60	1,5	44,5
8	1	1	1	5,8	60	1,5	51,2
9	0	0	0	4,8	50	1,0	35,7
10	0	0	0	4,8	50	1,0	45,1
11	0	0	0	4,8	50	1,0	36,0

* E: Extrato enzimático; ** AR: Açúcares redutores (glicose equivalente).

Para avaliar a qualidade do modelo gerado e a significância das variáveis independentes foi feita a análise de variância (ANOVA). Os resultados da ANOVA na Tabela 22 sugerem que o modelo não apresentou uma grande significância para nenhuma das variáveis avaliadas, uma vez que todas as variáveis apresentaram valores de $p < 0,05$.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi superior a 0,61 mostrando que para o modelo polinomial utilizado mais de 61% da variação total da variável resposta encontra-se em torno da média, e que menos de 39% da variação foi atribuída aos resíduos do ajuste ao modelo matemático. Sendo que, os resíduos são os dados obtidos que não se ajustaram ao modelo.

Desta forma, o R^2_{aj} mostrou que o modelo matemático descreveu moderadamente a influência das variáveis independentes e a inter-relação entre elas no processo de

hidrólise do papel de filtro pelas celulasas produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934, visto que apenas 61% dos resultados podem ser explicados.

Não foi evidenciada falta de ajuste do modelo no nível de significância de 5% ($p > 0,05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Fator ^a	SQ ^b	GL ^c	MQ ^d	F	Valor-p
X ₁	22,4450 ^{n.s.}	1	22,4450	0,786348	0,468761
X ₂	208,0800 ^{n.s.}	1	208,0800	7,289968	0,114159
X ₃	64,9800 ^{n.s.}	1	64,9800	2,276539	0,270389
X ₁ .X ₂	4,2050 ^{n.s.}	1	4,2050	0,147320	0,738072
X ₁ .X ₃	22,4450 ^{n.s.}	1	22,4450	0,786348	0,468761
X ₂ .X ₃	172,9800 ^{n.s.}	1	172,9800	6,060259	0,132896
Falta de ajuste	33,8056 ^{n.s.}	2	16,9028	0,592180	0,628070
Erro Puro	57,0867	2	28,5433		
R ² _{aj}			0,61225		

^a X₁ = pH; X₂ = temperatura (°C); X₃ = extrato enzimático (mL); ^b SQ = soma quadrática; ^c GL = graus de liberdade; ^d MQ = média quadrática; ^{n.s.} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Foram plotados gráficos de superfície de resposta (Figura 41), mantendo a variável dependente (concentração dos açúcares redutores) da função no eixo Z e nos eixos X e Y as variáveis independentes, através do qual foi possível observar a tendência de acréscimo ou decréscimo da concentração de açúcares redutores liberados no processo de hidrólise do papel de filtro através da variação simultânea de duas variáveis independentes. Uma vez que foram três as variáveis independentes, consequentemente foram três as superfícies de respostas obtidas.

Pela análise de variância não houve uma influência significativa (nível de significância de 95%) das variáveis independentes no processo de hidrólise do papel de filtro. Isso ocorreu, provavelmente, porque o complexo celulásico produzido pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 manteve a sua capacidade hidrolítica em toda a extensão da faixa de pH e temperatura testados.

Figura 41. Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre as celulasas do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.

De acordo com os resultados obtidos as maiores concentrações de açúcares redutores liberados foram obtidas quando os valores de temperatura, pH e volume de extrato enzimático foram elevados (pH 5,8, 60 °C e 1,5 mL de extrato enzimático, respectivamente). A partir destes experimentos esperava-se que o volume de extrato enzimático tivesse maior influência na liberação dos açúcares redutores, uma vez que o volume, e consequentemente a concentração de celulasas, usado nos ensaios 1-4 foi 3 vezes menor que nos ensaios 5-8 (Tabela 21). Tal observação e constatação ocorreram ao comparar os ensaios 4 (31,4 mg.100mL⁻¹) e 8 (51,2 mg.100mL⁻¹) (Tabela 21), os quais diferiram apenas no volume de extrato enzimático utilizado (0,5 mL e 1,5 mL, respectivamente). Nestes experimentos o meio reacional foi mantido em pH 5,8 e a

temperatura de 60 °C. O aumento na concentração de açúcares liberados no ensaio 4 para o ensaio 8 foi de aproximadamente 60%.

Uma provável causa para o fato de não se observar um aumento proporcional em relação à concentração de enzimas no meio reacional para a concentração de açúcares redutores liberados nestes experimentos pode ser devido às características do complexo enzimático, o qual geralmente é constituído por três tipos de celulasas que atuam sinergisticamente (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996). Neste caso, o aumento da concentração de enzimas no meio pode não ser tão efetivo devido à baixa concentração de uma das enzimas essenciais do processo de hidrólise. As alterações da temperatura e do pH podem, ainda, desfavorecer a atuação de uma ou mais enzimas e, conseqüentemente a liberação total dos açúcares esperada não será proporcional à concentração de enzimas adicionadas à reação.

Pelo diagrama de Pareto (Figura 41d) observou-se que embora nenhuma variável nem a interação entre as mesmas foi significativa no nível de significância de 95% ($p < 0,05$), a temperatura foi a variável que mais influenciou na liberação de açúcares redutores e o pH foi menos significativo.

5.4.2.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente

Foram estudados separadamente os efeitos das variáveis, pH, temperatura e concentração de enzimas, na hidrólise da celulose do papel de filtro usando o extrato enzimático do fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

5.4.2.2.1. Temperatura

A temperatura foi um parâmetro importante para a atividade das celulasas produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934. O efeito causado pela mudança da temperatura foi um decréscimo de cerca de 40% da atividade enzimática das celulasas quando se realizou os experimentos à temperatura de 50 °C. Este resultado confirmou a necessidade do estudo da variação das condições de hidrólise da celulose, uma vez que o maior valor de atividade *FPase* foi obtida à temperatura de 40 °C (Figura 42). O protocolo estabelecido pela IUPAC determina que a temperatura para uma maior eficiência enzimática seja de 50 °C.

Assim como para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 as temperaturas mais elevadas foram as que mais afetaram as atuações das celulasas frente à hidrólise do papel de filtro, com perda de mais de 60% da atividade enzimática das celulasas.

Figura 42. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 utilizando papel de filtro como substrato.

O decréscimo na atividade relativa com o aumento da temperatura já foi reportado na literatura, sendo também descrita a diminuição da estabilidade ou atividade das celulasas com o aumento da temperatura do meio reacional (YANG et al., 2016; VAID & BAJAJ, 2016).

Yang et al. (2016) estudaram a produção de celulasas por uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* e determinaram que a temperatura ótima da atividade das celulasas produzidas foi de ~50 °C, com perda de cerca de 40% da atividade em 80 °C devido à diminuição da estabilidade enzimática em temperaturas superiores a 60 °C (YANG et al., 2016).

Vaid & Bajaj (2016) também estudaram a influência da temperatura sobre atividade das celulasas produzidas pela bactéria *Bacillus subtilis* G2 e determinaram que a temperatura ótima foi de 45 °C, enquanto que com valores de temperatura tanto acima quanto abaixo deste valor, houve uma significativa diminuição da atividade (VAID & BAJAJ, 2016).

5.4.2.2.2. pH do tampão da reação

O efeito do estudo da variação do pH de acordo com o tipo de tampão utilizado sobre as celulasas produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi observado mais intensamente com o tampão citrato. Este tampão também foi o que apresentou o melhor

resultado para a produção de açúcares redutores, assim como observado para o fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, diferindo deste apenas o valor de pH ótimo que foi de 3,8 (Figura 43). Enquanto que usando o mesmo pH com o tampão ácido cítrico + Na₂HPO₄ a atividade enzimática foi 40% menor. Assim, ficou constatado através destes estudos que a mudança do tipo de tampão teve uma influência no resultado de atividade enzimática, mesmo mantendo o pH do meio inalterado.

A influência do tipo de tampão na atividade de celulases foi descrita por Criquet (2002) que estudou as celulases extraídas de restos de folhas de carvalho (*Quercus ilex* L.). Foram usados dois tampões: tampão acetato (pH 3,5-7,0) e tampão citrato (pH 3,5-6,5). Com o tampão acetato a atividade ótima foi obtida no pH 6,0, enquanto que com o tampão citrato foram obtidos dois valores de atividade ótima: pH 4,5 e 6,0. Além disso, em valores de pH entre 3,5-5,5 as atividades obtidas com o tampão citrato foram superiores às obtidas com o tampão acetato. Enquanto que o tampão acetato apresentou maiores atividades em valores de pH acima de 6,0 (CRIQUET, 2002).

A variação observada apenas na faixa de uso do tampão citrato (pH 3,8-5,8) também foi considerável. Por exemplo, ao mudar o valor do pH de 3,8 para 4,8 houve uma perda de 50% da atividade celulásica, a qual decaiu ainda mais acentuadamente em pH 5,8. Portanto, além do tipo de tampão usado o valor de pH também foi significativo para a atividade das celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934.

Figura 43. Efeito do pH e do tipo de tampão usado na reação para a liberação de açúcares redutores pelas celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 utilizando papel de filtro como substrato.

Falkosky et al. (2013) descreveram que as celulasas produzidas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* também apresentaram boa atividade hidrolítica em valores de pH próximo de 4, mais especificamente na faixa de pH 3,5-5,5 (FALKOSKY et al., 2013). Ang et al. (2013) também observaram que houve diferença de atividade para as celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus* SK1 quando foram usadas duas diferentes soluções-tampão, acetato e citrato, com diminuição de aproximadamente 30% da atividade hidrolítica quando a reação foi realizada em tampão citrato em relação àquela realizada em tampão acetato (ANG et al., 2013).

5.4.2.2.3. Volume de extrato enzimático

A variação do volume de extrato enzimático não apresentou alterações significativas de açúcares redutores liberados na faixa de 0,5-1,5 mL, mas, assim como ocorreu para as celulasas do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, houve um aumento da concentração destes açúcares liberados quando o volume do extrato enzimático usado durante a hidrólise da celulose do papel de filtro foi de 2,0 mL (Figura 44). O decréscimo da atividade celulásica foi maior que 70% quando se variou o volume do extrato enzimático de 2,0 mL para 1,5 mL.

Figura 44. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934 utilizando papel de filtro como substrato.

Foi possível observar também que os resultados obtidos para a atividade celulásica no planejamento experimental 2³ foram semelhantes aos obtidos quando se variou apenas o volume de extrato enzimático e mantendo a temperatura e pH do tampão fixos. Isso porque o volume de extrato enzimático do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 usado no planejamento experimental variou de 0,5-1,5 mL, não apresentando variação significativa na concentração de açúcares redutores produzidos nesta faixa de volume.

Em relação à temperatura e ao pH a tendência na variação da atividade enzimática observada, frente à liberação de açúcares redutores, foi inversa àquela obtida no planejamento experimental, pois, para a mesma faixa de valores usada em ambos os experimentos, a atividade celulásica diminuiu à medida que os valores de pH e temperatura foram aumentados. Enquanto que no planejamento experimental realizado a tendência foi de aumento da atividade enzimática para liberação de açúcares redutores.

5.4.3. *Penicillium citrinum* CBMAI 1186

5.4.3.1. Planejamento fatorial 2³

Foi realizado também o planejamento fatorial 2³ usando o extrato enzimático obtido a partir do crescimento do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 em meio sólido de farelo de trigo com a fermentação de 72 h.

Os resultados obtidos conforme os ensaios estabelecidos pelo planejamento experimental para a concentração de açúcares redutores estão apresentados na Tabela 23.

Diferentemente dos extratos enzimáticos dos fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, o extrato enzimático do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 apresentou significantes resultados nas concentrações de açúcares redutores liberados, variando de 9,0 mg.100mL⁻¹ até 46,5 mg.100mL⁻¹. Estes resultados mostraram que para este fungo a variação do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático afetaram a liberação dos açúcares redutores.

Tabela 23. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 para determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Temperatura (°C)	E* (mL)	AR** (mg/100mL)
1	-1	-1	-1	3,8	40	0,5	12,8
2	1	-1	-1	5,8	40	0,5	22,4
3	-1	1	-1	3,8	60	0,5	9,0
4	1	1	-1	5,8	60	0,5	24,7
5	-1	-1	1	3,8	40	1,5	15,7
6	1	-1	1	5,8	40	1,5	26,1
7	-1	1	1	3,8	60	1,5	46,5
8	1	1	1	5,8	60	1,5	12,8
9	0	0	0	4,8	50	1,0	34,0
10	0	0	0	4,8	50	1,0	35,8
11	0	0	0	4,8	50	1,0	36,0

* E: Extrato enzimático; ** AR: Açúcares redutores (glicose equivalente).

Para avaliar a qualidade do modelo matemático gerado no planejamento fatorial 2^3 foi realizado o teste ANOVA, através do qual avalia-se a falta de ajuste e obtém-se o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}). Os resultados da ANOVA na Tabela 24 sugerem que o modelo não apresentou significância para a variável dependente pH, uma vez que apresentou valores de $p > 0,05$.

Tabela 24. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. Em vermelho destacam-se os resultados significativos para o estudo, ou seja, variáveis que obtiveram valor- $p < 0,05$.

Fator ^a	SQ ^b	GL ^c	MQ ^d	F	Valor-p
X ₁	0,500 ^{n.s.}	1	0,5000	0,4121	0,586669
X ₂	32,000*	1	32,0000	26,3736	0,035888
X ₃	129,605*	1	129,6050	106,8173	0,009232
X ₁ .X ₂	180,500*	1	180,5000	148,7637	0,006655
X ₁ .X ₃	295,245*	1	295,2450	243,3338	0,004084
X ₂ .X ₃	45,125*	1	45,1250	37,1909	0,025850
Falta de ajuste	743,660*	2	371,8301	306,4534	0,003253
Erro Puro	2,427	2	1,2133		
R ² _{aj}	0				

^aX₁ = pH; X₂ = temperatura (°C); X₃ = extrato enzimático (mL); ^bSQ = soma quadrática; ^cGL = graus de liberdade; ^dMQ = média quadrática; * = significativo ao nível de 1% de probabilidade; n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Assim como para o planejamento experimental da hidrólise de celulose com o extrato enzimático do fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, o modelo matemático não apresentou ajuste para o experimento, cujo valor do coeficiente de determinação ajustado (R²_{aj}) foi zero. Assim, nenhuma variação dos resultados obtidos da hidrólise do papel de filtro pelas celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 podem ser explicados pelos dados da análise de variância.

Mesmo com a falta de ajuste mencionada, as tendências de acréscimo ou decréscimo na concentração dos açúcares redutores, obtidos na hidrólise do papel de filtro foram realizadas através da análise dos gráficos de superfície de resposta gerados (Figura 45) e também pela análise dos ensaios descritos na Tabela 23. As superfícies de resposta foram usadas para verificar qual a melhor combinação dos valores das variáveis independentes (pH, temperatura e concentração de enzimas) para uma melhor hidrólise do papel de filtro.

Figura 45. Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre as celulasas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.

As superfícies de resposta apresentaram a tendência de um aumento na liberação de açúcares quando foram utilizados maiores volumes de extrato enzimático e altas temperaturas. No entanto, a influência do pH foi condicionada à interação com as outras duas variáveis. Com maior volume de extrato enzimático (1,5 mL) e alta temperatura (60 °C) o melhor valor de pH que favoreceu a atividade hidrolítica das celulasas e, conseqüentemente, uma maior hidrólise do papel de filtro foi de 3,8. A maior concentração de açúcares redutores foi obtida com essa condição (46,5 mg.100mL⁻¹, ensaio 7, Tabela 23). Essa tendência pode ser observada nas Figuras 45a e 45b.

Pela análise dos gráficos de superfície de resposta também é possível notar que em valores de pH mais elevados (~5,8) para que ocorra uma hidrólise mais eficiente

foram usados menores volumes de extrato enzimático (0,5 mL) e temperaturas mais baixas (40 °C).

Embora tenha sido possível observar essas relações entre as variáveis, as replicatas do ponto central (pH 4,8, 50 °C e 1,0 mL de extrato enzimático) que correspondem aos ensaios 9, 10 e 11 (Tabela 23) apresentaram valores superiores (34,0 mg.100mL⁻¹, 35,8 mg.100mL⁻¹ e 36,0 mg.100mL⁻¹, respectivamente) aos demais ensaios, com exceção do ensaio 7 (Tabela 23). Desta forma, pôde-se concluir que as condições reacionais para o ponto central, que foram as determinadas pela IUPAC (pH 4,8, 50 °C), são as condições mais indicadas para a hidrólise do papel de filtro pelas celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 (GHOSE, 1987).

5.4.3.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente

Assim como para os extratos dos fungos já descritos acima foi avaliado o efeito de cada uma das variáveis, separadamente, sobre as celulasas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 para a hidrólise da celulose presente no papel de filtro.

5.4.3.2.1. Temperatura

A temperatura ótima para a hidrólise da celulose do papel de filtro pelas celulasas do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi encontrada na faixa entre 50-60 °C (Figura 46). Esses valores obtidos foram semelhantes aos obtidos durante o planejamento experimental 2³, uma vez que a melhor condição obtida naquele experimento foi quando se usou pH 4,8 e temperatura 50 °C (ensaios 9, 10 e 11, Tabela 23). O fato da temperatura de 60 °C também apresentar boa atividade corroborou com o ensaio 7 do planejamento experimental 2³ (Tabela 23), no qual foi obtida a maior concentração de açúcares redutores a partir da hidrólise do papel de filtro (46,5 mg.100mL⁻¹).

A perda de atividade celulásica foi semelhante quando foram usadas outras temperaturas (30, 40 e 70 °C) e em geral foi de 50 % (Figura 46).

Figura 46. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 utilizando papel de filtro como substrato.

Liu et al. (2010) também reportaram que celulasas produzidas pelo fungo *Trichoderma harzianum* ETS 323 apresentaram maior atividade quando as reações de hidrólise de celulose foram realizadas na faixa de temperatura de 50-60 °C, com a estabilidade enzimática também coincidindo nessa mesma faixa de temperatura (LIU et al., 2010).

5.4.3.2.2. pH do tampão da reação

A variação do pH e do tampão usado na hidrólise mostrou-se efetiva para a obtenção de melhores resultados na hidrólise da celulose presente no papel de filtro usando as celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186. Assim como para o fungo *A. sydowii* CBMAI 934 o tipo de tampão alterou drasticamente a atividade do ponto ótimo obtido com tampão citrato, sendo o valor de pH ótimo de 5,8 (Figura 47).

A diminuição de 80% da atividade quando foi usado o tampão fosfato ao invés do tampão citrato, mais uma vez mostrou que a escolha do tampão utilizado foi importante, pois influenciou na atividade do complexo celulásico durante a hidrólise da celulose.

Figura 47. Efeito do pH do tampão na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 utilizando papel de filtro como substrato.

Em estudos realizados por Yin et al. (2010) a celulase produzida pela bactéria *Cellulomonas* Sp. YJ5 foi influenciada pelo pH na reação de hidrólise da celulose. Nesse estudo observou-se que o pH ótimo foi 7, mostrando também boa atividade na faixa de pH 5-8. A maior semelhança com as celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 foi o estudo da atividade com o uso de diferentes tampões. Foram usados os tampões citrato (pH 3,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,5-9,5) e carbonato (pH 9,0-10,5). Observou-se que para o pH 7,5, quando foram usados os tampões citrato e Tris-HCl, não houve diferença significativa de atividade entre ambos. No entanto, quando usados os tampões Tris-HCl e carbonato para os valores de pH 9,0 e 9,5 ocorreu uma perda significativa de atividade nas reações realizadas em tampão carbonato em relação àquelas promovidas em tampão Tris-HCl (YIN et al., 2010).

5.4.3.2.3. Volume de extrato enzimático

O mesmo padrão de influência do volume de extrato enzimático observado com as celulasas estudadas anteriormente ocorreu para o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, com pouca variação de atividade celulásica na faixa de 0,5-1,5 mL de extrato enzimático e um aumento mais procuncioado de atividade celulásica quando o volume usado foi de 2,0 mL (Figura 48).

O aumento da atividade celulásica com o aumento da concentração de enzimas foi observado também quando se realizou os experimentos via planejamento experimental.

Figura 48. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 utilizando papel de filtro como substrato.

5.4.4. *Mucor racemosus* CBMAI 847

5.4.4.1. Planejamento fatorial 2^3

O mesmo planejamento fatorial 2^3 foi realizado para o extrato enzimático do fungo *M. racemosus* CBMAI 847, cujos resultados obtidos estão descritos na Tabela 22.

Assim como para o fungo *P. citrinum* CBMAI 1186 os resultados obtidos apresentaram grande variação da concentração de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do papel de filtro (15,7-46,5 mg.100mL⁻¹). O experimento com maior concentração de açúcares redutores foi o ensaio 7 (46,5 mg.100mL⁻¹, Tabela 25).

A concentração de açúcares redutores obtida para as replicatas do ponto central (ensaios 9, 10 e 11, Tabela 25) foram de 34,0, 35,8 e 36,0 mg.100mL⁻¹, respectivamente, os quais também foram semelhantes àqueles obtidos para o caldo enzimático do fungo *P. citrinum* CBMAI 1186.

