



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA CELULASE A PARTIR DA MATÉRIA
LIGNOCELULÓSICA BAGAÇO DO CAJU POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
UTILIZANDO O *Aspergillus niger***

MILLENA BARBOSA RIBEIRO TAVARES

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2009

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA CELULASE A PARTIR DA MATÉRIA
LIGNOCELULÓSICA BAGAÇO DO CAJU POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
UTILIZANDO O *Aspergillus niger***

MILLENA BARBOSA RIBEIRO TAVARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Mestre.

Área de Concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^a Dr^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira (UAEQ/UFCG)

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2009



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC

T231e

Tavares, Millena Barbosa Ribeiro.

Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando o *Aspergillus Niger* / Millena Barbosa Ribeiro Tavares. — Campina Grande, 2009.

xx f.: il. color

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Referências.

Orientadora: Profª Drª Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

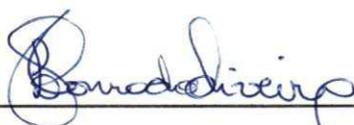
1. Celulose. 2. Bagaço do Caju. 3. Bioetanol 4. Fermentação Semi-Sólida. I. Título.

CDU 547.458.8 (043)

ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA CELULASE A PARTIR DA MATÉRIA LIGNOCELULÓSICA BAGAÇO DO CAJU POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO O *Aspergillus niger*

Dissertação aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA



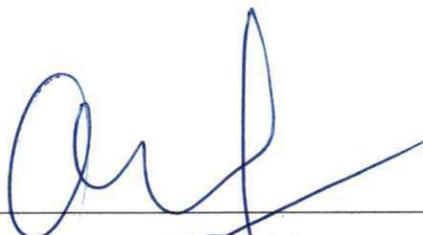
Profª Drª Líbia de Sousa Conrado Oliveira - UFCG

(Orientadora)



Profº Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Examinador Externo – (CCT/UFCG)



Profª Drª Odelsia Leonor Sánchez de Alsina

Examinadora Interna – (CCT/UFCG)

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2009

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo Adriano e aos meus
filhos Déborah e Davi, por serem
fundamentais em minha vida.*

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve presente em minha vida, iluminando o meu caminho, dando-me forças para superar os momentos difíceis.

À minha família, que esteve presente me incentivando e apoiando durante todo o tempo.

Ao meu esposo Adriano pelo apoio incondicional, pelo companheirismo, amor e paciência demonstrados, principalmente durante a realização deste trabalho.

Aos meus filhos Déborah e Davi, pela serenidade e força que vocês transmitem.

À minha orientadora Líbia de Sousa Conrado Oliveira pela orientação e compreensão prestadas na realização desse trabalho.

A Suzan Kátia, Carlos Bispo, Josefa Sandra, Daniel e a todos os amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química, pela amizade, pelos conhecimentos trocados e pela constante colaboração dispensada;

A Beatriz Cavalcanti Amorim que me apoiou nos momentos mais turbulentos deste trabalho, pela ajuda prestada durante as análises e na realização dos experimentos e, principalmente, por ter se tornado uma amiga muito importante em tão pouco tempo de convivência.

A Maricé pela dedicação ao trabalho e sempre disponível em ajudar.

Aos funcionários do Laboratório de Engenharia Química pela ajuda prestada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo Geral	4
1.1.1. Objetivos Específicos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Potencial de resíduos agroindustriais lignocelulósico para utilização como substrato microbiano	5
2.2 Caju	9
2.2.1 Generalidades e características do caju	9
2.3 Produção de enzimas por via microbiana	12
2.4 Enzimas celulolíticas	13
2.5 Exemplos de trabalhos de produção de celulase	15
2.6 Aplicação industrial das enzimas celulolíticas	19
2.7 Fermentação em estado sólido	19
2.8 Fatores que influenciam o processo	21
2.8.1 Umidade e Atividade de água	22
2.8.2 pH	25
2.8.3 Temperatura	26
2.8.4 Aeração	27
2.8.5 Microrganismo	28
2.8.5.1 Inóculo	30
2.8.5.2 Aspergillus	31
2.8.6 Substrato	33
2.8.7 Tamanho da partícula	35
2.8.8. Pré-tratamento	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
Realização do trabalho	37
3.1 Preparo do substrato	37

3.2 Caracterização da matéria-prima	38
3.2.1 Densidade aparente	39
3.2.2 pH	39
3.2.3 Distribuição Granulométrica	39
3.2.4 Umidade	39
3.2.5 Cinzas	40
3.2.6 Teor de sólidos solúveis (°Brix)	40
3.2.7 Açúcares redutores e redutores totais (AR e ART)	41
3.2.8 Pectina	41
3.2.9 Proteína total	42
3.2.10 Celulose	43
3.3 Atividade de água	43
3.4 Produção do Inóculo	44
3.5 Processo fermentativo	44
3.6 Extração da enzima	45
3.7 Determinação de atividade celulolítica	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Caracterização do resíduo seco do bagaço do caju	47
4.2 Isotermas de adsorção de umidade	51
4.3 Variáveis estudadas no processo.....	52
4.3.1 Bagaço do caju lavado	53
4.3.2 Bagaço do caju sem lavar	62
5. CONCLUSÃO	66
6. PERSPECTIVAS	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO I	88
ANEXO II	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de uma molécula de celulose	7
Figura 2 - Diversas unidades de açúcar	7
Figura 3 - Estrutura representativa de uma galactoglucomanana	8
Figura 4 - Estrutura de uma molécula de lignina	9
Figura 5 - Pedúnculo do caju	11
Figura 6 - Castanha do caju	11
Figura 7 - Micrografia eletrônica do <i>Aspergillus niger</i>	32
Figura 8 - Resíduo seco do pedúnculo do caju lavado	38
Figura 9 - Resíduo do pedúnculo do caju sem lavar	38
Figura 10 - Perfil Granulométrico do bagaço do caju lavado e sem lavar	50
Figura 11 - Isotermas de adsorção bagaço de caju lavado nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C.....	51
Figura 12 - Isotermas de adsorção bagaço de caju sem lavar nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C	52
Figura 13 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio	54
Figura 14 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 45% de umidade	56
Figura 15 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 65% de umidade	56
Figura 16 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 55% de umidade	56
Figura 17 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 69% de umidade e 1,1% de nitrogênio	56
Figura 18 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 41% de umidade e 0,75% de nitrogênio	56
Figura 19 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio com avaliação da atividade celulolítica	58

Figura 20 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio com avaliação do teor de AR	58
Figura 21 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 45% de umidade	59
Figura 22 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 65% de umidade e 0,5% de nitrogênio	59
Figura 23 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 55% de umidade	59
Figura 24 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 69% de umidade e 0,75% de nitrogênio	59
Figura 25 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 65% de umidade e 1,0% de nitrogênio	59
Figura 26 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 41% de umidade e 0,75% de nitrogênio	59
Figura 27 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio	62
Figura 28 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio com avaliação da atividade celulolítica	63
Figura 29 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio	64
Figura 30 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do pedúnculo do caju	12
Tabela 2 - Modelos matemáticos para o ajuste de isotermas	24
Tabela 3 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2^2 do tipo estrela com três repetições no ponto central	44
Tabela 4 - Caracterização físico-química do bagaço do caju lavado e sem lavar (b.s.)	47
Tabela 5 - Condições efetuadas durante o processo fermentativo para as umidades estudadas em cada experimento	55
Tabela 6 - Condições efetuadas durante o processo fermentativo para pH em cada experimento	55

NOMENCLATURA

° Brix	Percentual de sólidos solúveis
a_w	Atividade de água
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
abs	Absorbância
AR	Açúcares redutores
CCT	Centro de ciências e tecnologia
DNS	ácido 3,5 – dinitro-salicílico
FSS	Fermentação semi-sólida
N	Nitrogênio
RPM	Rotações por minuto
U/g	Unidade de atividade por grama de meio
U_i	Umidade Inicial
U	Unidade internacional
\bar{U}	Média da Umidade
UR%	Umidade relativa de equilíbrio
v/v	Volume por volume

TAVARES, Millena Barbosa Ribeiro - Estudo da produção da enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica bagaço do caju por fermentação semi-sólida utilizando o *Aspergillus niger*. Dissertação de mestrado, UFCG, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente, Campina Grande/PB, Brasil.

RESUMO - O pedúnculo do caju é um material lignocelulósico que se concentra basicamente na região Nordeste e, depois de extraído o suco é obtido o bagaço do caju. Sua composição físico-química varia em função do estado de maturação, do tamanho, da duração da colheita e de variações ambientais regionais. As enzimas celulases são utilizadas para hidrolizar celulose gerando fontes de carbono, como glicose, diretamente fermentescíveis para ser usada, por exemplo, na produção do bioetanol. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de celulase através da fermentação semi-sólida, usando como substrato o pedúnculo de caju seco e o *Aspergillus niger* CCT 0916 como microrganismo metabolizador. Para tanto, estudou-se a influência das variáveis: umidade inicial e concentração da fonte de nitrogênio, para determinar as melhores condições do processo. A temperatura de fermentação estudada foi de 30^oC durante um tempo estimado em 72 h. As metodologias utilizadas para o procedimento experimental foram as já utilizadas pelo LEB (Laboratório de Engenharia Bioquímica). Como meio de cultivo foram utilizados dois resíduos do pedúnculo de caju: resíduo lavado e resíduo sem lavar. O teor de sólidos solúveis para o lavado foi de 10,25% e 30,00% para o sem lavar. Os valores encontrados para o pH foram 4,58 para o lavado e 4,33 para o sem lavar. Para a umidade encontrou-se 5,87% e 8,22%, para o lavado e o sem lavar, respectivamente. A percentagem de celulose foi 12,75 para o resíduo lavado e 11,76 para o sem lavar. O teor de AR encontrado para o bagaço de caju lavado foi 10,02%. Durante o processo fermentativo, que foi realizado por um período de 72 horas, foram retiradas amostras periodicamente e foram analisados alguns parâmetros que caracterizam o processo como umidade do meio, pH, açúcares redutores e atividade celulolítica. A umidade não sofreu variações significativas ao longo do processo e o pH apresentou um perfil com tendência a cair ao longo das 72 horas de fermentação. Em termos de produção de celulase, utilizando o bagaço do caju lavado, os resultados da reprodutibilidade de dados nos experimentos cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio foram 55% e 0,75%, respectivamente, mostraram que, em geral, os pontos são bem reprodutivos, sendo que às 30 horas de processo obteve-se a maior produção de celulase (0,10U/mL). Para o teor de açúcares redutores (AR), nas mesmas condições, seu perfil tende a cair ao longo do processo, sendo um indício de que houve um provável consumo da fonte de carbono para produção da enzima. Os maiores valores de atividade celulolítica para o resíduo do pedúnculo do caju lavado, foram obtidos nos experimentos com 45% e 1,0% de umidade e nitrogênio, respectivamente e 55% e 1,1% de umidade e nitrogênio, respectivamente, sendo os picos de atividade de 0,15 U/mL para o primeiro, e 0,14 U/mL para o segundo. Os demais experimentos apresentaram os maiores picos de produção de celulase em 30 horas de fermentação. Comparando o processo de FSS do bagaço sem lavar com o bagaço lavado nas condições de maior atividade para o lavado, o bagaço de caju sem lavar apresentou um pico de atividade de 0,19U/mL em 7 horas de fermentação.

Palavras-chave: celulase, bagaço do caju, bioetanol, FSS.

1. INTRODUÇÃO

Um novo paradigma mundial em combustíveis e energia renováveis é a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (Bastos, 2007). Há um novo conceito de etanol, o bioetanol, que corresponde a sua produção utilizando-se como matérias-primas a biomassa lignocelulósica, provenientes de resíduos da agroindústria e culturas vegetais via processos fermentativos que são, há muito tempo, utilizados pela humanidade para a produção de bebidas alcoólicas, pães, vinagre, iogurte, queijos, entre outros, mas somente a partir do século XIX é que se descobriu que os responsáveis pela fermentação eram microrganismos, o que deu início à ciência denominada Biotecnologia, que envolve diversas áreas como Química, Biologia, Genética, Engenharia e Bioquímica, entre outras. A fermentação é uma ferramenta muito utilizada nos processos industriais e apresenta importância crescente em diversos setores da economia. Muitas empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos, tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (Borzani et al., 2001).

A produção do combustível etanol a partir de biomassa lignocelulósica está emergindo como uma das mais importantes tecnologias para a sustentabilidade da produção de combustíveis renováveis para transportes. O etanol tem uma octanagem superior a da gasolina e produz menos emissões sendo, portanto, amplamente reconhecido como um substituto e/ou aditivo para a gasolina. Devido a estas vantagens aparentes e também a ser uma alternativa renovável existente para combustíveis para transportes, existe agora um maior interesse em comercializar tecnologias para a produção de etanol de biomassa de baixo custo. A maior parte do combustível etanol produzido no mundo atualmente é proveniente da biomassa ou feculento e sacarose (melaço de cana ou suco), mas a tecnologia para produção do etanol a partir de fontes vegetais não-alimentares está se desenvolvendo rapidamente de modo que uma produção em grande escala será uma realidade nos próximos anos. A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica envolve diferentes etapas de pré-tratamento, hidrólise (sacarificação) do etanol e recuperação. A hidrólise da biomassa é essencial para a produção de açúcares fermentáveis, que são depois convertidos em etanol por ação microbiana. Os dois métodos, ou seja, hidrólise ácida e hidrólise enzimática são empregadas principalmente para hidrólise da biomassa com

diferentes rendimentos, dependendo das condições de tratamento, do tipo de biomassa e das propriedades dos agentes hidrolíticos. O primeiro é uma tecnologia madura, mas com a desvantagem da geração de resíduos perigosos e as dificuldades técnicas na recuperação do açúcar a partir do ácido. A hidrólise enzimática, porém, é mais eficiente e prossegue sob condições ambiente, sem qualquer geração de resíduos tóxicos. Este método, que está em rápido desenvolvimento, tem imensos potenciais de melhoria na eficiência e no custo. A comercialização do etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica é dificultada principalmente pelo custo proibitivo da produção de celulase (enzima usada para sacarificação) disponível atualmente. A redução no custo de celulases só pode ser alcançada através de esforços que abordem diversos aspectos da produção enzimática a partir da matéria-prima utilizada e através da melhoria de cepas microbianas usadas na produção. A utilização de matérias-primas mais baratas e rentáveis na fermentação traz como estratégia a fermentação em estado sólido, que pode melhorar o custo da produção de celulase (Ruggiero, 2002).

O tradicional processo industrial, além do produto de interesse, gera múltiplas saídas de outros materiais em forma de resíduos e emissões não incorporadas no produto final que geralmente são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Porém, nos últimos anos têm se intensificado o aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais tais como, polpa e folhas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana de açúcar, polpa de beterraba, etc. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de álcool, enzimas e ácidos orgânicos, gerando produtos de grande valor econômico. Este pensamento atende a proposta ZERI, “Zero Emissions Research Initiative”, que estabelece uma mudança de paradigmas no conjunto das atividades econômicas, particularmente dos processos de produção industrial. A estratégia da proposta ZERI, objetiva a transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos e emissões como insumos para outros produtos (Israel, 2005).

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). O cajueiro é originário do Brasil, tendo como centro de dispersão o litoral nordestino. A área ocupada com cajueiro no Brasil é estimada em

700.000ha dos quais, mais de 90% se encontra na região Nordeste e estão distribuídos nos estados do Piauí, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte.

Na região Nordeste o aproveitamento industrial do caju é feito praticamente do fruto (a castanha) para produção de castanha comestível e em pequena escala do suco e derivados do pseudofruto (**Embrapa, 2004; Globo Rural, 2005**). Segundo **Holanda & Oliveira (2001)** a quantidade desperdiçada representa um elevado potencial de uso para conversão por microrganismos. O potencial não utilizado representa um desperdício de suco extraído e do bagaço que, com suas concentrações de carboidratos, proteínas e vitamina C, apresentam potenciais energéticos, que é bastante necessário para minimizar os graves problemas da região Nordeste.

A busca de um melhor aproveitamento das culturas do pedúnculo do caju tem incentivado pesquisadores do Nordeste brasileiro na procura de maximizar a ampliação do aproveitamento dessas culturas. Com essa filosofia, busca-se utilizar as matérias-primas em escala industrial, para atender a necessidade de desenvolvimento sócio-econômico e tecnológico da região. E dentre estas possíveis inovações surge como proposta a produção de álcool etílico, por fermentação alcoólica utilizando-se como substrato as matérias-primas lignocelulósicas, que pode vir, se não substituir integralmente a tão tradicional cana-de-açúcar nas usinas, mas complementar a produção como matéria-prima em períodos de entre safra, aumentando o tempo de operação das unidades fabris (usinas) (**Rajeev et al., 2009**).

Com isso, o esforço na busca de alternativas para a produção de álcool se apresenta bastante atrativa para o setor. Endossado pela preocupação mundial, que desponta acentuadamente no sentido da busca de alternativas para tecnologias e combustíveis que sejam renováveis e que possuam um menor impacto ambiental.

Dentro dos objetivos do projeto, o aproveitamento do pedúnculo do caju (após a retirada do suco, ou seja, o bagaço) é contemplado como matéria-prima para produção da enzima celulase por fermentação semi-sólida. Essa enzima tem interesse sob o ponto de vista tecnológico e industrial, uma vez que a mesma hidrolisa as matérias lignocelulósicas (materiais indiretamente fermentescíveis) fonte para produção do bioetanol.

Na tentativa de minimizar os desperdícios na produção e industrialização do pedúnculo do caju, o Laboratório de Engenharia Bioquímica, CCT/UAEQ/UFCG, vem desenvolvendo pesquisas com a finalidade de produzir a enzima celulase a partir do

bagaço do caju e para tanto se faz necessária a extração da mesma e a determinação da sua atividade catalítica.

1.1. Objetivo Geral

Sendo o bagaço do caju um resíduo agroindustrial fibroso e que possui celulose, hemicelulose e lignina, o presente trabalho propõe estudar a produção da enzima celulase por fermentação semi-sólida, através da utilização do *Aspergillus niger* CCT 0916 da coleção da EMBRAPA TROPICAL. Essa enzima promove a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos, hidrolisando a celulose em açúcares diretamente fermentescíveis para o processo de produção de bioetanol.

1.1.1. Objetivos Específicos

- ✓ Caracterização físico-química do bagaço seco do caju, lavado e sem lavar: pH, densidade aparente, granulometria, cinzas, umidade, lignina, pectina, proteínas totais, °Brix-sólidos solúveis, ART-açúcares redutores totais, açúcares redutores-AR, celulose e isotermas de adsorção do bagaço de caju nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C;
- ✓ acompanhamento da cinética de produção de enzimas celulases, utilizando-se do bagaço de caju seco por fermentação semi-sólida e tendo o *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 como microrganismo metabolizador;
- ✓ extração da enzima e determinação da atividade celulolítica em termos de atividade com papel de filtro (FPase);
- ✓ estudar a influência da umidade inicial e da concentração da fonte de nitrogênio, para determinar as melhores faixas das condições do processo de fermentação semi-sólida na produção de celulase;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Potencial de resíduos agroindustriais lignocelulósico para utilização como substrato microbiano

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. Os órgãos fiscalizadores têm se mobilizado. Constantes revisões têm ocorrido em resoluções ligadas a resíduos, tais como a RDC 306/04, resolução da ANVISA (Brasil, 2004) e a Res 388/05 do CONAMA (Brasil, 2005) que classificam e propõem tratamentos, forma de manipulação e descarte dos resíduos de serviço da saúde. Muito se fala em Gestão Ambiental e certificação da ISO 14000, conjunto de normas que visa o desenvolvimento de atividades dos mais diversos segmentos, sem transgredir as leis ambientais vigentes. O século 21 está preocupado principalmente com o meio ambiente e a sustentabilidade do planeta.

