



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QUÍMICA INDUSTRIAL**

MARCOS EUGÊNIO DE ALEIXO JÚNIOR

**OBTENÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DO
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DO CAJU LAVADO USANDO
CARBOXIMETILCELULOSE COMO FONTE INDUTORA**

**CAMPINA GRANDE – PB
2014**

MARCOS EUGÊNIO DE ALEIXO JÚNIOR

**OBTENÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DO
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DO CAJU LAVADO USANDO
CARBOXIMETILCELULOSE COMO FONTE INDUTORA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Industrial da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Bacharel em químico industrial.

Orientador: Prof. Me. Carlos Alberto Bispo de Sousa

CAMPINA GRANDE – PB
2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A366o Aleixo Júnior, Marcos Eugênio de.

Obtenção de celulasas por fermentação semissólida do resíduo agroindustrial do caju lavado usando carboximetilcelulose como fonte indutora [manuscrito] / Marcos Eugênio de Aleixo Júnior. - 2014.

40 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.

"Orientação: Prof. Me. Carlos Alberto Bispo de Sousa, Departamento de Química".

1. Carboximetilcelulose. 2. Fermentação Semissólida. 3. Trichoderma reesei. I. Título.

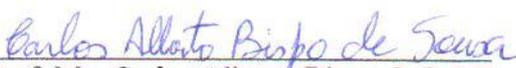
21. ed. CDD 580

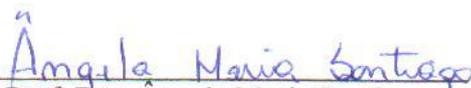
MARCOS EUGÊNIO DE ALEIXO JÚNIOR

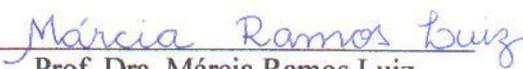
**OBTENÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DO
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DO CAJU LAVADO USANDO
CARBOXIMETILCELULOSE COMO FONTE INDUTORA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Química
Industrial da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do título de Bacharel em
química industrial.

Banca Examinadora


Prof. Me. Carlos Alberto Bispo de Sousa
Orientador (DQ/UEPB)


Prof. Dra. Ângela Maria Santiago
Examinadora (DQ/UEPB)


Prof. Dra. Márcia Ramos Luiz
Examinadora (DESA / UEPB)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos Eugênio de Aleixo e Nalva Ferreira de Aleixo, pelo amor incondicional e meus irmãos, Alisson, Arrisson e Nyédja, por sempre acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo o que tem feito.

A minha família, por toda colaboração, dedicação, amor, carinho e confiança.

A meu orientador Prof. Carlos Bispo, pela dedicação e paciência.

A Prof^a. Dra. Ângela Maria Santiago, pela colaboração e apoio durante o trabalho.

A Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado, que gentilmente cedeu a estrutura do LEB para a realização deste trabalho de pesquisa.

Aos colaboradores e funcionários do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, em Campina Grande – Paraíba.

Por fim, agradeço à UEPB pela minha formação e a todos que fazem o Departamento de Química.

RESUMO

As celulasas destacam-se em diversas áreas de atuação. Uma utilização que tem merecido destaque é na hidrólise de materiais lignocelulósicos para a obtenção de açúcares fermentescíveis destinados à produção de bioetanol de terceira geração. Atualmente, a maioria das celulasas microbianas comercialmente utilizadas é produzida pela espécie *Trichoderma*, em especial o *Trichoderma reesei* com capacidade comprovada de produção de enzimas celulolíticas. Estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de produzir essa enzima através de um processo de fermentação semissólida, a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, diminuindo assim os custos de produção da enzima, e agregando valor ao resíduo. Muitos substratos são utilizados com a finalidade de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos. O objetivo desse trabalho foi de obter celulasas a partir do bagaço do pedúnculo do caju utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48, empregando carboximetilcelulose como fonte indutora desta enzima. Inicialmente, foi realizada a fermentação semissólida do resíduo do caju lavado nas condições de 45% de umidade inicial e 1% de fonte de nitrogênio, porém adicionando-se 0,25% de carboximetilcelulose por grama de resíduo seco. Foi realizado um acompanhamento cinético no qual foram feitas análise de açúcares redutores e atividade enzimática expressa em CMCase, Fpase e celobiase. Em seguida foi feito um ensaio para se determinar o pH ótimo e temperatura ótima das enzimas. Verificou-se que a indução do meio com carboximetilcelulose proporcionou um aumento de atividade em CMCase considerável, comparando os dados da literatura. As enzimas CMCase e Fpase tiveram atividade ótima em temperatura de 50 °C e pH entre 4,0 e 5,0. A biomassa do resíduo do bagaço do pedúnculo do caju mostrou ter potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulasas e a indução com carboximetilcelulose mostrou ter um efeito positivo na obtenção de tais enzimas.

PALAVRAS – CHAVE: Carboximetilcelulose, Fermentação Semissólida, *Trichoderma reesei*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores médios e desvio padrão dos parâmetros analisados na caracterização físico-química do bagaço do pedúnculo do caju, lavado, seco a 55°C.....	5
Tabela 2 –	Acompanhamento cinético e desvio padrão.....	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Acompanhamento cinético da fermentação semissólida do resíduo do caju.....	9
Figura 2 –	Placas de petri com meio básico contendo o microrganismo <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48, após período em estufa a 28°C.....	12
Figura 3 –	Repique do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em arroz.....	12
Figura 4 –	Transferência dos esporos para o béquer.....	13
Figura 5 –	Microscópio óptico utilizado na contagem de esporos.....	14
Figura 6 –	Perfil cinético do processo de produção de celulasas por fermentação semissólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de pedúnculo do caju lavado, usando carboximetilcelulose como fonte indutora.....	18
Figura 7 –	Acompanhamento enzimático sob efeito de pH.....	19
Figura 8 –	Acompanhamento enzimático sob efeito da temperatura.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVO GERAL.....	3
1.1.1	Objetivos Específicos.....	3
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
2.1	CAJU.....	4
2.1.1	Resíduo do Processamento do Caju.....	4
2.2	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES.....	5
2.2.1	O Gênero <i>Trichoderma</i>	6
2.3	FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	7
2.3.1	Fatores que Influenciam a FSS.....	7
2.3.1.1	Temperatura.....	8
2.3.1.2	pH.....	8
2.3.2	Influência da Adição de fontes de Nitrogênio na FSS.....	8
2.3.3	Quantidade de Água no Meio Fermentativo.....	9
2.3.4	Adição de Fontes de Carbono.....	9
2.4	RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	10
2.4.1	Recuperação das Enzimas Obtidas por Fermentação Semissólida.....	10
2.5	PH E TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE.....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1	PREPARAÇÃO DO RESÍDUO.....	11
3.2	MICROORGANISMO E INÓCULO.....	11
3.3	PROCESSO FERMENTATIVO.....	12
3.3.1	Obtenção da Suspensão de Esporos e Quantificação.....	13
3.3.2	Lixiviação.....	14
3.3.3	Análise da Atividade Enzimática.....	14
3.3.3.1	Determinação de AR.....	16
3.3.4	Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	16
3.3.5	Efeito de pH na Atividade Enzimática.....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1	ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DA ENZIMA.....	17
4.2	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO.....	19

4.3	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA.....	20
5	CONCLUSÕES.....	22
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

O estudo da biotecnologia teve seu início com processos fermentativos, baseado no uso de microrganismos para converter uma substância em outra. Os fundamentos do entendimento científico da fermentação, na realidade, da ação de todos os microrganismos e, portanto, do seu controle econômico estão baseados firmemente nos estudos de Louis Pasteur. Pois foi ele quem mostrou que a fermentação é diretamente provocada pelo processo vital de microrganismos. E atualmente é possível controlar os processos de fermentação numa forma científica exata pelo entendimento da atividade dos microrganismos (VILLEN, 2001).