Tabela 25. Variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 com ponto central e resultados experimentais com extrato enzimático do fungo *M. racemosus* CBMAI 847 para determinação da concentração de açúcares redutores produzidos a partir do papel de filtro.

Variáveis codificadas				Variáveis decodificadas			
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Temperatura (°C)	E* (mL)	AR** (mg/100mL)
1	-1	-1	-1	3,8	40	0,5	19,1
2	1	-1	-1	5,8	40	0,5	23,3
3	-1	1	-1	3,8	60	0,5	21,5
4	1	1	-1	5,8	60	0,5	25,0
5	-1	-1	1	3,8	40	1,5	15,7
6	1	-1	1	5,8	40	1,5	26,2
7	-1	1	1	3,8	60	1,5	46,5
8	1	1	1	5,8	60	1,5	36,3
9	0	0	0	4,8	50	1,0	34,0
10	0	0	0	4,8	50	1,0	35,8
11	0	0	0	4,8	50	1,0	36,0

* E: Extrato enzimático; ** AR: Açúcares redutores (glicose equivalente).

Foi realizado o teste de ANOVA a fim de avaliar se o modelo matemático obtido no planejamento experimental 2^3 para o extrato enzimático do fungo *M. racemosus* CBMAI poderia explicar toda a variância dos resultados experimentais. Através da ANOVA foi possível obter o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}). Os resultados da ANOVA encontram-se detalhados na Tabela 23.

Como observado pelo valor- $p > 0,05$ (Tabela 26) a variável independente pH (X₁) não foi significativa ao nível de confiança de 95%, ou seja, a variação do pH não teve muita influência sobre a concentração de açúcares redutores liberados durante a hidrólise do papel de filtro.

O valor do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi de 0,3873, o que mostrou que o modelo matemático obtido não explicou mais que 39% das variâncias experimentais. Desta forma, 61% dos dados experimentais não foram explicáveis através da ANOVA.

Tabela 26. Análise de variância para o modelo de regressão polinomial ajustado aos dados experimentais em função do pH, da temperatura e do volume de extrato enzimático do fungo *M. racemosus* CBMAI 847. Em vermelho destacam-se os resultados significativos para o estudo, ou seja, variáveis que obtiveram valor- $p < 0,05$.

Fator ^a	SQ ^b	GL ^c	MQ ^d	F	Valor-p
X ₁	8,0000 ^{n.s.}	1	8,0000	6,5934	0,124064
X ₂	253,1250*	1	253,1250	208,6195	0,004759
X ₃	160,2050*	1	160,2050	132,0371	0,007489
X ₁ .X ₂	57,2450*	1	57,2450	47,1799	0,020545
X ₁ .X ₃	6,8450 ^{n.s.}	1	6,8450	5,6415	0,140773
X ₂ .X ₃	169,2800*	1	169,2800	139,5165	0,007091
Falta de ajuste	210,1188*	2	105,0594	86,5874	0,011417
Erro Puro	2,4267	2	1,2133		
R ² _{aj}	0,3873				

^aX₁ = pH; X₂ = temperatura (°C); X₃ = extrato enzimático (mL); ^bSQ = soma quadrática; ^cGL = graus de liberdade; ^dMQ = média quadrática; * = significativo ao nível de 1% de probabilidade; n.s. = não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Através dos gráficos de superfície de resposta (Figuras 49a, 49b e 49c) obtidos, foi possível observar que houve uma melhor hidrólise do papel de filtro quanto maiores forem os valores de pH, temperatura e volume de extrato enzimático. Pelo diagrama de Pareto (Figura 49d) foi possível observar que a variação de pH não foi significante para a obtenção de maior concentração de açúcares redutores e que a temperatura foi a variável independente mais significativa.

Figura 49. Superfícies de resposta mostrando o efeito: (a) temperatura e do pH; (b) pH e extrato enzimático; (c) temperatura e extrato enzimático sobre as celulasas do fungo *M. racemosus* CBMAI 847 durante a hidrólise da celulose do papel de filtro e (d) diagrama de Pareto mostrando as variáveis significativas.

Pela análise de todos os dados obtidos neste planejamento experimental foi possível determinar que, assim como para as celulasas produzidas pelo fungo *P. citrinum* CBMAI 1186, a melhor condição para a hidrólise da celulose de papel de filtro é aquela recomendada pela IUPAC (pH 4,8, 50 °C) usando-se 1 mL de extrato enzimático (GHOSE 1987).

5.4.4.2. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente

5.4.4.2.1. Temperatura

O efeito da temperatura sobre as celulasas produzidas pelo fungo *M. racemosus* CBMAI 847 foi o que mais se afastou da temperatura estabelecida pela IUPAC, o que diferiu dos resultados obtidos no planejamento experimental. A temperatura ótima obtida foi de 30 °C, enquanto que as demais temperaturas avaliadas (40, 50, 60 e 70 °C) apresentaram atividade celulásica em torno de 70% (Figura 50).

Não foi encontrado na literatura estudos que reportassem comportamentos diferentes das celulasas durante a hidrólise de celulose, quando estudadas em planejamento experimental, variando-se todos os parâmetros ao mesmo tempo, e quando estudadas fixando-se todas as variáveis exceto a temperatura. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para que tal comportamento seja compreendido.

Figura 50. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *M. racemosus* CBMAI 847 utilizando papel de filtro como substrato.

A obtenção de maior atividade quando a reação foi realizada a 30 °C também não foi encontrada na literatura. Inclusive, os estudos mostram que a tendência apresentada pelas celulasas descritas na literatura é de uma diminuição da atividade com a diminuição da temperatura de hidrólise (ACHARYA et al., 2010; FALKOSKY et al., 2013; HARSHVARDHAN et al., 2013; SRIARIYANUN et al., 2016; YANG et al., 2016).

5.4.4.2.2. pH do tampão da reação

A variação do pH do tampão foi o parâmetro que mais afetou a atividade das celulasas do fungo *M. racemosus* CBMAI 847. Foi possível observar a existência de dois pontos com maiores atividades relativas: um referente ao valor de pH 4,8 em tampão citrato e o outro referente ao valor de pH 7,8 em tampão fosfato, sendo que este foi um pouco superior àquele (Figura 51).

A existência de dois pontos ótimos pode ser um indicativo da presença de iso-enzimas ou subunidades que apresentam diferentes pontos ótimos para a hidrólise da celulose do papel de filtro (ACHARYA et al., 2010).

Figura 51. Efeito do pH do tampão na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *M. racemosus* CBMAI 847 utilizando papel de filtro como substrato.

Em estudo realizado por Annamalai et al. (2012) foi reportado que a celulase produzida pela bactéria de ambiente *Bacillus licheniformis* AU01 apresentou atividade ótima em pH alcalino (pH 8-11) (ANNAMALAI et al., 2012).

Vijayaraghavan et al. (2016) também relataram que a celulase produzida pela bactéria *Bacillus halodurans* IND18 apresentou maior atividade hidrolítica em valores de pH mais alcalinos, sendo mais ativas na faixa de 8-10 (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016).

5.4.4.2.3. Volume de extrato enzimático

Diferentemente dos outros dois parâmetros estudados, a influência do volume de extrato enzimático usado apresentou tendências semelhantes quando estudada via planejamento fatorial ou através da variação única desse parâmetro. Verificou-se que quanto maior o volume de extrato enzimático usado maior foi a quantidade de açúcares redutores liberados.

A atividade ótima, assim como para os extratos enzimáticos dos fungos anteriormente descritos, foi obtida quando se utilizou 2,0 mL de extrato enzimático fúngico e a menor atividade foi obtida quando se usou 0,5 mL de extrato enzimático. Entretanto, a principal diferença com relação às outras linhagens fúngicas é que houve um aumento na atividade celulásica quando usou 1,0 e 1,5 mL de extrato enzimático (Figura 52), ou seja, houve aumento da concentração de açúcares redutores liberados à medida que se aumentou o volume de extrato enzimático.

Figura 52. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *M. racemosus* CBMAI 847 utilizando papel de filtro como substrato.

5.4.5. *Aspergillus sydowii* CBMAI 935

Para essa linhagem a variação das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial não apresentou nenhum tipo de influência sobre a concentração de açúcares redutores liberados na reação de hidrólise do papel de filtro e, portanto, não serão mostrados os gráficos de superfície de resposta ou os resultados da análise de

variância (ANOVA), uma vez que não foi possível extrair nenhum resultado a partir das análises.

A inexistência de variação dos resultados, pode ter ocorrido devido à estabilidade das celulases presentes no extrato enzimático produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935, em diferentes valores de pH, temperatura e volume de extrato enzimático, o que pode ser comprovado nos estudos descritos a seguir.

5.4.5.1. Influência das variáveis independentes estudadas separadamente

5.4.5.1.1. Temperatura

A variação da temperatura durante o processo de hidrólise da celulose pelas celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 não afetou significativamente a atividade enzimática, uma vez que ficaram todas acima de 80%, além de apresentarem um desvio padrão alto (Figura 53). Dessa forma ficou constatado que as atividades das celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 mantiveram-se constantes em toda a faixa de temperatura estudada (30-70 °C), como foi descrito para o planejamento experimental realizado.

Figura 53. Efeito da temperatura na liberação de açúcares redutores pelas celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 utilizando papel de filtro como substrato.

A celulase produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis* AU01, isolada de ambiente marinho, também manteve sua atividade quase constante na faixa de temperatura 40-70 °C. A estabilidade térmica dessa celulase também foi avaliada e determinou-se que até 70 °C a enzima não perdeu a sua estabilidade (ANNAMALAI et al., 2012).

5.4.5.1.2. pH do tampão da reação

Foi também observada pouca variação na atividade enzimática durante o estudo da influência do pH do meio reacional (Figura 54). A maior produção de açúcares redutores ocorreu em pH 4,8 usando tampão citrato. No entanto, a atividade relativa nos demais valores de pH ficou em torno de 80%. Até mesmo a mudança do tampão usado durante a reação não influenciou a capacidade de hidrólise das celulases nos valores de pH estudados (3,8 e 5,8) para as celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

Figura 54. Efeito do pH do tampão na liberação de açúcares redutores pelas celulases produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 utilizando papel de filtro como substrato.

Ang et al. (2013) reportaram que as celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus fumigatus* SK1, quando cultivado em meio SSF, não apresentaram variações significativas na atividade na faixa de pH entre 5-9. Um ponto importante foi que também foram utilizados diferentes tampões no estudo que, como no presente trabalho, não tiveram grande influência sobre a atividade enzimática (ANG et al., 2013).

5.4.5.1.3. Volume de extrato enzimático

Quando se variou o volume de extrato enzimático o que se observou foi semelhante ao encontrado para as linhagens *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. citrinum* CBMAI 1186, com a atividade celulásica mantendo-se constante durante o intervalo de 0,5-1,5 mL de extrato enzimático seguido de um aumento significativo da atividade quando foram usados 2,0 mL (Figura 55).

Figura 55. Efeito da concentração de enzimas na liberação de açúcares redutores pelas celulasas produzidas pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 935 utilizando papel de filtro como substrato.

A partir da avaliação das cinco linhagens fúngicas estudadas observou-se que cada complexo celulásico proveniente de diferentes linhagens apresentaram condições distintas para a obtenção de maior concentração de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise de celulose usando como substrato o papel de filtro: *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 (pH 4,8, 50 °C); *A. sydowii* CBMAI 934 (pH 3,8, 40 °C); *A. sydowii* CBMAI 935 (pH 4,8, 30-60 °C); *P. citrinum* CBMAI 1186 (pH 5,8, 50-60 °C) e; *M. racemosus* CBMAI 847 (pH 7,8, 30 °C). O único parâmetro que apresentou valores ótimos semelhantes para todas as linhagens foi o volume de extrato enzimático (2,0 mL).

Destaca-se o extrato enzimático da linhagem fúngica *M. racemosus* CBMAI 847 que apresentou os resultados de atividade celulásica em valores de pH (7,8) e de temperatura (30 °C) mais distintos daqueles estabelecidos pela IUPAC. Nota-se que

várias celulasas produzidas por microrganismos marinhos, sobretudo por bactérias, apresentam atividade ótima em pHs alcalinos (Tabela 26). Podem ser citados como exemplos as bactérias *Bacillus carboniphilus* CAS 3 e *Bacillus licheniformis* AU01 as quais apresentaram atividade ótima em pH 9 e 8-11, respectivamente (ANNAMALAI et al., 2012; ANNAMALAI et al., 2014).

O uso de temperatura mais baixas durante o processo de hidrólise da celulose se configura como uma boa oportunidade para tornar o processo economicamente viável, sobretudo devido à economia de energia quando da implementação do processo em larga escala, não sendo encontrado na literatura nenhuma celulase, produzida por microrganismo de ambiente marinho ou terrestre, que apresentasse atividade ótima a 30 °C. Essa linhagem também foi a única dentre as cinco estudadas que foi mais sensível a pequenas mudanças no volume de extrato enzimático usado.

As celulasas produzidas pela linhagem *A. sydowii* CBMAI 935 apresentaram capacidade de manter a sua atividade constante em toda a faixa de pH (2,8-7,8) e temperatura (30-70 °C) estudadas. Essa capacidade de manter a atividade constante mesmo com a variação do pH e da temperatura usados permite que as celulasas de *A. sydowii* CBMAI 935 possam ser aplicadas tanto em reações em meio ácido quanto em meio alcalino, além de ser possível, também, a economia de energia pelo uso de 30 °C como temperatura reacional. As bactérias de ambiente marinho *Bacillus carboniphilus* CAS 3 e *Bacillus licheniformis* AU01 também já foram relatadas como capazes de apresentar atividade ótima em diferentes temperaturas e esta última também apresentou atividade ótima na faixa de pH 8-11 (Tabela 27) (ANNAMALAI et al., 2012; ANNAMALAI et al., 2014). No entanto, não foram encontrados relatos de celulasas produzidas por microrganismos de ambiente marinho que mantivessem atividade ótima tanto em pHs ácidos como em pHs alcalinos.

Estes estudos experimentais possibilitaram a otimização das melhores condições reacionais obtidas para serem aplicadas frente à hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar sendo esta a próxima etapa deste trabalho. Na tabela 27 encontram-se os valores de pH e temperatura para a obtenção da atividade ótima de celulasas por microrganismos de ambiente marinho encontrados na literatura e obtidos no presente trabalho.

Tabela 27. Valores de pH e temperatura para obtenção de atividade ótima de celulasas produzidas por microrganismos de ambiente marinho da literatura e do presente trabalho.

Linhagens	pH	Temperatura (°C)	Referência
<i>Bacillus</i> sp. H166	7,0	50	Harshvardhan et al. (2013)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	5,0	45	Trivedi et al. (2013)
<i>Bacillus licheniformis</i> AU01	8-11	40-70	Annamalai et al. (2012)
<i>Bacillus carboniphilus</i> CAS 3	9,0	50-60	Annamalai et al. (2014)
<i>Bacillus aquimaris</i>	10	45	Trivedi et al. (2011)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> A-53	6,5	50	Kim et al. (2009)
<i>Aspergillus sydowii</i> BTMFS 55	5,0	50	Madhu et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	5,0	66	Xue et al. (2012)
<i>Aspergillus</i> sp. CBMAI 1198	4,8	50	Santos (2017)
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	3,8	40	Santos (2017)
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	4,8	30-60	Santos (2017)
<i>Penicillium citrinum</i> CBMAI 1186	5,8	50-60	Santos (2017)
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	7,8	30	Santos (2017)

5.5. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a um pré-tratamento com solução de NaOH 2%. O tratamento alcalino é capaz de dissolver a maior parte da lignina, que é responsável pela inibição da degradação da celulose por celulasas, e assim permitir uma maior acessibilidade às fibras de celulose (KHUONG et al., 2014).

O bagaço foi submetido a diferentes tempos de tratamento (20, 40, 60, 80 e 100 min) a fim de determinar qual o melhor rendimento, considerando a massa resultante de cada componente (celulose, hemicelulose e lignina) após o pré-tratamento alcalino, e também determinar qual o tempo de pré-tratamento que mais poderia favorecer a hidrólise enzimática. Além disso, foi feito o tratamento da casca e da medula (parte interna do colmo) por 100 min, com o intuito de avaliar a influência das distintas partes que compõem o bagaço durante a hidrólise enzimática.

A Tabela 28 apresenta o rendimento do bagaço de cana-de-açúcar obtido após a etapa de pré-tratamento em cada um dos tempos de pré-tratamento, o qual foi determinado após a secagem do bagaço. Na Tabela 28 também está descrito o teor de umidade presente em cada amostra após o processo de secagem.

Os rendimentos de bagaço de cana-de-açúcar obtidos após o tratamento alcalino com NaOH 2% ficaram em torno de 50 %, ou seja, como a massa do material de partida (bagaço, medula e casca) foi 10 g, a massa final obtida foi de aproximadamente 5 g. Assim foi possível observar que não houve influência significativa do tempo de pré-tratamento no rendimento final, principalmente a partir de 40 min de reação (Tabela 28).

O teor de umidade obtido após a secagem do bagaço pré-tratado ficou em torno de 8 %, enquanto que o rendimento do bagaço não tratado foi de ~7 %. Esse valor de umidade foi considerado neste trabalho quando o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à hidrólise, a fim de que a umidade não interferisse nos cálculos de rendimento.

Tabela 28. Rendimentos obtidos para o pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes tempos.

Amostras (min)	Rendimento (%)	Umidade (%)
Bagaço (0)	-	7,0
Bagaço (20)	57	8,2
Bagaço (40)	53	8,6
Bagaço (60)	53	8,3
Bagaço (80)	54	8,0
Bagaço (100)	50	8,1
Medula (100)	48	8,3
Casca (100)	52	8,6

Após o pré-tratamento alcalino foi realizada a caracterização do material resultante do bagaço, onde foi possível determinar o percentual de celulose, hemicelulose, lignina e de cinzas, esta última corresponde à composição inorgânica presente no bagaço de cana-de-açúcar. Foi feita também a caracterização completa do bagaço sem tratamento químico, o qual, assim como as amostras de bagaço pré-tratado foi submetido ao processo de moagem antes de ser utilizado na hidrólise enzimática. Na Tabela 29 estão apresentados os resultados dos percentuais obtidos desta caracterização do bagaço.

Entre os materiais obtidos, inclusive para o bagaço não tratado, observou-se que o percentual de hemicelulose foi em torno de 26,0%. Já o percentual de celulose sofreu variação, pois no bagaço não tratado foi de 41,7% e após tratamento alcalino por 100 min foi de 63,8%. Observou-se também que as amostras com 20 e 40 min de tratamento

apresentaram teores de celulose abaixo de 60,0%, enquanto que as amostras com 60 e 80 min de tratamento foram semelhantes àquela tratada por 100 min (63,4% e 65,2%, respectivamente). Quando avaliadas as frações do bagaço separadas, medula e casca, esta última apresentou teor de celulose de 70,0%, sendo a amostra com maior percentual entre todas as estudadas e a medula com teor de celulose de 64,7% (Tabela 29).

O teor de lignina também é um fator importante para se avaliar, pois a sua redução está diretamente relacionada com a acessibilidade das enzimas à celulose a fim de realizar a hidrólise, especialmente a enzimática. O bagaço não tratado apresentou o maior teor de lignina, 26,5%, enquanto que, a amostra com 60 min de tratamento apresentou o menor teor (5,5%). As amostras com 20 e 40 min de tratamento apresentaram teores de lignina acima de 10% e as amostras restantes (bagaço 60, 80 e 100 min, medula e casca) teores em torno de 9%.

Esses percentuais de celulose obtidos após o tratamento do bagaço com NaOH 2% são semelhantes àqueles encontrados na literatura também usando solução de NaOH. Liu et al. (2016) realizaram o pré-tratamento com o bagaço de cana-de-açúcar usando NaOH 0,5 M por 2 h a 80 °C obtendo, no final da reação um aumento do teor de celulose e hemicelulose de 38,5 % e 20,6% para 63,4% e 26,1%, respectivamente e uma diminuição do teor de lignina de 25,0% para 8,3% (LIU et al., 2015).

Maryana et al. (2014) também obtiveram percentuais semelhantes usando NaOH 1N por 15 min a 100 °C (66,2% de celulose, 17,1% de hemicelulose e 8,3% de lignina), cuja única diferença dos resultados obtidos neste trabalho foi que houve redução do teor de hemicelulose de 22,9% para 17,1% (MARYANA et al., 2014). O aumento do teor de celulose e a diminuição do teor de lignina através do tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de NaOH foi também reportado por mais trabalhos descritos na literatura, sempre se obtendo redução significativa do teor de lignina (KHUONG et al., 2014; VELMURUGAN & MUTHUKUMAR).

A diminuição do teor de lignina após o pré-tratamento é um bom indicativo de que as celulasas terão menos interferentes, bem como uma melhora na acessibilidade das enzimas à celulose, a fim de hidrolisá-la para posterior fermentação dos açúcares liberados.