A preocupação com o meio ambiente leva à viabilização de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. A indústria de alimentos produz uma série de resíduos com alto valor de (re) utilização. Inúmeros estudos utilizando resíduos industriais do processamento de alimentos têm sido realizados com objetivo de aproveitamento destes. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda agrega-se valor aos produtos do mercado.

O estudo dos impactos causados pelas atividades agroindustriais no Brasil sobre o meio ambiente é pouco abrangente no sentido de que é restrita, normalmente, à unidade fabril, deixando de lado outros aspectos importantes e intrínsecos às atividades agroindustriais, necessitando da implantação de um completo planejamento ambiental dessas atividades e das demais que lhe são suportes ou as complementam.

Segundo **Laufenberg et al. (2003)**, os resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Numerosas substâncias relacionadas ao processo de produção de alimentos são adequadas para separação e reciclagem.

Segundo **Abarca (2003)**, o setor agroindustrial não é reconhecido pela sociedade como um setor que afeta o meio ambiente. De acordo com este autor talvez tal fato seja devido à sociedade valorizar mais a contribuição da atividade agroindustrial na produção de alimentos sendo, entretanto, desconhecido, para a maior parte dela, a complexidade dos processos tecnológicos existentes neste tipo de atividade, bem como o montante de subprodutos poluidores que são gerados e depositados no meio ambiente.

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Segundo **Doelle (1996)** uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir de materiais lignocelulósicos resultando em múltiplos produtos, sem efluentes poluentes no solo, na água e no ar, é caracterizada como uma “tecnologia integrada”.

Estes resíduos agroindustriais são, em sua maioria, de natureza lignocelulósica (**Kerem et al.,1992**) e de acordo com **Sermanni & Porri (1989)** a utilização de material lignocelulósico para a obtenção de compostos de alto valor econômico, por biotransformação, é um dos mais interessantes campos da pesquisa biotecnológica.

Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina. O teor de nitrogênio é, geralmente, muito baixo. A proporção percentual dos componentes celulose, hemicelulose e lignina, assim como do teor de nitrogênio depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (**Rajaratnam et al., 1992**).

A Figura 1 representa esquematicamente a estrutura da celulose, que é um polissacarídeo estrutural derivado da β -glucose de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, sendo por isso um polímero de "cadeia longa". A celulose se forma através da união destes monômeros (β -glucose) através de ligações β -1,4-glicosídicas. A estrutura de uma molécula de celulose é constituída por moléculas lineares de glicose. Em termos gerais, a celulose é insolúvel e altamente cristalina caracterizada por regiões cristalinas em grande parte do seu comprimento, entrecortadas por zonas amorfas. A celulose constitui o polissacarídeo predominante nos resíduos vegetais, representando entre 30 a 60% do seu peso seco total. É o principal componente das paredes celulares, responsáveis pela sustentação vegetal, possuindo uma estrutura cristalina altamente resistente.

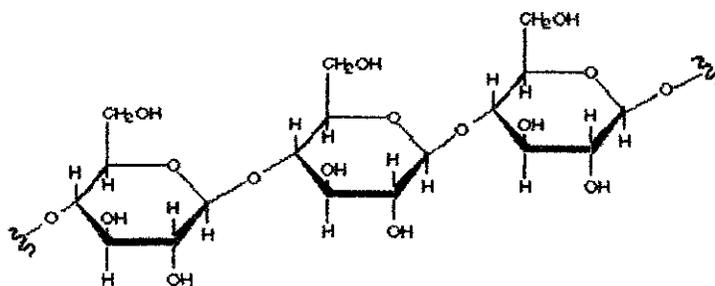


Figura 1 - Estrutura de uma molécula de celulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por duas cadeias ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores, facilmente hidrolisáveis. Representa o segundo maior componente dos resíduos lignocelulósicos, chegando até 40% do seu peso seco (Rajarithnam et al., 1992).

O termo hemiceluloses se refere a polissacarídeos de massas moleculares relativamente baixas, os quais estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas. Enquanto a celulose, como substância química, contém como unidade fundamental exclusivamente a β -D-glucose, as hemiceluloses são polímeros em cuja composição podem aparecer, condensadas em proporções variadas, diversas unidades de açúcar como apresentado na Figura 2 (Morais et al, 2005).

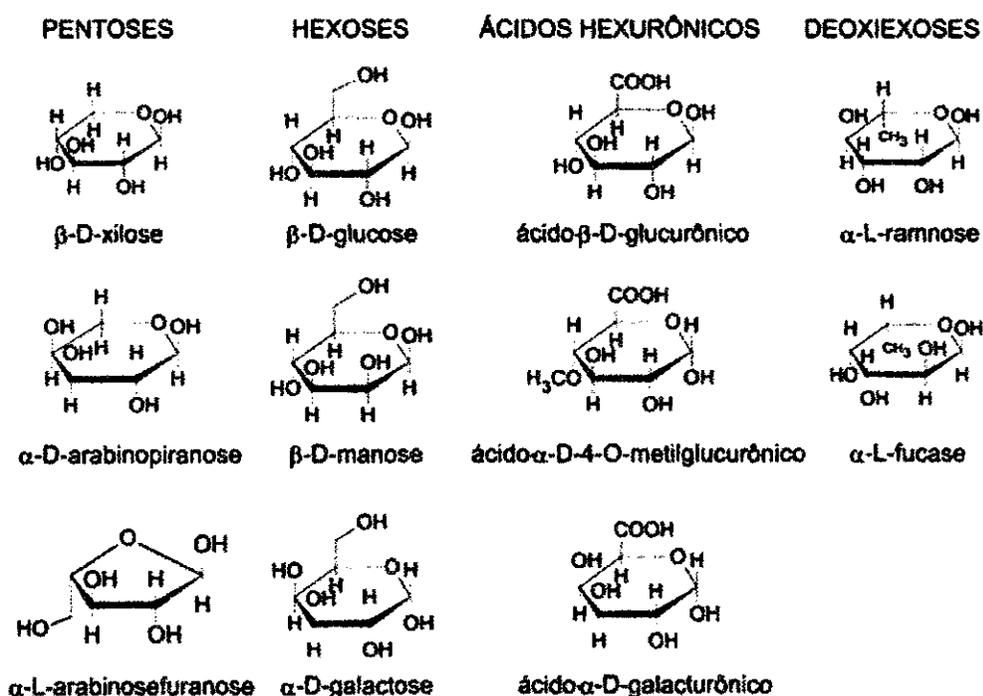


Figura 2 - Diversas unidades de açúcar

Observa-se, na Figura 2, que algumas unidades monoméricas possuem apenas cinco átomos de carbono, sendo denominadas pentoses, enquanto outras contam com seis deles, sendo, então, denominadas hexoses, gerando, assim, pentosanas (polímeros formados pela condensação de pentoses) e hexosanas (polímeros formados pela condensação de hexoses), respectivamente.

Isoladas das madeiras, as hemiceluloses apresentam-se como misturas complexas de polissacarídeos, sendo os mais importantes as glucoxilanas, arabinoglucoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas. Portanto, o termo hemiceluloses não designa um composto químico, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo, cada componente, propriedades peculiares. O teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses de madeira variam com a espécie e, provavelmente, também de árvore para árvore. Na Figura 3, apresenta-se a estrutura representativa de uma galactoglucomanana, uma das principais hemiceluloses encontradas em madeiras de coníferas (Morais et al, 2005).

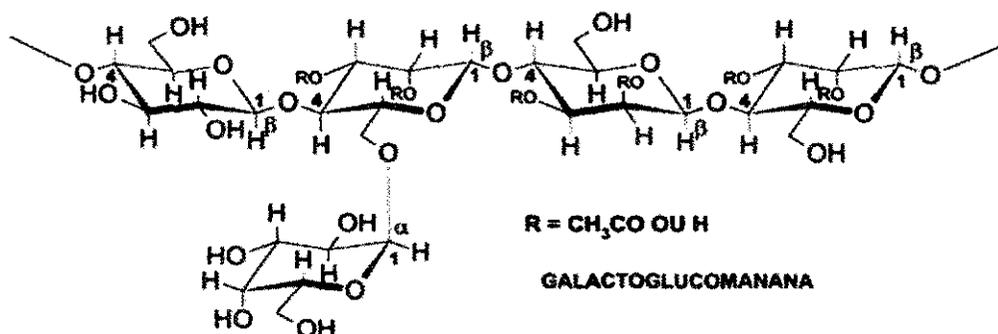


Figura 3 - Estrutura representativa de uma galactoglucomanana

A lignina é responsável, em parte, pela resistência mecânica das madeiras e funciona também como suporte para dispersão dos metabólitos excretados pelas células. Ela pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% do seu peso seco. Juntamente com a hemicelulose, envolve as fibras celulósicas, desempenhando as funções de cimentante e preservadora (Pauli, 1997). Esta ação é possível devido à estrutura tridimensional deste heteropolissacarídeo de fenilpropano, onde não existe ligação repetida na construção dos blocos monoméricos. Desta forma a lignina forma uma barreira física que dificulta a atividade de inúmeros organismos produtores de enzimas celulolíticas, limitando os sítios de ataques enzimáticos e impedindo a entrada de enzimas de maior peso

molecular, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, restringindo o ataque à superfície externa (Rajaratnam et al., 1992). A Figura 4 mostra a estrutura de uma molécula de lignina.

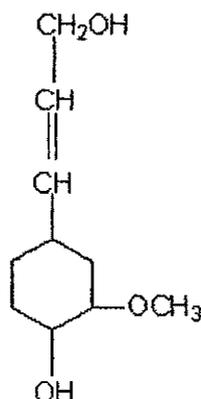


Figura 4 - Estrutura de uma molécula de lignina.

Fonte: Disponível em: <http://cnaturplas.dnsalias.com> Acesso em: 08 de fevereiro de 2009.

Dos diversos resíduos agroindustriais com potencialidade para serem utilizados em bioprocessos, o pedúnculo do caju, que possui alta concentração em material lignocelulósico (Tonini, 2004), ainda é pouco estudada.

2.2 Caju

2.2.1 Generalidades e características do caju

O cajueiro (*Anacardium Orcidentalle Lineu*) pertence à família *Anacardiaceae* e é uma planta perene, nativa do Brasil. Sua exploração econômica é uma atividade relativamente nova, dos anos 1950 e 1960. Ele foi aos poucos se espalhando em todo o território nacional. Posteriormente os portugueses levaram o cajueiro para as Índias, iniciando-se sua disseminação pelo mundo, inclusive para a África, espalhou-se pelas costas leste e oeste deste continente e lá encontrou condições muito favoráveis para seu desenvolvimento. Pode-se afirmar que nos dias atuais a área de ocorrência dos cajueiros esta compreendida entre as latitudes de 30° norte e 31° sul, vegetando em estado natural ou sob cultivo em diversos países (Assessoria de Comunicação FBB, 2007).

O cajueiro permite o uso de diversas partes da planta, a raiz do cajueiro pode ser usada como purgante, ou mesmo como suporte para facilitar o transporte de mercadorias pelos trabalhadores. A folha serve como curtume, tem um alto teor de tanino, pode também ser usada em redes de pesca, devido sua alta resistência e como medicinal na terapêutica das avitaminoses. As cascas, também ricas em tanino, podem

ser usadas para fazer chás, contra hemorragias, diarreia e úlceras. Quando cozidas, as cascas liberam uma substância tintorial avermelhada-escura, muito utilizada pelos pescadores para tingir suas roupas, redes e linhas de pesca, com isto adquirem maior durabilidade.

O caju é, entre as frutas comestíveis cultivadas, uma das que apresentam maior teor de vitamina C (ácido ascórbico), a castanha pode ser consumida de diversas formas, seu sabor e valor nutricional são reconhecidos. Além disto, o caju possui teores de açúcares, taninos e minerais, entre eles o ferro, cálcio e fósforo. Segundo **Ventura & Lima (1959)**, o caju possui ainda 14 tipos de aminoácidos, com maior presença da alanina, valina e leucina, segue-se ainda a prolina, triptofano e o ácido glutâmico. O caju tem, portanto, uma importância medicinal, principalmente do sistema nervoso, é um tônico de primeira qualidade e ainda antientérico, diurético e levemente depurador.

A árvore do cajueiro pode chegar a atingir cerca de 10 m de altura, apresentando uma copa proporcional ao seu tamanho, e suas folhas são rosas quando jovens e verdes posteriormente. Normalmente, o cajueiro encontra condições ideais de cultivo no litoral do Nordeste, preferindo um solo seco devendo seu plantio ser realizado nas estações chuvosas. A planta se desenvolve em climas tropicais e subtropicais.

O caju é a segunda fruta com maior área plantada no Brasil, ocupando uma área de 704 mil hectares, perdendo da laranja, que ocupa mais de 803 mil hectares e ganhando da banana, que ocupa aproximadamente 505 mil hectares.

Estudos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) mostram que cada quilo de castanha corresponde a 9 quilos de polpa. Assim, a estimativa da produção da polpa, em 2007, foi de 2,3 milhões de toneladas. Calcula-se que é utilizado apenas de 15 a 20% da polpa na fabricação de doces, sucos, vinhos ou consumo *in natura*, sendo que 80% é desperdiçado, ou seja, 1,9 milhões de toneladas são resíduos tratados como lixo. Depois de extraído o suco, sobra o bagaço do caju, muito rico em celulose.

Uma curiosidade a respeito do caju é que aquilo que chamamos de fruta é na verdade o pedúnculo (Figura 5), ou seja, o talo que prende a fruta ao galho e que, estranhamente, no caju é carnudo, saboroso e aromático. Esta parte suculenta e refrescante é o pseudofruto do cajueiro chamado cientificamente pedúnculo floral e tem incontáveis usos e, embora alcance pouco valor no mercado externo, é muito apreciada no Brasil (**Vitor Hugo de Oliveira/EMBRAPA, 2008**). O fruto propriamente dito é o que nós chamamos de castanha de caju (Figura 6), cuja produção é a principal

finalidade das lavouras. O fruto do cajueiro (a castanha) é definido como um aquênio reniforme pendente do pedúnculo floral. A castanha é constituída basicamente de três partes: a casca, a película e a amêndoa (Faria, 1994).



Figura 5 - Pedúnculo do caju



Figura 6 - Castanha do caju

São conhecidas cerca de vinte variedades de caju, classificadas segundo a consistência da polpa, o formato, o paladar e a cor da fruta (amarela, vermelha ou roxo-amarela, dependendo da variedade).

A composição físico-química do pedúnculo varia largamente em função da variedade, do estado de maturação, do tamanho, da duração da colheita e de variações ambientais regionais, entre outros fatores. Na Tabela 1, mostrada a seguir, já se observa a composição química constituinte do pseudofruto do caju, o pedúnculo suculento, o caju. Constam na Tabela 1 os componentes com os seus respectivos valores médios.

Tabela 1 - Composição química do pedúnculo do caju

Discriminação	Valores médios
Umidade (%)	86
°brix	11
pH	4,2
Açúcares redutores (%)	7,9
Açúcares totais (%)	8,4
Acidez total (%)	0,36
Ácido ascórbico (mg/100g)	204
Taninos (%)	0,35
Cálcio (mg/100g)	14,5
Fósforo (mg/100g)	33
Ferro (mg/100g)	0,36
Proteínas (%)	0,74
Vitamina A (U.I.)	11,32
Cinzas (%)	0,38

Fonte: Vitor Hugo de Oliveira/EMBRAPA, 2008

Entre as plantas tropicais do nosso país o caju é o que apresenta melhores condições para a industrialização fornecendo matéria-prima a vários tipos de indústria.

Na produção do suco de caju, mediante prensagem dos pedúnculos, gera como subproduto o seu bagaço que normalmente é descartado podendo ser utilizado em processos bioquímicos de produção de enzimas celulolíticas.

Sob o ponto de vista social, a caju-cultura ainda se caracteriza como uma das principais atividades da população rural. Em quase sua totalidade ela é cultivada por pequenos produtores, deste modo, a produção acontece na época da seca, justamente no período de entressafra das demais espécies cultivadas na região.

2.3 Produção de enzimas por via microbiana

O mercado mundial de enzimas é grande, sendo que as mesmas são produzidas por microrganismos que foram selecionados da natureza e, geralmente, modificados geneticamente para uma produção mais eficiente e para atuar em processos que possam ser realizados em temperaturas mais elevadas ou em outras condições de estresse (Serafini et al., 2001).

Para a produção industrial de enzimas por via microbiana, os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples e de baixo custo; e o extrato enzimático obtido deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos microrganismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (Fellows, 1994).

Após a fermentação, as enzimas são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que neste caso a recuperação da enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular, que pode ser extraída por precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração (Pessoa et al., 2003).

2.4 Enzimas celulolíticas

As enzimas conhecidas como celulases hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato. A conversão enzimática de celulose em glicose é uma árdua tarefa, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Adicionalmente as fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz à acessibilidade as enzimas celulolíticas (Beguin, 1990).

Celulase é um sistema enzimático que quebra celulose, o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Este sistema enzimático é o responsável pela hidrólise da celulose e sua produção é o passo mais importante na produção econômica de bioetanol. Os principais obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção (Md. et al., 2008).

As celulases são algumas vezes descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica. De acordo com Gilkes et al. (1991), este grupo reúne:

Endoglicanases (EC 3.2.1.4), são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D- glicanas que contenham ligações β -1,3. As endoglicanases são também conhecidas

como celulases, endo β -1,4 glicanases e carboximetilcelulases. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel (celulose cristalina), β glicana e xilana.

Celulose beta-1,4-celobiosidase (EC 3.2.1.91), conhecida também como exoglicanase, celobiohidrolase, β -1,4 celobiohidrolase ou Avicelase. Catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias.

Beta-glicosidase (EC 3.2.1.21), conhecida como gentobiase, celobiase e amígdalase. Catalisa a hidrólise de resíduos β -D-glicose terminais não redutores, liberando β -D-glicose. Apresenta ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos e β -D-fucosídeos.

Beta-1,3(4)-endo-glicanase (EC 3.2.1.6), conhecida também como β -1,4-endoglicanase, β -1,3 endoglicanase ou laminarinase. Esta enzima catalisa a hidrólise interna de ligações β -1,3 ou β -1,4 em da glicose D-glicanas. Tem como substrato a laminarina, lichenina e D-glicana. É uma enzima diferente de glicana β -1,3-endo-Dglicosidase (EC 3.2.1.39), embora ambas hidrolisem o substrato laminarina.

Celulases produzidas a partir de fungos são enzimas bem estudadas e são utilizadas em diversos processos industriais. Grande parte do conhecimento da despolimerização enzimática de material celulósico veio de sistema *Trichoderma* celulase. Espécies de *Trichoderma* podem produzir quantidades substanciais de endoglucanase e exoglucanase, mas muito baixos níveis de β -glucosidase. Esta deficiência exige investigação de fungos com potencial celulolítico, portanto, a atenção foi recentemente desviada para outros microrganismos incluindo os membros do gênero *Aspergillus*.

Em uma escala comercial, a conversão da biomassa celulósica requer o uso de celulases que torna o processo oneroso. Assim, para a produção de celulase, uma vasta gama de microrganismos que tem sido estudado extensivamente, portanto, a triagem e caracterização de novos isolados são essenciais para tornar o processo de produção da enzima viável.

Muitos organismos produzem celulases para executar celuloses necessárias para o crescimento e formação do produto em condições adequadas. Estudos sobre parâmetros para obter o máximo rendimento das enzimas celulase por fermentação parecem ser necessários. Temperatura e pH são considerados como as mais importantes

funções ao lado da utilização de indutores adequados a este respeito (Muhammad et al., 2009).