A produção de enzimas é um vasto campo de estudo quando se trata de processos biotecnológicos. As enzimas são biocatalisadores proteicos com características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade. (PEREIRA *et al.*, 2008).

As celulasas destacam-se em diversos nichos de atuação, tais como alimentício, detergentes, farmacêutico, têxtil e celulose no tratamento de efluentes e resíduos, além da produção de biocombustíveis, área onde as celulasas têm sido estudadas para produção de bioetanol, a qual é usada durante a etapa de hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose (AMORIM, 2010).

A maioria das celulasas microbianas comercialmente utilizadas é produzida pela espécie *Trichoderma* (ZHANG e LYND, 2006). São obtidas basicamente endoglicanases e exoglicanases, além de uma série de enzimas complementares, como β -glicosidase, hemicelulasas e pectinases (BERLIN *et al.*, 2005).

Considerando os nichos de atuação, é cada vez maior o uso de enzimas. O mercado mundial de enzimas é da ordem de 4 bilhões de dólares, sendo que 2,2 bilhões de dólares atende ao mercado de enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e 1,8 bilhão de dólares o de enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico e enzimas para química quiral). As celulasas e as amilases estão entre as principais enzimas de uso industrial no mundo, representando 22% desta demanda (POLITZER e BOM, 2006).

No Brasil, devido as suas características climáticas, existe abundância de matéria-prima a ser utilizada nos cultivos microbianos para a produção de enzimas. Além disso, há uma grande variedade e disponibilidade de recursos naturais renováveis, que podem ser convertidos, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado, e de interesse industrial

(PALMA, 2003). Dessa forma, a utilização de matérias-primas de baixo custo na produção de celulases pode ser uma forma de viabilizar economicamente processos que utilizam essa enzima (RUGGIERO, 2002).

O pedúnculo do caju é um material lignocelulósico que apresenta uma estimativa de produção no Brasil em torno de 1,8 milhão de toneladas/ano, concentrando-se basicamente na região Nordeste, e com aproveitamento industrial de apenas 15% do total (GLOBO RURAL, 2005). Segundo Holanda e Oliveira (2001) a quantidade desperdiçada dessa matéria-prima representa um elevado potencial de uso para conversão por microrganismos em bioprodutos.

Uma das formas de agregar valor aos resíduos agroindustriais, em particular ao resíduo do caju, é obter enzimas, como, por exemplo, as celulases através da fermentação semissólida utilizando microrganismos como agente metabolizador de açúcares e celulose (AMORIM, 2010).

A produção de celulases pode ser induzida pela presença de substratos, principalmente carboidratos como a carboximetilcelulose em pequenas quantidades (MANDELS *et al.*, 1960).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação do resíduo agroindustrial do caju com carboximetilcelulose, para verificar se há um impacto positivo na obtenção de celulases durante a fermentação semissólida.

1.1 OBJETIVO GERAL

- Obter celulases a partir da fermentação semissólida do resíduo agroindustrial do caju (bagaço do pedúnculo) lavado, tendo como agente da fermentação o microrganismo *Trichoderma Reesei LCB 48* e como fonte indutora a carboximetilcelulose.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Obter o extrato fermentado bruto por meio da fermentação semissólida do bagaço do caju nas condições de 45% de umidade e 1% de nitrogênio;
- Avaliar a influência da adição de uma fonte de carbono indutora (carboximetilcelulose) na produção das enzimas, comparando os dados obtidos com os da literatura;
- Estudar a estabilidade enzimática frente às variações de temperatura e o potencial hidrogeniônico (pH), para determinar o pH e a temperatura ótima para ativação das enzimas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAJU

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical, originária do Brasil, dispersa em quase todo o seu território. A área atualmente ocupada com a cultura do cajueiro no Nordeste é de cerca de 700.000 hectares, com uma produção em torno de 1.260.000.000 quilos de pedúnculo. O estado do Ceará é o maior produtor, com uma área cultivada superior a 350.000 hectares, sendo que quase 80% das árvores plantadas estão em terras de pequenos produtores rurais, segundo a Embrapa (OLIVEIRA, 2003).

A industrialização do caju pode ser dividida nos setores de beneficiamento da castanha e do processamento do pedúnculo. O beneficiamento da castanha visa principalmente à produção da amêndoa da castanha de caju; enquanto que o processamento do pedúnculo tem como principal produto industrial o suco de caju (BARRETO *et al.*, 2007).

O pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.) apresenta uma grande variabilidade com relação às suas características químicas e físico-químicas, tendo como principais fatores que as influenciam o tipo de solo, clima, tipo de cajueiro, estado de maturação e condições de plantio (sequeiro ou irrigado) (SOUZA FILHO *et al.*, 2012).

E que por sua vez, o pedúnculo possui alta concentração em material lignocelulósico que é um dos diversos resíduos agroindustriais com potencialidade para serem utilizados em bioprocessos (TONINI, 2004).

Os resíduos são constituídos basicamente de matéria orgânica e fibra, com alto valor nutritivo, abundante e de baixo custo econômico. Uma das formas de agregar valor aos resíduos agroindustriais, em particular ao resíduo do caju, é obter enzimas, como as celulases através da fermentação semissólida utilizando microrganismos como agente metabolizador de carboidratos (AMORIM, 2010).

2.1.1 Resíduo do Processamento do Caju.

Lins (2012) caracterizou o resíduo do processamento do caju resultante da produção de suco, visando conhecer a composição química do bagaço do caju lavado e seco em secador de leito fixo a temperatura de 55°C com relação aos nutrientes presentes no resíduo, o qual foi

utilizado para a produção de celulases. Os resultados obtidos a partir de análises físico-químicas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-química do bagaço do pedúnculo do caju lavado e seco a 55°C.