Tabela 29. Percentuais dos componentes principais presentes no bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento alcalino com NaOH.

Amostras (min)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Total (%)
Bagaço (0)	41,7±2,5	26,0±0,9	26,5±1,8	0,3	94,5±1,6
Bagaço (20)	59,2±0,7	26,8±0,0	11,4±3,2	2,4	99,8±4,0
Bagaço (40)	58,6±0,0	25,8±0,0	13,0±0,3	2,0	99,4±0,3
Bagaço (60)	63,4±1,4	26,1±1,0	5,5±0,7	1,6	96,6±1,7
Bagaço (80)	65,2±2,3	26,8±0,6	8,8±4,6	4,2	105,0±1,8
Bagaço (100)	63,8±3,2	26,2±0,2	10,0±7,2	3,0	103,0±10,1
Medula (100)	64,7±5,3	26,4±1,4	9,4±5,0	0,4	100,9±11,7
Casca (100)	70,0±2,4	25,7±0,4	9,0±5,5	0,2	104,9±7,4

Uma vez determinado o percentual de cada componente do bagaço após o pré-tratamento foi possível avaliar as perdas de massas que ocorreram durante o processo de pré-tratamento. Notou-se que o componente com maior perda de massa foi a lignina, com redução da mesma em mais de 70% em todas as amostras tratadas, sendo que, após 60 min de tratamento essa redução de massa ultrapassou 80% (Tabela 30).

Dentre as partes que compõem a holocelulose, hemicelulose e celulose, a que apresentou maior redução de sua massa total foi a hemicelulose, com perdas que ultrapassaram 40 % em todas as amostras (Tabela 30). A celulose foi a parte do bagaço de cana-de-açúcar que menos sofreu perda de massa. A redução da massa total observada para esse componente do bagaço variou entre 15-25% para as amostras de bagaço (Tabela 30).

A redução de massa de celulose presente na casca após o tratamento alcalino foi de ~13%, a menor perda observada, enquanto que para a medula a perda de massa foi de mais de 25% (Tabela 30). Uma vez que o bagaço é composto pela mistura de casca e medula, com um maior percentual de medula, foi possível observar que a perda de massa de celulose do mesmo está no intervalo entre os percentuais de perda da casca e da medula.

Tabela 30. Percentuais de perda de massa (g) dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento alcalino (NaOH).

Amostras (min)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Total (%)
Bagaço (20)	19,2	41,2	75,4	43,0
Bagaço (40)	25,6	47,4	74,0	47,0
Bagaço (60)	19,5	46,7	89,0	47,0
Bagaço (80)	15,6	44,3	82,1	46,0
Bagaço (100)	23,6	49,6	81,2	50,0
Medula (100)	25,6	52,3	83,0	52,0
Casca (100)	12,8	48,7	82,2	48,0

5.6. Hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar

A capacidade hidrolítica das enzimas celulasas produzidas pelos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 apresentados neste trabalho frente ao bagaço da cana-de-açúcar foi avaliada.

Através da massa resultante do bagaço de cana-de-açúcar após a hidrólise enzimática e da determinação da concentração de açúcares redutores usando o método DNS foi possível avaliar quais as linhagens que apresentaram o complexo celulásico mais eficiente para o tipo de substrato usado (bagaço da cana-de-açúcar). Nestes casos as unidades de atividade enzimática foram padronizadas para todos os experimentos nos quais foi utilizada 1 U *FPase*.

Na Tabela 31 estão apresentados os percentuais de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar obtidos para cada um dos fungos nos diferentes tempos de pré-tratamento e de partes do bagaço.

Tabela 31. Percentual de sacarificação do bagaço da cana-de-açúcar após a hidrólise enzimática com os extratos enzimáticos (1 U *FPase*) das linhagens fúngicas.

Amostras (min)	Sacarificação (%)				
	847 ^a	934 ^b	935 ^c	1186 ^d	1198 ^e
Bagaço (0)	20	21	0	0	4
Bagaço (20)	24	65	18	19	68
Bagaço (40)	22	65	15	17	70
Bagaço (60)	20	61	12	14	68
Bagaço (80)	24	73	17	19	73
Bagaço (100)	24	78	19	4	75
Medula (100)	37	81	32	28	87
Casca (100)	30	56	3	4	57

^a*M. racemosus* CBMAI 847; ^b*A. sydowii* CBMAI 934; ^c*A. sydowii* CBMAI 935; ^d*P. citrinum* CBMAI 1186; ^e*Aspergillus* sp. CBMAI 1198.

Apenas as celulasas de duas linhagens fúngicas foram capazes de hidrolisar o bagaço sem tratamento: *M. racemosus* CBMAI 847 e *A. sydowii* CBMAI 934, 20 e 21%, respectivamente. As demais linhagens não produziram celulasas capazes de hidrolisar significativamente ou simplesmente não hidrolisaram o substrato.

Contudo, todas as celulasas hidrolisaram parcialmente o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, principalmente *A. sydowii* CBMAI 934 e *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 que apresentaram teor de sacarificação acima de 60%. Essas mesmas linhagens apresentaram altos percentuais de sacarificação da medula (81% e 87%, respectivamente) e menor percentual de sacarificação da casca (56% e 57%, respectivamente).

Essa diferenciação entre o percentual de sacarificação da medula e da casca está diretamente relacionada com as características de cada uma dessas partes em relação à sua composição. A casca é composta majoritariamente por células fibrosas do esclerênquima, as quais são responsáveis por promover o principal apoio estrutural à planta (cana-de-açúcar) e também possuem uma parede secundária mais espessa e mais lignificada. A medula ou colmo é a parte interna da cana-de-açúcar, contém células de parênquima que são esféricas com paredes mais finas e flexíveis cuja principal função é o armazenamento da sacarose (WIRAWAN et al. 2010; GALBE & ZACCHI 2012). Essas diferenças possivelmente foram a principal razão do bagaço ser menos suscetível à hidrólise enzimática do que a medula, a qual é mais suscetível que a casca, visto que o mesmo é constituído por ambas.

As celulasas de *M. racemosus* CBMAI 847 não promoveram uma maior sacarificação do bagaço após o pré-tratamento com percentuais variando entre 20-24% para o bagaço. Uma melhora de rendimento ocorreu quando se hidrolisou a medula e a casca separadamente, mas ainda assim os valores de sacarificação foram de 37% e 30%, respectivamente.

As celulasas produzidas pelas linhagens fúngicas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. citrinum* CBMAI 1186 forneceram seus melhores resultados de hidrólise na sacarificação da medula (32% e 28%, respectivamente), enquanto que o percentual de sacarificação das demais amostras de bagaço ficou abaixo de 20%.

Os materiais lignocelulósicos usados para a hidrólise neste trabalho (bagaço, medula e casca) também possuem hemicelulose na sua composição (~26%), e no caldo enzimático dos fungos provavelmente estão presentes hemicelulasas. Assim não é possível afirmar que a produção de açúcares redutores estava diretamente relacionada apenas à hidrólise da celulose. No entanto, mesmo não conhecendo a capacidade hidrolítica do caldo enzimático frente à hemicelulose foi possível verificar que as celulasas dos fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 também hidrolisaram boas quantidades de celulose, pois mais de 60% do material sofreu degradação/hidrólise e mais o bagaço pré-tratado era constituído por 60% de celulose.

Desta forma foi possível observar que a linhagem de fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 foi tão eficiente quanto a linhagem de ambiente terrestre *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 para o reaproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado na produção de açúcares redutores.

O uso de microrganismos marinhos na sacarificação de materiais lignocelulósicos já foi reportado na literatura. Jain et al. 2013 relataram a sacarificação de *switchgrass* (gramínea nativa da América do Norte) pela bactéria de ambiente marinho *Clostridium phytofermentans*, embora não tenha sido usado extrato de celulasas, mas apenas se realizou o cultivo da bactéria no referido material lignocelulósico, obtendo-se a produção de açúcares redutores, etanol e acetato (JAIN et al., 2013). Essa metodologia usada para sacarificação se assemelha com o emprego de microrganismos no pré-tratamento de material lignocelulósico descrito por Muñoz et al. (2014). Neste último trabalho foram usadas as linhagens bacterianas de ambiente marinho *Aeromonas bivalvium* MA2, *Raoultella ornithinolytica* MA5, *Raoultella ornithinolytica* MC3 e *Aeromonas salmonicida* MC25 no pré-tratamento das microalgas marinhas *Botryococcus braunii* e *Nannochloropsis gaditana* (MUÑOZ et al., 2014).

Outros trabalhos relataram a produção de celulases e o posterior uso na sacarificação de lignocelulose. Harshvardhan et al. (2013) aplicaram as celulases produzidas pela bactéria marinha *Bacillus* sp. H1666 na sacarificação da alga marinha (*Ulva lactuca*) obtendo 450 mg de glicose por g de massa seca após 60 min de reação (HARSHVARDHAN et al., 2013). Trivedi et al. (2015) usaram celulases produzidas pelo fungo de ambiente marinho e obtiveram a produção de 124 mg de glicose por grama de massa seca de alga marinha (*Ulva fasciata*) após 48 h de reação (TRIVEDI et al., 2015).

Destaca-se que não há relatos de uso de celulases produzidas por microrganismos de ambiente marinho na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, sendo este o primeiro estudo realizado. No entanto, existem diversos trabalhos que relataram a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar por celulases produzidas por fungos de ambiente terrestre.

Um exemplo foi o uso de celulases produzidas pelo fungo *Fomitopsis* sp. RCK2010 na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (20 U/g de bagaço) com NaOH (0,5% m/v) produzindo 193 mg de açúcar redutor por g de bagaço após 24 h de reação (DESWAL et al., 2014). Visser et al. (2013) usaram uma blenda de celulases produzidas pelos fungos *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* (50:50) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar também tratado com solução de NaOH (1,5%). Nesse trabalho foram adicionadas 20 U *FPase* por g de bagaço obtendo-se a hidrólise de 64% da celulose e de 93% da hemicelulose após 120 h de reação (VISSER et al., 2013).

Outros trabalhos relataram a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com solução alcalina (NaOH) usando celulases produzidas por *Trichoderma viride* (82% de sacarificação), *Trichoderma reesei* (66% de hidrólise de celulose e 70% de hidrólise de hemicelulose), *Aspergillus awamori* (37% de hidrólise de celulose e 87% de hidrólise de hemicelulose) (GOTTSCHALK et al., 2010; LAN et al., 2013).

Nota-se que em todos esses estudos da literatura o teor médio de sacarificação, usando microrganismos de ambiente terrestre, foi semelhante ao teor de sacarificação obtido para os fungos de ambiente marinho *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *A. sydowii* CBMAI 934 descritos no presente trabalho (75% e 78%, respectivamente).

Desta forma, ficou evidente a importância em realizar estudos de produção de celulases usando também microrganismos de ambiente marinho, pois os mesmos são tão eficientes quanto os de ambiente terrestre para realizar a hidrólise de materiais

lignocelulósicos. Além disso, uma maior produção de celulasas não é um indicativo de que tal linhagem possui maior potencialidade para a aplicação no reaproveitamento de materiais lignocelulósicos, como pôde ser observado quando foi usado a mesma quantidade de atividade *FPAse* na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar obtendo-se resultados diferentes entre as linhagens (Tabela 31).

A experimentação continua sendo a melhor forma de avaliar tal potencialidade frente a um determinado substrato, isto é, a capacidade hidrolítica de celulasas frente a um determinado substrato não serve como prova da aplicabilidade da mesma na hidrólise de um outro substrato, sendo necessário o teste empírico.

6. CONCLUSÃO

O uso de linhagens fúngicas de ambiente marinho para a produção de celulasas foi investigada neste presente trabalho, uma vez que de 10 linhagens de fungos de ambiente marinho que foram avaliadas, sendo que seis apresentaram atividade celulolítica (*Trichoderma* sp. CBMAI 932, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186, *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *M. racemosus* CBMAI 847). Duas linhagens fúngicas de ambiente terrestre também foram testadas e uma delas também apresentou atividade celulolítica (*Aspergillus* sp. CBMAI 1198).

A variação do pH, da temperatura e do teor de umidade durante o cultivo das linhagens fúngicas mostrou-se relevante para o melhoramento da produção celulásica, sendo possível obter quais as condições ótimas de cultivo. Além disso, os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 apresentaram valores ótimos de pH, temperatura e umidade diferentes entre eles.

Foi possível observar também que cada linhagem fúngica produziu um complexo celulásico que apresentou valores distintos de pH, temperatura e concentração de enzimas como melhor condição para a obtenção de açúcares redutores a partir da hidrólise do papel de filtro, quando comparados entre si.

O planejamento experimental realizado para o extrato enzimático dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 obteve pouco ou nenhum ajuste ao modelo matemático, o que pode ser explicado pelo fato de que cada enzima que compõe o complexo enzimático pode apresentar valores ótimos de pH e temperatura diferentes, e a variação dos mesmo pode interferir no melhoramento ou diminuição da atividade de cada uma das enzimas. No entanto, foi possível determinar as melhores condições para a obtenção dos açúcares redutores variando-se cada um dos parâmetros separadamente, obtendo-se, inclusive, dois pontos ótimos de pH e temperatura para algumas celulasas, o que possibilita a sua aplicação em diferentes processos de reaproveitamento de resíduos de biomassa.

A avaliação da capacidade do complexo celulásico dos fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198, *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. citrinum* CBMAI 1186 e *M. racemosus* CBMAI 847 em hidrolisar o bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado permitiu observar que, mesmo usando o mesmo valor de unidade *FPase* (1 U), os

fungos diferiram na quantidade de material lignocelulósico hidrolisado, sendo os fungos *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 e *A. sydowii* CBMAI 934 os mais eficientes no processo de hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar.

Desta forma, ficou evidente que, apesar de serem oriundos de um ambiente com pouca presença de celulose, os microrganismos de ambiente marinho podem ser produtores de celulasas, permitindo, assim como os de ambiente terrestre, a sua aplicação no reaproveitamento de materiais lignocelulósicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, B.K.; MOHANA, S.; JOG, R.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 2019-2027, 2010.
- ADLER, E. Lignin chemistry-past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169-218, 1977.
- ALRUMMAN, S.A. Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 110-119, 2016.
- ANG, S.K.; SHAZA, E.M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A.A.; MADIHAH, M.S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1293-1302, 2013.
- ANNAMALAI, N.; THAVASI, R.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2111-2115, 2011.
- ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M.V.; ELAYARAJA, S.; THAVASI, R.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Purification and characterization of thermostable alkaline cellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01 by utilizing cellulosic wastes. **Waste and Biomass Valorization**, v. 3, p. 305-310, 2012.
- ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M.V.; BALASUBRAMANIAN, T. Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 151-160, 2014.
- ASHA, B.M.; SAKTHIVEL, N. Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 1839-1848, 2014.
- ASSAREH, R.; ZAHIRI, H.S.; NOGHABI, K.A.; AMINZADEH, S.; KHANIKI, G.B. Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 99-105, 2012.
- AZEVEDO, A.M.; GOMES, A.G.; BORLIDO, L.; SANTOS, I.F.S.; PRAZERES, D.M.F.; AIRES-BARROS, M.R. Capture of human monoclonal antibodies from a clarified cell culture supernatant by phenyl boronate chromatography. **Journal of Molecular Recognition**, v. 23, p. 569-576, 2010.

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504-510, 2007.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BALASUBRAMANIAN, N.; SIMÕES, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermostable enzyme with a wide substrate spectrum utility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 132-139, 2014.

BASSO, T.P.; BASSO, T.O.; GALLO, C.R.; BASSO, L.C. Towards the production of second generation ethanol from sugarcane bagasse in Brazil. In: GIKONYO, B. (Ed.). **Sugarcane as biofuel feedstock: advances toward a sustainable energy solution**. Waretown: Apple Academic Press, 2015. p. 67-78.

BIAZUS, J.P.M.; De SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.S. Desenvolvimento de kits para análise de níveis de glicemia em pacientes com suspeita de diabetes *Mellitus*. **Exacta**, São Paulo, v.5, p.155-166, 2007.

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: PANDEY, A., LARROCHE, C., RICKE, S. C., DUSSAP, C., GNANSOUNOU, E. (Ed.). **Biofuels**. Burlington: Academic Press, 2011. p. 229-250.

BISWAS, R.; UELLENDAHL, H.; AHRING, B.K. Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 104-113, 2014.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A.M.F.; Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BUANAFINA, M.M.O.; COSGROVE, D.J. Cell walls: Structure and biogenesis. In: MOORE, P.H.; BOTHA F.C. (Ed.). **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**. New York: Wiley, 2014. p. 307-329.

CANILHA L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, J.G.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através da pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-53, 2010.

CAO, S.; AITA, G.M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 357-364, 2013.

- CHEN, H.Y.; XUE, D.S.; FENG, X.Y.; YAO, S.J. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1754-1769, 2011.
- CHI, Z.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G.; LI, J.; WANG, X. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 236-255, 2009.
- CORREIA, M.A.S.; MAZUMDER, K.; BRÁS, J.L.A.; FIRBANK, S.J.; ZHU, Y.; LEWIS, R.J.; YORK, W.S.; FONTES, C.M.G.A.; GILBERT, H.J. Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 22510-22520, 2011.
- CRIQUET, S. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 165-173, 2002.
- Da SILVA, A.S.; De SOUZA, M.F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BOM, E.P.S. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1561-1567, 2016.
- DAVE, B.R.; SUDHIR, A.P.; PARMAR, P.; PATHAK, S.; RAYKUNDALIYA, D.P.; SUBRAMANIAN, R.B. Enhancement of cellulase activity by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: Optimisation by statistical design response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 108-115, 2013.
- De OLIVEIRA, S.L.R.; MACIEL, T.C.; SANCHO, S.O.; RODRIGUES, S. Solid-state production of cellulase by *Melanoporia* sp. CCT 7736: a new strain isolated from coconut shell (*Cocos nucifera* L.). **Bioresources and Bioprocesses**, v. 3, p. 1-11, 2016.
- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- DESWAL, D.; GUPTA, R.; NANDAL, P.; KUHAD, R.C. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 264-269, 2014.
- DHILLON, G.S.; OBEROI, H.S.; KAUR, S.; BANSAL, S.; BRAR, S.K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1160-1167, 2011.
- DHILLON, G.S.; BRAR, S.K.; KAUR, S.; METAHNI, S.; M'HAMDI, N. Lactoserum as a moistening medium and crude inducer for fungal cellulase and hemicellulase induction through solid-state fermentation of apple pomace. **Biomass and Bioenergy**, v. 41, p. 165-174, 2012a.

DHILLON, G.S.; KAUR, S.; BRAR, S.K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6-13, 2012b.

DIAS, A.A.; FREITAS, G.S.; MARQUES, G.S.M.; SAMPAIO, A.; FRAGA, I.S.; RODRIGUES, M.A.M.; EVTUGUIN, D.V.; BEZERRA, R.M.F. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6045-6050, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. **Cana de açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. 882 p.

DU, S.K.; SU, X.; YANG, W.; WANG, Y.; KUANG, M.; MA, L.; FANG, D.; ZHOU, D. Enzymatic saccharification of high pressure assist-alkali pretreated cotton stalk and structural characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 279-286, 2016.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 275-282, 2008.

EL BERGADI, F.; LAACHARI, F.; ELABED, S.; MOHAMMED, I.H.; IBNSOUDA, S.K. Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 815-822, 2014.

EL-BONDKLY, A.M.A.; EL-GENDY, M.M.A. Cellulase production from agricultural residues by recombinant fusant strain of a fungal endophyte of the marine sponge *Latrunculia corticata* for production of ethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 331-346, 2012.

EL-GHONEMY, D.H.; ALI, T.H.; EL-BONDKLY, A.M.; MOHARAM, M.E.; TALKHAN, F.N. Improvement of *Aspergillus oryzae* NRRL 3484 by mutagenesis and optimization of culture conditions in solid-state fermentation for the hyper-production of extracellular cellulase. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 853-864, 2014.

FADEL, M. Production physiology of cellulases and b-glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. **Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 401-411, 2000.

FALKOSKY, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; De ALMEIDA, M.N.; ALFENAS, A.C.; COLODETTE, J.L.; De REZENDE, S.T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.

FATEN, A.M.; EL ATY ABEER, A.A. Enzyme activities of the marine-derived fungus *Alternaria alternata* cultivated on selected agricultural wastes. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 7, p. 39-46, 2013.

GALBE, M.; ZACCHI G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass & Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, 2012.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, 2013a.

GAO, L.; GAO, F.; ZHANG, D.; ZHANG, C.; WU, G.; CHEN, S. Purification and characterization of a new β -glucosidase from *Penicillium piceum* and its application in enzymatic degradation of delignified corn stover. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 658-661, 2013b.

GAUR, R.; TIWARI, S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 1-12, 2015.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GLOSTER, T.M.; TURKENBURG, J.P.; POTTS, J.R.; HENRISSAT, B.; DAVIES, G.J. Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora. **Chemistry & Biology**, v. 15, p. 1058–1067, 2008.

GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BON, E.P.S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.