2.5 Exemplos de trabalhos de produção de celulase

Md. et al., (2008) estudaram a atividade celulolítica avaliada em fermentação em estado sólido utilizando o fruto da palma (EFB) em erlenmeyers. A maior atividade de celulase $8,2 \pm 0,8$ FPA/g foi observada no quarto dia de fermentação. Os resultados indicaram que a atividade celulolítica começou a diminuir após 4 dias e continuou um declínio gradual até o último dia de fermentação (15 dias). A diminuição na atividade de celulase pode ser devido ao efeito cumulativo de oligossacáridos especialmente celobiose, um dímero de glicose, que é conhecido por inibir tanto endoglucanase como β -glucosidase. Eles citam que outros estudos mostraram que celulases produzidas a partir de fungos foram encontrados com 2,314 U/g (FPase) por *T. reesei* MCG77 usando farelo de arroz, 25,6 FPase/g por *T. reesei* RUT C-30 utilizando bagaço de cana, 1,43 UI/mL (FPase) por *Phanerochaete chrysosporium* utilizando palha de arroz.

Gong & Tsao (1975) observaram que indutores da síntese de celulases incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, sofrorose e lactose. A resposta das células fúngicas aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de enzima celulolítica têm duas funções, ou seja, podem servir como fonte de carbono para o crescimento celular, ou mesmo como indutores da síntese enzimática.

Segundo Menezes et al. (1976) a atividade celulolítica de linhagens fúngicas, como *Aspergillus niger*, desenvolvidas em bagaço de cana foi superior às cultivadas em carboximetil celulose e papel de filtro. Sugeriram que estas linhagens produzem a fração exoglicanase, uma vez que o bagaço é uma celulose *in natura* e não havia recebido qualquer tratamento químico, o que exigiria ação da fração pré-hidrolítica da exoglicanase antes de ser hidrolisada pelas outras frações endoglicanase e glicosidase.

Segundo Lowe et al. (1987) atividades celulolíticas e xilanolíticas, com *Neocallimastix frontalis*, têm sido obtidas *in vitro*, utilizando-se papel de filtro e celulose microcristalina como substrato. TRIVEDI & RAO citados por Vitti (1988), observaram que açúcares como glicose, sacarose, maltose e arabinose não induziram a formação de celulase total por *Aspergillus fumigatus*. Altos níveis da enzima celulolítica foram observados quando celulose insolúvel foi usada como fonte de carbono.

JOGLEKAR & KARANTH, citados por Vitti (1988), verificaram que o desenvolvimento de *Penicillium funiculosum* UV49 em algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetil celulose foi pequeno e a atividade celulolítica baixa. Porém DEKKER, citado por Vitti (1988), observou que as celuloses que não são facilmente hidrolisadas pelas celulasas, como Avicel, algodão, celulose em pó e carboximetil celulose parecem ser os melhores substratos para induzir a formação de celulase.

Menezes et al. (1991) obtiveram valores próximos a 0,25 UI/mL de celulase total de *Aspergillus niger*, quando utilizaram bagaço de cana prétratado com solução de hidróxido de sódio 4%, como fonte de carbono.

Milagres et al. (1994), a partir de *Thermoascus aurantiacus*, um fungo termófilo, obtiveram, por fermentação submersa em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, atividades enzimáticas de 4,2, 3,3, 98 UI/mL para endoglicanase, exoglicanase e xilanase, respectivamente.

Costa et al. (1997) utilizaram substratos alternativos de baixo custo, ou seja, soja, milho e arroz na produção de enzimas, porém estes substratos não produziram resultados satisfatórios na produção de celulase de *A. oryzae* IMI.

Segundo Gupta & Madamwar (1997), resíduos lignocelulósicos disponíveis em abundância podem ser excelentes substratos para a produção enzimática por fermentação em estado sólido. Eles utilizaram uma cultura mista de *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* desenvolvida em bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de cálcio a 2% e observaram que foi favorável à produção de celulase e glicosidase, após 8 dias de fermentação

Abdelnasser et al. (1997) testaram três fungos: *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus versicolor* NRRL 6102, quanto às suas capacidades de produzir xilanase e celulase, em resíduos agrícolas (bagaço de cana tratado e não tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó). Espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana tratado promoveram maior indução enzimática.

Segundo Umikalson et al. (1997) uma linhagem de *Chaetomium globosum* apresentou bom crescimento e substancial quantidade de celulase em fibras deslignificadas de palma, produzindo extrato celulolítico cujas atividades de celulase total, endoglicanase e glicosidase foram 1,4, 30,8 e 9,8 UI/mL, respectivamente.

Para Vlaev et al. (1997) a máxima produção de celulase total foi percebida com 72 horas de fermentação e de xilanase com 96 horas, obtendo-se menor atividade em

fibras de sabugo de milho do que em Avicel, possivelmente, devido à presença de inibidores. A atividade de xilanase na fibra de espiga de milho alcançou 80% do valor obtido com Avicel e a atividade de celulase total alcançou somente 30% de valor medido com Avicel, possivelmente, devido ao maior teor de lignina naquele substrato.

Segundo **Rajoka & Malik (1997)** a produção média de celulase total por *Cellulomonas biazotea* foi significativamente maior em meios contendo celulose ou fibras de grama do que nos meios contendo fibra de algodão, Sigmacell100 e carboximetil celulose, atingindo até 18 UI/mL/h a 30°C. Após quinze dias de incubação de *Pleurotus sajor caju*, níveis de atividade de celulase total e glicosidase iguais a 3,7 UI/g e 0,6 UI/g, respectivamente, foram observados por **Bisaria et al. (1997)** em palha de arroz.

Bagaço de cana, em cultura mista de *Trichoderma reesei* LMUC4 e *Aspergillus phoenicis*, induziu a produção de celulase total atingindo 13,4 UI/g, após 120 horas de incubação a 30°C (**Gutierrez-Correa & Tengerdy, 1997**).

Fernandes-Salomão et al. (1996) afirmaram que a maioria das enzimas comerciais são obtidas por fermentação submersa, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptados, os rendimentos são maiores e os custos e riscos de contaminação menores. Por outro lado, **Draetta & Lobo Filho (1980)** e **Neder (1992)** observaram que a quantidade e propriedades das celulases produzidas por microrganismos dependem das condições de cultivo, sendo que os fatores ambientais influem na produção de celulases e xilanase de diversos fungos.

Aguiar-Menezes (2000) avaliaram a produção de celulases e xilanase de *Aspergillus niger* IZ9, crescido sobre bagaço de cana, quimicamente tratado, como substrato. Os tratamentos foram: solução de hidróxido de sódio a 4%, e solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico p.a. e vapor. A produção das enzimas celulolíticas (celulase total, endoglicanase e glicosidase) e xilanase foi observada nos bagaços tratados e não-tratado. O tratamento com solução de hidróxido de sódio a 4% promoveu maior indução de síntese da maioria das enzimas, com exceção de glicosidase, a qual apresentou produção semelhante para os bagaços tratados quimicamente.

Rajeev et al. (2009) estudando a produção da enzima celulase empregando *T. reesei* RUT C30 em farelo de trigo, quimicamente tratado, como substrato, demonstraram que a celulase produzida através SSF por fungos podem ser utilizados

para hidrólise da biomassa com grande eficiência, uma vez que obtiveram níveis apreciáveis de atividade de endoglucanase (0,45 U/mL) através do método CMCase.

No estudo feito por **Muhammad et al., (2009)**, é relatada a cinética de produção de uma celulase autógena utilizando a cepa de *Aspergillus niger* MS82, por fermentação submersa, bem como por fermentação em estado sólido utilizando materiais lignocelulósicos. Os parâmetros de formação do produto endoglucanase e β -glucosidase (QP + Yp / s) indicam que *A. niger* MS82 é capaz de produzir moderados a altos níveis de ambos (endoglucanase e β -glucosidase) quando cultivada em diferentes substratos naturais que contêm carbono, por exemplo, gramíneas, sabugo de milho, bagaços tratados. A maior produção de celulase foi observada em pH 4,0 a 35°C, sob condições submersas. Crescimento e produção enzimática foi afetada por variações na temperatura e pH. Neste estudo, o *A. niger* MS82 produziu altos níveis de celulasas (0,43IU/mL) em gramíneas, em comparação com outros materiais naturais lignocelulósicos.

Juhasz (2005) relataram sobre os níveis mais elevados de endoglucanase e β -glucosidase de estirpe de *Trichoderma reesei* Rut C30 quando cultivada em materiais lignocelulósicos após sete dias. Outros estudos com *Trichoderma viride* e *Penicillium janthinellum* revelaram os níveis mais elevados de β -glucosidase e xilanase quando bagaço foi utilizado em comparação com celulose purificada, porém menor rendimento de FPase foi anotado no mesmo suporte.

Victor et al. (2003) obtiveram 0,0743, 0,0573 e 0,0502 UI/mL de celulase dentro de 12h de fermentação quando serragem, bagaço de cana e sabugo de milho, respectivamente, foram utilizadas como substratos a partir de uma cepa de *Aspergillus flavus*.

Krisztina et al. (2008), estudando sobre a preparação e seleção de novos celulolíticos por cepa *Trichoderma atroviride* mutante, para a produção de celulasas e β -glucosidases, observaram que a atividade celulolítica utilizando *T. reesei* Rut C30 aumentou continuamente durante a fermentação, atingindo o máximo em torno de 0,55 FPU/mL (método FPase). Cepas mutantes produziram cerca de 0,45-0,6 FPU/mL, e atingiram os seus máximos após 2-3 dias de fermentação, enquanto que a cepa do tipo selvagem produziu apenas 0,25 FPU/mL. *T. reesei* Rut C30 rendeu níveis muito baixos de β -glucosidase (<0,1 UI/ml), enquanto cepas mutantes produziram 4,5-8 UI/mL β -glucosidase já após 3 dias de fermentação. A atividade da endoglucanase das cepas mutantes foram um pouco maior (~160-180 EG/mL) do que a de *Rut C30* (~130 EG/mL).

2.6 Aplicação industrial das enzimas celulolíticas

As celulases têm uma ampla variedade de aplicações industriais. São utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal (**Bhat et al., 1997**).

A partir de 1980, as celulases foram introduzidas na indústria têxtil e de detergentes, passando a ser um importante componente do mercado mundial de enzimas, vêm sendo usadas também, muito eficientemente em detergentes enzimáticos biodegradáveis (**Mitidieri et al., 2002**). As celulases estão sendo produzidas comercialmente em cultivos submersos, contendo, como fonte de carbono e de indução, a celulose (**Bitencourt et al., 2002**).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja, do Agar, na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (**Orberg, 1981**).

Atualmente, tem sido estudada a produção de enzimas como a celulase para ser utilizada em processos de conversão de celulose em glicose para produção de bioetanol secundário.

2.7 Fermentação em estado sólido

A fermentação do ponto de vista bioquímico é um termo geral que denota a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos para diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP (**Lehninger et al., 2002**). É um processo comumente desenvolvido por microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) cujo desempenho depende muito da composição do meio de cultura onde são colocados (**Schmidell et al., 2001**), pois cada ser vivo responde de maneira única ao ambiente, usando mecanismos físicos ou químicos para a formação do produto desejado (**Cooney, 1981**).

Fermentação semi sólida, fermentação de substrato sólido, fermentação em estado sólido, ou simplesmente FSS é o processo em que os microrganismos crescem

sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde o conteúdo de líquido ligado a ela está a um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das células sem exceder à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida, ou seja, é o processo no qual microrganismos crescem sobre materiais sólidos, em ausência “ou quase ausência” de água livre (Del Bianchi et al., 2001).

As necessidades da FSS são satisfeitas com menor infra-estrutura e recursos humanos qualificados relativamente menores além de ser capaz de utilizar matérias-primas mais baratas para a produção enzimática. Todas estas vantagens aumentam a economia deste tipo de fermentação para a produção da enzima. FSS também produz um produto mais concentrado, o que no caso de produção de bioetanol, é muito vantajoso (Rajeev et al., 2009).

A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos); 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes.

A ocorrência da fermentação em estado sólido é mais antiga que o próprio homem, sendo, portanto, muito difícil precisar o início desta prática pela atividade humana. Sabe-se, contudo, que várias formas de alimentos utilizando esse processo microbiano fazem parte da dieta de diversos povos há muitos séculos, como por exemplo, na produção de pão desde 2600 a.C. pelos egípcios; na produção de molho de soja na China em 3000 a.C.; na maturação de queijos por fungos em 1000 a.C.; na produção de álcool etílico a partir de milho entre 1937 - 1949 (Araújo, 2004).

Empregado primeiramente em países do Oriente, na elaboração de alimentos, e posteriormente na Europa e América.

Até a metade deste século, para o caso de fermentação semi-sólida, as pesquisas em torno da produção de enzimas microbianas. Porém, para agilizar a produção de penicilina, durante o período da Segunda Guerra Mundial, houve a opção de desenvolver os processos que envolviam a fermentação submersa em tanques profundos, negligenciando os processos em estado sólido.

No Japão, contudo, o processo tradicional, que era realizado em bandejas de madeira ou bambu, foi sendo aperfeiçoado. Projetaram-se incubadoras automatizadas com inoculação, controle das condições ambientais, agitação controlada do meio e recuperação do produto final, utilizando-se também linhagens mutantes melhoradas. Esses fatos conduziram ao Japão à obtenção de uma tecnologia cada vez mais avançada, em termos de produção por fermentação em estado sólido.

Nos países do Ocidente, nos dias de hoje, diversos estudos estão sendo realizados utilizando-se substrato sólido, porém, em níveis industriais, o processo submerso continua sendo o principal sistema de geração de produtos obtidos via fermentação, sendo muito pouco o número de empresas que empregam a FSS para estes fins.

Embora a FSS tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de biorremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, enriquecimento protéico de alimentos fermentados, pré-digestões de rações animais e variações dos tradicionais alimentos fermentados. De uma forma geral, a aplicação comercial dos processos de fermentação em estado sólido pode ser dividida em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustriais; 2) aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados.

2.8 Fatores que influenciam o processo

Segundo **Gutierrez et al. (1997)** todos os processos de fermentação em estado sólido, necessitam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matéria-prima ou substrato, escolha de um microrganismo específico e controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita .

Os principais fatores que afetam a síntese microbiana de enzimas em um sistema de FSS incluem: seleção de um substrato satisfatório e microrganismo; pré-tratamento do substrato; tamanho de partícula (espaço inter-partícula e área superficial) do substrato; umidade e atividade de água (a_w) do substrato; temperatura e pH da fermentação; período de cultivo; manutenção de uniformidade no ambiente do sistema em FSS, taxa de consumo de oxigênio (**Pandey et al., 1999**).

Segundo **Del Bianchi et al., (2001)** e **Pandey et al., (2001)**, o controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes.

2.8.1 Umidade e Atividade de água

O teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influencia o sucesso de uma fermentação em estado sólido.

Para **Murthy et al. (1993)**, o teor de umidade inicial é um dos fatores que mais afetam o crescimento microbiano e a formação de produto, pelo fato de determinar a quantidade de água inicial disponível para o microrganismo e por fazer com que o substrato se dilate, facilitando assim, a penetração do micélio para a utilização do substrato.

A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter ao longo da fermentação.

Um substrato apropriadamente umedecido deve ter um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e transferência de massa de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas devem existir canais que permitam a difusão de gases e a dissipação de calor.

Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo de porosidade do substrato e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e conseqüentemente decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, principalmente a bacteriana (**Losane et al., 1985**). Para níveis de umidade menores que o necessitado, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um crescimento do microrganismo menor do que o possível e esperado e, conseqüentemente, com menor produção do produto desejado, lembrando que, a um teor de umidade abaixo de 12%, não há desenvolvimento microbiano.

O teor de umidade na FSS pode variar entre 18 e 85%, sendo ele estipulado em função do poder de absorção do substrato. A umidade ótima para o cultivo do microrganismo em FSS é dependente da capacidade do substrato em reter água. Por exemplo, o nível de umidade ótimo para o cultivo de *Aspergillus niger* em arroz é de 40%, entretanto, para polpa de café é de 80%. O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água do meio em lugar da umidade do substrato sólido (**Doelle, 1996**).

A atividade de água do meio é o parâmetro que fornece a quantidade de água não ligada viável à disposição dos microrganismos. Ela é definida como a razão entre a

pressão de equilíbrio de vapor do substrato em relação à água pura, à mesma temperatura e é definida de acordo com a expressão a seguir (Ramana et al., 1993).

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

Onde:

a_w = atividade de água

P = pressão de vapor da água contida na solução ou no alimento

P_0 = pressão de vapor da água pura, a uma dada temperatura

A atividade de água está relacionada à quantidade de água disponível para o desenvolvimento do microrganismo (água livre). O teor de água do meio (umidade) revela a concentração de água existente em determinado material, sendo expresso normalmente em termos percentuais.

Assim, cada microrganismo tem um nível de a_w mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas. Em termos gerais, por exemplo, os fungos possuem uma atividade de água mínima de 0,7. No caso do *Aspergillus niger*, a quantidade mínima de atividade de água necessária a sua sobrevivência é 0,77 (Afonso Junior et al., 2003); Leitão (1997).

O estudo da atividade de água pode ser feito através de isotermas de sorção (dessorção e adsorção), que permitem a determinação do valor da monocamada de água ligada no substrato. Estudos realizados por pesquisadores afirmam que não se deve retirar água em quantidade inferior a monocamada, por este ser o limite abaixo do qual se inicia uma série de reações químicas indesejáveis no substrato.

Segundo Fennema (1996), as isotermas de sorção podem ser representadas graficamente relacionando a umidade de equilíbrio expressa em massa de água por unidade de massa de matéria seca com sua atividade de água a temperatura constante. As isotermas podem ser de adsorção, onde o material passa pelo processo de umedecimento, ou de dessorção, processo pelo qual ocorre a secagem do material.

O controle da umidade na fermentação semi-sólida pode ser utilizado para modificar a produção e excreção de metabólitos (Pandey, 1992). O metabolismo dos microrganismos é fortemente influenciado pelas condições de atividade de água e

através do seu controle, pode-se regular a fermentação e formar condições favoráveis para a biossíntese do produto desejado (Pandey et al., 2001).

Existem diversas equações disponíveis na literatura que descrevem a relação entre a atividade de água e o conteúdo de umidade a uma determinada temperatura em alimentos, então, com o objetivo de prever o comportamento das isotermas, foram propostos por vários autores diversos modelos de ajuste de isotermas de sorção, que são úteis no conhecimento das características do produto. Para o ajuste dos dados experimentais das isotermas de sorção, é necessário utilizar modelos matemáticos e fazer a correspondência entre o teor de umidade em equilíbrio do produto analisado (X_{eq}) e a atividade de água (a_w).

Apesar de suas limitações, com alcance restrito de atividade de água (0,3 – 0,4) (Timmermann et al., 2001), o modelo de Brunauer, Emmett and Teller (BET), (Tabela 2), é ainda usado para o cálculo do valor da umidade na monocamada por ser recomendada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) (Timmermann, 2003). O modelo de Guggenheim, Anderson e de Boer (GAB), (Tabela 2) é considerado adequado para representar os dados experimentais na faixa de atividade de água (0,1 – 0,9) de interesse mais prático em alimentos (Iglesias & Chirife, 1995).

Tabela 2- Modelos matemáticos para o ajuste de isotermas

Modelos	Equação
BET	$XE = \frac{X_M \times C_B \times a_w}{(1 - a_w)} \times \left[\frac{1 - (n+1) \times (a_w)^n \times n \times (a_w)^{n+1}}{1 - (1 - C_B) \times a_w - C_B \times (a_w)^{n+1}} \right] \quad (1)$
GAB	$XE = \frac{X_M \times C \times K \times a_w}{(1 - K \times a_w) \times (1 - K \times a_w + C \times K \times a_w)} \quad (2)$

Em que:

XE – umidade de equilíbrio (base seca)

a_w – atividade de água

X_M – umidade na monocamada molecular

C_B – constante de BET

C – constante relacionada ao calor de sorção da camada molecular

K – fator de correção das propriedades das moléculas na multicamada

n – número de camadas moleculares

2.8.2 pH

O controle do pH durante a FSS, embora este seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e à consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (Losane et al., 1985).