Parâmetros	Valores
Densidade aparente (g/cm ³)	0,42±0,00
Densidade real (g/cm ³)	1,36±0,00
Porosidade	0,69±0,00
pH	5,45±0,01
Sólidos solúveis (°Brix)	0,00±0,00
AR (%)	0,21±0,00
Umidade (b.u.) (%)	7,02±0,03
Cinzas (%)	1,31±0,01
Extrativos (%)	7,60±0,33
Celulose (%)	32,37±0,50
Proteína bruta (%)	12,50±0,83

Fonte: Lins, 2012

Destaca-se nessa caracterização o percentual de celulose que o resíduo contém. Para metabolizar a celulose, o microrganismo deverá produzir um complexo celulolítico (Mandels, et al. 1960).

2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

As celulases são um grupo de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar a celulose natural ou modificá-la por pré-tratamentos em carboidratos menores, (DAMISA; KUTA; ADABARA, 2013).

A produção de celulases por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com objetivo de estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas. Nesse processo de produção de enzima, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes em um meio de cultivo, ou substrato, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas. Uma vasta gama de microrganismos tem sido estudada extensivamente de forma a tornar o processo de produção da enzima viável (TAVARES, 2009).

Vários microrganismos produzem celulases, mas apenas alguns são capazes de degradar a celulose natural, estes são conhecidos como verdadeiros celulolíticos (ROBSON e CHAMBLISS, 1989). Os microrganismos celulolíticos ao degradarem a celulose, secretam, em maior ou menor quantidade, complexo multienzimático (BEGUIN, 1990).

Muitos substratos são utilizados com a finalidade de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos (VITTI, 1988; SILVA e DILLON, 1988). Os resíduos agroindustriais podem servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em uma fermentação (DA SILVA *et al.*, 1994). Na maioria dos casos, o simples enriquecimento destes compostos com fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de elevada atividade enzimática (BISARIA & GHOSE, 1984; ELISASHVILI, 1993).

Amorim (2010), ao estudar a produção de celulases por *Trichoderma sp* em bagaço de caju lavado e sem lavar, observou que, para umidade de 45%, o pico de atividade foi atingido mais rapidamente quando se utilizou a matéria-prima lavada. Santos (2007) observou o mesmo ao estudar a produção de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* CCT 0916 também em bagaço de caju lavado e sem lavar. Isto pode ser explicado pelo fato de que a matéria-prima lavada contém baixo teor de glicoses, induzindo o fungo a produzir enzimas para degradar outras fontes de carbono disponíveis, como a celulose e a pectina.

2.2.1 O Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* foi estudado há mais de dois séculos por Persoon (RIFAI, 1969). São fungos anamórficos e podem ser encontrados em materiais orgânicos e em materiais vegetais em decomposição, disponíveis na natureza (GAMS e BISSET, 1998), essas características, tornam-os de grande interesse econômico e são usados em aplicações comerciais.

Trichoderma reesei é um importante produtor de celulases (KUBICEK e PENTTILA, 1998), trata-se de fungos filamentosos no qual a celulase é produzida; é o sistema enzimático mais eficiente para hidrólise completa de substratos celulósicos em componentes monoméricos de glicose (AHAMED e VERMETTE, 2008).

2.3 FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

A fermentação semissólida é um processo em que o microrganismo se desenvolve sobre partículas da matriz sólida (substrato ou material inerte) onde o conteúdo de líquido ligado a ela atua, de modo que a atividade de água assegure o crescimento e metabolismo das células sem exceder a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida (MENESES, 2009).

Segundo Amorim (2010), o processo de fermentação semissólida tem se mostrado muito promissor. Os estudos sobre esse tipo de fermentação têm-se intensificado por algumas de suas vantagens: suas necessidades são satisfeitas com menor infraestrutura e recursos humanos qualificados relativamente menores e utilizam-se matérias-primas baratas. Toda essa vantagem faz com que seja economicamente viável para a produção da enzima, industrialmente vantajoso, também, pois se obtêm um produto concentrado como no caso de produção de bioetanol (RAJEEV *et al.*, 2009). Conforme Pinto *et. al* (2006), a FSS também apresenta vantagens para a sua utilização, pois a fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas. O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas, outra vantagem é que o crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas aos do habitat natural, o meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

Por outro lado, as maiores desvantagens são as dificuldades no monitoramento e controle dos parâmetros da fermentação como o conteúdo de biomassa, pH, temperatura, umidade e dificuldades na manutenção da temperatura e umidade especialmente em larga escala (HAMIDI-ESFAHANI *et al.*, 2004).

2.3.1 Fatores que Influenciam a Fermentação Semissólida

Um dos fatores mais importantes que afetam a fermentação semissólida é a natureza do substrato sólido empregado, pois depende seriamente dos fatores intimamente relacionados com o custo e a viabilidade e ainda pode envolver o armazenamento de resíduos agroindustriais (COUTO e SANROMÁN, 2006).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo da fermentação semissólida quanto à escolha do microrganismo. Segundo Santos *et al.*, (2005), nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo,

favorece a formação de enzimas. Nesse sentido, torna-se necessário fazer análises, que devem ser relacionadas com as variáveis que afetam o processo em questão. A estrutura destes materiais tem como seus principais componentes a celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas; o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos. A heterogeneidade dos substratos não diz respeito apenas às variações existentes entre diferentes lotes de matéria-prima utilizada, mas também às variações na estrutura química de cada uma das moléculas presentes e à proporção entre os diferentes componentes que podem variar de acordo com a espécie e tecido vegetal (PINTO *et al.*, 2006).

2.3.1.1 Temperatura

Segundo Souza (2008), a temperatura é um fator crítico em sistemas de fermentação semissólida devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura no meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura (PINTO *et al.*, 2006).

2.3.1.2 pH

O pH de um cultivo, segundo Amorim (2010), varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do microrganismo. De acordo com Franco *et al.* (2011), o pH em torno da neutralidade (entre 6,5 e 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos.

De acordo com Amorim (2010), durante um processo de fermentação semissólida, o controle do pH é um dos fatores mais críticos, dificilmente sendo conseguido devido à heterogeneidade e à consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, faz-se necessário a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (LOSANE *et al.*, 1985).