GRANT, G.A. Isolation/purification of proteins. In: BRADSHAW, R.A.; STAHL, P.D. (Ed.). **Encyclopedia of Cell Biology**. Amsterdam: Elsevier, 2016. v. 1, p. 66-74.

GUNNY, A.A.N.; ARBAIN, D.; JAMAL, P.; GUMBA, R.E. Improvement of halophilic cellulase production from locally isolated fungal strain. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 476-483, 2015.

GUO, H.; CHANG, J.; YIN, Q.; WANG, P.; LU, M.; WANG, X.; DANG, X. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 361-365, 2013.

GUOWEI, S.; MAN, H.; SHIKAI, W.; HE, C. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 357-361, 2011.

HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 51-56, 2013.

HE, Y.C.; LIU, F.; DI, J.H.; DING, Y.; ZHU, Z.Z.; WU, Y.Q.; CHEN, L.; WANG, C.; XUE, Y.F.; CHONG, G.G.; MA, C.L. Effective enzymatic saccharification of dilute NaOH extraction of chestnut shell pretreated by acidified aqueous ethylene glycol media. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 129-138, 2016.

HIROSE, Y. Production and Isolation of Enzymes. In: DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O. (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. 3 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. v. 1, p. 191-215.

HONG, J.H.; JANG, S.; HEO, Y.M.; MIN, M.; LEE, H.; LEE, Y.M.; LEE, H.; KIM, J.J. Investigation of marine-derived fungal diversity and their exploitable biological activities. **Marine Drugs**, v. 13, p. 4137-4155, 2015.

HUI, Y.S.; AMIRUL, A.A.; YAHYA, A.R.M.; AZIZAN, M.N.M. Cellulase production by free and immobilized *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 79-84, 2010.

HUNG, K.S.; LIU, S.M.; TZOU, W.S.; LIN, F.P.; PAN, C.L.; FANG, T.Y.; SUN, K.H.; TANG, S.J. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1257-1263, 2011.

ISABIRYE, M.; RAJU, D.V.N.; KITUTU, M.; YEMELINE, V.; DECKERS, J.; POESEN, J. Sugarcane biomass production and renewable energy. In: GIKONYO, B. (Ed.). **Sugarcane as biofuel feedstock: advances toward a sustainable energy solution**. Waretown: Apple Academic Press, 2015. p. 3-20.

JAFFAR, M.; PANG, Y.; YUAN, H.; ZOU, D.; LIU, Y.; ZHU, B.; KORAI, R.M.; LI, X. Wheat straw pretreatment with KOH for enhancing biomethane production and fertilizer value in anaerobic digestion. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 404-409, 2016.

JAIN, A.; MORLOK, C.K.; MICHAEL HENSON, J. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 905-917, 2013.

JAMES, G. **Sugarcane**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 216 p.

JIN, W.; CHEN, L.; HU, M.; SUN, D.; LI, A.; LI, Y.; HU, Z.; ZHOU, S.; TU, Y.; XIA, T.; WANG, Y.; XIE, G.; LI, Y.; BAI, B.; PENG, L. Tween-80 is effective for enhancing steam-exploded biomass enzymatic saccharification and ethanol production by specifically lessening cellulase absorption with lignin in common reed. **Applied Energy**, v. 175, p. 82-90, 2016.

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

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

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**, v. 91, p. 153-156, 2004.

KHUONG, L.D.; KONDO, R.; De LEON, R.; ANH, T.K.; SHIMIZU, K.; KAMEI, I. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 62-68, 2014.

KIM, B.K.; LEE, B.H.; LEE, Y.J.; JIN, I.H.; CHUNG, C.H.; LEE, J.W. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 411-416, 2009.

KHUONG, L.D.; KONDO, R.; De LEON, R.; ANH, T.K.; SHIMIZU, K.; KAMEI, I. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 62-68, 2014.

KUMPALUME, P.; GHOSE, S. Chromatography: The high-resolution technique for protein separation. In: HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. (Ed.). **Isolation and Purification of Proteins**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 29-56.

LAINE, Christiane. **Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp**. 2005. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) - Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Espoo-Finland, 2005.

LAN, T.Q.; WEI, D.; YANG, S.T.; LIU, X. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 175-182, 2013.

LEE, Y.J.; KIM, B.K.; LEE, B.H.; JO, K.I.; LEE, N.K.; CHUNG, C.H.; LEE, Y.C.; LEE, J.W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 378-386, 2008.

LEE, C.K.; DARAH, I.; IBRAHIM, C.O. Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* strain 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

LI, X.H.; YANG, H.J.; ROY, B.; PARK, E.Y.; JIANG, L.J.; WANG, D.; MIAO, Y.G. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. **Microbiological Research**, v. 165, p. 190-198, 2010.

LI, Z.; CHEN, X.; LI, Z.; LI, D.; WANG, Y.; GAO, H.; CAO, L.; HOU, Y.; LI, S.; LIANG, J. Strain improvement of *Trichoderma viride* for increased cellulase production by irradiation of electron and $^{12}\text{C}^{6+}$ -ion beams. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 983-989, 2016.

LIMA, M.A.; GOMEZ, L.D.; STEELE-KING, C.G.; SIMISTER, R.; BERNARDINELLI, O.D.; CARVALHO, M.A.; REZENDE, C.A.; LABATE, C.A.; DE AZEVEDO, E.R.; MCQUEEN-MASON, S.J.; POLIKARPOV, I. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of brazilian biomass for sustainable biorenewables production. In: GIKONYO, B. (Ed.). **Sugarcane as biofuel feedstock: advances toward a sustainable energy solution**. Waretown: Apple Academic, 2015. p. 21-66.

LIU, S.Y.; SHIBU, M.A.; JHAN, H.J.; LO, C.T.; PENG, K.C. Purification and characterization of novel glucanases from *Trichoderma harzianum* ETS 323. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10309-10314, 2010.

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**, v. 65, p. 717-725, 2011.

LIU, J.; XUE, D.; HE, K.; YAO, S. Cellulase production by solid-state fermentation of marine *Aspergillus* ZJUBE-1 and its enzymological properties. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**, v. 16, p. 381-386, 2012.

LIU, Y.Y.; XU, J.L.; ZHANG, Y.; LIANG, C.Y.; HE, M.C.; YUAN, Z.H.; XIE, J. Reinforced alkali-pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Fuel Processing Technology**, v. 143, p. 1-6, 2016.

LIU, Z.J.; LAN, T.Q.; LI, H.; GAO, X.; ZHANG, H. Effect of bisulfite treatment on composition, structure, enzymatic hydrolysis and cellulase adsorption profiles of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 27–33, 2017.

MADHU, K.M.; BEENA, P.S.; CHANDRASEKARAN, M. Extracellular β -glucosidase production by a marine *Aspergillus sydowii* BTMFS 55 under solid state fermentation using statistical experimental design. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 457-466, 2009.

MARYANA, R.; MA'RIFATUN, D.; WHENI I., A.; SATRIYO, K.W.; RIZAL, W.A.; Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. **Energy Procedia**, v. 47, p. 250-254, 2014.

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

MEKALA, N.K.; SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 122-131, 2008.

MELGAR, G.Z.; ASSIS, F.V.S.; ROCHA, L.C.; FANTI, S.C.; SETTE, L.D.; PORTO, A.L.M. Growth curves of filamentous fungi for utilization in biocatalytic reduction of cyclohexanones. **Global Journal of Science Frontier Research Chemistry**, v. 13, p. 13-19, 2013.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7842-7847, 2008.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A.L.; DILLON, A.J.P.; CAMASSOLA, M. Influence of different chemical pretreatments of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) used as a substrate for cellulase and xylanase production in submerged cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1455-1464, 2016.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G.D.; YOUNESI, H.; LAHIJANI, P.; UZIR, M.H.; MOHAMED, A.R. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4255-4273, 2011.

MOREAU, A.; MONTPLAISIR, D.; SPARLING, R.; BARNABÉ, S. Hydrogen, ethanol and cellulase production from pulp and paper primary sludge by fermentation with *Clostridium thermocellum*. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 256-262, 2015.

MUND, N.K.; DASH, D.; BARIK, C.R.; GOUD, V.V.; SAHOO, L.; MISHRA, P.; NAYAK, N.R. Chemical composition, pretreatments and saccharification of *Senna siamea* (Lam.) H.S. Irwin & Barneby: An efficient biomass producing tree legume. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 205-212, 2016.

MUÑOZ, C.; HIDALGO, C.; ZAPATA, M.; JEISON, D.; RIQUELME, C.; RIVAS, M. Use of cellulolytic marine bacteria for enzymatic pretreatment in microalgal biogas production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 4199-4206, 2014.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; VISWANATH, B.; CHANDRA, M.S.; REDDY, B.R. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 472-476, 2006.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A.R. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NG, I.S.; LI, C.W.; CHAN, S.P.; CHIR, J.L.; CHEN, P.T.; TONG, C.G.; YU, S.M.; DAVID HO, T.H. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1310-1317, 2010.

NOVO, L.P. **Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLAJUYIGBE, F.M.; OGUNYEW, O.A. Enhanced production and physicochemical properties of thermostable crude cellulase from *Sporothrix carnii* grown on corn cob. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 110-117, 2016.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

PADMAVATHI, T.; NANDY, V.; AGARWAL, P.; Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 2, p. 1161-1170, 2012.

PAREEK, N.; GILLGREN, T.; JÖNSSON, L.J. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 70-77, 2013.

PARK, J.I.; KENT, M.S.; DATTA, S.; HOLMES, B.M.; HUANG, Z.; SIMMONS, B.A.; SALE, K.L.; SAPRA, R. Enzymatic hydrolysis of cellulose by the cellobiohydrolase domain of CelB from the hyperthermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5988-5994, 2011.

PERRONE, O.M.; COLOMBARI, F.M.; ROSSI, J.S.; MORETTI, M.M.S.; BORDIGNON, S.E.; NUNES, C.C.C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; Da-SILVA, R. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 69-76, 2016.

PHITSUWAN, P.; PERMSRIBURASUK, C.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; RATANAKHANOKCHAI, K. Evaluation of fuel ethanol production from aqueous ammonia-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 150-157, 2016.

POPPE, K.M.; PERICO, S.C.A. **Bioetanol combustível**: uma oportunidade para o Brasil. Brasília: Ed. CGEE, 2009. 536 p.

PRASANNA, H.N.; RAMANJANEYULU, G.; REDDY, B.R. Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-11, 2016.

QING, Q.; ZHOU, L.; HUANG, M.; GUO, Q.; HE, Y.; WANG, L.; ZHANG, Y. Improving enzymatic saccharification of bamboo shoot shell by alkalic salt pretreatment with H₂O₂. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 230-236, 2016.

RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V.R.; MISHRA, R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 433-441, 2004.

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

RAMADOSS, G.; MUTHUKUMAR, K. Ultrasound assisted ammonia pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 33-41, 2014.

RAVANAL, M.C.; PEZOA-CONTE, R.; von SCHOULTZ, S.; HEMMING, J.; SALAZAR, O.; ANUGWOM, I.; JOGUNOLA, O.; MÄKI-ARVELA, P.; WILLFÖR, S.; MIKKOLA, J.; LIENQUEO, M.E. Comparison of different types of pretreatment and enzymatic saccharification of *Macrocystis pyrifera* for the production of biofuel. **Algal Research**, v. 13, p. 141-147, 2016.

RAVINDRAN, C.; VARATHARAJAN, G.R.; KARTHIKEYAN, A. Role of alkaline-tolerant fungal cellulases in release of total antioxidants from agro-wastes under solid state fermentation. **BioResources**, v. 6, p. 3142-3154, 2011.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A.K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92-102, 2016.

RICHARDS, T.A.; JONES, M.D.M.; LEONARD, G.; BASS, D. Marine fungi: Their ecology and molecular diversity. **Annual Review of Marine Science**, v. 4, p. 495-522, 2011.

ROCHA, C.F. **Avaliação da viabilidade da bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar em metano por meio da digestão anaeróbia**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2011.

SAJITH, S.; SREEDEVI, S.; PRIJI, P.; UNNI, K.N.; BENJAMIN, S. Production and partial purification of cellulase from a novel fungus, *Aspergillus flavus* BS1. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 763-771, 2014.

SAINI, J.K.; PATEL, A.K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R.R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, v. 98, p. 29-42, 2016.

SALES, M.R.; De MOURA, R.B.; Da SILVA, M.F.; De MACEDO, G.R.; PORTO, A.L.F. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 917-924, 2011.

SALLES, M.R.; De MOURA, R.B.; PORTO, T.S.; De MACEDO, G.R.; PORTO, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1290-1296, 2010.

SANTOS, I.D. **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e concentração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SASI, A.; RAVIKUMAR, M.; MANTHIRIKANI, S. Optimization, production and purification of cellulase enzyme from marine *Aspergillus flavus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 4214-4218, 2012.

SETHI, R.; PADMAVATHI, T.; SULLIA, S.B. Lignocellulose biomass degradation by marine microorganisms. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, p. 129-138, 2013.

REN21. **Renewables 2016 global status report. Renewable energy policy network for the 21st century.** 2016. Disponível em: <http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2016/10/REN21_GSR2016_FullReport_en_11.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.

SHARMA, S.; SHARMA V.; KUILA, A. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-11, 2016.

SHI, J.; CHINN, M.S.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6556-6564, 2008.

SMICHI, N.; MESSAUODI, Y.; KSOURI, R.; ABDELLY, C.; GARGOURI, M. Pretreatment and enzymatic saccharification of new phytoresource for bioethanol production from halophyte species. **Renewable Energy**, v. 63, p. 544-549, 2014.

SMRITI; SANWAL, G.G. Purification and characterization of a cellulase from *Catharanthus roseus* stems. **Phytochemistry**, v. 52, p. 7-13, 1999.

SINGH, K.; RICHA, K.; BOSE, H.; KARTHIK, L.; KUMAR, G.; RAO, K.V.B. Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus* VITRKHB. **3 Biotech**, v. 4, p. 591-598, 2014.

SINGHVI, M.S.; ADSUL, M.G.; GOKHALE, D.V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6569-6572, 2011.

SRIARIYANUN, M.; TANTAYOTAI, P.; YASURIN, 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**, v. 19, p. 23-28, 2016.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, p. 480-486, 2012.

SUKUMARAM, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, Y. & CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002.

TANG, B.; PAN, H.; TANG, W.; ZHANG, Q.; DING, L.; ZHANG, F. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 366-372, 2012.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1616-1623, 2002.

THONGEKKAWE, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.60, p.140-146, 2008.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; KUMAR, M.; KUMARI, P.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. **Chemosphere**, v. 83, p. 706-712, 2011.

TRIVEDI, N.; GUPTA, V.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. Detection of ionic liquid stable cellulase produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. isolated from brown alga *Sargassum polycystum* C. Agardh. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 313-319, 2013.

TRIVEDI, N.; REDDY, C.R.K.; RADULOVICH, R.; JHA, B. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. **Algal Research**, v. 9, p. 48-54, 2015.

TRIVEDI, N.; REDDY, C.R.K.; LALI, A.M. Marine microbes as a potential source of cellulolytic enzymes. In: KIM, S.K.; TOLDRA, F. (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**. Burlington: Academic Press, 2016. v. 79, p. 27-41.

UNICA. **Setor sucroenergético do estado de São Paulo frente à crise econômica**. 2016. Disponível em: <www.unica.com.br/convidados/29063662920344564516/setor-sucroenergetico-do-estado-de-sao-paulo-frente-a-crise-economica>. Acesso em: 19 abr. 2017.

VAID, S.; BAJAJ, B.K. Production of ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus subtilis* g₂ using agroindustrial residues with application potential for saccharification of biomass under one pot consolidated bioprocess. **Waste Biomass Valor**, p. 1-16, 2016. No prelo. Disponível em: <[dx.doi.org/10.1007/s12649-016-9626-x](https://doi.org/10.1007/s12649-016-9626-x)>. Acesso em: 10 dez. 2016.

VALENCIA, E.Y.; CHAMBERGO, F.S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: Sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7119-7123, 2011.

VIELL, J.; WULFHORST, H.; SCHIMIDT, T.; COMMANDEUR, U.; FISCHER, R.; SPIESS, A.; MARQUARDT, W. An efficient process for the saccharification of wood chips by combined ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 144-151, 2013.

VIJAYARAGHAVAN, P.; VINCENT, S.G.P.; DHILLON, G.S. Solid-substrate bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by *Bacillus halodurans* IND18. **Waste Management**, v. 48, p. 513-520, 2016a.

VIJAYARAGHAVAN, P.; ARUN, A.; AL-DHABI, N.A.; VINCENT, S.G.P.; ARASU, M.V.; CHOI, K.C. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulase and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1-13, 2016b.

VISSER, E.M.; FALKOSKI, D.L.; De ALMEIDA, M.N.; MAITAN-ALFENAS, G.P.; GUIMARÃES, V.M. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 587-594, 2013.

WALKER, G.M. **Bioethanol: science and technology of fuel alcohol**. Ventus Publication, 2010. 114 p. Disponível em: <<http://tpielibrary.com/resources/8bd51.pdf>> Acesso em: 12 ago. 2015.

WANG, C.Y.; HSIEH, Y.R.; NG, C.C.; CHAN, H.; LIN, H.T.; TZENG, W.S.; SHYU, Y.T. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 373-379, 2009.

WANG, F.Q.; XIE, H.; CHEN, W.; WANG, E.T.; DU, F.G.; SONG, A.D. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 572-578, 2013.

WIRAWAN, R.; SAPUAN, S.M.; ROBIAH, Y.; KHALINA, A. Flexural properties of sugarcane bagasse pith and rind reinforced poly(vinyl chloride). **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, v. 11, p. 1-4, 2010. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/1757-899X/11/1/012011>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

WU, S.; LAN, Y.; WU, Z.; PENG, Y.; CHEN, S.; HUANG, Z.; XU, L.; GELBIC, I.; GUAN, X.; ZHANG, L.; ZOU, S. Pretreatment of spent mushroom substrate for enhancing the conversion of fermentable sugar. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 596-600, 2013.

XU, F.; WANG, J.; CHEN, S.; QIN, W.; YU, Z.; ZHAO, H.; XING, X.; LI, H. Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, p. 53-58, 2011.

- XU, H.; YU, G.; MU, X.; ZHANG, C.; DeROUSSEL, P.; LIU, C.; LI, B.; WANG, H. Effect and characterization of sodium lignosulfonate on alkali pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of corn stover. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 638-646, 2015.
- XUE, D.S.; CHEN, H.Y.; REN, Y.R.; YAO, S.J. Enhancing the activity and thermostability of thermostable β -glucosidase from a marine *Aspergillus niger* at high salinity. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 606-611, 2012.
- XUE, D.S.; WANG, J.B.; YAO, S.J. High production of b-glucosidase from a marine *Aspergillus niger* immobilized on towel gourd vegetable sponges. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, p. 1011-1015, 2015.
- YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v. 2, p. 421-450, 2011.
- YANG, P.; ZHANG, H.; JIANG, S. Construction of recombinant sesc *Saccharomyces cerevisiae* for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol production by in situ fermentation. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-11, 2016.
- YIN, L.J.; HUANG, P.S.; LIN, H.H. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* Sp. YJ5. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9833-9837, 2010.
- YOON, L.W.; ANG, T.N.; NGOH, G.C.; CHUA, A.S.M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.
- ZHANG, D.; LUO, Y.; CHU, S.; ZHI, Y.; WANG, B.; ZHOU, P. Enhancement of cellulase and xylanase production using ph-shift and dissolved oxygen control strategy with *Streptomyces griseorubens* JS D-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 338-352, 2016.
- ZHU, Z.; ZHU, M.; WU, Z. Pretreatment of sugarcane bagasse with NH_4OH – H_2O_2 and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 199-207, 2012.
- ZENG, Y.; ZHAO, S.; YANG, S.; DING, S.Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014.
- ZHENG, Y.; ZHANG, R.; PAN, Z. Investigation of adsorption kinetics and isotherm of cellulase and β -glucosidase on lignocellulosic substrates. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 1-9, 2016.
- ZING, H.W.; PARK, K.H.; CHOI, T.J. Purification and characterization of a carboxymethyl cellulase from *Artemia salina*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, p. 194-199, 2014.