O pH é um fator importante em qualquer processo biológico, havendo valores mínimo, ótimo e máximo de pH para o desenvolvimento de cada microrganismo (Perazzo Neto, 1999). De acordo com Franco et al. (2001), o pH em torno da neutralidade (entre 6,5 e 7,5) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos. Ainda comenta que os bolores podem se multiplicar em valores de pH mais baixos que as leveduras, sendo estas mais tolerantes que as bactérias a valores baixos de pH, onde os valores de pH ótimo para a multiplicação de *Aspergillus niger* é entre 3 e 6.

O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do microrganismo. Quando ácidos orgânicos são secretados, como ácidos acético ou láctico, causam o decréscimo do pH. Entretanto, o consumo destes ácidos quando presente no meio causa o aumento do pH. A utilização de fonte de nitrogênio causa variação de pH. Com sais de amônia o pH geralmente decresce durante o crescimento celular, devido a formação do íon hidrogênio durante o consumo da amônia. Quando nitrato serve de fonte de nitrogênio o pH tende a subir (Doelle, 1996).

Muhammad et al., (2009) observaram que o maior pico de endoglucanase foi obtido quando *A. niger* MS82 foi cultivado em 30 e 35°C com um pH inicial do meio igual a 4. A produção da enzima diminuiu drasticamente com o pH igual a 5 e se manteve aproximadamente constante até 7. O pico de endoglucanase diminuiu ligeiramente quando a temperatura de incubação foi de 25°C; no entanto, o nível da enzima continuou a diminuir com o aumento do pH do meio. Um aumento na temperatura de incubação para 40°C afetou drasticamente a produção de endoglucanase em todos os pH. Já para a β -glucosidase, os níveis mais elevados foram obtidos em 25°C e pH 4, e diminuiu drasticamente com um aumento do pH do meio para 5, continuando a diminuir com o aumento do pH para 7. Houve uma ligeira redução na taxa de produção, quando a temperatura de incubação foi de 30°C e 35°C. A produção de β -glucosidase foi drasticamente afetada à 40°C e continuou a diminuir com um aumento no pH e tornou-se insignificante com pH 7.

Xiong et. al. (2004) relataram que houve uma correlação entre o pH inicial do meio e picos de celulase por *Trichoderma reesei* Rut C-30. Foi relatado que *Trichoderma reesei* Rut C-30 apresentou maior produção de celulases, quando o pH do meio contendo lactose foi ajustado para 4,0-4,5. Este estudo sugere também que o pH ácido (4,0) do meio induz a produção de celulases.

2.8.3 Temperatura

A temperatura afeta diretamente o crescimento microbiano e a formação de produto.

As atividades metabólicas dos microrganismos e a altura da camada do substrato podem produzir uma grande quantidade de calor durante o processo de fermentação levando a um aumento de temperatura e prejudicando o processo. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos e a formação de produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada. Isso pode ser efetuado com a introdução de ar comprimido através do meio de cultura, com o controle da temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, ou pelo sistema de camisas de refrigeração em torno do fermentador com circulação de água refrigerante (Losane et al., 1985).

Remover calor por evaporação é o método mais eficiente e pode remover 80% do calor gerado. No entanto, a perda de umidade nesta escala representa um sério problema na FES onde o conteúdo de umidade já é baixo. Neste caso, o resfriamento por evaporação pode ser acompanhado por reposição de umidade.

No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, são os mesmos em qualquer ponto do leito. No entanto, com o progresso da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam, fato que, por sua vez, libera calor, o qual não é facilmente dissipado devido à baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Sendo assim, são formados gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos dependendo dos parâmetros de controle do sistema. Nesse caso podem ser formadas zonas de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio, que afetam negativamente a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (Palma, 2003).

Existe uma temperatura mínima, abaixo da qual o microrganismo não se desenvolve, uma temperatura ótima na qual o crescimento microbiano é máximo e uma temperatura máxima, acima da qual não há crescimento microbiano. A grande maioria dos microrganismos é mesófila, ou seja, a temperatura ótima de multiplicação ocorre entre 25 e 40°C). No caso da produção de proteína com o *Aspergillus Níger*, **Del Bianchi et al. (2001)** observaram os maiores resultados ocorrem à 35°C, já a 45°C, ocorre uma perda sensível na eficiência do processo.

2.8.4 Aeração

Sabe-se que para um bom rendimento e uma rápida fermentação em substrato sólido, é necessário o uso de uma grande área superficial do meio de cultura no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar. Na maior parte dos processos, tanto em nível laboratorial como industrial, a oxigenação do meio é realizada pela introdução de ar esterilizado sob pressão no equipamento de fermentação.

O volume ocupado pelo microrganismo dentro do substrato depende das características do substrato e da umidade. A umidade deve ser ótima, se for muito alta os espaços nulos ficam cheios de água e o ar é impulsionado para fora, criando anaerobiose. Por outro lado, se a umidade for baixa, o crescimento de microrganismos será dificultado. A transferência de oxigênio inter-partículas pode ser alcançada pela mistura e aeração do meio, sendo a eficiência influenciada pela fração nula e a umidade do substrato sólido. Porém, para valores altos de fração nula, a mistura e aeração não são suficientes para oxigenar a célula, comprometendo, dessa forma, seu crescimento.

Del Bianchi et al. (2001) comenta que existem diferentes formas de se obter uma movimentação interna do ar no substrato, proporcionando uma melhor transferência de oxigênio, utilizando-se material poroso mediantemente granulado ou fibroso e pelo uso de uma pequena espessura da camada de substrato. Afirmam ainda, que a quantidade de ar estéril a ser introduzido no processo fermentativo depende da natureza dos microrganismos bem como da espessura da camada de substrato, dentre outros parâmetros.

Correia (2004) citou que a aeração cumpre funções básicas como manter condições aeróbicas; eliminar o dióxido de carbono formado; regular a temperatura do substrato; ajustar o nível de umidade.

Os sistemas de FSS têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como não existe água livre no meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais. A transferência de oxigênio acontece, fundamentalmente, em duas instâncias: transferência inter-partículas e transferência intra-partículas.

A maioria dos cultivos semi-sólidos permite o livre acesso do oxigênio atmosférico ao substrato, já que o oxigênio é capaz de se difundir, com rapidez, pelo filme líquido superficial formado nas partículas do substrato.

A passagem de ar através do leito permite elevadas taxas de crescimento e produtividade, mas, pode levar ao desenvolvimento do fenômeno de secagem que faz com que a transferência de nutrientes e metabólitos sejam lentas ou nulas, que a pressão osmótica do meio aumente e se acelere o processo de esporulação. Para controlar ou minimizar este problema, o ar deve ser saturado em vapor de água ou próximo da saturação.

De acordo com **Doelle (1996)**, a taxa de aeração ótima nos processos de FSS é determinada pela natureza do microrganismo usado, do requerimento particular de oxigênio para o crescimento e síntese de produtos, da quantidade de calor metabólico gerado, do grau de CO₂ e outros metabólitos voláteis que devem ser eliminados, da espessura e densidade aparente do meio e da umidade.

De acordo com **Thiemann (1985)** a fermentação semi-sólida necessita de quatro a cinco vezes mais oxigênio que a fermentação submersa.

2.8.5 Microrganismo

Pandey (1992) indica que os processos por fermentação em estado sólido podem utilizar tanto os microrganismos no seu estado natural como na forma de culturas puras individuais ou, mais raramente, na forma de culturas mistas.

A *Trichoderma celulases*, que é a cepa mais amplamente estudada para produção de celulases, tem apresentado várias desvantagens, e tentativas para utilizá-la em algumas bioconversões não foram bem sucedidas por diversas razões tais como: baixa produtividade enzimática, baixa atividade específica e inibição do produto final; e uma das razões que tem sido relatada para baixos rendimentos enzimáticos, é a repressão da enzima biosintetizada devido a celobiose, um vez que

Trichodermas são geralmente deficientes em β -glucosidase, portanto a celobiose acumula e reprime a biossíntese da enzima (Mahesh et. al., 2009).

Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas atuais pesquisas, pois apresentam maior capacidade de crescimento na ausência de água livre, uma vez que se adequam ao meio e excretam grandes quantidades de enzimas nestas condições.

O próprio modo de crescimento dos fungos gera uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares. A combinação de prolongamento da região apical e a geração de novas hifas permitem aos fungos uma rápida colonização dos substratos sólidos, além de uma melhor utilização dos nutrientes disponíveis. De forma coordenada ao crescimento, os metabólicos excretados pelo microrganismo permitem a penetração das hifas nas partículas sólidas, o que aumenta o contato e a disponibilidade dos substratos macromoleculares, bem como a assimilação e metabolização dos nutrientes (Pinto, 2003).

Na FSS o crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinadas pela disponibilidade dos nutrientes, bem como pelas características do substrato (Losane et al., 1985). As hifas crescem ao longo da superfície da partícula sólida úmida utilizando o filme líquido como fonte de umidade e nutrientes e os poros do substrato como espaço para o crescimento em busca de novos nutrientes.

Como todo processo fermentativo, a escolha do microrganismo adequado é uma peça chave no sucesso da produção desejada. Por exemplo, a cultura de *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado (Pandey, 1992).

Neste sentido, a fermentação em estado sólido tem se mostrado apta a realizar vários tipos de transformações, seja ela por fungos, bactérias ou leveduras, e o que irá determinar a escolha da linhagem mais apropriada, durante a fase de seleção de microrganismos, será o estudo detalhado do processo, visando obter o melhor meio de cultura e as melhores condições ambientais da fermentação, principalmente no que se refere à temperatura e à umidade do sistema.

Raghavarao et al. (2003) comentam que bactérias e leveduras crescem em substrato sólido com um teor de umidade entre 40-70%, como na compostagem ou na ensilagem aeróbica ou anaeróbica, mas o crescimento e propagação das células ricas em proteínas sempre necessitam de água livre.

2.8.5.1 Inóculo

Mudgett citado por **Perazzo Neto (1999)** comenta que é necessário otimizar a concentração de inóculo nas fermentações em substrato sólido, uma vez que uma baixa concentração de inóculo pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e formar pouca biomassa. Por outro lado, um inóculo com elevada concentração de esporos pode exaurir o meio para a formação de biomassa, reduzindo a quantidade de produto desejado. O autor ainda relata que, caso se deseje a produção de biomassa é recomendado o emprego de inóculo elevado para evitar contaminantes, no entanto, deve-se ter cuidado para não elevar muito o custo de produção com a preparação de inóculo.

Zilá et. al. (2000) visando ajustar metodologia de produção de inóculo, isolaram o fungo *Alternaria cassiae*, selecionado como agente para biocontrole de fedegoso (*Senna obtusifolia*), estudado quanto ao crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura e condições de cultivo. Meio V-8 caseiro sem adição de CaCO_3 , incubação em volume de 200-250 mL de meio (cerca de 50% do volume do frasco), período de 48 horas de agitação a 250 rpm, seguida de exposição da massa micelial em escuro contínuo foram as condições que se mostraram mais adequadas para a produção de inóculo em larga escala. A esporulação foi favorecida por incubação da massa micelial a 25°C. A adoção de 300 mL de massa fúngica por bandeja (29,9 x 44,5 x 5,0 cm) possibilitou secagem rápida, assegurando a integridade dos conídios, refletida na maior infectividade do inóculo produzido.

Del Bianchi et al. (2001) estudando a produção de ácido cítrico por fermentação semi-sólida com o *Aspergillus niger*, inocularam uma suspensão na concentração de 2×10^6 esporos/g substrato, e verificaram que após 4 a 6 dias houve uma conversão de 80%.

Perazzo Neto (1999) estudando o enriquecimento protéico da algaroba (*Prosopis juliflora*) e da palma forrageira (*Opuntia ficus-índica*) utilizou uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* IA-UFPE 2003 em água destilada, proporcionando uma concentração de $\pm 10^5$ esporos/mL. Para cada quilo de substrato triturado foi inoculado 300mL da suspensão de esporos, correspondendo a $\pm 10^7$ esporos/kg de substrato.

2.8.5.2 Aspergillus

Um grande número de microrganismos são capazes de produzir celulasas, no entanto, os fungos são considerados mais ativos que os demais. Diferentes cepas pertencentes a *Trichoderma sp.* têm sido amplamente estudadas a este respeito. Uma série de estudos revelaram que *Aspergillus sp.* produzem quantidades relativamente grandes de *endoglucanase* e *β-glucosidase*, mas os baixos níveis de *exoglucanase*, juntamente com elevados níveis de proteína o tornam um organismo ideal para aplicações industriais. Estudos conduzidos por **Iyayi (2004)** e **Kang et al. (2004)** revelaram níveis mais elevados de produção de celulasas por cepas autógenas.

Kang et al. (2004) relataram que a cepa de *A. niger* KK2 pode produzir celulasas em fermentação semi-sólida. Outros estudos sobre a fermentação dos produtos agroindustriais, pelo *A. niger*, *A. flavus* e *Penicillium sp.*, levou a uma conclusão de que as linhagens de *A. niger* são melhores degradantes de celulose em substratos naturais brutos.

Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (**Wainwright, 1995**). Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fulmigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*.

De acordo com **Castilho (1997)**, os fungos filamentosos, em especial do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus wentii*) possuem corpos de frutificação com conidióforos contendo vesículas terminais arredondadas, recobertos de esporos nas extremidades das hifas.

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro” (**Wainwright, 1995**). De acordo com **Prado (2002)**, o *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 μm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *A. niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforas com vesículas recobertas por conídios negros, podendo ser visualizado através de micrografia eletrônica conforme apresentado na Figura 7.

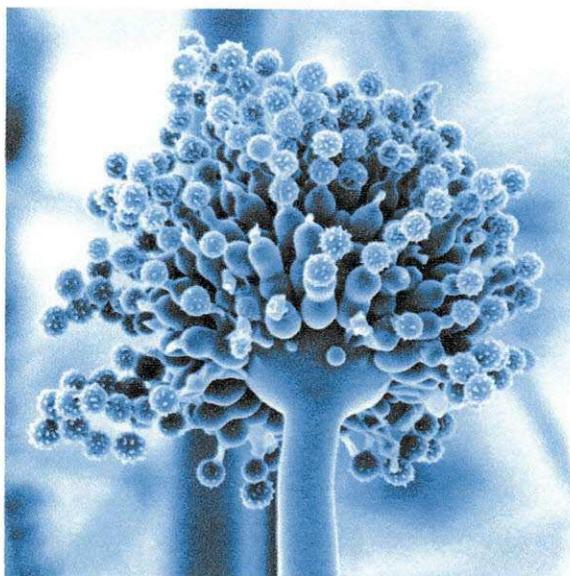


Figura 7 - Micrografia eletrônica do *Aspergillus niger*

Fonte: Disponível em: <<http://129.215.156.68/Images/asexual.htm>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2009.

Perazzo Neto (1999) afirma que o *Aspergillus niger* é o gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõem este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical. Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem tóxicos. A taxonomia atual reconhece 150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e atualmente facilmente distinguíveis (**Rosa et al., 2002**).

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídios.

O uso de *Aspergillus niger* em processos fermentativos apresenta algumas vantagens em relação a outros fungos, como facilidade de manipulação, habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (**Spier, 2005**).

Por esses motivos, é um fungo filamentoso muito importante economicamente, sendo utilizado em fermentações industriais para produção de várias substâncias

(Pelczar, 1998; De Paula, 1996), tais como: endoglucanase a partir de farelo e palha de trigo (Jecu, 2000), ácidos orgânicos, flavor e compostos de aroma a partir de bagaço de mandioca (Pandey et al., 2000), pectinase a partir de farelo de trigo e soja, casca de laranja e maçã e borra de café (Trindade et al., 1996; Dartora, 2000; Rizzatto et al., 2001, Diaz-Godinez et al., 2001), invertase (Montiel-González et al., 2004), feruloil esterase (Asther et al., 2002), ácido cítrico (Peter et al., 2001), protease (Gouka et al., 1997; Papagianni et al., 1893), enzimas amilolíticas tais como amilase 34 (Bryjak, 2003) e glucoamilase (Bryjak, 2003; Polakovic, 2004; Sanjay & Sugunan, 2005; Silva et al., 2005) e várias outras enzimas, as quais têm sido avaliadas, aceitas e regulamentadas para o consumo diário pela Organização Mundial de Saúde - OMS (Wikipedia, 2006). Relatos ainda descrevem vantagens no perfil de produção de enzimas por *Aspergillus niger* em FES quando comparadas com a fermentação submersa, incluindo aumento na produtividade (Aguilar et al., 2001; Diaz-Godinez et al., 2001) bem como aumento na estabilidade das enzimas secretadas (Loera et al., 1999).

Aspergillus niger é fonte de celulase destinada ao uso alimentício e *Trichoderma viride* é usado para aplicações não alimentícias, embora ambas enzimas possam cumprir muitas tarefas. Suas enzimas são concentradas e parcialmente purificadas antes de serem comercializadas (Bigelis, 1993). Segundo Gokhale (1986) *Aspergillus niger* pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como *Trichoderma viride*.

2.8.6 Substrato

O termo fermentação em estado sólido remete à idéia de dois tipos de materiais insolúveis em água, sobre os quais os microrganismos irão crescer: quando o suporte sólido atua, ele próprio, como fonte de nutrientes e no caso em que os nutrientes são solúveis em água e os microrganismos estão aderidos a uma matriz sólida, inerte ou não, que irá absorver o meio de cultura líquido. A maioria dos processos utiliza o princípio em que o suporte sólido atua também como fonte de nutrientes.

O substrato pode ser usado na forma natural ou sintética, dependendo do processo que se quer realizar, da facilidade de se obter determinadas matérias-primas ou dos resultados desejados (Pandey et al., 1999).

De forma geral, os materiais utilizados são provenientes de matérias-primas, produtos e/ou resíduos agroindustriais, sendo que, estes últimos têm sido a preferência nas pesquisas devido ao baixo ou nenhum valor comercial.

O substrato ou matriz sólida deve ter algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo. A principal peculiaridade é o alto grau de acessibilidade do microrganismo a todo o meio e, para tanto, de suas características mais importantes destacam-se a porosidade, que fornece a capacidade de absorção de água que facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e os microrganismos; o tamanho e formato das partículas. Quanto menor o tamanho das partículas maior será a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação. O processo necessita ter uma granulometria que permita a circulação do ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo.

Muitos substratos sólidos são complementados com fontes solúveis de nitrogênio durante a sua preparação, já que o nitrogênio é um nutriente importante no desenvolvimento microbiano (**Mitchell et al., 2000**). Muitos fungos obtêm o nitrogênio a partir de fontes inorgânicas, como nitratos e sais de amônia. Porém, algumas espécies exigem substratos nitrogenados orgânicos.

Em boa parte dos estudos sobre FSS, o substrato necessita de um pré-tratamento para se adequar as condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelos microrganismos. São eles: esmagamento, quebra, moagem e peneiramento para obter uma granulometria mais adequada ao processo; suplementação de nutrientes e correção de pH visando suprir a falta de algum nutriente ou adequar às condições de crescimento microbiano; hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico para favorecer a atuação enzimática; embebição no intuito regular o teor de umidade inicial do processo; vaporização ou aquecimento para expansão do substrato; adição de agente sequestrante com o objetivo de remover íons metálicos do meio, que podem reduzir o rendimento do processo; esterilização que visa a redução ou eliminação de contaminações (**Oshima & Church, 1923**).

Um problema que pode surgir quando da atividade em larga escala para a obtenção de um bioproduto por FSS é o descarte ou o aproveitamento do resíduo gerado. Segundo **Roussos et al., (1992)**, tem-se sugerido a utilização do resíduo na geração de biogás, de ração animal, disposição em aterro sanitário e fabricação de chapas e papéis, sem, porém, haver uma pesquisa concreta da viabilidade de cada aplicação.