2.3.2 Influência da Adição de Fontes de Nitrogênio na Fermentação Semissólida

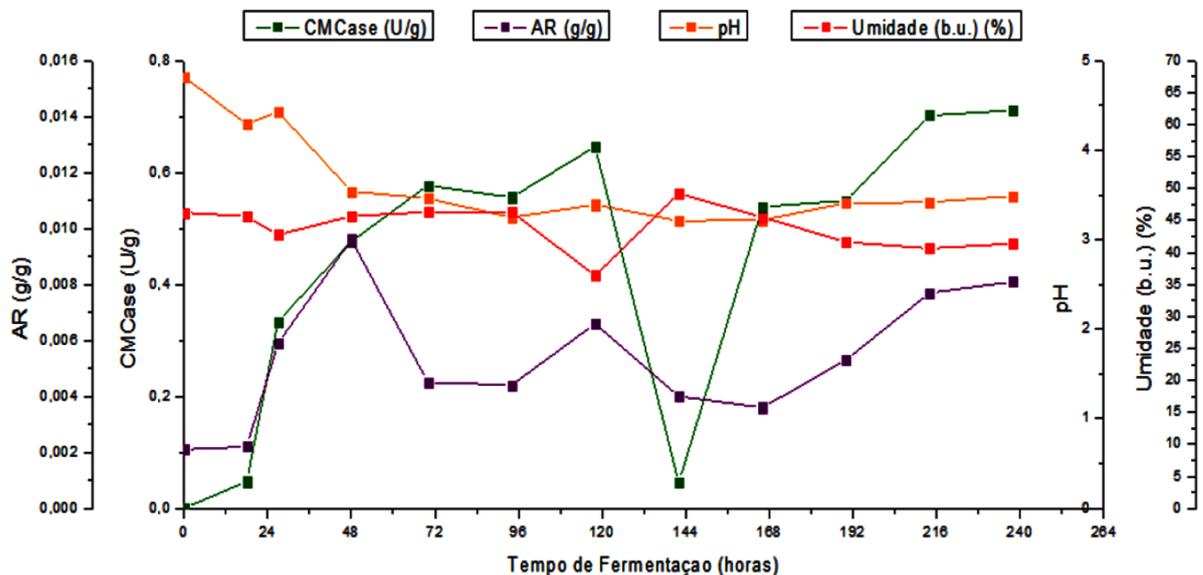
Um fator importante na produção de celulases através da fermentação semissólida é a composição do meio de cultivo. O balanço apropriado entre as fontes de nitrogênio é importante para o requerimento nutricional do microrganismo (RAIMBAULT *et al.*, 1992).

2.3.3 Quantidade de Água no Meio Fermentativo

A água presente no sistema é muito importante, pois a quantidade está relacionada com o meio através da umidade e atividade de água; umidade esta, presente em porcentagem de água na massa total do meio, o seu valor determinante no processo está intimamente relacionado com a natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado (DEL BIANCHI *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2006).

A Figura 1 apresenta o acompanhamento cinético feito por Lins (2012) para as condições consideradas mais adequadas para a produção de celulases de *Trichoderma reesei* usando o resíduo de caju como substrato. A biomassa do caju era a única fonte de carbono do processo e também atuava como suporte.

Figura 1- Acompanhamento cinético da fermentação semissólida do resíduo do caju lavado e seco a 40% de umidade e 1% de nitrogênio.



Fonte: Lins, 2012.

2.3.4 - Adição de Fontes de Carbono

Segundo Mandels *et al.*, (1960) e Dutra (2013), o tipo de fonte de carbono disponível para o microrganismo no processo fermentativo influencia no tipo de celulase a ser produzido e na quantidade, sendo que açúcares mais simples (glicose, celobiose, lactose, galactose, manose, xilose e arabinose) atuam como inibidores, enquanto carboidratos mais complexos (farelo de trigo, carboximetilcelulose – CMC, xilana Birchwood – XB, Locust bean gum – LBG, pectina de citrus peel – CP) podem atuar como indutores. O carboximetilcelulose é um

derivado do tipo éter, solúvel em água usado industrialmente em vários produtos como detergentes, alimentos, cerâmicas, cosméticos e farmacêuticos (HADER; WALDECK; SMITH, 1954).

2.4 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

2.4.1 Recuperação das Enzimas Obtidas por Fermentação Semissólida

A recuperação das enzimas obtidas por fermentação semissólida inicia através da lixiviação do material fermentado. Trata-se na dissolução preferencial de um ou vários solutos de interesse por meio de contato entre um sólido e um solvente líquido (FERNÁNDEZ, 2009). Podendo o solvente ser: água, tampões, soluções salinas diluídas ou soluções aquosas, de maneira que, obtém-se, após a operação de separação do tipo sólido-líquido, um extrato enzimático bastante límpido. Alternativamente, antes da extração, a massa semissólida pode ser seca a baixas temperaturas. Podendo, o material seco ser armazenado e posteriormente manipulado ou ser usado como uma preparação comercial bruta. O concentrado do extrato bruto líquido pode ser obtido a vácuo ou a ultrafiltração e vendido na forma líquida após a adição de estabilizantes, como por exemplo, glicerol ou tampões (CASTILHO, 1997).

2.5 - pH e temperatura ótima de atividade

Enzimas fúngicas em geral tem melhor desempenho na faixa de pH ácida. O estudo de estabilidade das enzimas frente ao pH e a temperatura é importante para determinar as condições de pH e temperatura nas quais o processo será conduzido, pois são nesses valores que a enzima apresenta atividade máxima (SOUZA, 2010). As enzimas celulasas geralmente tem pH ótimo próximo a 4,8 e temperatura ótima em cerca de 50 °C (AKCAPINAR *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritas as metodologias de fermentação e caracterização físico-química do resíduo utilizado na fermentação semissólida e a forma de avaliação de seu desempenho no processo de recuperação de enzimas.

3.1 PREPARAÇÃO DO RESÍDUO

O resíduo utilizado neste trabalho foi previamente preparado por Lins (2012) e encontrava-se armazenado em potes herméticos. Ele foi obtido da seguinte maneira: Após aquisição do caju, lavagem do fruto e extração do suco, o bagaço foi lavado com água destilada até que todos os sólidos solúveis, presentes no bagaço, remanescentes do processo de beneficiamento industrial do caju fossem removidos. Em seguida, o resíduo foi seco em secador de leito fixo a uma temperatura de 55°C e com uma velocidade de secagem de aproximadamente 1 m/s até atingir massa constante. Em seguida, o resíduo foi triturado em moinho de facas da marca MARCONI e colocado em embalagem de vidro hermeticamente fechada (LINS, 2012). Antes da utilização foi feita uma leitura de umidade.

3.2 MICRORGANISMO E INÓCULO

Foi utilizado o fungo lignocelulolítico *Trichoderma reesei* LCB 48. A metodologia foi seguida conforme Lins (2012). O *Trichoderma reesei* LCB 48 foi mantido em tubos tipo *eppendorf*. A partir do tubo tipo *eppendorf* contendo o fungo, foi realizado o primeiro repique, para isto, foram retiradas algumas gotas da suspensão de esporos do *eppendorf* e em seguida transferidas para placas de *petri* contendo meio básico.

Após inocular o *Trichoderma reesei* LCB 48 em placas de *petri*, as mesmas foram incubadas. Em seguida, foi realizado o segundo repique, em arroz, proveniente do repique em placas de *petri*. Este meio de cultura foi preparado segundo protocolo da EMBRAPA/CPATSA. Após resfriamento o arroz umedecido e estéril foi inoculado.

O arroz foi usado como substrato devido o fungo poder crescer em uma superfície maior e conseqüentemente aumentar sua esporulação (CHÁVEZ, 2006).

Figura 2 - Placas de petri com meio básico contendo o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, após período em estufa a 28°C.



Fonte: Própria (2014).