Capítulo 2

PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE GLICEROL E GLICOSE PELA BACTÉRIA *Serratia marcescens*

RESUMO

Foi avaliada a capacidade de 6 bactérias isoladas de turfeira (*Bacillus subtilis* LQOB-SE1, *B. coagulans* LQOB-SE2, *B. pumilus* LQOB-SE3, *Brevibacillus brevis* LQOB-SE4, *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5 e *Serratia marcescens* LQOB-SE6) em produzir 2,3-butanodiol. Este composto químico tem ampla utilização na indústria e na síntese orgânica e foi obtido a partir da fermentação do glicerol com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6. Em seguida esta bactéria também foi usada para produzir o 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose. Estes estudos tiveram como objetivos o reaproveitamento de resíduos gerados na produção de biodiesel como o glicerol que corresponde a 10% do total de biodiesel produzido e de etanol, através da hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de glicose. Assim, foram realizadas as otimizações do processo de fermentação do glicerol e da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6. As melhores condições para o uso do glicerol obtidas neste trabalho foram: valor inicial de pH 7, o meio de cultura foi o *Caldo nutriente* 8 g.L⁻¹, a concentração inicial de glicerol foi de 50 g.L⁻¹ e o tempo de cultivo e de biotransformação foi de 7 dias. Com esses parâmetros obteve-se rendimento de 2,3-butanodiol foi de 0,30 g.g⁻¹, produtividade de 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹ e concentração máxima de 2,3-butanodiol de 22,4 g.L⁻¹. Nessas condições foram produzidos dois estereoisômeros do 2,3-butanodiol, o *meso*-2,3-butanodiol, confirmado por padrão e por comparação com a literatura e um outro estereoisômero, nomeado como *quiral*-2,3-butanodiol devido à não confirmação da configuração absoluta, porém opticamente ativo. As melhores condições para a fermentação da glicose foram: valor de pH inicial de 7, o meio de cultura foi o *Caldo nutriente* 8 g.L⁻¹, a concentração inicial de glicose foi de 75 g.L⁻¹ e o tempo de cultivo foi de 5 dias. A partir destas condições obteve-se o rendimento de 2,3-butanodiol de 0,42 g.g⁻¹ em 5 dias de fermentação, a produtividade foi de 0,45 g.L⁻¹.h⁻¹ após 2 dias e a concentração máxima de 2,3-butanodiol foi de 31,2 g.L⁻¹. A partir da glicose apenas o estereoisômero *meso*-2,3-butanodiol foi produzido. A produção de 2,3-butanodiol a partir do hidrolisado gerado na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelas celulasas do fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 não foi observada devido, possivelmente, à baixa concentração de açúcares no hidrolisado.

ABSTRACT

It was evaluated the capability of 6 bacteria strains (*Bacillus subtilis* LQOB-SE1, *B. coagulans* LQOB-SE2, *B. pumillus* LQOB-SE3, *Brevibacillus brevis* LQOB-SE4, *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5 and *Serratia marcescens* LQOB-SE6), isolated from peat soil, of producing 2,3-butanediol from glycerol fermentation. 2,3-butanediol has application in industry and in organic synthesis and, in this work, was produced from glycerol only by the bacterium *S. marcescens* LQOB-SE6. The same strain was also capable of producing 2,3-butanediol from glucose fermentation. The aim of this work was to reuse wastes generated in the biodiesel production, once glycerol production corresponds to 10% of the total produced biodiesel, and in the bioethanol production, by hydrolyzing the sugarcane bagasse releasing glucose as product. Therefore, the glycerol and glucose fermentation processes, performed by *S. marcescens* LQOB-SE6, were optimized. The best conditions for glycerol fermentation were: initial pH 7, *Nutrient Broth* (8 g.L⁻¹), initial glycerol concentration (50 g.L⁻¹) and fermentation time of 7 days. It were obtained good yield (0.30 g.g⁻¹), productivity (0.13 g.L⁻¹.h⁻¹) and glycerol concentration (22.4 g.L⁻¹). It was obtained two 2,3-butanediol stereoisomers, o *meso*-2,3-butanediol, confirmed by using standards and by comparison with literature, and another isomer, named in this work as *quiral*-2,3-butanediol because the absolute configuration was not assigned, but optically active. For glucose fermentation, the best conditions in 2,3-butanediol production were: initial pH 7, *Nutrient Broth* (8 g.L⁻¹), initial glucose concentration (75 g.L⁻¹) and fermentation time of 5 days. It were also obtained good yield (0.42 g.g⁻¹) and glucose concentration (31.2 g.L⁻¹) after 5 days and productivity (0.45 g.L⁻¹.h⁻¹) after 2 days. Only the *meso*-2,3-butanediol stereoisomer was produced. The 2,3-butanediol production from the hydrolysate of sugarcane bagasse, obtained by using cellulases from *A. sydowii* CBMAI 934, was not observed due the low sugar concentration in the hydrolysate.

1. INTRODUÇÃO

2,3-Butanodiol é um reagente químico promissor e que possui inúmeras aplicações industriais, tais como, na produção de cosméticos, de alimentos, de medicamentos, de polímeros, fumigantes, explosivos e de soluções anticongelantes; além de ser usado na síntese de produtos químicos como blocos de construção (PETROV & PETROVA, 2009; KIM et al., 2014; CELINSKA & GRAJEK, 2009; HU et al., 2016).

O 2,3-butanodiol possui dois carbonos assimétricos e, portanto, possui três estereoisômeros, sendo dois quirais, o (-)-(2*R*,3*R*) e (+)-(2*S*,3*S*), e um na sua forma *meso* sem atividade óptica (Figura 1). O 2,3-butanodiol tem ponto de ebulição de aproximadamente 180 °C e em condições normais de temperatura e pressão (1 atm, 25 °C) pode estar na forma líquida ou de cristais, dependendo de sua estereoquímica. A temperatura de combustão (27,198 kJ.g⁻¹) é muito semelhante a de outros combustíveis líquidos, tais como, o etanol (29,055 kJ.g⁻¹) e o metanol (22,081 kJ.g⁻¹) (SYU, 2001).

Figura 1. Estereoisômeros do 2,3-butanodiol.

A produção de 2,3-butanodiol data de mais de 100 anos, cujas primeiras investigações foram feitas por Harden e Walpole em 1906 e por Harden e Norris em 1912 usando a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (JI et al., 2011; CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Durante a Segunda Guerra Mundial a sua produção em escala piloto foi desenvolvida, sendo uma etapa importante para a síntese do 1,3-butadieno. No entanto, com o desenvolvimento de rotas de produção do 1,3-butadieno a partir do petróleo, a produção do 2,3-butanodiol usando microrganismos foi descontinuada nos anos 1950 (SABRA et al., 2011; JI et al., 2011).

A produção de 2,3-butanodiol voltou a ser estudada devido à alta do preço do barril de petróleo nas décadas de 1980 e 1990, tendo como principal alvo o

reaproveitamento da biomassa na produção do mesmo (SABRA et al., 2015; SABRA et al., 2011).

Mesmo após décadas de estudo, a produção microbiana do 2,3-butanodiol ainda não é economicamente competitiva. Contudo, o melhoramento das (bio)tecnologias e metodologias empregadas na sua produção, além do uso de substratos mais baratos e o emprego de linhagens de microrganismos mais eficazes, pode permitir uma produção mais economicamente viável (SABRA et al., 2011). Desta forma, a produção microbiana de 2,3-butanodiol a partir de biomassa, além de tornar-se economicamente viável, seria uma rota para uma produção mais sustentável (JI et al., 2011).

Com o objetivo de contribuir para a produção microbiana do 2,3-butanodiol a partir de biomassa e também para a aplicação dos açúcares produzidos na hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar, via celulasas de microrganismos de ambiente marinho, obtidos e descritos no Capítulo 1, este trabalho se propôs a realizar um estudo com bactérias isoladas de turfeira visando a biotransformação desses açúcares na produção de 2,3-butanodiol. Também foi avaliada a produção de 2,3-butanodiol usando glicerol como substrato, uma vez que se trata de um substrato de menor custo em relação aos carboidratos, o que pode favorecer a viabilidade econômica do processo via produção microbiana de 2,3-butanodiol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos usados na produção de 2,3-butanodiol

Espécies de leveduras e bactérias são descritas na literatura como capazes de produzir 2,3-butanodiol a partir de biomassa, sendo que algumas espécies se destacam por produzi-lo em quantidades consideráveis.

Em geral, as leveduras apresentam uma baixa produtividade sendo as bactérias os principais microrganismos com potencial de aplicação industrial na produção de 2,3-butanodiol. Dentre as espécies de bactérias, as dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia* são consideradas as mais promissoras para a aplicação em grande escala, mais especificamente as espécies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *B. polymyxa* e *S. marcescens*, que são descritas como as mais eficientes na produção de 2,3-butanodiol (JI et al., 2011; CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Embora apresentem maiores produtividades, as espécies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *B. polymyxa* e *S. marcescens* como principais produtoras de 2,3-butanodiol são patogênicas dificultando sua implementação em um processo em escala industrial (JI et al., 2011) (Tabela 1). Um exemplo de patogenicidade pode ser descrito para a espécie *K. pneumoniae* que causa pneumonia e infecções graves no trato urinário (KIM et al., 2015). No entanto, devido à capacidade efetiva de produção de 2,3-butanodiol por essas espécies, estudos continuam sendo realizados com a finalidade de minimizar a patogenicidade através de mudanças nos genes expressos pelas mesmas. Por exemplo, Jung et al. (2013a) relataram a inativação do gene *wabG* das espécies *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242, *Klebsiella oxytoca* KCTC1686 e *K. oxytoca* ATCC 43863, o qual foi determinado como responsável pelo fator de virulência dessas linhagens, sem que o crescimento microbiano fosse afetado. No entanto, houve diminuição da produção de 2,3-butanodiol, pela linhagem mutante da bactéria *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2242, de 31,27 para 22,44 g.L⁻¹ (JUNG et al., 2013a).

Uma outra possibilidade para a produção deste composto usando bactérias é a descoberta de espécies que não sejam patogênicas, como por exemplo a linhagem de *Bacillus licheniformis* DSM Z 8785, que não apresenta o mesmo risco que as bactérias patogênicas e que também é capaz de produzir o 2,3-butanodiol com alta produtividade (72,6 g.L⁻¹ de butanodiol a partir de 180 g.L⁻¹ de glicose após 86 h, Tabela 1) (JURCHESCU et al., 2013). O uso de linhagens recombinantes também é uma

alternativa para a produção de 2,3-butanodiol com menor risco de desenvolvimento de doenças causadas por microrganismos, como por exemplo a bactéria recombinante *Escherichia coli* usada por Xu et al. (2014), a qual foi cultivada usando um modo de fermentação alimentada obtendo-se a produção de 73,8 g.L⁻¹ de 2,3-butanodiol após 62 h de cultivo (XU et al., 2014).

Tabela 1. Produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicose por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Referência
<i>Klebsiella</i> sp. Zmd30	146	0,37	2,1	Wong et al. (2014)
<i>Serratia marcescens</i> G12	130	0,39	1,0	Shi et al. (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130	0,36	0,32	Kim et al. (2013)
<i>Escherichia coli</i>	50*	0,49	1,44	Xu et al. (2014)
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 8 78 5	180	0,42	0,86	Jurchescu et al. (2013)
<i>Bacillus licheniformis</i> 10-1-A	240	0,47	2,4	Li et al. (2013)
<i>Bacillus licheniformis</i> BL5	30	0,45	-	Wang et al. (2012)
<i>Bacillus subtilis</i> 168 (ATCC 23857)	20	0,30	0,4	Biswas et al. (2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CICC 10011	90	0,35	1,6	Cheng et al. (2013)
<i>Klebsiella oxytoca</i> NBRF4	44	0,32	1,15	Han et al. (2013)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	20	0,40	-	Perego et al. (2000)

* Concentração inicial de glicerol durante a fermentação alimentada

Embora seja conhecido que o 2,3-butanodiol possui três estereoisômeros, dentre os estudos na literatura que descrevem a sua produção, a maioria dos trabalhos não descreve a relação estereoquímica referente à produção dos respectivos estereoisômeros (SYU, 2001). No entanto, dentre os trabalhos avaliados observou-se que a maioria dos microrganismos produziu uma mistura de dois estereoisômeros, sendo que o composto *meso*-2,3-butanodiol estava sempre presente na mistura e o outro isômero formado é uma das formas opticamente ativa (JI et al., 2011; CELINSKA & GRAJEK, 2009).

O *meso*-2,3-butanodiol foi o principal produto obtido pelas espécies *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. aerogenes* as quais também produziram o isômero (+)-(2*S*,3*S*)-butanodiol em menor escala, cuja razão isomérica foi de 9:1 (JI et al., 2011,

CELINSKA & GRAJEK, 2009). Em geral, a espécie de *S. marcescens* é sempre descrita na literatura como produtora apenas do *meso*-2,3-butanodiol, no entanto Höhn-Bentz & Radler (1978) reportaram que a linhagem *S. marcescens* B 513 também produziu pequenas quantidades de (+)-(2*S*,3*S*)-butanodiol. As espécies que produziram o outro isômero opticamente ativo, (-)-(2*R*,3*R*)-butanodiol, são majoritariamente do gênero *Bacillus*, sendo que as mesmas produziram também o *meso*-2,3-butanodiol em menor quantidade, por exemplo, a razão estereoisomérica obtida pela espécie *B. subtilis* foi de 3:2 (MOES et al., 1985).

Além das linhagens de *S. marcescens* que produziram apenas o *meso*-2,3-butanodiol, outras espécies produziram também apenas o isômero (-)-(2*R*,3*R*)-butanodiol, como por exemplo as espécies *Paenibacillus polymyxa*, produzindo 19,5 g.L⁻¹ de (-)-(2*R*,3*R*)-butanodiol e a *B. subtilis* que o produziu 49,29 g.L⁻¹ quando foi cultivada em condições contendo quantidade oxigênio limitada (SABRA et al., 2015; FU et al., 2014).

2.2. Substratos alternativos usados na produção de 2,3-butanodiol

A produção microbiana de 2,3-butanodiol a partir de biomassa tem como objetivo usar substratos que não são usados como alimentos e que sejam de baixo custo (SABRA et al., 2011). Portanto, novos substratos passaram a ser estudados e alguns deles serão descritos nas próximas seções deste trabalho.

2.2.1. Resíduos da indústria alimentícia

Os resíduos da indústria alimentícia constituem uma importante fração dos substratos que podem ser utilizados para a produção de 2,3-butanodiol, uma vez que alguns desses resíduos apresentam altos teores de açúcares (PEREGO et al., 2000; JI et al., 2011).

O soro de leite obtido na produção de queijo é um desses resíduos e foi muito reportado por trabalhos na literatura (JI et al., 2011). No entanto, esses mesmos trabalhos compararam a produtividade obtida com o soro de leite com a produtividade ao usar amido ou melaço de beterraba e concluíram que em termos totais de produtividade ele foi inferior. O principal sacarídeo presente no soro de leite é a lactose ao invés de glicose ou sacarose, como no caso do amido e do melaço, respectivamente.

Além da diferença da composição química, a concentração de lactose no soro de leite é baixa, sendo aproximadamente 4,0% da massa seca (PEREGO et al., 2000).

A fim de melhorar a produtividade de 2,3-butanodiol Champluvier et al. (1989) imobilizaram as células de *K. oxytoca* junto com células da levedura *Kluyveromyces lactis*. Foram obtidas altas concentrações de 2,3-butanodiol (14 g.L^{-1}) e uma boa velocidade de produção (produtividade de $1,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Quando comparados esses resultados com trabalhos publicados 10 anos depois, notou-se que a produção de 2,3-butanodiol a partir de lactose foi quase duas vezes maior, mesmo após uma década de estudos na área, uma vez que Perego et al. (2000), usando a bactéria *Enterobacter aerogenes*, obteve a produção de $8,6 \text{ g.L}^{-1}$ de 2,3-butanodiol a partir de lactose (CHAMPLUVIER et al., 1989; PEREGO et al., 2000).

O uso de hidrolisado de amido gerado no processamento do milho também se mostrou uma ótima alternativa de uso para a produção de 2,3-butanodiol, como foi descrito por Perego et al. (2000). Neste trabalho foram também avaliados, além do hidrolisado de amido, o soro de leite e o melaço produzido durante o processo de extração de açúcar de beterraba além de glicose pura para fins de comparação. Observou-se que a bactéria *E. aerogenes* produziu 2,3-butanodiol a partir de todos os substratos, mas os melhores rendimentos foram obtidos com o hidrolisado de amido e o soro de leite. Contudo, a produtividade do hidrolisado de amido foi muito superior às demais ($0,68 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), enquanto que o melaço apresentou a mais baixa produtividade ($0,38 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Outro resíduo da indústria alimentícia que forneceu bons resultados na produção de 2,3-butanodiol foi o melaço gerado após o processo de cristalização da sacarose a partir do caldo da cana-de-açúcar. Jung et al. (2013b) estudaram a produção de 2,3-butanodiol pela linhagem mutante EMY-68 da bactéria *E. aerogenes* KCTC 2190 usando o melaço de cana-de-açúcar como substrato e observaram que a mesma consumiu os açúcares presentes no melaço muito mais rápido que a linhagem selvagem da *E. aerogenes* KCTC 2190 ($82,13 \text{ g.L}^{-1}$ e $50,99 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) e, consequentemente, apresentou uma maior produção de 2,3-butanodiol ($28,88 \text{ g.L}^{-1}$ e $15,91 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) após 10 h de cultivo.

Afschar et al. (1991) também produziram 2,3-butanodiol a partir de melaço de cana-de-açúcar usando a bactéria *K. oxytoca* (118 g.L^{-1} de 2,3-butanodiol a partir de 280 g.L^{-1} de melaço).

2.2.2. Açúcares obtidos a partir de materiais lignocelulósicos

O uso de biomassa lignocelulósica também tem atraído a atenção de grupos de pesquisa como possível substrato para biotransformações, uma vez que mesmo não apresentando maiores produtividades, se comparada com o uso de glicose pura, tem um baixo custo de obtenção, o que torna viável sua aplicação na produção de 2,3-butanodiol (JI et al., 2011).

Diversos materiais lignocelulósicos podem ser usados na produção de 2,3-butanodiol sendo necessário, contudo, que tais materiais sejam hidrolisados a fim de libertar os açúcares que compõem a celulose e a hemicelulose, para serem aproveitados no processo de produção de 2,3-butanodiol. Com a hidrólise dessas duas frações os açúcares liberados em maior concentração são glicose e xilose, bem como quantidades consideráveis de arabinose e ribose (JI et al., 2011).

Exemplos de materiais lignocelulósicos já avaliados como substratos para a produção de 2,3-butanodiol foram o aguapé, materiais florestais, palha de milho, casca de pinhão-manso, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros (MOTWANI et al., 1993; FRAZER & MCCASKEY, 1989; HUANG et al., 2013; CHENG et al., 2010; CAO et al., 1997; JIANG et al., 2012; SONG et al., 2012).

A metodologia para a obtenção do hidrolisado lignocelulósico rico em açúcares pode interferir no rendimento e na produtividade da produção do 2,3-butanodiol, como foi observado nos estudos realizados por Cheng et al. (2010). Os autores avaliaram o efeito dos subprodutos gerados na hidrólise ácida da palha de milho durante o processo de produção do 2,3-butanodiol. Verificou-se a presença de ácido acético no hidrolisado o que promoveu a inibição no crescimento celular da bactéria *K. oxytoca* ATCC 10370. A estratégia encontrada pelos autores foi de ajustar o pH para 6,3 e realizar uma fermentação alimentada, ou seja, com o substrato sendo adicionado ao longo do processo, evitando assim uma alta concentração inicial de ácido acético. Por fim, nas condições ótimas determinadas nesse trabalho, obtiveram o rendimento máximo na produção de 2,3-butanodiol após 60 h de cultivo, com produtividade de $0,59 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Jiang et al. (2012) realizaram primeiramente uma hidrólise do material lignocelulósico a partir da casca de pinhão-manso (150 °C, 0,5 h, 1,5% de ácido) seguida de uma segunda etapa de hidrólise em condições mais acídicas (150 °C, 1 h, 4% de ácido). Assim, foi obtido 37% de hidrólise na primeira etapa e 64% de hidrólise total. Os hidrolisados de ambas as etapas foram avaliados separadamente e observou-se que o hidrolisado da primeira etapa apresentou rendimento de 71,2% e produtividade de 0,42

$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto que o hidrolisado da segunda etapa apresentou maior rendimento (82,8%) e maior produtividade ($0,59 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Uma abordagem que pode diminuir a presença de inibidores no hidrolisado é o uso de enzimas celulolíticas para a liberação dos açúcares, ao invés do uso de ácidos (JI et al., 2011). Um exemplo do emprego de hidrólise enzimática foi o trabalho realizado por Song et al. (2012) que estudaram o uso de bagaço de cana-de-açúcar como substrato na produção do 2,3-butanodiol, obtendo um rendimento de produção deste produto de 86%.

Tendo em conta esses relatos da literatura, nota-se que estudos estão sendo direcionados para o reaproveitamento de materiais lignocelulósicos para a produção de 2,3-butanodiol, sendo que as condições de hidrólise desses materiais são determinantes para a obtenção de melhores resultados.

2.2.3. Glicerol

Além de ser um substrato de baixo custo, o uso do glicerol na produção de 2,3-butanodiol é vantajoso, pois é um subproduto na produção de biodiesel, cuja massa do glicerol corresponde a 10% da massa do biodiesel produzida (PETROV & PETROVA, 2009; DA SILVA et al., 2009). No entanto, o 2,3-butanodiol não é, na maioria dos trabalhos publicados, o principal produto da fermentação do glicerol, sendo o produto secundário, tendo como produto majoritário o 1,3-propanodiol (OH et al., 2013; DE SOUZA et al., 2014; YEN et al., 2014a).