2.8.7 Tamanho da partícula

O tamanho e a forma da partícula afetam a relação área superficial e volume da partícula, o tamanho e a forma dos espaços vazios entre as partículas (**Mitchell et al., 2000**). Geralmente, partículas menores do substrato oferecem área superficial maior para o ataque microbiano. Porém, uma partícula de substrato muito pequena pode resultar em aglomeração do substrato que pode interferir na respiração microbiana e podendo resultar em pouco crescimento. Ao contrário, partículas maiores oferecem melhor aeração devido aos espaços entre as partículas, limitam a superfície para ataque microbiano. Isto necessita um tamanho de partícula para um processo particular (**Pandey et al., 1999**). Segundo **Mitchell et al. (2000)** o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio.

2.8.8 Pré-tratamento

Os polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes na biomassa lignocelulósica precisam ser hidrolisados com ácidos ou enzimas, a fim de liberar açúcares fermentáveis. Em muitos processos enzimáticos de conversão dessa biomassa em etanol e outros produtos químicos, uma etapa de pré-tratamento é necessária para quebrar parcialmente a estrutura da lignina e para solubilizar os polissacarídeos. Muitos processos de pré-tratamento requerem equipamentos caros e grandes quantidades de energia. Nos processos físicos, o gasto energético pode fazer a conversão de holocelulose economicamente inviável. Além disso, em pré-tratamentos efetuados por explosão a vapor, a glicose liberada a partir da celulose pode ser degradada em 5-hidroximetilfurfural e ácidos fórmico e levulínico, enquanto pentoses liberadas da hemicelulose podem ser convertidas em ácido fórmico e furfural. Esses produtos agem como inibidores nas fases posteriores de hidrólise enzimática e fermentação. Pré-tratamentos químicos têm várias desvantagens, como a necessidade de equipamentos feitos com materiais anti-corrosivos, extensa lavagem da biomassa e, conseqüentemente, a geração de resíduos com os reagentes. Pré-tratamentos biológicos utilizando um método eficiente e ambientalmente correto para a remoção de lignina têm sido reportados em estudos recentes (**Camassola & Dillon, 2009**)

De acordo com **Del Bianchi et al. (2001)**, o substrato necessita de um pré-tratamento para se adequar às condições requeridas para o crescimento e metabolismo dos microrganismos, e facilitar a atuação dos microrganismos sobre o meio, tais como:

- 1) Esmagamento, quebra, moagem e peneiramento visando obter uma granulometria mais adequada ao processo;
- 2) Suplementação de nutrientes e correção de pH, para suprir a deficiência de algum nutriente ou adequar às condições de crescimento microbiano;
- 3) Hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico, buscando favorecer a atuação enzimática;
- 4) Embebição, para regular o teor de umidade inicial do processo;
- 5) Vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou inchamento do substrato;
- 6) Adição de agente sequestrante, com o objetivo de remover íons metálicos, que podem reduzir o rendimento do processo;
- 7) Processo de esterilização, buscando reduzir ou eliminar possíveis contaminações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Realização do trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

A metodologia empregada foi baseada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica em Engenharia Química (UAEQ) da UFCG. Este laboratório já vem desenvolvendo pesquisas utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima em fermentação semi-sólida tais como: as cactáceas palma forrageira e mandacaru sem espinho para produção de enriquecidos nutricionais para ração animal e os bagaços de caju e de maracujá para produção de enzimas pectinolíticas. Dessa maneira as metodologias empregadas foram as mesmas já utilizadas nas pesquisas que vem sendo desenvolvidas realizando-se adaptações quando necessárias para a execução do presente projeto.

3.1 Preparo do substrato

Foi utilizado o resíduo agroindustrial do pedúnculo do caju, adquirido da indústria de produção de sucos, Frutnat, localizada na cidade de Campina Grande, Paraíba.

O bagaço foi descongelado e uma parte do material foi lavado em água corrente para remover alguma substância remanescente do processo de beneficiamento industrial e distribuído em bandejas de alumínio previamente forradas com sacos plásticos e deixadas em estufa de circulação de ar por um período de 15 horas para remover a umidade residual, obtendo-se uma secagem completa até massa constante. Após a obtenção da massa invariável, as amostras foram distribuídas em béckeres e colocadas no dessecador até atingir temperatura ambiente. Estas porções do bagaço do caju foram moídas, para reduzir o tamanho, divididas em sacolas plásticas do tipo ZIP-PLOT e armazenadas em estojo térmico contendo sílica gel até serem utilizadas. A Figura 8 mostra o aspecto do resíduo do pedúnculo de caju lavado.

O processo de secagem, moagem e armazenamento foi feito também com o bagaço do caju sem ser lavado. A Figura 9 mostra o aspecto do resíduo do pedúnculo de caju sem lavar.



Figura 8 - Resíduo seco do pedúnculo do caju lavado



Figura 9 - Resíduo seco do pedúnculo do caju sem lavar

3.2 Caracterização da matéria-prima

A caracterização físico-química do bagaço do caju é indispensável tendo em vista que para fermentação semi-sólida por microrganismo se faz necessário conhecer as características físico-químicas do substrato, principalmente por ser um meio poroso e rico em nutrientes. Nesta caracterização foram analisados densidade aparente, pH, distribuição granulométrica, umidade, cinzas, °Brix, açúcares redutores, açúcares redutores totais, pectina, celulose e proteína total.

3.2.1 Densidade aparente

Para a densidade aparente, descrita em **Brasil (2005)**, foram pesados 100 gramas do material, lavado e sem lavar, e colocados em proveta para determinar o volume ocupado, sem que houvesse compactação. Os cálculos foram feitos seguindo a Equação 3.1:

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{massa, g}}{\text{volume ocupado, cm}^3} \quad (3.1)$$

3.2.2 pH

Foi preparada uma suspensão com 20mL de água destilada e 2,0g da amostra sólida (bagaço de caju lavado e sem lavar). Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos, e em seguida filtrada. Feito isso, o pH foi mensurado em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões (**Brasil, 2005**).

3.2.3 Distribuição Granulométrica

A distribuição granulométrica do substrato foi determinada pesando 40 gramas (balança analítica) do substrato, lavado e sem lavar, e transferindo para o agitador de peneiras PRODUTEST na frequência 50 rpm durante treze minutos, em jogo constituído por sete peneiras, seguindo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): 14 mesh (1,180mm), 20 mesh (0,850 mm), 24 mesh (0,710 mm), 35 mesh (0,425 mm), 42 mesh (0,355 mm), 65 mesh (0,212 mm) e 115 mesh (0,125 mm). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação ao peso do material original (**Correia, 2004**).

3.2.4 Umidade

Foram pesados 5 gramas das amostras, lavada e sem lavar, em cadinho de porcelana previamente seco e tarado. Os cadinhos foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas, em seguida as amostras foram colocadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente e foram então pesados em balança analítica, de acordo com o

procedimento descrito em **Brasil (2005)**. O resultado foi expresso em porcentagem (m/m). Os cálculos foram realizados com base na Equação (3.2):

$$Umidade, \% = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.5 Cinzas

Para a determinação do conteúdo de cinzas foi utilizado o método descrito pela **AOAC (1997)**. Os cadinhos de porcelana vazios foram colocados em estufa e deixados a 150°C, durante 1 hora. Depois foram deixados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados vazios e com cinco gramas das amostras, lavada e sem lavar. Logo após pesagem, foram levados à mufla durante um período de cinco horas, a 550°C, até obter a cor cinza clara. Foram deixados no dessecador até a temperatura ambiente e novamente pesados (**Brasil, 2005**). Os cálculos foram feitos através da Equação (3.3):

$$Cinzas, \% = \frac{peso\ final\ da\ amostra}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.6 Teor de sólidos solúveis (°Brix)

A concentração de sólidos solúveis medida em °Brix é uma medida relacionada com a quantidade de açúcares presentes na amostra. A leitura do °Brix foi feita de forma direta em refratômetro (**Brasil, 2005**). Foram adicionados 9mL de água destilada a 1g dos resíduos, agitou-se até perfeita homogeneização e deixou-se a suspensão em repouso por 30 minutos. Após este período a suspensão foi filtrada com gaze e algodão, e foi feita a leitura em refratômetro. Utilizou-se um fator de diluição (F) (devido à diluição) para determinar o teor de sólidos solúveis (°brix) como mostra a Equação (3.4):

$$°Brix(\%) = Leitura\ (\%) \times F \quad (3.4)$$

3.2.7 Açúcares redutores e redutores totais (AR e ART)

Os teores de AR e ART foram determinados pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) que se baseia na redução do ácido 3,5 a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Após aquecimento, a solução torna-se avermelhada, sendo lida, no espectrofotômetro a 540nm, conforme procedimento descrito por **Miller (1959)**.

Inicialmente foi determinada a quantidade inicial de amostra que resulte uma leitura dentro da curva padrão. As diluições necessárias foram usadas no cálculo para determinação do teor de açúcares da amostra.

Depois de dissolver determinada quantidade de amostra em um volume definido de água, a análise de AR foi iniciada transferindo-se 0,5mL para um tubo de ensaio contendo 0,5mL de solução DNS. Em seguida, os tubos foram levados para banho de água fervente por exatos 5 minutos e colocados em banho de água fria por 5 minutos, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 4mL de água destilada e agitou-se. Foi então feita a leitura imediatamente em espectrofotômetro a 540nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância para gramas de açúcares redutores por litro de solução.

Para a análise de ART foi feita uma hidrólise da amostra utilizando 1mL da amostra com 1mL de HCl a 2N por 5 minutos em banho de água fervente. Em seguida foi levado ao resfriamento por 5 minutos e então foram adicionados 3mL de NaOH a 1N. Dessa solução, foram colocados 0,5mL em um tubo com 0,5mL de DNS, procedendo com a metodologia descrita para AR. Os teores de AR e ART foram obtidos de acordo com as Equações (3.5) e (3.6).

$$AR(\%) = \text{Leitura} \times F \times \text{diluição} \times 0,1 \quad (3.5)$$

$$ART(\%) = \text{Leitura} \times F \times 5 \times \text{diluição} \times 0,1 \quad (3.6)$$

3.2.8 Pectina

A determinação de pectina foi baseada no procedimento de **Rangana (1979)**. A extração da pectina foi realizada pesando-se 20g das amostras, lavada e sem lavar, em um béquer de 1000mL, adicionou-se 400mL de solução de HCl 0,05N seguido de aquecimento por duas horas, a uma temperatura de 80 – 90°C, substituindo-se a água

perdida por evaporação e mantendo-se o volume inicial constante. Após esse período de tempo, a suspensão foi resfriada até a temperatura ambiente e transferida para uma proveta de 500mL onde se completou o volume com água destilada e foi então filtrada com auxílio de algodão e gaze. Do extrato filtrado mediu-se 200mL em proveta, transferiu-se para um bécker de 1000mL e acrescentou-se 250mL de água destilada. A solução foi então neutralizada com NaOH 1N, utilizando um phmetro. Após neutralização, adicionou-se 10mL de NaOH 1N em excesso, com agitação constante. Em seguida, foi deixada em repouso por uma noite e no dia seguinte foram adicionados 50mL de ácido acético 1N e após 5 minutos, adicionou-se 25mL de solução de cloreto de cálcio 1N com agitação constante. A solução foi levada à ebulição por 2 minutos e deixada em repouso por 3 horas. Após esse período foi filtrada através de papel Whatman número 1 preparado antecipadamente (molhar o papel com água destilada, secar em estufa a 105°C por 2 horas, resfriar em dessecador e pesar). O precipitado foi lavado com água destilada quase fervendo, até que ficasse livre de cloretos e para isto fez-se o teste usando nitrato de prata no filtrado. O papel de filtro contendo o pectato de cálcio foi seco em estufa a 105°C até peso constante e a pectina foi expressa em % de pectato de cálcio através da Equação (3.7):

$$\% \text{ Pectato de cálcio} = \frac{\text{massa do pectato de cálcio} \times 500 \times 100}{\text{mL do filtrado} \times \text{peso da amostra}} \quad (3.7)$$

3.2.9 Proteína total

O teor de proteína foi determinado utilizando o método semi-micro Kjeldahl com adaptação para UV-visível a 410 nm, de acordo com a metodologia de **Silva (1998)**.

No método de Kjeldahl determina-se o nitrogênio protéico propriamente dito e outros compostos nitrogenados não protéicos, tais como: aminas, amidas, lecitinas, nitrilas e aminoácidos. Neste caso, o resultado é dado como proteína bruta. O termo proteína bruta envolve um grande grupo de substâncias com estruturas semelhantes, porém com funções biológicas diferentes.

Pelo método Kjeldahl as proteínas e outros compostos nitrogenados são decompostos na presença de ácido sulfúrico concentrado, à quente, com produção de sulfato de amônio. O sulfato de potássio ou de sódio é adicionado, a fim de aumentar o

ponto de ebulição do ácido sulfúrico, apressando a digestão. O sulfato de amônia resultante, neste caso, foi quantificado usando o Reagente de Nessler.

Com auxílio da curva padrão obteve-se o teor de proteína bruta, de acordo com a Equação (3.8):

$$\% \text{ Proteína} = \text{ABS} \times \text{valor da curva de calibração} \times 5 \times 6,25 \quad (3.8)$$

3.2.10 Celulose

O teor de celulose foi determinado pelo método de **Updegraff (1969)** com adaptações para o tempo de hidrólise.

3.3 Atividade de água

Para a determinação da atividade de água do substrato foram preparadas amostras com 5g do resíduo e adicionadas diferentes quantidades de água destilada, de modo a restabelecer a umidade inicial do material. Cada amostra umedecida foi colocada na geladeira em recipientes herméticos e deixado por 24 horas em repouso para uniformizar a umidade do meio.

A atividade de água das amostras foi analisada diretamente em equipamento Thermoconstanter Novasina RTD 200 TH2, nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C. Após estabilização do equipamento, colocou-se uma quantidade de cada amostra em cubetas plásticas apropriadas e inseridas no aparelho. A amostra permanecia no equipamento até que a leitura da atividade de água se estabilizasse. Efetuada a leitura da atividade de água, as amostras foram pesadas imediatamente e colocadas em dessecador até atingir a temperatura ambiente, e então, foram levadas a estufa a 105°C por 24 horas para determinação da umidade de equilíbrio (base seca).

As isotermas de adsorção de umidade para cada temperatura estudada foram construídas com os dados de umidade de equilíbrio (base seca) e atividade de água.

3.4 Produção do inóculo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosos da linhagem *Aspergillus niger* mutante CCT 0916 pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria Tropical,

com sede em Fortaleza-CE, cultivado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/UAEQ/UFCG), em tubos de ensaio com tampas rosqueadas estocados a -18°C. Esta cepa de *Aspergillus* foi geneticamente modificada para produção da enzima pectinase, sendo este o único fungo filamentosos disponível no laboratório, justificando assim a utilização do mesmo para verificação da sua potencialidade também na produção de celulases.

De acordo com procedimento adotado por **Couri (1993)**, os conídios foram ativados em duas etapas de transferência, usando um meio básico formulado no laboratório do CTAA. Neste meio a pectina é a única fonte de carbono, como é mostrado na tabela 4.

Tabela 3 - Composição do meio básico

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
(GRAU p.a.)	(g/L)
Pectina crítica	10,00
NaNO ₃	3,00
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01
Agar-Agar	20,00
Água destilada	q.s.p.

Fonte: Couri (1993)

O procedimento de preparação do meio encontra-se descrito no ANEXO I.

3.5 Processo fermentativo

As fermentações foram realizadas em erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g do substrato úmido.

A umidade inicial do meio foi ajustada em 41%, 45%, 55%, 65% e 69% para o resíduo do pedúnculo de caju.

A suplementação do substrato com a fonte de nitrogênio foi realizada adicionando sulfato de amônio no volume de água a ser adicionado ao resíduo, diluindo-se o sulfato de amônio, obtendo as concentrações a serem estudadas no

processo. Os erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão envolvido com gaze e autoclavados por 5 minutos a 0,5 atm.

Para realização das fermentações, o meio contido nos erlenmeyers foi inoculado com o microrganismo na concentração de 10^7 esporos/g de resíduos úmidos e incubados em estufa úmida a 30°C, sendo esta a temperatura média anual da região e também favorável ao desenvolvimento de microrganismos mesófilos. Durante o processo, o nível da água era restabelecido, sendo a umidade relativa dentro da estufa mantida pela evaporação da água contida em um recipiente colocado dentro da estufa, provavelmente esse fato permitiu que a umidade nos erlenmeyers, fechados com gaze e algodão, permanecesse praticamente constante em seu interior. O período de incubação foi de 72h para produção de celulase, e as amostras foram retiradas em períodos de tempo regular durante o processo (0, 7, 20, 30, 44, 54, 68 e 72 horas de fermentação) para realização das análises de pH, umidade e açúcares redutores (AR), segundo metodologias descritas anteriormente. A extração do complexo enzimático também foi realizada e nela será avaliada a atividade celulolítica. Para cada amostragem quatro Erlenmeyers eram retirados da estufa, estando todos nas mesmas condições iniciais do processo.

3.6 Extração da enzima

A extração do complexo enzimático foi realizada de acordo com metodologia descrita por **Ruegger (2004)**. O extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 30 mL de água destilada/grama de fermentado em Erlenmeyers. Os substratos foram agitados com espátula e permaneceram em repouso por 3h a 4°C. O sobrenadante foi separado através de filtração com gaze e algodão, permanecendo congelado (-18°C) até o momento da análise em frascos de vidro tampados e rotulados.

3.7 Determinação de atividade celulolítica

A atividade de celulase foi determinada seguindo a metodologia descrita por **Attili (1994)**, utilizando o método FPase. A atividade foi determinada no extrato obtido ao final da extração, usando-se uma fita de papel de filtro de 1cm x 6cm em um tubo de

ensaio contendo 0,5 mL do extrato e 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Após incubação por 60 min a 50°C, a reação é interrompida pela adição de 1 mL do reagente DNS. Para desenvolvimento da cor, os tubos foram aquecidos por 5 min em banho de água fervente e, depois de esfriar por aproximadamente 5 min, foi adicionado 8mL de água destilada e os açúcares redutores foram determinados em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 540 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática, foram comparados os valores de açúcares redutores após a incubação da celulose no extrato e as leituras do tubo em branco obtido nas mesmas condições, contudo, sem a fonte de celulose.

A unidade de atividade enzimática foi expressa em U/mL e foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de glicose por minuto de reação nas condições especificadas anteriormente. A atividade foi calculada de acordo com a Equação 3.9 a seguir, na qual alguns fatores convertem o teor de AR liberado de $\frac{g}{L.hora}$ para $\frac{\mu mol}{min \times mL}$.

$$\text{Atividade(U / mL)} = \frac{\text{AR}_{\text{liberado}} \times 1000}{18 \times 60} \quad (3.9)$$

As definições para cada termo da Equação 3.9 encontram-se no Anexo II.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do resíduo seco do bagaço do caju

A caracterização do resíduo agroindustrial do bagaço do caju após secagem e moagem, bem como os respectivos desvios padrão, estão apresentados na Tabela 4. As análises foram realizadas em triplicata para densidade aparente, umidade, pH, cinzas, sólidos solúveis (°Brix), açúcares redutores e redutores totais, pectina, celulose e proteína total do bagaço do caju lavado e sem lavar.

Tabela 4 - Caracterização físico-química do bagaço do caju lavado e sem lavar (b.s.).