Para o preparo do inóculo, foi adicionado a cada placa de *petri* com microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, entre 5 e 8 mL de Tween 80 e, com o auxílio da alça de platina, foi feito o desprendimento dos esporos contidos no meio de cultivo deixando a suspensão homogênea. Em seguida, inoculou-se 1 mL de suspensão de esporos em cada erlenmeyer contendo arroz previamente autoclavado e homogeneizado. Os erlenmeyers de 250 mL foram incubados a 28 °C por período de 10 à 15 dias, até que todo o arroz estivesse coberto de esporos.

Figura 3 - Repique do *Trichoderma reesei* LCB 48 em arroz.



Fonte: Própria (2014).

Após o período de cultivo do microrganismo, os erlenmeyers foram mantidos sob refrigeração.

3.3 PROCESSO FERMENTATIVO

O processo fermentativo foi realizado em erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g de bagaço do pedúnculo de caju já suplementado com sulfato de amônio. Após resfriamento o substrato foi inoculado com suspensão de esporos de *T. reesei* LCB 48. As suspensões foram ajustadas para conter 10^7 esporos por grama de substrato.

Os erlenmeyer foram fechados com tampão de algodão envolvido com gaze e autoclavados por 15 min a 1 atm. Também foram esterilizados o Tween 80, funis, pipetas, proveta, bastões e beckeres que seriam usados posteriormente.

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se 40 mL de uma solução de Tween 80 (v/v) nos erlenmeyers contendo o arroz com esporos. Após agitação, os esporos foram transferidos para o béquer com auxílio de gaze e algodão para a contagem.

Figura 4 - Transferência dos esporos para o béquer.



Fonte: Própria (2014).

Após inoculação, os Erlenmeyer foram transferidos para estufa a 28°C e foram recolhidos diariamente. O extrato foi obtido por lixiviação seguida de filtragem em filtro de algodão.

3.3.1 Obtenção da Suspensão de Esporos e Quantificação

A suspensão de esporos foi obtida, transferindo 40 mL de solução Tween 80 para os erlenmeyer, Em seguida com auxílio de um funil com algodão, filtrou-se, a fim de obter os esporos. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume da suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a se ter um inóculo de 10^7 esporos por grama de meio.

Figura 5 – Microscópio óptico utilizado na contagem de esporos.



Fonte: Própria (2014).

3.3.2 Lixiviação

Durante o período de 194 horas de fermentação, os erlenmeyers foram retirados da estufa, adicionou-se o volume de 75 mL de solução tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 e foram transferidos para um shaker marca MARCONI, com velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 minutos a 30°C. Em seguida a amostra foi filtrada em gaze e algodão, ambos estéreis. O extrato enzimático foi utilizado para determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase, Fpase e celobiase.

3.3.3 Análise da Atividade Enzimática

A atividade celulolítica analisada neste trabalho foi de endoglucanases (CMCases) celobiasas e Fpases, A atividade de cada enzima foi determinada com base na metodologia de Ghose (1987).

A análise da atividade CMCase foi feita usando como substrato uma solução 1% de carboximetilcelulose preparada em tampão citrato 50 mMol pH 4,8. Inicialmente, 0,5mL do extrato foi adicionado a 0,5 mL do tampão citrato 50 mMol pH 4,8 em tubos de ensaio, que foram incubados por 30 minutos a 50°C em banho termostático. O branco deste ensaio consistia de 0,5 mL do extrato com 0,5 mL de tampão do tampão citrato 50 mMol pH 4,8. Estes ensaios em brancos expressaram o teor de AR presente no extrato e foram utilizados também para a quantificação da FPase e celobiase. Após 30 minutos de incubação, os tubos

de ensaios receberam 1 mL de DNS e seguiu-se a determinação de AR descrita mais adiante, pelo método de Miller (1959).

A atividade em FPase, ou celulose total, foi realizada misturando-se em tubos de ensaio 0,5 mL do extrato com 0,5 mL do tampão e 1 fita de papel qualitativo n° 1 de 6 X 1 cm. O branco deste ensaio consistiu de 1mL de tampão e uma fita do papel. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 50°C em banho termostático, recebendo em seguida 1mL de DNS e procedendo a quantificação dos açúcares gerados.

A atividade em celobiase foi quantificada pela adição de 0,5 mL do extrato com 0,5 mL de uma solução de celobiose 15mM feita com o tampão citrato pH 4,8. O ensaio em branco consistiu de 0,5 ml da solução de celobiose com 0,5 mL de tampão e serviu para quantificar os açúcares já existentes na solução de celobiose. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 50°C em banho termostático, recebendo em seguida 1mL de DNS e procedendo a quantificação dos açúcares gerados.

Segundo Ghose (1987), no período de incubação ocorre a liberação de açúcares redutores. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose, por minuto, a 50°C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa (U), definida como a quantidade de enzima (CMCase, FPase, ou celobiase). A atividade enzimática produzida na fermentação semissólida foi expressa em U/g, a qual foi calculada conforme a Equação 1. No caso de atividade por unidades de volume, a leitura de AR deve ser expressa em gramas de AR por mL, ao invés de gramas de AR por grama de meio fermentado.

$$Atividade_{CMCase, FPase, celobiase} (U / g) = \frac{AR_{liberado} \times 10^6}{180 \times 30} = \frac{(AR_{com\ substrato} - AR_{branco}) \times 10^6}{180 \times 30} \quad (1)$$

Nessa Equação, 10^6 é um fator de conversão que transforma grama em micrograma (portanto, mol em micromol), 180 é a massa molar da glicose (g/mol), 30 é o tempo de reação em minutos, $AR_{com\ substrato}$ é a leitura de açúcares redutores no tubo contendo o substrato, onde ocorreu reação enzimática e AR_{branco} é a leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, onde não houve reação enzimática por não haver substrato.

Neste trabalho, a atividade foi expressa nas seguintes unidades:

- U/mL : Unidades de atividade enzimática por mililitro de extrato

- U/g: Unidades de atividade enzimática por grama de substrato úmido
- U/gds: Unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco

3.3.3.1 Determinação de AR

Os grupos redutores (AR) foram quantificados com base no procedimento descrito por Miller (1959), que consiste na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), com a oxidação simultânea do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após receberem 1 mL de DNS, os tubos da análise de atividade ficaram em banho de água fervente por exatos 5 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados do banho e resfriados à temperatura ambiente, aos quais adicionou-se 8 mL de água destilada a cada tubo, e após homogeneização, foi feita a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram calculados com base em uma curva de calibração preparada com uma solução de glicose 2mg/mL.

3.3.4 Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

O estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática foi baseado na metodologia empregada por Akcapinar *et al.*, (2012). A atividade de cada enzima em diferentes temperaturas (25, 35, 50, 65, 75 e 85°C) foi determinada conforme a metodologia de Ghose (1987), sendo que o ensaio foi conduzido por 20 minutos. A atividade residual em cada ensaio foi calculada em relação ao ensaio de maior atividade, considerando a atividade de 100% na temperatura de maior atividade.