Mesmo o 2,3-butanodiol não sendo o produto majoritário da biotransformação do glicerol, a sua produção pode ser aumentada através de mudanças reacionais, tais como, alterações nos valores de pH, composição do meio de cultura, dentre outras variáveis (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Um exemplo de aumento na produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol foi descrito por Petrov & Petrova (2009) no qual os autores usaram a linhagem *K. pneumoniae* G31. Nesse trabalho uma condição que minimizou a produção de subprodutos foi o cultivo microbiano com pH inicial entre 7-7,4. Com a fermentação realizada sem controle de pH, obteve-se uma proporção de 2,3-butanodiol e 1,3-propanodiol de 5:1, obtendo-se uma produção de $49,2 \text{ g.L}^{-1}$ de 2,3 butanodiol a partir do glicerol. Quando o cultivo microbiano foi realizado com controle do pH em 5 ou em 7 a proporção de 2,3-butanodiol e 1,3-propanodiol foi de 1:2 e 1:25, respectivamente, com produção de 2,3-butanodiol de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,52 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente (PETROV &

PETROVA, 2009). Desta forma, ficou claro não apenas a importância do uso de pH adequado, através dos diferentes resultados obtidos com o uso de diferentes valores de pH, como também a importância da existência ou não controle do mesmo, durante a fermentação, para uma maior produção de um determinado composto.

A importância do pH na fermentação do glicerol ficou ainda mais evidenciado com outro estudo realizado pelos mesmos autores, Petrov & Petrova (2010), no qual, através de variações de pH promovidas com aumento de valor pH em uma unidade a cada 12 h, foram produzidos 70 g.L⁻¹ de 2,3-butanodiol após 150 h de cultivo.

Outros trabalhos relataram mudanças na concentração dos produtos da fermentação do glicerol através de alterações do pH do meio cultivo, reforçando a sua importância para o processo (BIEBL et al., 1998; YEN et al., 2014).

A Tabela 2 apresenta mais trabalhos que descreveram a produção de 2,3-butanodiol, usando o glicerol como substrato.

Tabela 2. Produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicerol por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Concentração de glicerol (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Referência
<i>Raoultella planticola</i> CECT 843	90	0,38	0,30	Ripoll et al. (2016)
<i>Raoultella terrigena</i> CECT 4519	90	0,30	0,38	Ripoll et al. (2016)
<i>Klebsiella oxytoca</i> FMCC-197	40	0,12	-	Metsoviti et al. (2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B10-127	40	0,30	0,37	Yang et al. (2013)
<i>Klebsiella</i> sp.1	75	0,39	0,33	Huang et al. (2013)
<i>Serratia</i> sp.	75	0,40	0,36	Huang et al. (2013)
<i>Klebsiella</i> sp.2	75	0,39	0,34	Huang et al. (2013)
<i>Klebsiella</i> sp. Ana-WS5	70	0,43	0,21	Yen et al. (2014b)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> G31	140	0,24	0,17	Petrov & Petrova (2009)

2.3. Rotas metabólicas para a produção de 2,3-butanodiol

São muitos os monossacarídeos (pentoses e hexoses) que podem ser fermentados usando bactérias para produzir o 2,3-butanodiol. A rota metabólica de diversos microrganismos durante a fermentação dos monossacarídeos e também do glicerol já foram descritas na literatura (MACIS et al., 1998; FU et al., 2014).

Nessas rotas metabólicas foram conhecidas quais são as enzimas envolvidas na diferenciação na produção dos estereoisômeros do 2,3-butanodiol. Algumas das rotas para a produção do 2,3-butanodiol e outros subprodutos, além de seus estereoisômeros originados durante a fermentação da glicose (que também serve como representação também para os demais monossacarídeos) e do glicerol, serão descritas nas próximas seções.

2.3.1. Rota a partir da glicose

A produção do 2,3-butanodiol a partir de glicose passa por um intermediário comum a todas as rotas, tanto a partir de pentoses como a partir de glicerol, que é o piruvato (Figura 2). Este, por sua vez, é produzido através de glicólise, conhecida pela rota de Embden-Meyerhof. A partir do piruvato são produzidos diversos compostos, tais como, acetato, lactato, formiato, succinato, etanol, acetoína e o 2,3-butanodiol (Figura 2) (MAGEE & KOSARIC, 1987; JI et al., 2011).

As principais enzimas envolvidas na produção do 2,3-butanodiol a partir do piruvato são: α -acetolactato sintase (EC 4.1.3.18), α -acetolactato descarboxilase (EC 4.1.1.5) e 2,3-butanodiol desidrogenase (EC 1.1.1.76), também chamada de acetoína redutase (EC 1.1.1.4) (JI et al., 2011). Nessa rota metabólica são produzidos três compostos intermediários, α -acetolactato, diacetil e acetoína (Figura 2) (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Na etapa de produção do intermediário α -acetolactato a enzima envolvida é a α -acetolactato sintase. Na primeira etapa da reação catalisada pela α -acetolactato sintase ocorre a complexação do piruvato com tiamina pirofosfato (TPP) gerando a forma acetil-TPP, sendo que, em seguida, o acetil-TPP é condensado com uma segunda molécula de piruvato produzindo o α -acetolactato (JI et al., 2011). Esse processo ocorre com baixa disponibilidade de NADH (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

A enzima α -acetolactato descarboxilase realiza a produção de acetoína a partir do α -acetolactato, mas apenas em condições anaeróbicas. Se houver presença de oxigênio, o α -acetolactato sofre descarboxilação espontânea gerando o diacetil. Quando isso ocorre, uma outra enzima entra em ação para produzir a acetoína, a diacetil redutase (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Na última etapa de formação do 2,3-butanodiol quem catalisa a reação é a enzima 2,3-butanodiol desidrogenase ou acetoína redutase. Há relatos de que esta última enzima, no metabolismo de alguns microrganismos, pode estar envolvida em duas etapas, tanto na produção do 2,3-butanodiol a partir da acetoína quanto na produção da acetoína a partir do diacetil (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Figura 2. Metabolismo do piruvato da bactéria *Lactococcus lactis* contendo as rotas metabólicas para a produção de etanol, acetato, formiato, lactato e 2,3-butanodiol (CELINSKA & GRAJEK, 2009).

Em destaque (vermelho) a rota metabólica da produção do 2,3-butanodiol.

2.3.2. Rota a partir do glicerol

A produção do 2,3-butanodiol tendo como substrato o glicerol, como já mencionado anteriormente, também passa pelo intermediário piruvato (Figura 3). Desta forma, nesta seção foi descrito apenas a parte da rota metabólica que se inicia no glicerol até a formação do piruvato, destacando que a rota de produção do 2,3-butanodiol a partir da glicose não necessita de um grande controle das condições da fermentação para evitar a formação de subprodutos.

A fermentação do glicerol, no entanto, possui duas rotas distintas: uma delas é oxidativa e a outra redutora. A rota redutora tem como produto final o 1,3-propanodiol, que é o principal produto obtido durante a fermentação do glicerol pela maioria dos microrganismos (ZHU et al., 2002). Na primeira etapa de formação do 1,3-propanodiol a coenzima B₁₂-dependente glicerol desidratase (EC 4.2.1.30) converte glicerol em 3-hidroxi propionaldeído e a enzima NADH-H⁺-dependente 1,3-propanodiol oxidorredutase (EC 1.1.1.202) reduz o 3-hidroxi propionaldeído a 1,3-propanodiol, regenerando o NAD⁺, que participa na etapa oxidativa (ZHU et al., 2002; DA SILVA et al., 2009).

A produção do 2,3-butanodiol ocorre na rota oxidativa, sendo produzidos também outros compostos, tais como lactato, acetato, butirato, butanol, etanol e propionato (Figura 3).

Considerando apenas a rota até a formação do piruvato, a primeira etapa é a produção da diidroxiacetona, catalisada pela enzima NAD⁺-dependente glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.6). A etapa seguinte é catalisada pela enzima diidroxiacetona quinase (EC 2.7.1.29) que realiza a fosforilação da diidroxiacetona. A última etapa é a glicólise, que passa pelo intermediário fosfoenolpiruvato que em seguida origina o piruvato (MACIS et al., 1998; DA SILVA et al., 2009).

Figura 3. Representação geral da rota metabólica de possíveis produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos (DA SILVA et al., 2009).

Em destaque as rotas metabólicas de produção do 2,3-butanodiol (vermelho) e 1,3-propanodiol (azul).

2.3.3. Rotas de produção dos estereoisômeros

Uma vez compreendida de forma geral a rota metabólica de produção do 2,3-butanodiol através da fermentação da glicose e do glicerol por bactérias, a grande questão passa por diferenciar as rotas de formação dos três estereoisômeros possíveis que podem ser formados.

De acordo com Ui et al. (1984, 1986) as principais enzimas envolvidas na produção dos isômeros são *meso*-2,3-butanodiol desidrogenase, L-(+)-2,3-butanodiol desidrogenase, D-(-)-2,3-butanodiol desidrogenase e diacetil redutase (Figura 4).

As rotas de formação dos estereoisômeros foram determinadas a partir de duas espécies de bactérias, *K. pneumoniae* e *P. polymyxa*, sendo que a primeira produziu *meso*-2,3-butanodiol e L-(+)-2,3-butanodiol e a segunda produziu D-(-)-2,3-butanodiol como produto principal e também produziu o *meso*-2,3-butanodiol.

Nessa rota descrita por Ui et al. (1984, 1986) a formação do intermediário diacetil possui duas formas de ser produzido pelo metabolismo microbiano. A primeira delas é via decomposição espontânea do α -acetolactato, já descrita na rota metabólica de produção do 2,3-butanodiol na Figura 2, e a outra envolve a condensação de acetaldeído com acetil-CoA.

Figura 4. Proposta de rotas metabólicas para a formação dos estereoisômeros do 2,3-butanodiol em *K. pneumoniae* e *P. polymyxa* (UI et al., 1984 e 1986; JI et al., 2011).

Linhas tracejadas são apenas para *P. polymyxa*. E1, E2, E3, e E4 são NADH-dependentes e E5 é NADPH-dependente.

Apesar do grande número de trabalhos na literatura que reportaram a produção de 2,3-butanodiol além do estudo das rotas metabólicas envolvidas, faz-se necessário o desenvolvimento dos processos de produção microbiana de 2,3-butanodiol, através do estudo de novos microrganismos capazes de metabolizar os diferentes substratos, a fim de que a produção microbiana deste produto seja economicamente viável.

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Produzir 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol e da D-(+)-glicose por bactérias isoladas de turfeira visando o reaproveitamento de resíduos gerados na indústria de biodiesel e bioetanol, respectivamente.

3.2. Metas

- Realizar uma triagem com bactérias isoladas da turfeira capazes de produzir os estereoisômeros do 2,3-butanodiol a partir de glicerol;
- Melhorar as condições de fermentação microbiana para a obtenção de uma maior produção de 2,3-butanodiol a partir do glicerol;
- Melhorar as condições de fermentação microbiana para a obtenção de uma maior produção de 2,3-butanodiol a partir da D-(+)-glicose;
- Produzir de 2,3-butanodiol a partir dos açúcares liberados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por celulasas do fungo de ambiente marinho *Aspergillus sydowii* CBMAI 934;
- Identificação por CG/DIC com coluna quiral os estereoisômeros do 2,3-butanodiol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e solventes

O glicerol (99,5%) e os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil). A D-(+)-glicose (99,5%) e os padrões *meso*-2,3-butanodiol e (2*R*,3*R*)-butanodiol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os substratos de para o meio de cultura, Agar e *Caldo nutriente* foram comprados da Himedia (Paraná, Brasil).

4.2. Linhagens de bactérias usadas nas fermentações

As linhagens avaliadas no *screening* foram *Bacillus subtilis* LQOB-SE1, *Bacillus coagulans* LQOB-SE2, *Bacillus pumilus* LQOB-SE3, *Brevibacillus brevis* LQOB-SE4, *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5 e *Serratia marcescens* LQOB-SE6. As bactérias foram isoladas e purificadas a partir de um solo de turfeira tropical coletado em Santo Amaro das Brotas, SE, Brasil. As bactérias foram isoladas e purificadas por Simone C. O. Lucas no Laboratório de Química Analítica Ambiental com a supervisão da Prof^a Dra. Luciane P. C. Romão (LUCAS, 2014).

4.3. Meio de cultura

As linhagens dos microrganismos usados neste trabalho foram cultivadas inicialmente em um meio de cultura comercial composto por *Caldo nutriente* (8 g.L⁻¹) e Agar (20 g.L⁻¹) em água destilada. Durante a preparação do meio de cultura o pH foi ajustado para 7 usando uma solução de 0,7 M de NaOH. Em seguida o meio de cultura foi esterilizado em autoclave (AV-50, Phoenix, Brazil) à temperatura de 121 °C por 20 min. O inóculo dos microrganismos foi realizado em câmara de fluxo laminar (Veco) em condições estéreis (luz UV, álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio 0,2%)

4.4. Fermentação em meio líquido

O meio de cultura foi preparado usando *Caldo nutriente* (8 g.L⁻¹) dissolvido em água destilada e o pH inicial foi ajustado para 7. Em seguida os substratos avaliados no trabalho (glicerol e glicose) foram adicionados na concentração inicial de 50 g.L⁻¹.

Na fermentação do glicerol, o mesmo foi adicionado antes do processo de esterilização do meio em autoclave (121 °C, 20 min), enquanto que na fermentação da glicose a adição foi feita após a esterilização em autoclave para evitar a degradação da glicose em outros compostos devido a alta temperatura (WOO et al., 2015).

O inóculo foi realizado através da diluição bacteriana em solução salina (NaCl 0,86%) de células de cada microrganismo cultivadas previamente por 24 h a 32 °C. A diluição foi feita até atingir uma densidade óptica de 0,1 OD na escala McFarland. Dessa suspensão celular retirou-se 1 mL o qual foi adicionado em 100 mL do meio de cultura líquido em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. As culturas bacterianas foram mantidas em agitador tipo shaker por 130 rpm, 32 °C durante 5 dias.

Em todos os experimentos realizados foi cultivada uma cultura controle sem a presença dos substratos (glicerol e glicose). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5. Variação das condições de cultivo durante o processo de fermentação com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

4.5.1. Composição do meio de cultura

Ao meio de cultura líquido (*Caldo nutriente*, 8 g.L⁻¹) foram adicionados os sais (NH₄)₂SO₄ (4 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0.52 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.25 g.L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0.20 g.L⁻¹) a fim de se verificar a influência dos mesmos na produção de 2,3-butanodiol.

A influência no decréscimo da concentração do meio de cultura *Caldo nutriente* também foi avaliada. As concentrações usadas foram 8, 4, 2 e 0 g.L⁻¹. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2. pH de cultivo

O pH do meio de cultura durante o processo de fermentação tanto do glicerol como da glicose foi variado a fim obter-se o melhor valor de pH inicial para uma maior produção de 2,3-butanodiol. Os valores de pH inicial testados foram de 5, 6, 7, 8 e 9. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.3. Concentração dos substratos e o tempo de cultivo bacteriano

Diferentes concentrações dos substratos (glicerol e glicose) foram avaliadas a fim de obter-se uma maior produtividade de 2,3-butanodiol, bem como, determinar qual a concentração de substrato que poderia promover a inibição enzimática ou celular.

As concentrações de glicerol e glicose testadas foram de 75, 50, 25 e 10 g.L⁻¹. Esses experimentos foram realizados em triplicata.

O tempo de cultivo também foi avaliado a fim de obter-se o melhor tempo para a produção de 2,3-butanodiol com bons rendimentos e produtividade. O período máximo de cultivo avaliado foi de 8 dias.

O controle do melhor tempo de cultivo foi realizado interrompendo-se uma reação a cada dia, ou seja, foram realizadas reações em diferentes frascos Erlenmeyer com as mesmas condições para cada um dos dias que foram avaliados. Esses experimentos foram realizados em duplicata.

4.6. Produção do 2,3-butanodiol a partir de açúcares liberados via hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Os açúcares liberados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (Seção 5.6 do Capítulo 1) foram submetidos à fermentação com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 a fim de produzir o 2,3-butanodiol. Foram usados os açúcares produzidos pelas celulasas do fungo *A. sydowii* CBMAI 934, pois foi a linhagem de origem marinha que produziu maior sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

O sobrenadante com os açúcares foi suplementado com *Caldo nutriente* (8 g.L⁻¹) (NH₄)₂SO₄ (4 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0.52 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.25 g.L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0.20 g.L⁻¹) e o pH do meio de cultura foi ajustado para 7. Foi então realizado o inóculo da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 que foi cultivada por 5 dias em agitador tipo shaker (32 °C, 130 rpm).

4.7. Análises da produção de 2,3-butanodiol

Para analisar e quantificar a produção do 2,3-butanodiol a partir dos substratos glicerol e glicose foram usados processos de separação das células, pois o composto que foi produzido pela célula foi excretado para o meio líquido, sendo realizada em seguida a análise da composição do sobrenadante por cromatografia gasosa.

4.7.1. Centrifugação

As células das bactérias foram removidas do meio de cultura ao fim de cada fermentação por centrifugação (Centrífuga Hitachi CR22GIII) a 10000 rpm, 4 °C, por 15 minutos. A partir do sobrenadante foram retiradas as amostras para as análises da concentração do 2,3-butanodiol produzido. As amostras foram filtradas em filtros com membrana de celulose 0,45 µm (Minsart®, Sartorius Stedium Biotech) antes de serem analisadas.

4.7.2. Análise da concentração de 2,3-butanodiol por cromatografia gasosa (CG/DIC)

A análise quantitativa do 2,3-butanodiol foi realizada usando cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização em chama (CG/DIC), auto-injetor AOC 20i+s e coluna capilar de sílica fundida (Restek, Stabilwax-DA; 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura de filme).

O programa de temperatura do forno foi: temperatura inicial de 40 °C por 2 min, taxa de aumento de aquecimento de 10 °C/min até atingir a temperatura final de 220 °C seguido por uma isoterma nessa temperatura por 7,5 min. O H₂ foi usado como gás carreador com fluxo de 1,05 mL/min. A temperatura do injetor e do detector foram ambas de 250 °C. O volume de injeção foi 1,0 µL com razão *split* de 1:10.

A concentração do *meso*-2,3-butanodiol e do *quiral*-butanodiol foi determinada pela construção de uma curva de analítica com os padrões adquiridos junto a Sigma-Aldrich e analisado por CG/DIC equipado com a coluna quiral CP-Cyclodextrin-β-2,3,6-M-19 (25 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura de filme).

4.7.3. Quantificação de 2,3-butanodiol por CG/DIC

A quantificação do 2,3-butanodiol foi realizada através da construção da curva analítica usando padrões comerciais do *meso*-2,3-butanodiol e do (2*R*,3*R*)-butanodiol, variando-se a concentração dos mesmos frente a área obtida na análise cromatográfica por CG/DIC (auto-injetor AOC 20i+s e coluna capilar de sílica fundida (Restek, Stabilwax-DA; 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura de filme). As concentrações de *meso*-2,3-butanodiol foram 500, 1000, 1500 e 2000 ppm (Figura 5), enquanto que as concentrações de (2*R*,3*R*)-butanodiol foram 250, 500, 750 e 1000 ppm (Figura 6).

As amostras oriundas das fermentações com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 foram diluídas em 10 vezes antes de serem analisadas por CG/DIC para quantificação.

Figura 5. Curva analítica usada na quantificação do composto *meso*-2,3-butanodiol.

Figura 6. Curva analítica usada na quantificação do composto *quiral*-2,3-butanodiol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Screening* das bactérias isoladas de turfeira capazes de produzir 2,3-butanodiol

O *screening* inicial foi realizado com 6 linhagens de bactérias isoladas de turfeira em Sergipe-Brasil (*B. subtilis* LQOB-SE1, *B. coagulans* LQOB-SE2, *B. pumilus* LQOB-SE3, *B. brevis* LQOB-SE4, *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5 e *S. marcescens* LQOB-SE6) em Sergipe-Brasil usando como substrato o glicerol.

Esse trabalho teve como objetivo estudar os parâmetros envolvidos no favorecimento da produção do 2,3-butanodiol pelas bactérias da turfeira. Foi escolhido o glicerol como substrato para o *screening* devido ao fato de que a maioria das linhagens descritas na literatura como produtoras de 2,3-butanodiol são relatadas também como produtoras de 1,3-propanodiol.

Dentre todas as linhagens estudadas, apenas a *S. marcescens* LQOB-SE6 se mostrou capaz de produzir 2,3-butanodiol a partir do glicerol. As demais linhagens não metabolizaram o glicerol para produzir quaisquer outros compostos que não seja o 2,3-butanodiol.

Notou-se também que houve a produção de pelo dois estereoisômeros do 2,3-butanodiol (Figura 7). Ainda o composto produzido em maior quantidade foi confirmado e quantificado por uso de padrões adquiridos da Sigma-Aldrich, como sendo o *meso*-2,3-butanodiol. Enquanto que não foi possível identificar o outro estereoisômero produzido em menor escala, o qual a partir deste momento foi nomeado de *quiral*-2,3-butanodiol, confirmado por cromatografia gasosa usando coluna quiral (CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M-19, 25 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de espessura de filme), porém não foi possível assegurar se foi o (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol ou o (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol.