Parâmetros Analisados	Unidade	Lavado	Sem lavar
Densidade Aparente	g/mL	0,43 ± 0,01	0,65 ± 0,01
Umidade	%	5,87 ± 0,11	8,22 ± 0,46
Cinzas	%	1,25 ± 0,04	1,69 ± 0,06
pH	-	4,58 ± 0,02	4,33 ± 0,00
°Brix	%	10,25 ± 0,35	30,00 ± 0,00
AR	%	10,02 ± 0,08	-
Proteínas Totais	%	4,70 ± 0,17	4,00 ± 0,27
Pectina	%	14,48 ± 0,53	10,94 ± 0,04
Celulose	%	12,75 ± 0,18	11,76 ± 1,39

AR - açúcares redutores

A caracterização dos resíduos secos do pedúnculo de caju visa conhecer a composição dos resíduos com relação ao conteúdo de nutrientes, que são importantes na síntese da enzima como percentual de celulose e açúcares redutores, bem como os parâmetros que afetam o processo como pH, umidade e densidade aparente.

Os valores de umidade encontrados são inferiores aos determinados por **Amorim (2008)** que, estudando a utilização de resíduos agroindustriais em processos bioquímicos, encontrou para os bagaços, lavado e sem lavar, valores de 11,4 e 16,7, respectivamente. O teor de umidade para o caju lavado (5,87%) foi menor que o do caju sem lavar (8,22%), isso pode ser devido ao fato de açúcares terem sido removidos durante a lavagem que antecedeu o processo de secagem, ou que os açúcares contidos no bagaço interajam com as fibras retendo a água contida no mesmo.

Os valores de pH estão de acordo com os determinados por **Campos (2003)** para o pedúnculo fresco (4,5) e com o encontrado por **Kinh et. al (1996)** quando determinaram o pH do bagaço do pedúnculo do caju de 4,1. **Amorim (2008)** encontrou valores de pH de 3,74 para o bagaço do caju lavado e 3,32 para o sem lavar, concluindo que estes apresentam um pH comumente encontrado nos resíduos agroindustriais utilizados em fermentações semi-sólidas, e é propício para o crescimento microbiano do *Aspergillus niger*. **Zheng & Shetty (2000)** estudando o efeito do pH sobre a produção de enzimas por *Lentinee edones* em resíduos de frutas cítricas concluíram que este microrganismo tem seu pico de produtividade em pH baixo e na faixa de 3,0-6,5 demonstrando uma alta tolerância a meios ácidos. Uma das vantagens em se utilizar frutas cítricas para produção de enzimas é que o microrganismo se adapta ao meio já na sua forma *in natura*.

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente os fungos tem como condição favorável de desenvolvimento pH baixo (4,5 – 5,0). Os valores de pH encontrados, 4,58 para o resíduo do pedúnculo de caju lavado e 4,33 para o sem lavar, associados ao baixo teor de umidade, permitiram que os resíduos fossem armazenados em temperatura ambiente sem problemas de contaminação, quando analisados visualmente.

Para o processo de fermentação em estado sólido o pH do meio é um parâmetro importante mas de difícil controle. A padronização do pH do substrato pode se dar durante a sua preparação. Há componentes com capacidade tamponante, os quais podem ser adicionados ao meio de modo a evitar flutuações drásticas de pH (**Pandey et al, 2001**). Para os resíduos analisados, no entanto, não foi realizada adição de qualquer componente com tal capacidade.

Com relação ao °Brix, que representa o teor de sólidos solúveis, os bagaços apresentam valores diferentes, sendo 10,25°Brix para o bagaço lavado e 30,0°Brix para o sem lavar. Esta diferença está associada ao fato de que as lavagens feitas no resíduo do pedúnculo de caju retiraram sólidos solúveis, inclusive açúcares solúveis. Além disso, estes valores dão indícios de que os mesmos podem ser utilizados como substrato no processo de produção de celulase por fermentação semi-sólida, desde que a quantidade de celulose, substância indutora da produção da enzima, presente no substrato seja balanceada com o teor de açúcares redutores (**Amorim, 2008**).

A glicose é uma fonte de carbono adequada como substrato para fermentação microbiana, assim como outros açúcares (sacarose e maltose), e ainda outros compostos orgânicos mais complexos, por exemplo, amido e celulose (**Pelczar et al., 1980**). A glicose deve estar disponível para o microrganismo, já no substrato escolhido, em quantidade suficiente de forma a proporcionar um crescimento inicial da população microbiana, mas não o bastante para impedir que o microrganismo seja capaz de metabolizar a fonte indutora. Porém a fonte indutora não pode ter um valor percentual acentuado de forma a inibir a excreção da enzima pelo microrganismo. Segundo **Fontana et al. (2005)**, substratos que apresentam concentrações balanceadas de açúcares e pectina, indutor da pectinase, tem mostrado altos rendimentos em enzimas. Dessa forma pode-se pressupor que para produção de celulase deve existir também um valor ótimo da relação entre açúcares redutores e a celulose como fonte indutora.

Os resíduos aqui estudados apresentam alto teor de pectina sendo de 14,48 para o resíduo do pedúnculo de caju lavado e 10,94 para o sem lavar, expressos em % de pectato de cálcio. Estes valores estão próximos aos determinados por **Santos (2007)** para o pedúnculo lavado e sem lavar (13% e 7%, respectivamente).

O teor de cinzas de 1,25% para o pedúnculo lavado e 1,69% para o sem lavar foi próximo aos encontrados por **Santos (2007)**, quando este pesquisador caracterizou o pedúnculo do caju e verificou ser 0,86% e 2,05% o teor de cinzas para os materiais lavado e sem lavar, respectivamente.

Os valores encontrados para o teor protéico foram de 4,70 para o resíduo do pedúnculo de caju lavado e de 4,00 para o resíduo do pedúnculo de caju sem lavar. **Almeida (2009)**, estudando a caracterização físico-química da farinha da casca de frutos tropicais obteve valores de 4,88% de proteínas totais para a casca de jabuticaba e 4,01% para farinha de casca de umbu.

Assim, como o percentual de pectina, para proteína percebe-se um aumento dos valores percentuais sendo no resíduo lavado superior ao resíduo sem lavar, isto se deve ao fato de, como durante as lavagens houve arraste dos componentes solúveis, proporcionalmente houve aumento dos componentes insolúveis em água.

A Figura 10 apresenta os perfis granulométricos do bagaço do caju lavado e sem lavar.

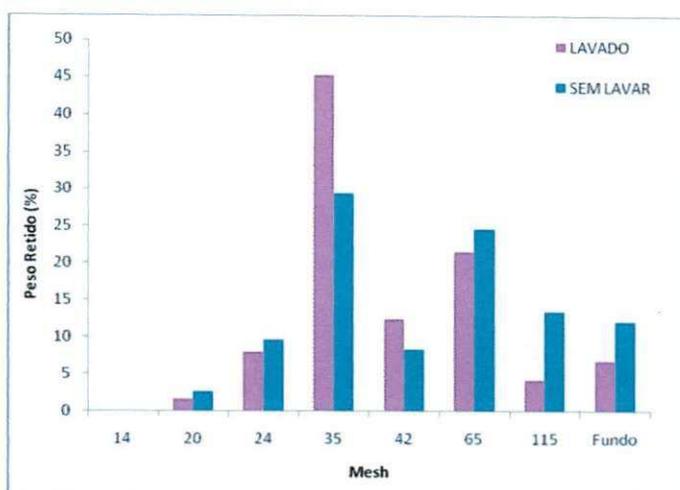


Figura 10 - Perfil Granulométrico do bagaço do caju lavado e sem lavar.

Como pode ser observado pela distribuição granulométrica, tanto para o bagaço lavado como sem lavar, a maioria das partículas apresenta tamanhos em torno de 35 mesh, o que corresponde a partículas de 0,425mm, tamanho de partículas satisfatório para fermentação semi-sólida. **Correia (2004)** estudando o enriquecimento protéico do bagaço de abacaxi trabalhou com partículas de tamanho maior que 0,42 mm. **Souza et al. (2008)**, estudando a caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida observaram que a maioria das partículas possuía tamanho entre 20 e 35 mesh (0,42 - 0,85 mm).

Através da Figura 10 percebe-se que há uma diferença entre a granulometria do bagaço lavado e a do sem lavar, sendo o bagaço lavado aquele que apresenta, em média, o menor valor. Provavelmente o processo de lavagem do bagaço pode ter modificado parcialmente a quantidade de açúcar, a resistência mecânica e a textural das fibras, afetando a tendência em formar aglomerados. Isso pode ter diminuído o tamanho das mesmas, entretanto, melhores estudos para controle de lavagem devem ser feitos para elucidar tal fenômeno.

Os fungos filamentosos necessitam que suas hifas penetrem em espaços vazios do substrato de forma a obter uma maior eficiência da fermentação; e no processo de extração são necessários sólidos mais finamente divididos para que as porções solúveis da mistura sólida tornem-se mais acessíveis ao solvente.

4.2 Isotermas de adsorção de umidade

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto que se deseja sintetizar e necessidade do microrganismo. Níveis de umidade muito altos resultam numa diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento no risco de contaminação, redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Por outro lado, baixos níveis de umidade levam a um crescimento minimizado da população microbiana em relação ao ponto ótimo e baixo grau de utilização do substrato pelos mesmos.

Através dos dados obtidos pode-se caracterizar o resíduo seco predizendo, por exemplo: o teor de água livre contido nesse substrato logo após re-umidificação do mesmo com o objetivo de correlacionar a umidade de equilíbrio com a atividade de água necessária para o crescimento do microrganismo.

A partir dos dados experimentais foram construídas isotermas de adsorção de umidade do resíduo seco para as diferentes temperaturas estudadas. Estas isotermas estão representadas nas Figuras 11 e 12, e mostram a relação entre atividade de água (a_w) e umidade (%) correspondente aos resíduos secos do pedúnculo de caju lavado e sem lavar, respectivamente.

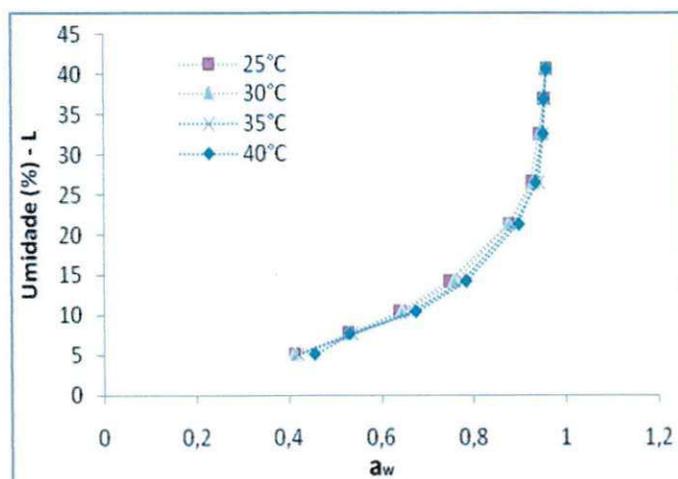


Figura 11 - Isotermas de adsorção bagaço de caju lavado nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C

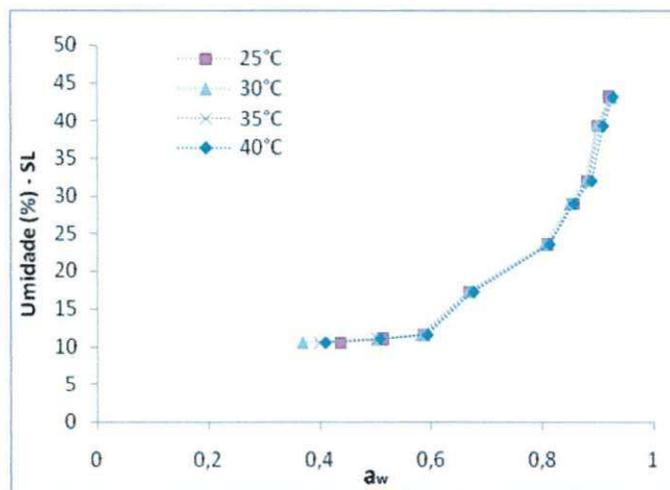


Figura 12 - Isotermas de adsorção bagaço de caju sem lavar nas temperaturas 25, 30, 35 e 40°C

É possível verificar, através das isotermas que, como na maioria dos materiais higroscópicos, a umidade de equilíbrio aumenta com o aumento da atividade de água (a_w) e as isotermas se encontram muito próximas umas das outras, indicando que há pouca influência da temperatura neste caso.

Devido ao processo fermentativo ter sido realizado com umidades iniciais de 41%, 45%, 55%, 65% e 69%, foi possível através do levantamento das isotermas de equilíbrio verificar quais atividades em que se encontraria o substrato e se o mesmo seria ideal para o desenvolvimento do microrganismo em metabolizar a celulose para a produção da enzima celulolítica.

4.3 Variáveis estudadas no processo

O estudo da produção de celulase foi feita por fermentação semi-sólida utilizando bagaço de caju, em um esforço para reduzir o custo de futuras produções de etanol por hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. A FSS satisfaz as necessidades de menor infra-estrutura, além de ser capaz de utilizar matérias-primas mais baratas para a produção enzimática e produzir um produto mais concentrado. Todos estes adicionais aumentam as vantagens econômicas deste tipo de fermentação para a produção da enzima.

Dentro deste contexto, estudaram-se as seguintes variáveis de processo: umidade inicial do meio e suplementação com uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) para os resíduos do pedúnculo de caju lavado e sem lavar. **Souza (2008)** em seu trabalho sobre produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato estudou a umidade inicial do meio (40%, 50% e 60%) e a

suplementação com uma fonte de nitrogênio (1,0%; 1,5% e 2,0%). No presente trabalho, as umidades iniciais utilizadas foram 41, 45, 55, 65 e 69%, visando verificar as melhores condições intermediárias desta variável associadas às diferentes concentrações de fonte de nitrogênio (0,4; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,1%), condições estas bem menores que as estudadas por **Souza (2008)**, uma vez que, em seu trabalho, foi observado que concentrações de nitrogênio acima de 1,5% demonstraram repressão ao metabolismo do microrganismo.

Durante a fermentação semi-sólida do bagaço do caju, que foi realizada por um período de 72 horas, foram retiradas amostras periodicamente, incluindo o tempo inicial do processo obtido no instante seguinte à inoculação do microrganismo, e foram analisados alguns parâmetros que caracterizam o processo como umidade do meio, pH, AR e atividade celulolítica.

Serão mostrados a seguir os dados referentes a todos os experimentos para o bagaço do caju lavado. Para o bagaço do caju sem lavar só serão apresentados os dados referentes aos experimentos executados em triplicata para verificação de reprodutibilidade de dados, assim como os referentes ao experimento que teve como condições: 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio, uma vez que nestas condições o caju lavado apresentou a maior atividade celulolítica média.

4.3.1 Bagaço do caju lavado

Os desvios relativos médios absolutos serão os parâmetros estatísticos utilizados para verificar se as variáveis umidade e pH tiveram significância no processo de fermentação. Todos os dados relativos aos experimentos executados neste trabalho constam no Apêndice.

A Figura 13 apresenta os resultados da reprodutibilidade, para as variáveis pH e umidade, dos pontos nos experimentos cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio são 55% e 0,75%, respectivamente. Estes experimentos tiveram como finalidade verificar a reprodutibilidade dos dados sendo, portanto, realizados em triplicata.

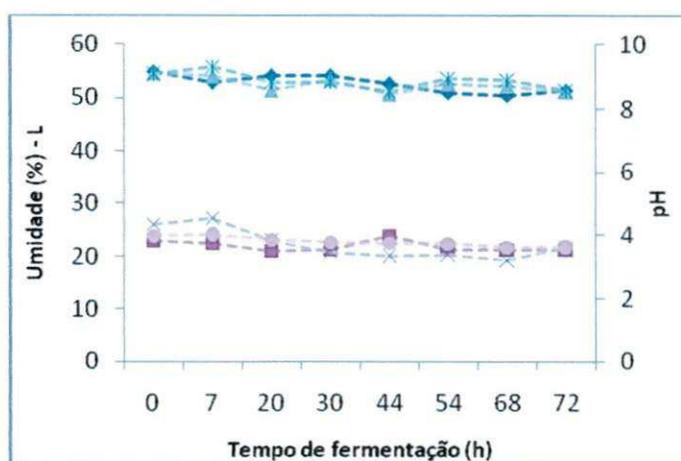


Figura 13 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio
(♦ - ▲ - x - Umidade; ■ - x - □ - pH)

Os resultados para as variáveis umidade e pH, dos pontos nos experimentos de reprodutibilidade de dados são mostrados nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Dados referentes a umidade dos experimentos de reprodutibilidade de dados durante o processo fermentativo.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	EXPERIMENTO			MÉDIA	ERRO RELATIVO (%)
	5	6	7		
0	54,67	54,44	54,18	54,43 ± 0,17	0,31
7	52,77	53,98	55,77	54,18 ± 1,06	1,96
20	53,95	51,33	52,81	52,69 ± 0,91	1,73
30	53,96	53,22	52,75	53,31 ± 0,44	0,82
44	52,53	50,58	51,18	51,43 ± 0,73	1,42
54	50,93	52,52	53,56	52,34 ± 0,94	1,79
68	50,42	52,20	53,36	51,99 ± 1,05	2,02
72	51,50	51,09	51,50	51,50 ± 0,18	0,36

Durante as 72 horas de fermentação a umidade apresentou um erro relativo máximo de 2,02%. Este valor sugere que foi possível obter uma boa reprodutibilidade para cada ponto da triplicata durante a cinética de fermentação. A variação entre os valores de umidade mínima e máxima foi em torno de 5% da variação máxima, apesar de ser um valor maior do que o erro relativo considerado para a reprodutibilidade dos dados, não se poderia afirmar com precisão que para a variável umidade de um processo fermentativo semi-sólido possa ocorrer mudanças significativas do metabolismo celular.

Tabela 6 - Dados referentes ao pH dos experimentos de reprodutibilidade de dados durante o processo fermentativo.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	EXPERIMENTO			MÉDIA	ERRO RELATIVO (%)
	5	6	7		
0	3,80	4,35	3,99	4,05 ± 0,20	5,00
7	3,72	4,54	4,00	4,09 ± 0,30	7,40
20	3,50	3,80	3,85	3,72 ± 0,14	3,89
30	3,54	3,43	3,79	3,59 ± 0,14	3,78
44	3,98	3,32	3,75	3,68 ± 0,24	6,58
54	3,51	3,36	3,74	3,54 ± 0,14	3,83
68	3,54	3,22	3,61	3,46 ± 0,16	4,56
72	3,53	3,62	3,60	3,58 ± 0,04	0,99

O pH, para estes experimentos, apresentou um erro relativo de 7,40%. Este valor pode ser considerado como apreciável, porém considerando trabalhar com processos biológicos e fungos filamentosos, foi considerado neste trabalho, como um erro bastante aceitável para reprodutibilidade de experimentos, uma vez que, embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido, o controle e monitoramento deste parâmetro, durante as FSS's, não é fácil de ser realizado (Pandey, 2003). A variação do valor da umidade mínima e a máxima é de aproximadamente 15% valor esse acima do erro relativo considerado para reprodutibilidade dos dados, sendo assim pode inferir que houve um efeito uma variação do pH durante o processo fermentativo .

A Tabela 7, a seguir, mostra as condições para as concentrações de nitrogênio e umidades iniciais planejadas para cada experimento, bem como os valores das umidades iniciais experimentalmente alcançadas com suas respectivas médias e o desvio relativo percentual referente a cada média.