3.3.5 Efeito do pH na Atividade Enzimática.

A análise do efeito do pH na atividade enzimática foi baseado na metodologia empregada por Akcapinar, Gul e Sezerman (2012). A atividade de cada enzima em diferentes valores de pH (3,15 – 7,11) foi determinada com base na metodologia de Ghose (1987). Os ensaios para medição da atividade enzimática foram realizados na presença de tampões (tampão glicina-NaOH para pH 3,11; tampão glicina diluído 1:1 com tampão citrato de sódio para pH 4,32, tampão citrato de sódio para pH 4,68, tampão acetato para pH 5,34 e tampão Tris-HCl para pH acima de 6,0. Todos com concentração de 0,1M). A reação enzimática foi

conduzida por 20 minutos, à temperatura de 50°C. Em seguida, a reação foi interrompida com banho de gelo e adição de 1mL de DNS para quantificação de açúcares redutores. A atividade residual em cada ensaio foi calculada em relação ao ensaio de maior atividade, considerando a atividade de 100% no pH de maior atividade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

Os resultados do acompanhamento cinético estão na Tabela 2.

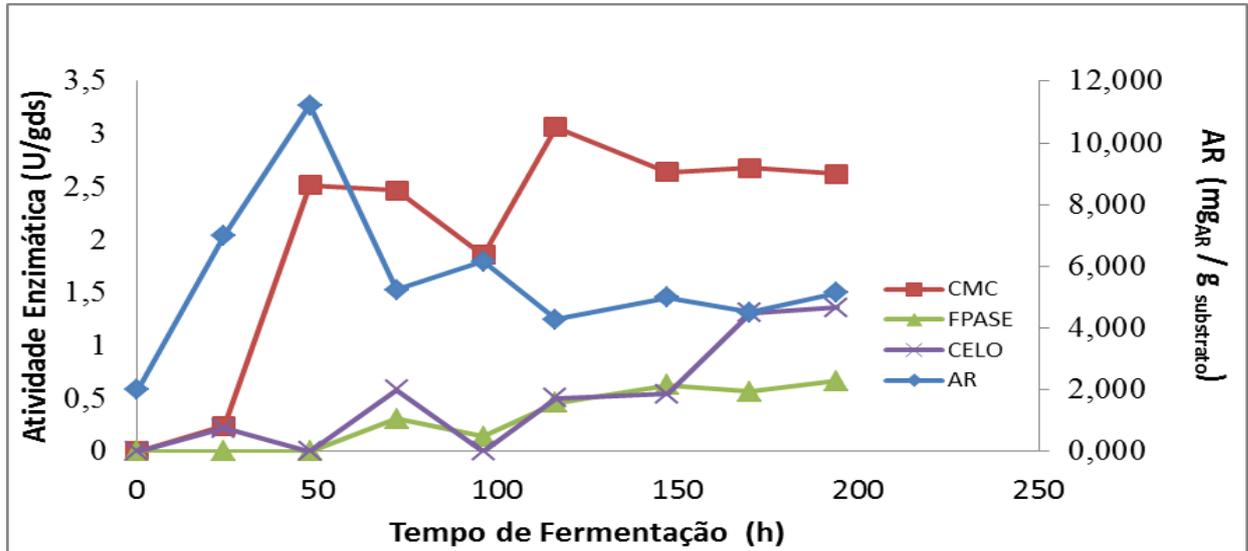
Tabela 2 - Acompanhamento cinético e desvio padrão a 45% de umidade e 1% de nitrogênio, com 0,25% de carboximetilcelulose.

Tempo (h)	CMCase (U/gds)	Fpase (U/gds)	Celobiase (U/gds)	AR (mg _{AR} /g _{substrato})
0	0 ± 000	0 ± 0,000	0 ± 000	2,00 ± 00
24	0,242 ± 0,016	0 ± 0,000	0,220 ± 0,000	7,00 ± 0,16
48	2,52 ± 0,078	0 ± 0,000	0 ± 0,000	11,22 ± 0,28
72	2,470 ± 0,055	0,309 ± 0,027	0,582 ± 0,103	5,23 ± 0,16
96	1,856 ± 0,178	0,142 ± 0,028	0 ± 0,003	6,15 ± 0,28
116	3,068 ± 0,095	0,458 ± 0,193	0,502 ± 0,000	4,28 ± 0,33
147	2,639 ± 0,121	0,625 ± 0,084	0,541 ± 0,000	4,98 ± 0,61
170	2,681 ± 0,148	0,567 ± 0,115	1,311 ± 0, 622	4,51 ± 0,21
194	2,623 ± 0,095	0,667 ± 0,123	1,361 ± 0,108	5,15 ± 0,09

Fonte: Própria (2014).

A Tabela 2 mostra que houve produção enzimática de CMCase e celobiase já nas primeiras 24 horas. O primeiro pico de atividade da CMCase ocorreu após 48 horas de processo. A Fpase só foi detectada a partir de 72 horas, apresentando um primeiro pico de atividade em 147 horas de processo. A celobiase teve vários picos exibindo grande variação nas primeiras 96 horas de processo. O teor de AR apresentou um pico em 48 horas, praticamente estabilizando a partir de 116 horas. Também não houve produção apreciável de enzimas a partir de 116 horas. Detalhes do acompanhamento cinético são exibidos na Figura 6

Figura 6 – Perfil cinético do processo de produção de celulases por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de pedúnculo do caju lavado, usando carboximetilcelulose como fonte indutora.



Comparando-se a Figura 6 com a 1 mostrada na revisão bibliográfica, percebe-se que, em relação a produção de CMCases, os perfis das curvas são semelhantes. Ambas apontam rápida produção já nas primeiras 48 horas, com pico máximo em cerca de 120 horas. Porém, os valores de atividade encontrados neste trabalho, cuja única diferença foi a adição de 0,25% de carboximetilcelulose, foram todos superiores aos de Lins (2012). Enquanto Lins 2012 obteve atividade máxima de 1,09 U/gds em 120 horas, neste trabalho obteve-se 3,07 U/gds no mesmo período, comprovando a influência positiva da adição de carboximetilcelulose, que aumentou a produção enzimática em torno de 281,6%.

Amorim (2010) estudou a produção de CMCCase por fermentação semissólida do resíduo de caju utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp. Os testes foram feitos com bagaço integral e o bagaço lavado. A maior atividade enzimática obtida para o bagaço lavado foi de 1,173 U/g (2.13 U/gds) em 42 horas de fermentação quando utilizou 45% de umidade inicial e 1,00% de adição de fonte de nitrogênio e para o bagaço sem lavar, a maior atividade enzimática foi de 1,896 (3,44 U/gds) U/g em 18 horas de fermentação quando utilizou 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio. Estes valores foram similares aos obtidos neste trabalho para o caju lavado, porém o microrganismo usado por Amorim (2010) era melhor produtor de celulases que a cepa empregada neste trabalho.