Portanto, neste trabalho a concentração de 2,3-butanodiol produzida será sempre relatada como o somatório da concentração dos dois estereoisômeros produzidos (*meso*-2,3-butanodiol + *quiral*-2,3-butanodiol). O *quiral*-2,3-butanodiol foi quantificado por CG/DIC equipado com coluna quiral e usando o (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol.

A Figura 7 apresenta o cromatograma obtido da análise da fermentação do glicerol por *S. marcescens* LQOB-SE6 por CG/DIC.

Figura 7. Cromatograma obtido por CG/DIC a partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 após 5 dias de cultivo.

A produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 não foi reportada anteriormente na literatura, sendo este o primeiro relato, obtendo-se uma concentração de $14,7 \text{ g.L}^{-1}$, quando da realização do *screening*.

No trabalho publicado por Zhang et al. (2014a) foi realizada a clonagem, expressão e caracterização de uma enzima glicerol desidrogenase envolvida na produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* H30. Neste trabalho foi observado que essa enzima poderia estar envolvida na interconversão da (3*S*)-acetoína em *meso*-2,3-butanodiol e da (3*R*)-acetoína em (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. Esse resultado já indicava a capacidade dessa espécie bacteriana em produzir 2,3-butanodiol a partir do glicerol, uma vez que a enzima glicerol desidrogenase é a enzima responsável pela conversão do glicerol em diidroxiacetona na rota metabólica de produção do 2,3-butanodiol a partir do glicerol (Figura 3).

Observou-se que a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 produziu o 2,3-butanodiol sem que ocorresse também a produção de 1,3-propanodiol ou outro subproduto em menor quantidade. Há apenas um relato na literatura em que foi realizada a produção de 2,3-butanodiol usando glicerol como substrato sem que houvesse a formação de 1,3-propanodiol (HUANG et al., 2013). Desta forma, ficou evidente o potencial dessa linhagem para aplicação em larga escala na conversão do glicerol em 2,3-butanodiol.

5.2. Melhoramento da produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol pela variação das condições de cultivo da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

Uma vez determinada que a linhagem *S. marcescens* LQOB-SE6 foi boa produtora de 2,3-butanodiol a partir de glicerol, as condições de cultivo durante o processo de fermentação foram variadas para obter-se um melhoramento no processo de

produção do composto de interesse. Foram então avaliadas a composição do meio de cultura, o pH inicial do cultivo, a concentração de glicerol e o tempo de fermentação.

5.2.1. Influência da composição do meio de cultura na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

A concentração de *Caldo nutriente* foi reduzida a fim de reduzir os gastos durante o processo de fermentação e principalmente para promover a indução de um maior consumo de glicerol pelo microrganismo como fonte de carbono, acelerando o processo de transformação do glicerol em 2,3-butanodiol. As concentrações de *Caldo nutriente* usadas foram de 0, 2, 4 e 8 g.L⁻¹.

Observou-se que na ausência de *Caldo nutriente* não houve crescimento celular, mostrando que foi necessária a presença de uma fonte de nitrogênio. A necessidade de uma fonte de nitrogênio para que o microrganismo pudesse metabolizar o glicerol ficou ainda mais evidente quando se usou uma concentração de 2 g.L⁻¹ de *Caldo nutriente*, onde foi observado o crescimento celular, mas não houve produção de 2,3-butanodiol.

As concentrações de 4 e 8 g.L⁻¹ favoreceram o crescimento da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 e a produção de 2,3-butanodiol foi confirmada nas análises por CG/DIC. No entanto, a concentração de 2,3-butanodiol obtida para a concentração de 4 g.L⁻¹ foi de apenas 5,7 g.L⁻¹. A produção de 2,3-butanodiol usando 8 g.L⁻¹ de *Caldo nutriente* foi de 14,5 g.L⁻¹. Observou-se que houve um aumento de 2,5 vezes quando se aumentou a concentração de *Caldo nutriente* de 4 para 8 g.L⁻¹. Ficou constatado através desses estudos a importância da presença de uma fonte secundária de carbono, em concentrações normalmente usadas no cultivo de bactérias, para que sejam produzidas pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 as enzimas necessárias na rota metabólica de produção do 2,3-butanodiol a partir de glicerol (Figura 8).

Pequenas concentrações de dois subprodutos observados no cromatograma nos tempos de retenção 6,83 e 13,5 min (concentração relativa de aproximadamente 8% e 1% respectivamente), os quais não foram possíveis de serem identificados (Figura 8).

A Figura 8 apresenta os cromatogramas do controle e das fermentações que apresentaram produção de 2,3-butanodiol, com as devidas identificações dos picos correspondentes aos compostos *meso*-2,3-butanodiol, *quiral*-2,3-butanodiol e glicerol.

Figura 8. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação de glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 usando a concentração de *Caldo nutriente* de 4 g.L⁻¹ (vermelho) e 8 g.L⁻¹ (azul).

NI: Não identificado.

De acordo com Casey et al. (2013) a presença de sais em baixa concentração promove um pequeno aumento do consumo da glicose do meio de fermentação (CASEY et al., 2013). Desta forma, uma vez determinada que a concentração de 8 g.L⁻¹ de *Caldo nutriente* como sendo a melhor para a produção de 2,3-butanodiol foi realizado um estudo para a avaliação da influência da presença de alguns sais no meio de cultura na produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicerol. Os sais usados foram (NH₄)₂SO₄ (4 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0.52 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.25 g.L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0.20 g.L⁻¹).

Através destes estudos foi observado um aumento de 6% na concentração total do 2,3-butanodiol, ao fim de 5 dias de reação, após a adição dos sais inorgânicos ao meio de cultura. Contudo, essa não foi a principal mudança observada. Nos experimentos realizados na ausência dos sais quase todo o glicerol foi consumido em 5 dias de fermentação, enquanto que na presença dos sais uma quantidade considerável de

glicerol ainda estava presente no meio de cultura, como pode ser verificado no cromatograma da Figura 9. Desta forma, além de produzir maior concentração de 2,3-butanodiol, os experimentos com adição dos sais consumiram menos glicerol, o que significa a obtenção de um maior rendimento. A presença de sais provavelmente interferiu na rota metabólica da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6.

Figura 9. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 na presença (vermelho) ou ausência (azul) de sais no meio de cultura.

Desta forma ficou definido que para os experimentos posteriores a composição do meio de cultura durante a fermentação do glicerol foi constituída de *Caldo nutriente* (8 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (4 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0.52 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.25 g.L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0.20 g.L⁻¹).

5.2.2. Influência da concentração inicial de glicerol na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

A concentração inicial de glicerol no meio de cultura foi avaliada a fim de obter-se melhores rendimentos e produtividades do 2,3-butanodiol; bem como avaliar se em alguma concentração de glicerol a atividade enzimática seria inibida pela presença do glicerol. As concentrações avaliadas de glicerol foram 10, 25, 50 e 75 g.L⁻¹. Na concentração de 10 g.L⁻¹ de glicerol não foi observada a produção de 2,3-butanodiol.

A maior concentração de 2,3-butanodiol (15,6 g.L⁻¹) foi obtida quando foram usados 50 g.L⁻¹ de glicerol, que foi a concentração utilizada desde os primeiros

experimentos. Quando foram usados 25 g.L⁻¹ de glicerol obteve-se 6,2 g.L⁻¹ de 2,3-butanodiol, enquanto que a partir de 75 g.L⁻¹ de glicerol produziu-se apenas 4,0 g.L⁻¹ de 2,3-butanodiol (Figura 10).

A concentração do *meso*-2,3-butanodiol foi semelhante em ambas as concentrações (25 g.L⁻¹ e 75 g.L⁻¹), mas o *quiral*-2,3-butanodiol foi produzido em maior quantidade quando a concentração de glicerol foi 25 g.L⁻¹. Outra diferença entre os dois experimentos foi que o glicerol foi completamente consumido quando foi usado 25 g.L⁻¹ do reagente de partida (Figura 11). Contudo, concentrações maiores de glicerol foram observadas no meio de cultura em que inicialmente foram adicionados 75 g.L⁻¹ deste reagente.

Figura 10. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 frente a variação da concentração inicial de glicerol

Figura 11. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 usando-se as concentrações iniciais de glicerol de 25 g.L⁻¹ (vermelho) e 75 g.L⁻¹ (azul).

Pelos resultados obtidos a partir da variação da concentração de glicerol observou-se que ocorreu inibição no metabolismo da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 quando a concentração usada de glicerol foi de 75 g.L⁻¹. Uma possível solução seria a utilização do processo de fermentação alimentada, ou seja, adição inicial de 25 g.L⁻¹ de glicerol e quando observada a diminuição da concentração de glicerol no meio de cultura realizar uma nova adição de glicerol ao meio e assim sucessivamente.

Estudos na literatura com outras espécies de microrganismos não relataram a inibição realizada pelo glicerol, em altas concentrações, durante a produção de 2,3-butanodiol, embora haja relatos de que a capacidade máxima de produção deste composto pelos microrganismos tenha sido alcançada. Por exemplo, o estudo realizado por Metsoviti et al. (2012) mostrou que a variação da concentração inicial de glicerol (40, 60 e 80 g.L⁻¹) não alterou a concentração do 2,3-butanodiol produzido (4,8 g.L⁻¹) pela bactéria *Klebsiella oxytoca* FMCC-197. No entanto, ocorreu variação da concentração do 1,3-propanodiol de 7,5 a 10,1 g.L⁻¹ (METSOVITI et al., 2012).

Outro trabalho que investigou o efeito da concentração de glicerol foi realizado por Ripoll et al. (2016), no qual os autores obtiveram uma melhora no rendimento quando a concentração de glicerol aumentou de 30 para 60 g.L⁻¹ bem como de 60 para 90 g.L⁻¹, alcançando rendimentos máximos de 0,38 g.g⁻¹ e 0,32 g.g⁻¹ na produção do 2,3-butanodiol a partir de glicerol usando os microrganismos *Raoultella planticola* e *Raoultella terrigena*, respectivamente (RIPOLL et al., 2016). No entanto, foi

determinada qual a concentração máxima de glicerol que poderia ser metabolizada por tais microrganismos nem qual a concentração de glicerol que promovesse a inibição enzimática na produção de 2,3-butanodiol, contrariamente ao efetuado no presente estudo.

Desta forma, fica constatado que a concentração de glicerol pode afetar diretamente a produção de 2,3-butanodiol e que alguns microrganismos possuem um limite máximo de produção.

5.2.3. Influência do pH inicial do meio de cultura durante a produção de 2,3-butanodiol a partir do glicerol na presença da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

Sabe-se que a fermentação do glicerol em pH controlado interfere na rota metabólica de produção tanto do 2,3-butanodiol quanto do 1,3-propanodiol e, consequentemente, no rendimento de ambos os produtos (YEN et al., 2014a). Também foi descrito na literatura que o valor do pH inicial do meio de fermentação é um dos fatores mais importantes na seleção de qual produto será formado majoritariamente, ou seja, se o 2,3-butanodiol ou o 1,3-propanodiol (PETROV & PETROVA, 2009).

Embora a linhagem de trabalho (*S. marcescens* LQOB-SE6) não produziu o 1,3-propanodiol, avaliou-se a influência do pH inicial do meio de fermentação do glicerol a fim de encontrar a melhor condição para a obtenção de maiores concentrações de 2,3-butanodiol. Os valores de pH testados nestes ensaios foram 5, 6, 7, 8 e 9.

Não houve uma variação significativa na produção do 2,3-butanodiol obtido a partir da fermentação do glicerol ao longo da faixa de pH estudada, como pode ser observado na Figura 12 e nos perfis cromatográficos da Figura 13. A maior concentração obtida foi para os valores de pH 7 e 8 ($16,2 \text{ g.L}^{-1}$) e a menor concentração obtida foi para o pH 9 ($15,0 \text{ g.L}^{-1}$), correspondendo a uma diminuição de 8% da produção quando variou o pH inicial de 8 para 9. Para os valores de pH inicial de 5 e 6 a diminuição da produção do 2,3-butanodiol foi de 6% e 5%, respectivamente.

Ficou então definido que os valores de pH inicial que favoreceram uma maior produção de 2,3-butanodiol foram pH 7 e 8, sendo que o primeiro foi usado também nos primeiros ensaios relatados neste trabalho.

Figura 12. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 frente a variação do pH inicial do meio de fermentação

Figura 13. Cromatogramas obtidos por CG/DIC partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* usando diferentes valores de pH inicial.

NI: Não identificado.

5.2.4. Influência do tempo de fermentação do glicerol na produção de 2,3-butanodiol na presença da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

Após estabelecidos o valor de pH inicial ótimo, a melhor concentração inicial de glicerol e a composição do meio de cultura que favoreceram uma maior produção de 2,3-butanodiol, todos esses parâmetros foram usados no estudo do melhor tempo de fermentação para a obtenção de melhores rendimento e produtividade do composto de

interesse. Todos os experimentos descritos anteriormente foram realizados no período de 5 dias.

Os diferentes tempos de fermentação avaliados foram de 1-8 dias, sendo realizada um cultivo diferente para cada um dos tempos avaliados. Nestes experimentos foram obtidas as maiores concentrações de 2,3-butanodiol, o que é explicado pelo fato de que as condições de fermentação já estavam otimizadas, exceto o parâmetro em estudo.

A interpretação dos resultados que estão expressos na Tabela 3 pode ser feita por dois pontos de vista diferentes. O primeiro deles é observando o rendimento (massa/massa) obtido e o segundo é considerando a produtividade (massa obtida/litro.hora) de 2,3-butanodiol.

O melhor rendimento obtido foi 0,30 g.g⁻¹ após 7 dias de fermentação e a melhor produtividade obtida foi de 0,15 g.L⁻¹.h⁻¹ após 4 dias para o 2,3-butanodiol. A produtividade após 7 dias de fermentação foi de 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹, enquanto que o rendimento após 4 dias foi de 0,19 g.g⁻¹ para o 2,3-butanodiol (Tabela 3). Desta forma, pode-se concluir que o ganho de rendimento superou em muito a perda de produtividade quando aumentou-se o tempo de fermentação durante a produção do 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6.

Tabela 3. Rendimento e produtividade obtidos de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 ao longo do tempo de cultivo.

Tempo (d)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	-	-
2	0,08	0,09
3	0,12	0,13
4	0,19	0,15
5	0,21	0,14
6	0,27	0,14
7	0,30	0,13
8	0,28	0,11

A máxima concentração de 2,3-butanodiol produzida a partir da fermentação do glicerol (50 g.L⁻¹) pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 foi de 22,4 g.L⁻¹.

Foram reportados na literatura estudos realizados por Yen et al. (2014) usando a bactéria *Klebsiella* sp. Ana-WS5. Nesse estudo, a concentração máxima de 2,3-butanodiol ($30,3 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtido após 8 dias de cultivo da bactéria *Klebsiella* sp. Ana-WS5, sem controle do pH do meio de fermentação, com rendimento e produtividade de $0,43 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (YEN et al., 2014).

Yang et al. (2013) obtiveram a produção de $11,9 \text{ g.L}^{-1}$ a partir da fermentação do glicerol (40 g.L^{-1}) pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* durante 4 dias, com rendimento e produtividade de $0,30 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,37 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Desta forma, nota-se que os valores de rendimento e produtividade obtidos neste trabalho são comparáveis com estudos publicados na literatura.

Outros valores de rendimento e produtividade obtidos na produção de 2,3-butanodiol a partir do glicerol usando diferentes microrganismos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre os valores de rendimentos e produtividades obtidos na produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol com os resultados descritos na literatura para diferentes microrganismos.

Microrganismo	Rendimento (g.g^{-1})	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i> G31	0,42	-	Petrov & Petrova (2009)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,30	0,37	Yang et al. (2013)
<i>Klebsiella</i> sp. Ana-WS5	0,43	0,13	Yen et al. (2014)
<i>Serratia</i> sp.	0,40	0,36	Huang et al. (2013)
<i>Raoultella planticola</i>	0,38	0,30	Ripoll et al. (2016)
<i>Raoultella terrigena</i>	0,30	0,38	Ripoll et al. (2016)
<i>Serratia marcescens</i> LQOB-SE6 ^a	0,30	0,13	Santos (2017)
<i>Serratia marcescens</i> LQOB-SE6 ^b	0,19	0,15	Santos (2017)

^a7 dias de cultivo; ^b4 dias de cultivo

A comparação entre os resultados descritos na literatura com aqueles obtidos no presente estudo, mostram que a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 é também uma linhagem promissora para aplicação na produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol, principalmente pelo fato de que não há produção significativa de subprodutos da reação, tais como 1,3-propanodiol.

5.3. Melhoramento da produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose pela variação das condições de cultivo da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

O estudo da produção do 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose foi realizado partindo-se do pressuposto de que a linhagem da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 também era capaz de metabolizar a glicose, visto que existem estudos na literatura em que linhagens microbianas dessa mesma espécie já foram usadas em estudos de produção do 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicose (ZHANG et al., 2010; RAO et al., 2012; BAI et al., 2015).

A fim de confirmar se a linhagem *S. marcescens* LQOB-SE6 é de fato capaz de produzir 2,3-butanodiol foi realizado o cultivo da mesma a 32 °C em meio de fermentação contendo glicose (50 g.L⁻¹), *Caldo nutritivo* (8 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (4 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0.52 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0.25 g.L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0.20 g.L⁻¹), com pH inicial 7,0.

Observou-se que nas condições estabelecidas ocorreu a produção do 2,3-butanodiol (10 g.L⁻¹). Contudo, apenas o estereoisômero *meso*-2,3-butanodiol foi produzido (Figura 14) enquanto que, durante a biotransformação do glicerol, obteve-se a formação de ambos os estereoisômeros, embora o composto produzido majoritariamente tenha sido o *meso*-2,3-butanodiol.

Figura 14. Cromatograma obtido por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 após 5 dias de cultivo (pH 7, 130 rpm, 32 °C).

NI: Não identificado.

Sendo assim, após confirmada a capacidade da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 em produzir o 2,3-butanodiol a partir de glicose, foi realizada a otimização dos parâmetros do processo de fermentação, variando-se os mesmos parâmetros da fermentação do glicerol.

5.3.1. Influência da concentração inicial de glicose na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6

A concentração inicial de glicose no meio de cultura foi avaliada a fim de obter-se melhores rendimento e produtividade de 2,3-butanodiol, bem como também avaliar uma possível inibição na produção do produto de interesse na presença de altas concentrações de glicose. Assim, como foi realizado para o glicerol, as concentrações avaliadas de glicose foram de 10, 25, 50 e 75 g.L⁻¹.

Na concentração de 10 g.L⁻¹ de glicose não foi observada a produção de 2,3-butanodiol e na concentração de 25 g.L⁻¹ de glicose a concentração de 2,3-butanodiol produzida foi não-quantificável nas condições estabelecidas pelo método cromatográfico utilizado (Figura 15).

A maior concentração de 2,3-butanodiol (22,2 g.L⁻¹) foi produzida quando a concentração inicial de glicose foi de 75 g.L⁻¹, enquanto que, quando a concentração de glicose foi de 50 g.L⁻¹ a concentração de 2,3-butanodiol obtida foi de 7,7 g.L⁻¹ (Figuras 15 e 16). De acordo com estes resultados os próximos experimentos foram realizados usando 75 g.L⁻¹ de glicose.

Figura 15. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 frente a variação da concentração inicial de glicose.

Figura 16. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 usando-se as concentrações iniciais de glicose de 50 g.L⁻¹ (preto) e 75 g.L⁻¹ (vermelho).

Nestes estudos não se observou uma concentração de glicose que promovesse a inibição da produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 nas condições realizadas. No entanto, Li et al. (2013) observaram que entre as concentrações de 64 g.L⁻¹ e 125 g.L⁻¹ de glicose não houve diferença na produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *Bacillus licheniformis*10-1-A e em concentrações maiores que 125 g.L⁻¹ ocorreu inibição, ou seja, uma diminuição no rendimento do processo de fermentação.

Jurchescu et al. (2013) também verificaram em seus estudos que a concentração máxima de glicose foi de 180 g.L⁻¹ em que houve boa produção de 2,3-butanodiol (72,6 g.L⁻¹) pela bactéria *B. licheniformis* DSM 8785, o que corresponde ao rendimento de 0,42 g.g⁻¹. Valores superiores a 180 g.L⁻¹ de glicose causaram inibição da produção de 2,3-butanodiol.

5.3.2. Influência da composição do meio de cultura na produção de 2,3-butanodiol com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 na presença de glicose

Para o estudo da influência da composição do meio de cultura considerou-se os resultados obtidos para a fermentação do glicerol quando do estudo da utilização de sais no meio de cultura. Portanto, foi avaliada apenas a influência da concentração do meio de cultura *Caldo nutriente*.

A diminuição da concentração de *Caldo nutriente* na fermentação da glicose foi realizada visando uma redução nos gastos durante o processo de fermentação e

promover a indução de um maior consumo de glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 frente à produção do 2,3-butanodiol. As concentrações de *Caldo nutriente* usadas foram 0, 2, 4 e 8 g.L⁻¹.