Tabela 7 - Condições efetuadas durante o processo fermentativo para as umidades estudadas em cada experimento

Concentração de N (%)	U _i planejada (%)	U _i alcançada (%)	Ū no processo (%)	Desvio Relativo (%)
0,5	45	42,15	41,79 ± 0,93	2,23
1,0	45	44,72	40,69 ± 1,33	3,29
0,5	65	64,48	61,99 ± 1,11	1,79
1,0	65	61,24	59,23 ± 2,00	3,39
0,4	55	52,68	51,29 ± 1,70	3,29
0,75	69	68,69	65,87 ± 1,53	2,31
1,1	55	54,99	51,18 ± 1,75	3,42
0,75	41	40,34	38,59 ± 0,53	1,38

N = Nitrogênio; U_i = Umidade inicial; Ū = Média da umidade

A Tabela 8, a seguir, mostra as condições para as concentrações de nitrogênio e umidade, bem como a média do pH ao longo do processo de fermentação semi sólida, com suas respectivas médias e o desvio relativo percentual referente a cada média.

Tabela 8 - Condições efetuadas durante o processo fermentativo para pH em cada experimento

Concentração de N (%)	U _i planejada (%)	Média do pH no processo (%)	Desvio Relativo (%)
0,5	45	3,69 ± 0,25	6,74
1,0	45	3,81 ± 0,34	9,00
0,5	65	3,82 ± 0,20	5,18
1,0	65	3,69 ± 0,43	11,6
0,4	55	3,79 ± 0,22	5,79
0,75	69	3,88 ± 0,24	6,20
1,1	55	3,70 ± 0,45	12,29
0,75	41	3,86 ± 0,42	10,87

N = Nitrogênio; U_i = Umidade inicial

A Figura 14 apresenta o comportamento do pH e da umidade ao longo de 72 horas de fermentação semi sólida utilizando o *Aspergillus niger* CCT 0916 para produção de celulases, analisados para cada experimento realizado.

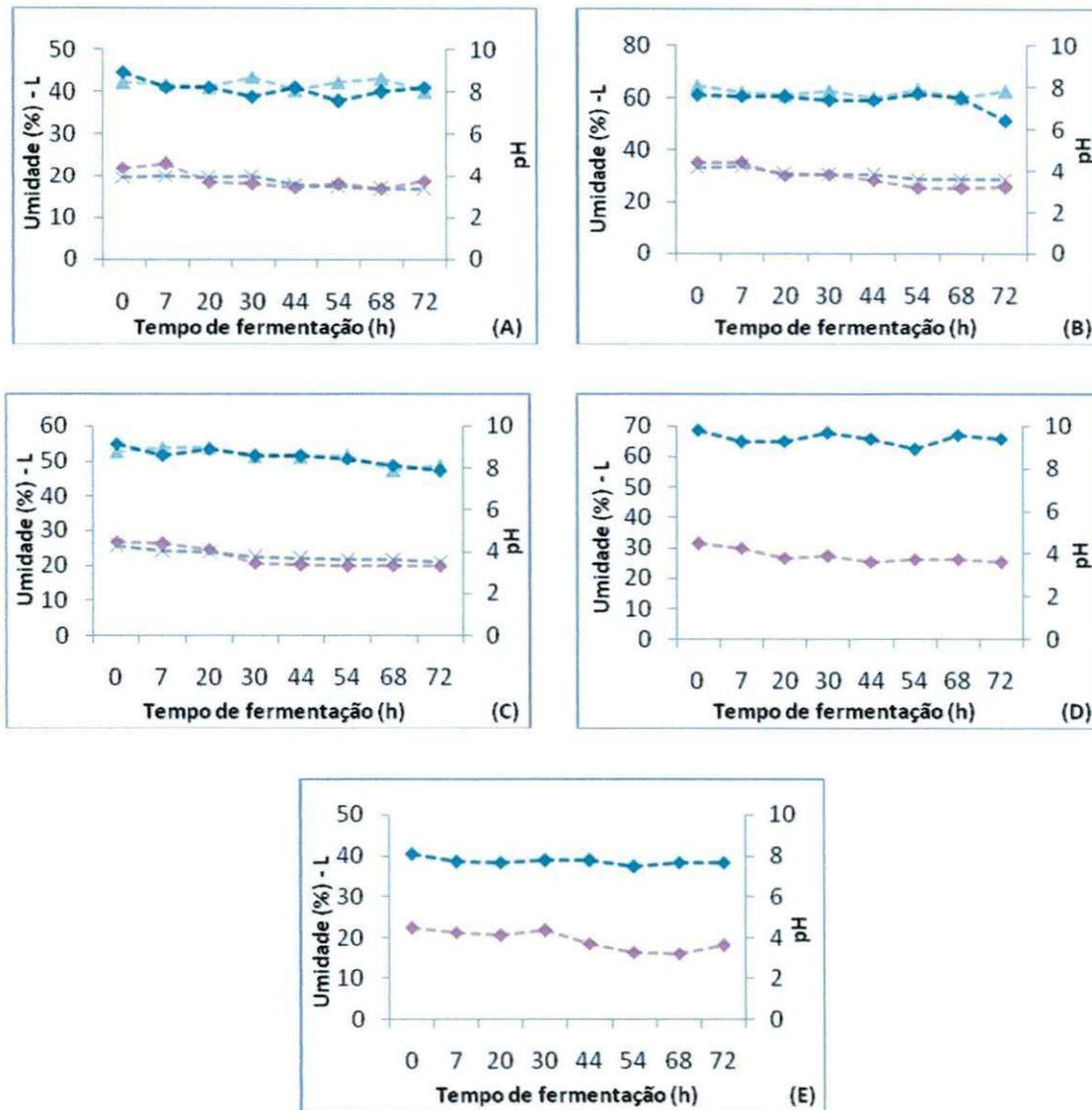


Figura 14 - (A) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 45% de umidade (♦ - U para 0,5% de N; ▲ - U para 1,0% de N; ◆ - pH para 0,5% de N; × - pH para 1,0% de N); **(B)** Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 65% de umidade (♦ - U para 0,5% de N; ▲ - U para 1,0% de N; ◆ - pH para 0,5% de N; × - pH para 1,0% de N); **(C)** Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 55% de umidade (▲ - U para 0,4% de N; ◆ - U para 1,1% de N; × - pH para 0,4% de N; ◆ - pH para 1,1% de N); **(D)** Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 69% de umidade e 1,1% de nitrogênio (♦ - Umidade; ◆ pH); **(E)** Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 41% de umidade e 0,75% de nitrogênio (♦ - Umidade; ◆ pH)

Durante o processo de fermentação, para todos os experimentos realizados, nas condições acima apresentadas pode-se observar que não houve variação significativa para as umidades, isso pode ser um indício de que o metabolismo do microrganismo durante todo o processo não mudou, em média, a umidade no reator, podendo ser justificado pelo fato de que durante a fermentação foi colocado um recipiente contendo água destilada dentro da estufa e que a troca de transferência de massa de umidade manteve o tampão umedecido, servindo como um meio de estabilizar a umidade inicial no interior do reator, fazendo com que toda água evaporada devido ao calor gerado

pelas atividades metabólicas do microrganismo fosse compensada, mantendo assim as condições iniciais de fermentação.

Em se tratando do pH do meio para os experimentos realizados, é possível observar que ocorreu variação do pH em relação a média de até 12,29% , valor esse superior ao erro relativo máximo encontrado na reprodutibilidade dos dados, indicando que em experimentos com desvios acima de 7% houve um efeito dessa variável no processo. Em alguns experimentos o erro relativo ficou próximo ao do desvio da média dos experimento. **Botella et al. (2007)** observaram durante o processo de produção de enzimas com a polpa de uva utilizando o microrganismo *Aspergillus awamori* que o fato de o pH sofrer uma diminuição durante a fermentação pode ser associado à produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos durante a fermentação, e no caso de o pH sofrer um aumento ao longo do processo pode ser justificado pela assimilação destes ácidos por ação microbiana. **Santos (2007)** também percebeu um decréscimo do pH a partir das 35 horas de processo da fermentação de produção de enzimas utilizando o pedúnculo do caju com o *Aspergillus niger*. **Souza (2008)** estudando a produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo agroindustrial como substrato observou que com 22 horas de fermentação, o pH diminuiu, e com relação à estabilidade diante às variações de pH, a enzima apresentou boa tolerância em valores de pH entre 3,5 e 5,5 e que a partir de maiores valores de pH não foi observada atividade enzimática. **Muhammad et al. (2009)** estudando o efeito da temperatura e do pH na produção de celulase com *Aspergillus niger* MS82, observaram que ocorreu uma diminuição do pH para 4,0 nas primeiras 20 horas de incubação, especialmente quando o pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 ou 7,0; e que o pH permaneceu constante em seguida. No entanto, quando o pH do meio foi de 4,0 ou 5,0, ele diminuiu lentamente e tornou-se estável quando chegou a 3,5. Também observaram que as produções de endoglucanase e β -glucosidase não foram iniciadas até que o pH do meio baixou para 4,0.

As Figuras 15 e 16, a seguir, apresentam os resultados da reprodutibilidade, para a atividade celulolítica e teor de açúcares redutores (AR), dos pontos nos experimentos cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio são 55% e 0,75%, respectivamente. A finalidade destes experimentos foi verificar a reprodutibilidade dos dados sendo, portanto, realizados em triplicata.

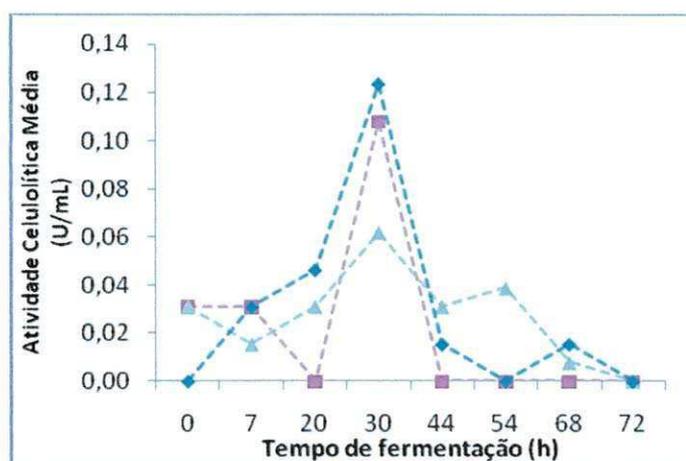


Figura 15 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio com avaliação da atividade celulolítica

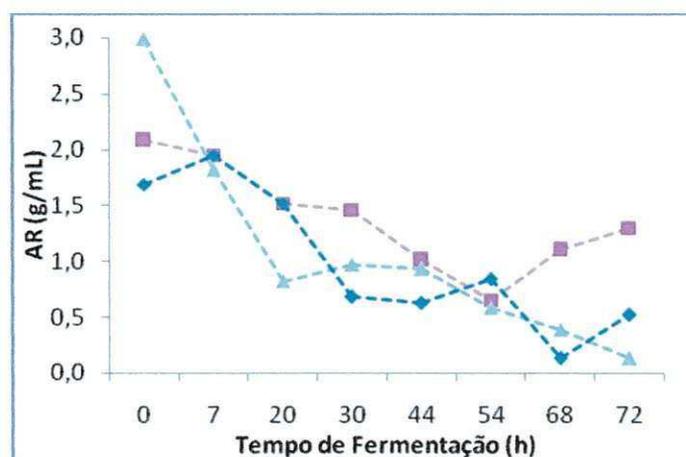


Figura 16 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio com avaliação do teor de AR.

Os dados apresentados na Figura 15 mostram que, em geral, os pontos são bem reprodutivos para a atividade enzimática e que às 30 horas de processo tem-se a maior produção de celulase, que se repete nas três análises, apresentando um desvio padrão de 0,03 para este ponto. Este desvio pode ser justificado devido ao microrganismo vivo que está em constante atividade metabólica.

A Figura 16 mostra que o perfil de açúcares para as condições efetuadas nos três experimentos de reprodutibilidade de dados, tende a cair ao longo do processo, sendo um indício de que houve um provável consumo da fonte de carbono para produção da enzima.

A Figura 17 apresenta o comportamento da atividade celulolítica e de AR ao longo de 72 horas de fermentação semi sólida fermentação da biomassa lignocelulósica do bagaço do caju utilizando o *Aspergillus niger* CCT 0916 para produção de celulases,

analisados para cada experimento realizado, nos quais os extratos foram avaliados pelo método PFase, descrito no item 3.7.

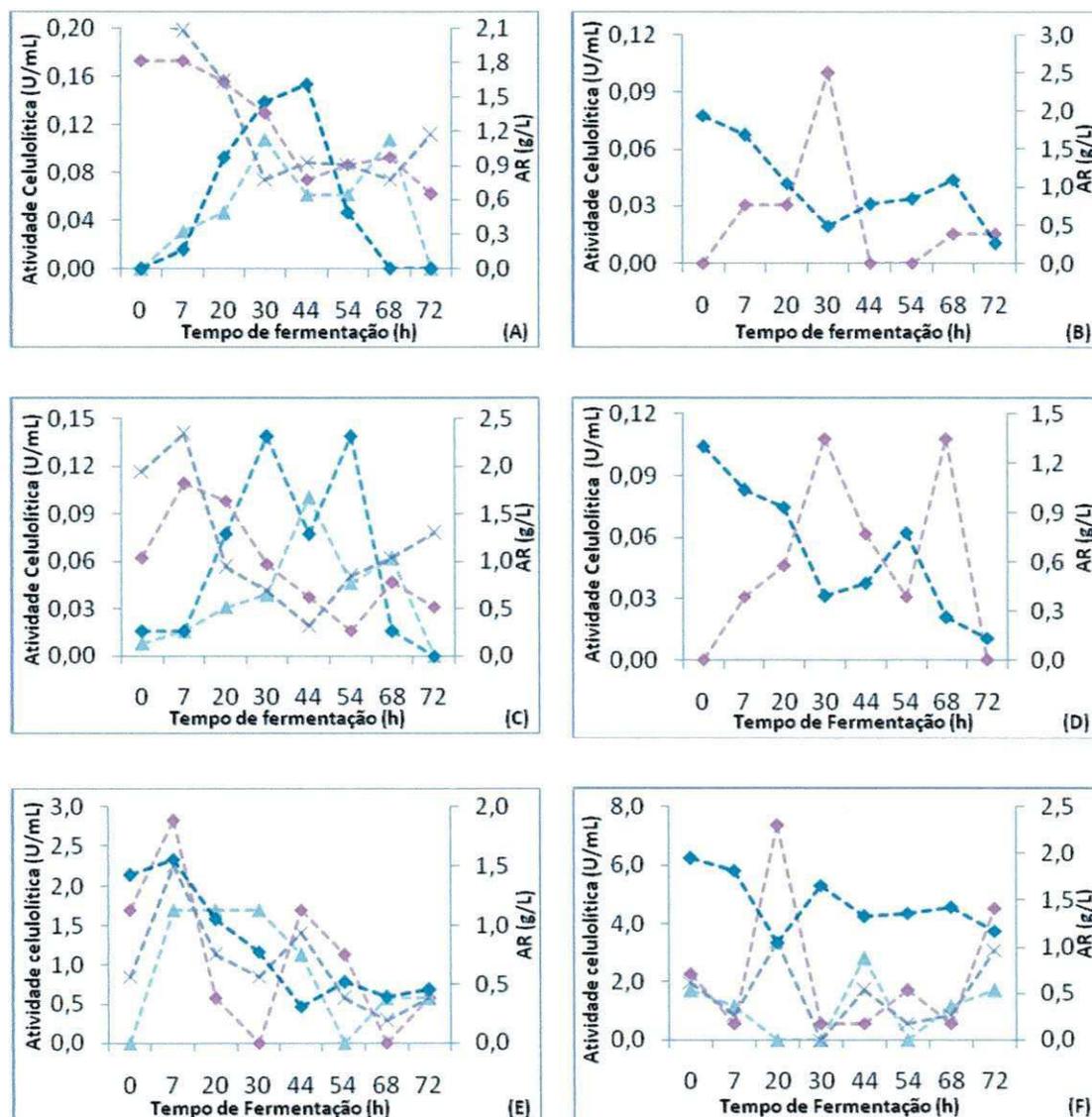


Figura 17 – (A) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 45% de umidade (\blacktriangle - AC para 0,5% de N; \blacklozenge - AC para 1,0% de N; \times - AR para 0,5% de N; \blacklozenge - AR para 1,0% de N); (B) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 65% de umidade e 0,5% de nitrogênio (\blacklozenge - Atividade celulolítica; \blacklozenge - AR); (C) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 55% de umidade (\blacktriangle - AC para 0,4% de N; \blacklozenge - AC para 1,1% de N; \times - AR para 0,4% de N; \blacklozenge - AR para 1,1% de N); (D) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 69% de umidade e 0,75% de nitrogênio (\blacklozenge - Atividade celulolítica; \blacklozenge - AR); (E) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 65% de umidade e 1,0% de nitrogênio (\blacklozenge - AC/Tubo 1; \blacktriangle - AC/Tubo 2; \times - AC/Média; \blacklozenge - AR); (F) Perfil cinético do processo fermentativo do caju lavado para 41% de umidade e 0,75% de nitrogênio (\blacklozenge - AC/Tubo 1; \blacktriangle - AC/Tubo 2; \times - AC/Média; \blacklozenge - AR) – (AC - Atividade celulolítica)

Pode-se observar através da Figura 17 (A) que, para a condição de 45% de umidade e 0,5% de nitrogênio, a cinética de produção enzimática revelou que a produção da enzima celulase iniciou já nas primeiras horas do processo e apresentou picos de 0,11U/mL em 30 e 68 horas de cultivo. Nestes períodos, a concentração de

açúcares foi de 0,78g/L e foram as menores durante todo o processo, sendo um indício de que houve o consumo destes para a produção da enzima. Já para as condições de 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio, a atividade celulolítica atinge seu maior valor em 44 horas de cultivo, chegando a um pico de 0,15U/mL, neste ponto ocorre o maior consumo de açúcares e a sua concentração atinge um valor mínimo de 0,78g/mL. A partir daí a atividade celulolítica começa a cair nas últimas horas do processo, enquanto a concentração de açúcares redutores começa a aumentar, sugerindo que as enzimas degradaram a celulose presente no substrato transformando-a em glicose (Heck et al., 2002).

A Figura 17 (B) mostra que a maior produção de celulase acontece às 30 horas de cultivo atingindo (0,1U/mL) nas condições estudadas. Este valor acontece no mesmo instante em que há um maior consumo de açúcares. Camassola & Dillom (2008) obtiveram este valor após 3 dias de fermentação utilizando bagaço de cana pré-tratado e usado posteriormente na produção de celulases e xylanases pelo fungo *Penicillium echinulatum* 9A02S1.

Para as condições de 55% de umidade e 0,4% de nitrogênio, a concentração de açúcares redutores, representada na Figura 17 (C), é no início do cultivo 1,95 g/L, aumentando rapidamente nas primeiras 7 horas, chegando a 2,34 g/L e depois passa a cair entre 7 e 44 horas de processo. Nas primeiras horas de cultivo observa-se o início da produção de celulases, apresentando valor máximo de 0,10 U/mL em 44 horas de processo, quando há consumo máximo de açúcares redutores (0,31 g/L) indicando um possível consumo de celulose para a produção de celulases. E para as mesmas condições de umidade e com 1,1% de nitrogênio, a concentração de açúcares redutores no início do processo é de 1,04 g/L, e entre 0 e 7 horas de fermentação este teor de açúcar sofre um aumento, o que pode ser justificado pelo fato de a velocidade de hidrólise de outros carboidratos seja maior que a velocidade de consumo de açúcares redutores por parte dos microrganismos. A partir deste ponto, há um indício de que os açúcares passam a ser consumidos de modo mais acentuado, chegando ao valor de 0,26 g/L. Neste instante tem-se o segundo pico de produção de celulase pelo *Aspergillus niger* CCT 0916. É possível que esteja ocorrendo o consumo do carboidrato como fonte de carbono resultando na produção da celulase.

No experimento realizado para 69% de umidade e 0,75% de nitrogênio, mostrado na Figura 17 (D), pode-se verificar o primeiro pico de produção de celulase com 30 horas de cultivo e o segundo com 68 horas, ambos apresentando 0,11U/mL de

atividade. Este experimento apresenta alto teor de umidade, com isso os açúcares se encontram dissolvidos no meio, facilitando o transporte do interior para o exterior da partícula do sólido.