Em relação aos perfis da FPase e Celobiase não foram encontrados dados para comparação em relação ao resíduo do caju. As curvas para Fpase e celobiase da Figura 6

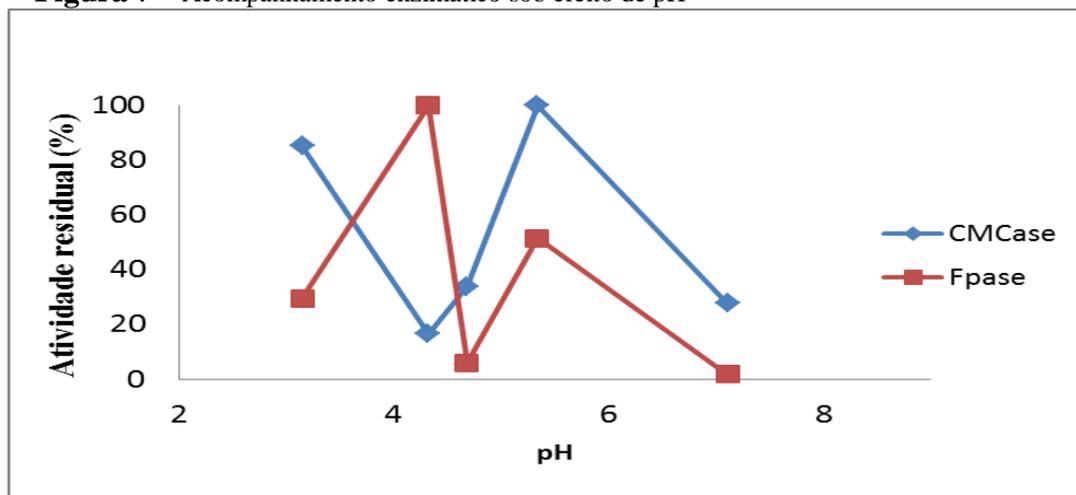
mostram que a partir de 100 horas de fermentação não se percebe variação apreciável na quantidade de celobiase e Fpase produzida. Quanto aos açúcares redutores, percebe-se elevada produção de açúcar nos tempos iniciais, cuja concentração vai diminuindo até sua estabilização por volta de 120 horas. Observa-se o fato da curva de AR, a partir de 120 horas seguir de perto as variações de CMCase, que provavelmente é a enzima responsável pelo AR produzido a partir desse tempo de acordo com a Figura 6.

Lins (2012) e Amorim (2010) afirmam que o procedimento de lavagem diminui o teor de glicose no substrato, forçando os microrganismos a buscarem fontes alternativas de carbono, como a celulose, sendo induzidos a produzirem celulases para quebrar a molécula de celulose e obter glicose para seu metabolismo. Assim, a produção de celulase na biomassa lavada inicia-se mais rapidamente.

4.2 - DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO

A Figura 7 mostra o comportamento da enzima sob variação de pH.

Figura 7 – Acompanhamento enzimático sob efeito de pH



Fonte: Própria (2014).

A atividade da celobiase não foi incluída, pois apresentou valores inconsistentes. O gráfico da Figura 7 mostra que ambas as enzimas atuam em pH ácido, perdendo atividade a medida que se aproximam do pH 7,0. A CMCase apresentou pH ótimo em torno de 5,5 e a FPase apresentou pH ótimo próximo a 4,5.

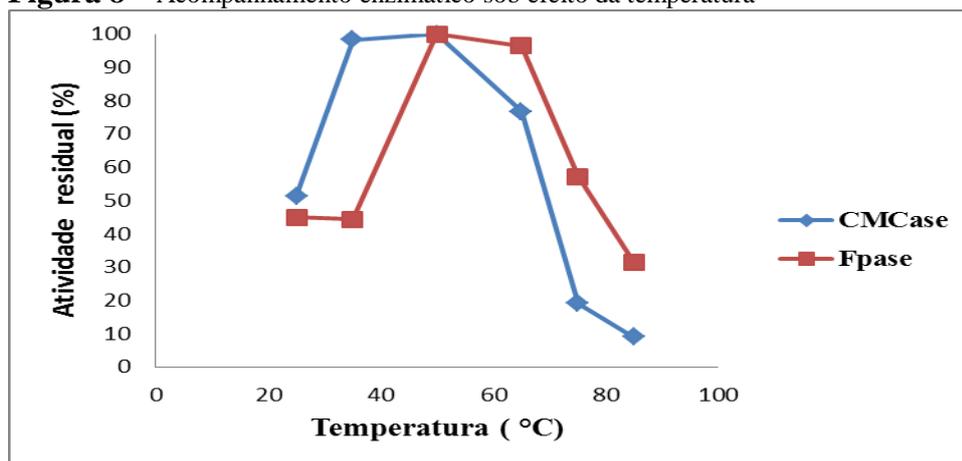
Esta observação corrobora com Silva (2008), que caracterizando o complexo celulolítico produzido pelo *Aspergillus phoenicis*, verificou que as enzimas celulases possuíam melhores atividades entre os pHs 3,0 e 5,0.

Também Akcapinar, Gul e Sezerman (2012) determinaram que o pH ótimo para endoglucanases produzidas por *Trichoderma reesei* e *Pichia pastoris* era 5,0.

4.3 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

A Figura 8 exibe o comportamento da atividade da enzima frente a variação de temperatura.

Figura 8 – Acompanhamento enzimático sob efeito da temperatura



Fonte: Própria (2014).

A Figura 8 mostra que ambas as enzimas têm atividade máxima à temperatura de 50 °C. Porém, a faixa de temperatura da CMCase vai de 35°C a 50°C, sendo que a partir de 50 a atividade reduz bastante, sendo que a 85°C, a atividade reduz a menos de 10%.

Quanto a FPase, a atividade aumenta a partir de 35°C, atingindo atividade máxima em 50°C, sendo que em 65°C a enzima ainda conserva quase toda a sua atividade, atingindo ainda cerca de 30% da atividade residual em 85°C.

Estes resultados são semelhantes aos observados por Akcapinar, Gul e Sezerman (2012), que ao estudarem o efeito da temperatura de endoglucanases produzidas por *Trichoderma Reesei* e *Pichia pastoris*, determinaram que a atividade máxima (CMCase) era obtida em temperaturas entre 45 e 55 °C.

Os valores de pH e temperatura ótima obtidos neste trabalho estão de acordo com os de Medina, Núñez e Ordeñez (2010), que foram de 50°C e o pH de 5,3 para o complexo celulolítico produzidos pelos fungos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Lentinula edodes*, na fermentação semissólida da biomassa da bananeira. Além disso, a atividade das

celulases é determinada nas condições de temperatura e pH de 50°C e 4,8; os quais são valores onde se observa a atividade máxima das celulases (GHOSE, 1987).