Na ausência de *Caldo nutriente* não houve crescimento celular. Na fermentação com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6, na concentração de 2 g.L⁻¹ de *Caldo nutriente*, obteve-se uma produção de 2,3-butanodiol de 5,4 g.L⁻¹, cujo resultado foi diferente quando comparado frente à fermentação na presença de glicerol, que não levou a produção de 2,3-butanodiol (Figuras 17 e 18).

A maior concentração de 2,3-butanodiol obtida foi de 26,4 g.L⁻¹ com meio de cultura contendo 8 g.L⁻¹ de *Caldo nutriente*. Enquanto que a concentração foi reduzida a menos da metade desse valor (12,2 g.L⁻¹) quando se usou 4 g.L⁻¹ de *Caldo nutriente*. Portanto, este estudo mostrou a importância da presença de uma fonte primária de carbono e nitrogênio no processo de produção do 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6.

A Figura 17 apresenta os cromatogramas das fermentações realizadas com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 com produção do 2,3-butanodiol.

Foram observados os mesmos compostos não-identificados na fermentação do glicerol, os quais estão presentes nos cromatogramas com os tempos de retenção de 6,83 e 13,5 minutos (Figura 17), os quais não estavam presentes na reação controle.

A influência de uma fonte de nitrogênio para a produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicose foi também descrita por Häßler et al. (2012), cujos resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, visto que a produção de 2,3-butanodiol aumentou com o aumento da concentração do extrato de levedura adicionado no meio de cultura.

Zhang et al (2010) através de análises estatísticas também evidenciaram que a concentração do extrato de levedura foi a variável mais significativa no processo de produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação de glicose.

Figura 17. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 variando-se as concentrações iniciais de *Caldo nutriente* de 2 g.L⁻¹ (preto), 4 g.L⁻¹ (azul) e 8 g.L⁻¹ (vermelho).

Figura 18. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 frente a variação da concentração inicial de *Caldo nutriente*.

5.3.3. Influência do pH inicial do meio de cultura durante a produção de 2,3-butanodiol com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 na presença de glicose

Nessa etapa de otimização ocorreu uma diminuição da capacidade da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 em produzir o 2,3-butanodiol a partir de glicose. Contudo, foi possível determinar qual o valor de pH que favoreceu uma maior produção do 2,3-butanodiol. Os valores de pH testados foram de 5, 6, 7, 8 e 9.

A maior concentração de 2,3-butanodiol foi obtida com pH 8 (12,3 g.L⁻¹) e com pH 7 a concentração do composto de interesse foi de 12,2 g.L⁻¹. As concentrações de 2,3-butanodiol obtidas para os valores de pH inicial de 5, 6 e 9 foram de 10,0 g.L⁻¹ (81%), 9,8 g.L⁻¹ (79%) e 10,5 g.L⁻¹ (85%), respectivamente (Figura 19). Através desses resultados ficou estabelecido que o pH ótimo a ser utilizado é o pH 7.

A Figura 20 apresenta os cromatogramas da produção de 2,3-butanodiol usando glicose como substrato, nos quais foi possível verificar que os valores de pH 7 e pH 8 foram os que mais favoreceram a obtenção do produto no processo de fermentação com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6.

Figura 19. Produção de 2,3-butanodiol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 frente a variação do pH inicial do meio de fermentação

Figura 20. Cromatogramas obtidos por CG/DIC a partir da fermentação da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 usando diferentes valores de pH inicial.

NI: Não identificado.

5.3.4. Influência do tempo de fermentação da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 na presença de glicose visando a produção de 2,3-butanodiol

Uma vez determinadas as melhores condições para a produção de 2,3-butanodiol foi realizado um estudo do tempo de fermentação com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 para a obtenção de maiores rendimentos e produtividades de 2,3-butanodiol. Todos os experimentos descritos foram realizados no período de 5 dias.

Os diferentes tempos de fermentação avaliados foram de 1-8 dias com a realização de diferentes fermentações para cada um dos tempos estudados. Nesses experimentos foram obtidas as maiores concentrações de 2,3-butanodiol devido ao uso das condições de fermentação previamente otimizadas nos estudos anteriores. Os resultados obtidos (rendimento e produtividade) estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimentos e produtividades obtidos a partir da fermentação da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 ao longo do tempo de cultivo.

Tempo (dias)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	0,13	0,40
2	0,29	0,45
3	0,36	0,37
4	0,36	0,28
5	0,42	0,26
6	0,37	0,19
7	0,33	0,15
8	0,29	0,11

O melhor rendimento obtido foi de 0,42 g.g⁻¹ após 5 dias de fermentação e a melhor produtividade obtida foi de 0,45 g.L⁻¹.h⁻¹ após 2 dias. A produtividade no período de 5 dias de fermentação foi de 0,26 g.L⁻¹.h⁻¹ e o rendimento após 2 dias foi 0,29 g.g⁻¹ (Tabela 5). A concentração máxima de 2,3-butanodiol obtida a partir da fermentação de 75 g.L⁻¹ de glicose pela bactéria *S. marcescens* foi 31,2 g.L⁻¹ (5 dias).

Analisando os resultados da Tabela 5 pode-se concluir que foram obtidos bons valores de rendimentos e produtividades, uma vez que, embora inferiores, são comparáveis àqueles encontrados na literatura. No trabalho reportado por Huang et al. (2013), usando a bactéria *Serratia* sp., o rendimento e a produtividade obtidos foram de 0,41 g.g⁻¹ e 0,75 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, em um período de cultivo de 26 h,

demonstrando a potencialidade do gênero *Serratia* como produtor de 2,3-butanotiol a partir de glicose.

A Tabela 6 apresenta comparação entre os resultados de rendimento e produtividade obtidos neste trabalho em comparação com alguns trabalhos da literatura também realizados em escala laboratorial, a fim de comparação mais próxima em relação a todos os parâmetros estudados.

Tabela 6. Dados de rendimentos e produtividades obtidos na produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose com microrganismos relatados na literatura e com a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6.

Microrganismo	Rendimento (g/g)	Produtividade (g/L h)	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,31	0,78	Yang et al. (2013)
<i>Serratia</i> sp.	0,41	0,75	Huang et al. (2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SB-Ea	0,36	0,21	Choi et al. (2016)
<i>Klebsiella oxytoca</i> NBRF4	0,26	1,15	Han et al. (2013)
<i>Serratia marcescens</i> LQOB-SE6 ^a	0,42	0,26	Santos (2017)
<i>Serratia marcescens</i> LQOB-SE6 ^b	0,29	0,45	Santos (2017)

^a5 dias de cultivo; ^b2 dias de cultivo.

Assim como foi confirmado para a produção do 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol, a comparação entre os resultados descritos na literatura com aqueles obtidos por este trabalho, a bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 é uma linhagem promissora para a aplicação na produção de 2,3-butanodiol a partir de glicose, sem a produção de subprodutos majoritários.

5.4. Produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação dos açúcares liberados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo fungo *A. sydowii* CBMAI 934

Foi realizada a fermentação dos açúcares obtidos após a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por celulasas do fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 nas mesmas condições determinadas para a fermentação da glicose.

Devido à baixa concentração de açúcares liberados no processo de hidrólise (< 2 g.L⁻¹) não houve produção de 2,3-butanodiol, embora não tenha sido observada a inibição do crescimento da bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6, o que poderia ter sido provocada pela presença de algum composto ou proteína no extrato enzimático.

Portanto, para obter o 2,3-butanodiol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, faz-se necessário o uso de processos de hidrólise de biomassa que produzam um hidrolisado final com maiores concentrações de açúcares.

6. CONCLUSÃO

Uma nova linhagem de bactéria *Serratia marcescens* LQOB-SE6 foi capaz de produzir 2,3-butanodiol a partir de glicerol e glicose, como foi descrito neste trabalho. Essa bactéria foi isolada de turfeira em Sergipe-Brasil junto com outras 5 linhagens (*B. subtilis* LQOB-SE1, *B. coagulans* LQOB-SE2, *B. pumilus* LQOB-SE3, *B. brevis* LQOB-SE4 e *Lysinibacillus* sp. LQOB-SE5), as quais não apresentaram capacidade de produzir o 2,3-butanodiol a partir de glicerol, que foi usado como substrato para o *screening*.

As melhores condições para a produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação do glicerol pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6 foram: pH inicial de 7, *Caldo nutriente* (8 g.L⁻¹), concentração inicial de glicerol de 50 g.L⁻¹ e tempo de cultivo de 7 dias. Com esses parâmetros foram obtidos rendimento de 0,30 g.g⁻¹, produtividade de 0,13 g.L⁻¹.h⁻¹ e concentração máxima de 2,3-butanodiol produzida de 22,4 g.L⁻¹. Nessas condições foram produzidos dois estereoisômeros do 2,3-butanodiol, sendo que o majoritário foi o *meso*-butanodiol (80%), confirmado por padrão e por comparação com a literatura. O outro estereoisômero foi denominado como *quiral*-butanodiol (20%) devido à não identificação da configuração absoluta para o (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol ou (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol).

As condições de cultivo semelhantes foram encontradas na otimização da produção de 2,3-butanodiol a partir da fermentação da glicose pela bactéria *S. marcescens* LQOB-SE6: pH inicial de 7, *Caldo nutriente* (8 g.L⁻¹), concentração inicial de glicose de 75 g.L⁻¹ e tempo de cultivo de 5 dias. Nestas condições obteve-se um rendimento de 0,42 g.g⁻¹ em 5 dias de fermentação, produtividade de 0,45 g.L⁻¹.h⁻¹ após 2 dias e concentração máxima de 2,3-butanodiol de 31,2 g.L⁻¹. A partir da glicose foi produzido apenas o estereoisômero *meso*-butanodiol.

Não foi possível produzir o 2,3-butanodiol a partir do hidrolisado gerado na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelas celulasas do fungo de ambiente marinho *A. sydowii* CBMAI 934 devido à baixa concentração de açúcares no hidrolisado, fazendo-se necessário um estudo no melhoramento das condições de hidrólise para a produção de um hidrolisado com maior teor de açúcares fermentescíveis.

A linhagem bacteriana *S. marcescens* LQOB-SE6 isolada de turfeira apresentou um potencial para aplicação na produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol e glicose. Vale destacar que são poucos os estudos na literatura que apresentaram a produção de 2,3-butanodiol a partir de ambos os substratos sem a geração de outros compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSCHAR, A.S.; BELLGARDT, K.H.; VAZ ROSSEL, C.E.; CZOK, A.; SCHALLER, K. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 582-585, 1991.

BAI, F.; DAI, L.; FAN, J.; TRUONG, N.; RAO, B.; ZHANG, L.; SHEN, Y. Engineered *Serratia marcescens* for efficient (3R)-acetoin and (2R,3R)-2,3-butanediol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, p. 779-786, 2015.

BIEBL, H.; ZENG, A.P.; MENZEL, K.; DECKWER, W.D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 24-29, 1998.

BISWAS, R.; YAMAOKA, M.; NAKAYAMA, H.; KONDO, T.; YOSHIDA, K.; BISARIA, V.S.; KONDO, A. Enhance d production of 2,3-butanediol by engineered *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 651-658, 2012.

CAO, N.; XIA, Y.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Production of 2,3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 129-139, 1997.

CASEY, E.; MOSIER, N.S.; ADAMEC, J.; STOCKDALE, Z.; HO, N.; SEDLAK, M. Effect of salts on the co-fermentation of glucose and xylose by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-10, 2013.

CELINSKA, E.; GRAJEK, W. Biotechnological production of 2,3-butanediol - Current state and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 715-725, 2009.

CHAMPLUVIER, B.; FRANCA, B.; ROUXHET, P.G. Co-immobilization by adhesion of β -galactosidase in nonviable cells of *Kluyveromyces lactis* with *Klebsiella oxytoca*: Conversion of lactose into 2,3-butanediol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 844-853, 1989.

CHENG, K.K.; LIU, Q.; ZHANG, J.A.; LI, J.P.; XU, J.M.; WANG, G.H. Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 613-616, 2010.

CHENG, K.K.; WU, J.; WANG, G.Y.; LI, W.Y.; FENG, J.; ZHANG, J.A. Effects of pH and dissolved CO₂ level on simultaneous production of 2,3-butanediol and succinic acid using *Klebsiella pneumoniae*. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 500-503, 2013.

CHOI, M.H.; KIM, S.J.; KIM, J.W.; PARK, Y.C.; SEO, J.H. Molecular cloning and expression of *Enterobacter aerogenes* α -acetolactate decarboxylase in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* for efficient 2,3-butanediol production. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 170-176, 2016.

DA SILVA, G.P.; MACK, M. CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

DE SOUZA, E.A.; ROSSI, D.M.; AYUB, M.A.Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. **Renewable Energy**, v. 72, p. 253-257, 2014.

FRAZER, F.R.; McCASKEY, T.A. Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. **Biomass**, v. 18, p. 31-42, 1989.

FU, J.; WANG, Z.; CHEN, T.; LIU, W.; SHI, T.; WANG, G.; TANG, Y.J.; ZHAO, X. NADH Plays the vital role for chiral pure D-(-)-2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* under limited oxygen conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 2126-2131, 2014.

HÄBLER, T.; SCHIEDER, D.; PFALLER, R.; FAULSTICH, M.; SIEBER, V. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 237-244, 2012.

HAN, S.H.; LEE, J.E.; PARK, K.; PARK, Y.C. Production of 2,3-butanediol by a low-acid producing *Klebsiella oxytoca* NBRF4. **New Biotechnology**, v. 30, p. 166-172, 2013.

HÖHN-BENTZ, H.; RADLER, F. Bacterial 2,3-Butanediol Dehydrogenases. **Archives of Microbiology**, v. 116, p. 197-203, 1978.

HU, X.; SHEN, X.; HUANG, M.; LIU, C.; GENG, Y.; WANG, R.; XU, R.; QIAO, H.; ZHANG, L. Biodegradable unsaturated polyesters containing 2,3-butanediol for engineering applications: Synthesis, characterization and performances. **Polymer**, v. 84, p. 343-354, 2016.

HUANG, C.F.; JIANG, Y.F.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. Method of 2,3-butanediol production from glycerol and acid-pretreated rice straw hydrolysate by newly isolated strains: Pre-evaluation as an integrated biorefinery process. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 446-453, 2013.

JL, X.J.; HUANG, H.; OUYANG, P.K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 351-364, 2011.

JIANG, L.Q.; FANG, Z.; GUO, F.; YANG, L.B. Production of 2,3-butanediol from acid hydrolysates of *Jatropha* hulls with *Klebsiella oxytoca*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 405-410, 2012.

JUNG, S.G.; JANG, J.H.; KIM, A.Y.; LIM, M.C.; KIM, B.; LEE, J.; KIM, Y.R. Removal of pathogenic factors from 2,3-butanediol-producing *Klebsiella* species by inactivating virulence-related *wabG* gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1997-2007, 2013a.

JUNG, M.Y.; PARK, B.S.; LEE, J.; OH, M.K. Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 21-27, 2013b.

JURCHESCU, I.M.; HAMANN, J.; ZHOU, X.; ORTMANN, T.; KUENZ, A.; PRUSSE, U.; LANG, S. Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6715-6723, 2013.

KIM, S.J.; SEO, S.O.; JIN, Y.S.; SEO, J.H. Production of 2,3-butanediol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 274-281, 2013.

KIM, S.J.; SEO, S.O.; PARK, Y.C.; JIN, Y.S.; SEO, J.H. Production of 2,3-butanediol from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 192, p. 376-382, 2014.

KIM, B.; LEE, S.; YANG, J.; JEONG, D.; SHIN, S.H.; KOOK, J.H.; YANG, K.S.; LEE, J. The influence of budA deletion on glucose metabolism related in 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 73-74, p. 1-8, 2015.

LI, L.; ZHANG, L.; LI, K.; WANG, Y.; GAO, C.; HAN, B.; MA, C.; XU, P. A newly isolated *Bacillus licheniformis* strain thermophilically produces 2,3-butanediol, a platform and fuel bio-chemical. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 123, 2013.

LUCAS, Simone. **Avaliação da potencialidade da microbiota da turfa na biorremediação de agroquímicos neonicotinoides em água**. 2014. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2014.

MACIS, L.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Properties and sequence of the coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, p. 21-28, 1998.

MAGEE, R.J.; KOSARIC, N. The microbial production of 2,3-butanediol. **Advances in Applied Microbiology**, v. 32, p. 89-161, 1987.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINAS, A.; ZENG, A.P.; PAPANIKOLAOU, S. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolate *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1872-1882, 2012.

- MOES, J.; GRIOT, M.; KELLER, J.; HEINZLE, E.; DUNN, I.J.; BOURNE, J.R. A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 482-489, 1985.
- MOTWANI, M.; SETH, R.; DAGINAWALA, H.F.; KHANNA, P. Microbial production of 2,3-butanediol from water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 44, p. 187-195, 1993.
- OH, B.R.; HONG, W.K.; HEO, S.Y.; LUO, L.H.; KONDO, A.; SEO, J.W.; KIM, C.H. The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 719-724, 2013.
- PEREGO, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, A.; CANEPA, P. 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: Selection of the optimal conditions and application to food industry residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, p. 613-620, 2000.
- PETROV, K.; PETROVA, P. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 659-665, 2009.
- PETROV, K.; PETROVA, P. Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 943-949, 2010.
- RAO, B.; ZHANG, L.Y.; SUN, J.; SU, G.; WEI, D.; CHU, J.; ZHU, J.; SHEN, Y. Characterization and regulation of the 2,3-butanediol pathway in *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2147-2159, 2012.
- RIPOLL, V.; DE VICENTE, G.; MORÁN, B.; ROJAS, A.; SEGARRA, S.; MONTESINOS, A.; TORTAJADA, M.; RAMÓN, D.; LADERO, M.; SANTOS, V.E. Novel biocatalysts for glycerol conversion into 2,3-butanediol. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 740-748, 2016.
- SABRA, W.; QUITMANN, H.; ZENG, A.P.; DAI, J.Y.; XIU, Z.L. Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 2 Ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. v. 3, p. 87-97.
- SABRA, W.; GROEGER, C.; ZENG, A.P. Microbial cell factories for diol production. In: YE, Q.; BAO, J.; ZHONG, J.J. **Bioreactor engineering research and industrial applications I: cell factories**. Berlin: Springer, 2015. v. 155, p. 165-197.
- SHI, L.; GAO, S.; YU, Y.; YANG, H. Microbial production of 2,3-butanediol by a newly-isolated strain of *Serratia marcescens*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 969-973, 2014.

- SONG, Y.; LI, Q.; ZHAO, X.; SUN, Y.; LIU, D. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from enzymatic hydrolizate of sugarcane bagasse. **BioResources**, v. 7, p. 4517-4530, 2012.
- SYU, M.J. Biological production of 2,3-butanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 10-18, 2001.
- UI, S.; MATSUYAMA, N.; MASUDA, H.; MURAKI, H. Mechanism for the formation of 2,3-butanediol stereoisomers in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 62, p. 551-559, 1984.
- UI, S.; MASUDA, T.; MASUDA, H.; MURAKI, H. Mechanism for the formation of 2,3-butanediol stereoisomers in *Bacillus polymyxa*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, p. 481-486, 1986.
- WANG, Q.; CHEN, T.; ZHAO, X.; CHAMU, J. Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus licheniformis* for chiral pure D-2,3-butanediol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1610-1621, 2012.
- WONG, C.L.; YEN, H.W.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 169-176, 2014.
- WOO, K.S.; KIM, H.Y.; HWANG, I.G.; LEE, S.H.; JEONG, H.S. Characteristics of the thermal degradation of glucose and maltose solutions. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 20, p. 102-109, 2015.
- XU, Y.; CHU, H.; GAO, C.; TAO, F.; ZHOU, Z.; LI, K.; LI, L.; MA, C.; XU, P. Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol. **Metabolic Engineering**, v. 23, p. 22-33, 2014.
- YANG, T.W.; RAO, Z.M.; ZHANG, X.; XU, M.J.; XU, Z.H.; YANG, S.T. Fermentation of biodiesel-derive d glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7651-7658, 2013.
- YEN, H.W.; LI, F.T.; CHANG, J.S. The influences of pH control strategies on the distribution of 1,3-propanediols and 2,3-butanediols production by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 292-296, 2014a.
- YEN, H.W.; LI, F.T.; CHANG, J.S. The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 374-378, 2014b.

ZHANG, L.; YANG, Y.; SUN, J.; SHEN, Y.; WEI, D.; ZHU, J.; CHU, J. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1961-1967, 2010.

ZHANG, L.; XU, Q.; ZHAN, S.; LI, Y.; LIN, H.; SHA, L.; HU, K.; GUAN, X.; SHEN, Y. A new NAD(H)-dependent *meso*-2,3-butanediol dehydrogenase from an industrially potential strain *Serratia marcescens* H30. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 1175-84, 2014.

ZHU, M.M.; LAWMAN, P.D.; CAMERON, D.C. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 694-699, 2002.