5. CONCLUSÕES

- A adição de carboximetilcelulose induziu positivamente a produção de celulases, aumentando em cerca de 260% o valor de atividade em relação a ensaios descritos na literatura sem essa fonte indutora.
- A maior produção de enzima celulase expressa em CMC_{Case} foi 3,068 U/g (0,410 U/_{mL}), obtida no mesmo tempo em que a literatura afirma ter um máximo de concentração enzimática: 120 horas, nas condições de 45% de umidade inicial e 1% de fonte de nitrogênio.
- O caju mostrou-se uma biomassa promissora na produção de celulases por fermentação semissólida.
- As enzimas produzidas tiveram atividade máxima à temperatura de 50°C e em faixa de pH ligeiramente ácida: 4,0 para a Fpase e 5.5 para a CMC_{Case}.

6 REFERÊNCIAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

AKCAPINAR, G. B.; GUL, O.; SEZERMAN, U. O. From in silico to in vitro: Modelling and production of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 and its mutant in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, n.159, p.61– 68, 2012.

AMORIM, B. C. **Estudo da produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de caju (*Anarcadium occidentale* L.) utilizando o microrganismo *Trichoderma* sp.** Dissertação - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 86, p.37-66. 2010.

BARRETO, G. P. M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição**,v. 18, p. 207-213. 2007.

BEGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 219-248, 1990.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBUR, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV.; MAXIMENKO, V.; GRECC, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 175-184, 2005.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 3, p. 90-104, 1981.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida.** Rio de Janeiro, 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

CHÁVEZ, M. P. **Producción de *Trichoderma sp* y Evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).** Trabajo de grado - Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering.** v. 76, p. 291-302, 2006.

DA SILVA, L. H. M.; **Equilíbrio de Fases em Sistemas Aquosos PEG/Fosfato de Potássio.** Dissertação (mestrado), FEA/UNICAMP, Campinas, 1994.

DAMISA, D., KUTA; F.A.; ADABARA, N.U. Mutagenic treatment of *aspergillus niger* with hydroxylamine for improved cellulase synthesis from cellulosic wastes. **Journal of Biotechnological Sciences.** n.1, v.2 p. 65-72, 2013.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D.M.F., 2001. Fermentação em estado sólido. In: SCHIMEDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica.** Edgard Blücher Ltda, São Paulo, v. 2, p. 247-276.

DEL BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em meio semi-sólido. In: **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W, v. 2, p. 247- 276, 2001.

DUTRA, T. R. **Influência das fontes de carbono na indução de celulasas e hemicelulasas em *chrysoporte cubensis* cultivado em meio líquido.** Dissertação (Mestrado em bioquímica). UFV, Viçosa, Minas gerais. 2013.

ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biotechnology and Microbiology**, v. 29, p. 257-266, 1993.

FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação e em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. Curitiba, 2009. 125p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FIEC. Evitando o desperdício. **Revista da Fiec**, Janeiro 2010. Disponível em: <http://www.sfiac.org.br/portalv2/sites/revista/home.php?st=maisnoticias&conteudo_id=34324&start_date=2010-01-28>. Acesso em: 20 de maio. 2014.

FRANCO, M. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Exatas on-line**. v.2, n.2, p.22-29, agosto, 2011.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. **Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. p. 3-34.

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

GLOBO RURAL. Reforma na casa. **Globo Rural, Agropecuária, Negócios e Vida no Campo**, n. 233, p. 58-63, 2005.

HADER, R. N., WALDECK, W. F., SMITH, F. W. Carboxymethylcellulose. In: **MODERN chemical processes**. New York: Reinhold, 1954, p. 132-141.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 21, p. 265-272, 2004.

HOLANDA, J. S.; OLIVEIRA, A. C. Enriquecimento protéico de pedúnculo de caju com emprego de leveduras, para alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 787-792, 2001.

KUBICEK, C. P.; PENTTLILA, M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. ***Trichoderma and Gliocladium***: Enzymes, biological control and commercial applications. London : Taylor and Francis Ltd., 1998. p. 49-72.

LINS, S. A. S. **Produção de celulases por fermentação semi-sólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48**. Campina Grande, 2012. 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) UFCG, Campina Grande, 2012.

LOSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LONSANE, B. K. Potencial of ensiling for efficient management of spent residue from solid state fermentation system. **Biotechnology Techniques**, v.6, p. 87- 90, 1992.

MANDELS, M., REESE, T. E. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**. 79(6):816, 1960.

MENESES, G. D. G. **Produção de Poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semissólida em biorreatores de Coluna**. Tese de Mestrado em Engenharia Química. UFRRJ, Seropédica RJ – 55f.: RJ, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytica Chemistry**. 31, 426–430, 1959.

OLIVEIRA, V. H. Cultivo do Cajueiro. **Embrapa**, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caju/CultivodoCajueiro/index.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

PALMA, M. B., **Produção de Xilanases em *Thermoascus aurantiacus* Cultivo em Meio Sólido**. 2003. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PEREIRA Jr, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Séries em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Escola de Química, v. 1, 2008.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H., SANTOS, S. F. M., MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v. 74, p. 17-20, 2006.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais - Visão geral e área de enzimas, conclusões e recomendações**. CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro, p. 580. 2006.

RAIMBAULT, M.; DESCHAMPS, A.; MEYER, F.; SENEZ, J. C. Direct protein enrichment of starchy products by fungal solid fermentation. In: Proc. Giam-V, 1977, Marseilles. **Anais ...** Marseilles: ____, 1977.

RAJEEV, K. S.; REETA, R. S.; GINCY, M. 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.

RIFAI, R. W. A revision of the genus *Trichoderma*. **C. M. I. - Mycological Papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin.. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 626-644, 1989.

RUGGIERO C., 2002. Disponível em: www.todafruta.com.br. Acessado em: 20 de Fevereiro de 2014.

SANTOS, S. F. M.; NOBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju visando sua utilização como substrato para fermentação semissólida. **Anais** - XV Simpósio Brasileiro de Bioprocessos. Recife. 2005.

SILVA, D. M.; DILLON, A. J. P. Produção de celulases em fermentação semi sólida por uma linhagem de *Trichoderma* sp. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15., 1988. **Anais...** Piracicaba : FEALQ, p. 54, 1988.

SOUZA R. L. A.; AMORIM B. C.; SILVA F. L. H.; CONRADO L. S. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 17., 2008. **Anais** - Recife, 2008.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.9, p.987–992, 2010.

SOUZA FILHO, M. S. M.; ARAGÃO, A. O.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Aspectos da colheita, pós-colheita e transformação industrial do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Embrapa - CEINFO**, 2012.

TAVARES, M. B. R. **Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger***. Campina Grande, 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2009.

TONINI, R. C. G.; **Utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis* Mart. – Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler**, 2004, 125f. Dissertação (Mestrado), Faculdade Regional de Blumenau, Blumenau.

VILLEN, R. A. **Biotecnologia: Histórico e Tendências**. Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2001. Disponível em: <<http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>> Acessado em: 20 de novembro de 2013.

VITTI, L. S. S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus sp* e seus mutantes isolados de bagaço de cana**. 1988. 108f. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnonology and Bioengineering.**, New York, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.