Os resultados para os experimentos mostrados na Figura 17 (E) e (F) não apresentaram boa reprodutibilidade de análise para as condições apresentadas, isto pode ser explicado por dificuldades elétricas ocorridas no laboratório durante estas análises, que repercutiram em problemas técnicos no equipamento. Sendo assim, fica impossibilitado o confronto destes dados de produção de celulase com os demais parâmetros avaliados durante o processo fermentativo.

4.3.2 Bagaço do caju sem lavar

Assim como o resíduo do pedúnculo de caju lavado, para o resíduo sem lavar foram efetuados todos os experimentos, realizados em triplicata, variando a umidade inicial do meio e a suplementação com uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), que também tiveram como finalidade verificar a reprodutibilidade dos dados. Após a fermentação foram analisados os parâmetros: umidade do meio, pH e atividade celulolítica. Os resultados de reprodutibilidade para estes experimentos cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio são 55% e 0,75%, respectivamente, são mostrados a seguir na Figura 18, apresentando o perfil cinético de cada processo para os parâmetros pH e umidade, e na Figura 19, para a atividade celulolítica, analisados ao longo de 72 horas de fermentação.

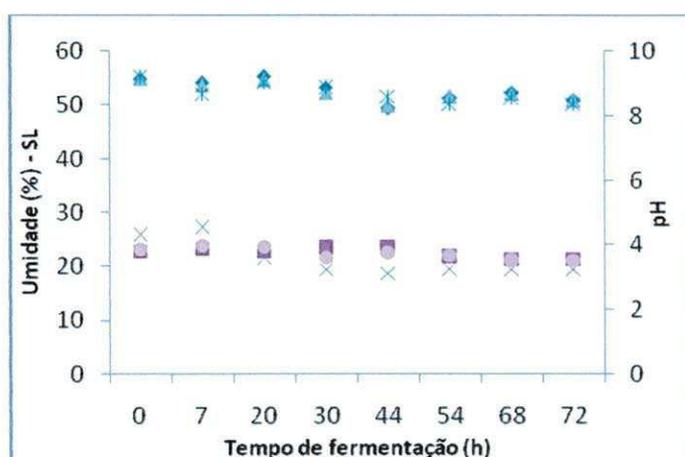


Figura 18 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio
(♦ - ▲ - x - Umidade; ■ - x - ● - pH)

Os resultados para as variáveis umidade e pH, dos pontos nos experimentos de reprodutibilidade de dados são mostrados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 - Dados referentes a umidade dos experimentos de reprodutibilidade de dados durante o processo fermentativo.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	EXPERIMENTO			MÉDIA	ERRO RELATIVO (%)
	5	6	7		
0	54,82	54,82	55,03	54,89 ± 0,09	0,17
7	54,14	53,62	52,11	53,29 ± 0,79	1,48
20	55,29	54,56	54,28	54,71 ± 0,38	0,70
30	53,30	52,26	53,20	52,92 ± 0,44	0,83
44	49,35	49,81	51,58	50,25 ± 0,89	1,77
54	51,35	51,53	50,16	51,01 ± 0,57	1,12
68	52,40	52,16	51,35	51,97 ± 0,41	0,79
72	50,79	50,84	50,22	50,62 ± 0,26	0,52

Durante as 72 horas de fermentação a umidade apresentou um erro relativo máximo de 1,77%. Considerando ser um erro baixo, sugere-se que a umidade não variou de forma expressiva para cada ponto da triplicata durante a cinética de fermentação para o bagaço do caju sem lavar. A variação da umidade mínima e a máxima foi de 8%, estando bem acima do valor do erro relativo, podendo sugerir que o metabolismo do microrganismo pode ter provocado essa variação de umidade durante o processo fermentativo.

Tabela 10 - Dados referentes ao pH dos experimentos de reprodutibilidade de dados durante o processo fermentativo.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	EXPERIMENTO			MÉDIA	ERRO RELATIVO (%)
	5	6	7		
0	3,80	4,28	3,87	3,87 ± 0,20	4,97
7	3,87	4,52	4,00	4,13 ± 0,26	6,30
20	3,80	3,57	3,96	3,78 ± 0,14	3,65
30	3,89	3,24	3,59	3,57 ± 0,22	6,22
44	3,90	3,13	3,76	3,60 ± 0,31	8,65
54	3,61	3,23	3,68	3,51 ± 0,18	5,26
68	3,56	3,25	3,50	3,44 ± 0,12	3,62
72	3,55	3,25	3,51	3,44 ± 0,12	3,62

O pH, para estes experimentos, apresentou um erro relativo máximo de 6,30%. Este valor pode ser considerado como apreciável para reprodutibilidade de experimentos, pelos mesmos motivos justificados para os experimentos com o bagaço

lavado na reprodutibilidade de dados. A variação do valor mínimo e máximo do pH foi de 16,7% sugerindo que houve efeito do pH durante esse processo de fermentação.

A Figura 19 a seguir apresenta os resultados para a atividade celulolítica nos experimentos cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio são 55% e 0,75%, respectivamente. Estes experimentos foram realizados em duplicata para verificar a reprodutibilidade dos dados nestas condições.

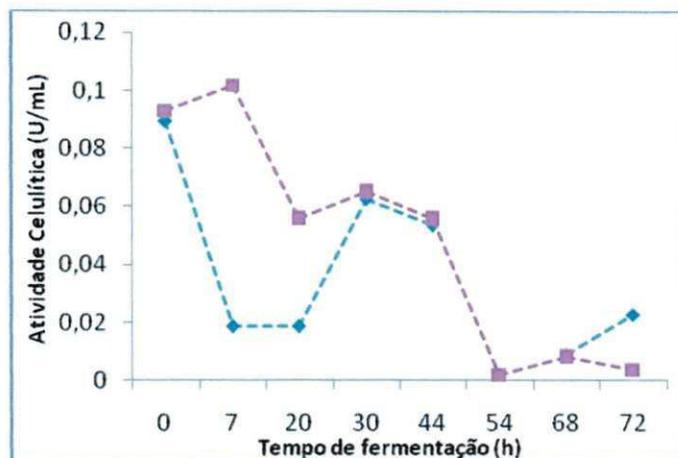


Figura 19 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para os experimentos de reprodutibilidade de dados com 55% de umidade e 0,75% de nitrogênio com avaliação da atividade celulolítica

O perfil cinético exposto acima aponta que, dos 8 pontos avaliados, 5 deles apresentam reprodutibilidade de dados para a atividade enzimática, e que o bagaço de caju sem lavar *in natura* apresentou uma atividade celulolítica de 0,09U/mL e que se repete nas duas análises de enzima.

A Figura 20 apresenta o comportamento do pH e da umidade, ao longo de 72 horas de fermentação semi-sólida utilizando o *Aspergillus niger* CCT 0916 para produção de celulases, analisados para o experimento realizado com as seguintes condições: 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio, uma vez que, para as mesmas condições, o caju lavado apresentou a maior atividade celulolítica média.

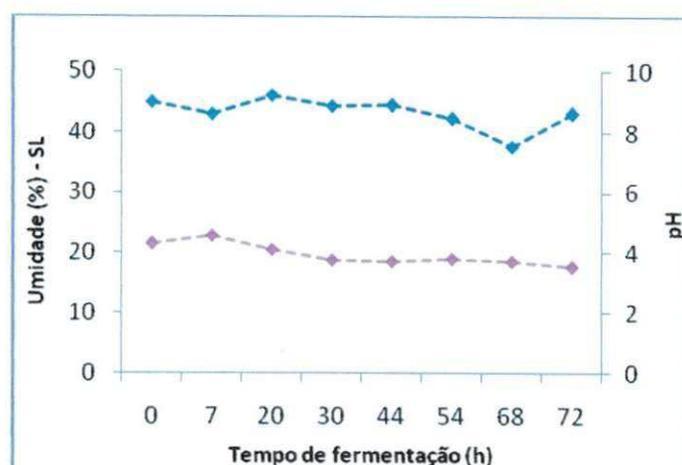


Figura 20 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio (♦ - Umidade; ♦ - pH)

Durante o processo realizado para o experimento nas condições acima descritas a umidade apresentou um valor médio de $43,21 \pm 1,70$, em base úmida, ou seja, os resultados apresentaram um erro relativo em relação à média da umidade de 3,94%. Considerando ser 1,70 (3,94%) um desvio baixo, pode-se sugerir que a umidade não variou de forma expressiva, em média, durante a cinética de fermentação, podendo ser um indício de que o metabolismo do microrganismo durante todo o processo não alterou a umidade no reator.

O pH, para este experimento, apresentou um valor médio de $3,96 \pm 0,29$ com um erro do relativo em relação a média de 7,30%. Este valor (7,30%) pode ser considerado significativo e pode ser justificado pela produção e/ou assimilação de ácidos orgânicos pelos microrganismos durante o processo fermentativo.

A Figura 21 apresenta os resultados para a atividade celulolítica no experimento cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio são 45% e 1,0%, respectivamente. Através desta, é possível analisar que, para estas condições, a cinética de produção enzimática revelou que o cultivo da enzima celulase iniciou já nas primeiras horas do processo e apresentou picos de 0,19U/mL e 0,14U/mL em 7 e 30 horas de cultivo respectivamente. Para o experimento realizado nas mesmas condições com o bagaço de caju lavado, a atividade celulolítica atinge seu maior valor em 44 horas de cultivo, chegando a um pico de 0,15U/mL. **Menezes et al. (1991)** obtiveram valores próximos a 0,25 UI/mL de celulase total de *Aspergillus niger*, quando utilizaram bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio 4%, como fonte de carbono e **Umikalsen et al. (1997)** utilizando uma linhagem de *Chaetomium globosum* verificou que esta apresentou bom crescimento e substancial quantidade de celulase em fibras deslignificadas de palma, produzindo extrato celulolítico cuja atividade de celulase total

foi 1,4 UI/mL. **Victor et al. (2003)** obtiveram 0,0743, 0,0573 e 0,0502 UI/mL de celulase dentro de 12h de fermentação quando serragem, bagaço de cana e sabugo de milho, respectivamente, foram utilizadas como substratos a partir de uma cepa de *Aspergillus flavus*.

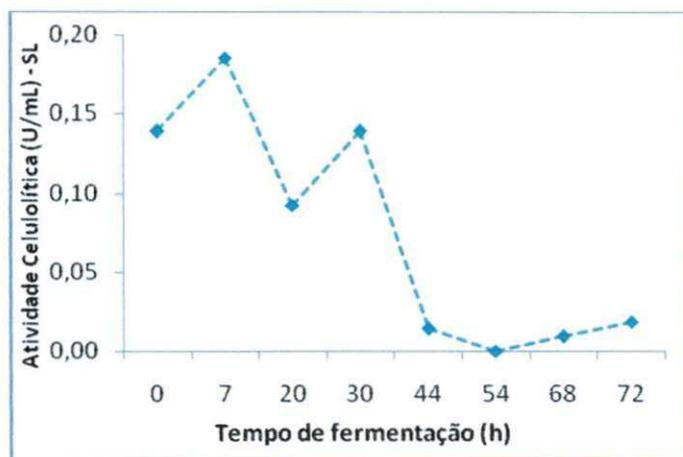


Figura 21 - Perfil cinético do processo fermentativo do caju sem lavar para 45% de umidade e 1,0% de nitrogênio (♦ - Atividade celulolítica)

5. CONCLUSÃO

Caracterização:

✓ A caracterização dos resíduos secos do pedúnculo de caju lavado e sem lavar mostrou, através dos dados experimentais, que estes possuem viabilidade para serem utilizados como substratos na síntese de celulases por fermentação semi-sólida, visto que apresentaram um pH comumente encontrado nos resíduos agroindustriais utilizados em fermentações para a produção de celulases por *Aspergillus niger* (4,58 para o lavado e 4,33 para o sem lavar), e uma boa fonte de carbono representada pelos açúcares redutores do bagaço lavado de 10,02, sendo estas condições favoráveis a adaptação do fungo propícios para produção destas enzimas.

✓ Com a secagem, os resíduos ficaram com umidade de 5,87 para o resíduo lavado e 8,22 para o resíduo sem lavar. Estes valores de umidade associados ao pH dos resíduos, por volta de 4,0; permitiram que os resíduos fossem armazenados em temperatura ambiente durante o decorrer dos experimentos.

Processo Fermentativo:

✓ O processo fermentativo do bagaço do caju lavado ocorreu durante 72 horas apresentando ao longo desse tempo um valor médio para a umidade nos experimentos de reprodutibilidade de dados de $52,72 \pm 1,18$, em base úmida. Para o bagaço de caju sem lavar, a umidade apresentou um valor médio para estes experimentos de $52,46 \pm 1,54$, em base úmida.

✓ O pH, para os mesmos experimentos apresentou um valor médio de $3,71 \pm 0,23$, para o bagaço do caju lavado. Para o resíduo sem lavar, o pH apresentou um valor médio de $3,96 \pm 0,29$.

✓ Para os experimentos realizados sob as demais condições, para o resíduo do caju lavado, todos apresentaram valores sem uma variação significativa para as umidades, uma vez que toda água evaporada devido ao calor gerado pelas atividades metabólicas do microrganismo pode ter sido compensada pelo fato de ter sido colocado um recipiente contendo água destilada dentro da estufa, mantendo assim as condições iniciais de fermentação no interior do reator.

✓ Em se tratando do pH do meio, para o mesmo bagaço, foi observado que sua variação ao longo da fermentação foi significativa para alguns experimentos realizados, uma vez que os erros relativos percentuais foram acima de 7%, erro relativo esse encontrado como máximo na reprodutibilidade dos dados.

✓ Em termos de produção de celulase, utilizando o bagaço do caju lavado, os resultados da reprodutibilidade de dados nos experimentos cujas condições de umidade e concentração de nitrogênio foram 55% e 0,75%, respectivamente, mostram que, em geral, os pontos são bem reprodutivos, sendo que às 30 horas de processo obteve-se a maior produção de celulase que se repetiu nas três análises, com um desvio padrão de 0,03 para este ponto. Para o teor de açúcares redutores (AR), nas condições efetuadas nos três experimentos de reprodutibilidade de dados, seu perfil tende a cair ao longo do processo, sendo um indício de que houve um provável consumo da fonte de carbono para produção da enzima.

✓ Os resultados para os experimentos realizados nas condições de 65% e 41% de umidade, e 1,0% e 0,75% de nitrogênio, para o bagaço lavado, não apresentaram boa reprodutibilidade de análise, ficando impossibilitado o confronto destes dados de produção de celulase com os demais parâmetros avaliados durante o processo fermentativo.

✓ Os maiores valores de atividade celulolítica para o resíduo do pedúnculo do caju lavado, foram obtidos nos experimentos com 45% e 1,0% de umidade e nitrogênio, respectivamente e 55% e 1,1% de umidade e nitrogênio, respectivamente, sendo os picos de atividade de 0,15 U/mL às 44 horas de processo para o primeiro, e 0,14 U/mL as 30 e 54 horas de fermentação, para o segundo. Estes valores, comparados aos da literatura, são bons, visto que a celulase é uma enzima que apresenta baixo rendimento e o microrganismo utilizado foi modificado geneticamente para produção de pectinase.

✓ Os demais experimentos apresentaram os maiores picos de produção de celulase em 30 horas de fermentação.

6. PERSPECTIVAS:

Com o objetivo de dar continuidade ao trabalho realizado, segue abaixo algumas sugestões:

- ✓ Para realização de novas fermentações para a produção da enzima celulase, recomenda-se outra cepa de *Aspergillus niger*, que não o CCT 0916 ou outro microrganismo;
- ✓ Utilizar e/ou otimizar um método para extração da enzima observando o efeito da relação da quantidade de fermentato e solvente de extração, a temperatura, tempo e processo de agitação;
- ✓ Empregar novos métodos de análise para determinação da atividade celulolítica, como por exemplo o método CMCase ou cromatografia, visto que neste trabalho foi empregado o método PFase, obtendo-se uma atividade celulolítica total.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, C. D. G. **Agroindústria e meio ambiente na experiência brasileira**. COPPE/UFRJ, 1999. Disponível em: <http://www.produto.ufrj.br/abepro/enegep96/2/a>. Acesso em: 10/09/2003.

ABDELNASSER, N. H., HELMY, S. M., EL GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, n. 7, p. 249-255, 1997.

AFONSO JÚNIOR, P. C. A.; CORRÊA, P. C.; SILVA, F. S.; RIBEIRO, D. M. Atividade de água, crescimento microbiológico e perda de matéria seca dos grãos de café (*coffea arabica* L.) em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.1, p.17-24, 2003.

AGUILAR, C.N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 565-570, 2001.

AGUIAR C. L., MENEZES T. J. B. **Produção de celulasas e xilase por *Aspergillus Niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**, B.CEPPA, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000

AGUIAR, C. L. **Sacarificação de bagaço de canadeaçúcar (*Saccharum* spp) usando extrato enzimático**. Piracicaba, 1998. p. 77. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, K., V., **Caracterização físico-química da farinha de casca de frutos tropicais**, Monografia de Conclusão de Curso, Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, 2009.

ALVES, R. M. V. Quem tem medo de atividade de água? In: Atividade de água em alimentos. JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. Campinas: ITA, p. 13.1-13.8, 1997.

AMORIM, B. C., Estudo da utilização de resíduos agroindustriais em processos bioquímicos, p.Relatório de Estágio Integrado – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, 2008

ANDRADE, A. M., NUNES, W. H., ABREU, H. S., SOUSA E.L. Polpação Kraft do estipe de *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro). **Floresta e Ambiente**, v. 07, n. 01p. 227 – 237, jan/dez. 2000.

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

A.O.A.C., **Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists**.12th ed.: Washington, 1997.

A. Radzicka, R. Wolfenden (1995), "A proficient enzyme.", *Science*, 6(267), p. 90-931

Assessória de Comunicação Fundação Banco do Brasil. Projeto Caju é apresentado ao presidente Lula. Imprensa - Pautas de agosto 2007. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/consea/excc/pauta_meses.cfm?cod=16229&mes=8&ano=2007. Acesso em 18/10/2007.

ASTHER, M.; HAON, M.; ROUSSOS, S.; RECORD, E.; DELATTRE, M.; LESAGEMEESSEN, L.; LABAT, M.; ASTHER, M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 685-691, 2002.

ATTILI, D. S. Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

BASTOS, V. D. Etanol, Alcooquímica e Biorrefinarias, BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, março, 2007.

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

BELSHAW, N.J.; WILLIAMSON, G. Production and purification of a granular-starchbinding domain of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v. 269, n. 2, p. 350-353, 1990.

BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degradating enzymes and their Potencial Industrial Application. **Biotechnol adv**, v.15, n 3-4, p. 586 – 620,1997.

BIGELIS, R. Carbohydrases. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G. (Ed.). **Enzyme in Food Processing**. San Diego : Academic Press, 1993. Cap. 6, p. 121-158.

BISARIA, V. S., GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 3, p. 90104, 1984.

BISARIA, R., MADAN, M., VASUDEVAN, P. Utilisation of agroresidues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 58, 1997.

BITTENCOURT, L. R. SILVEIRA, M. M. DILLON, J. P. Produção de celulasas de *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos contendo sorbitol ou glicerol. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, 5., 2002, Brasília (DF). **Anais.. Brasília (DF)**, 2002

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: fundamentos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, p. 254.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. **Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation**. **Process Biochemistry**, v.42, n.1, p. 98-101, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília: Editora MS, 2005, 1017 p.

BRYJAK, J. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 347–355, 2003.

CAMASSOLA M., DILLON A. J.P. - Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*, industrial crops and products 29 (2009) 642–647.

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

CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CAMPOS, A. R. N. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação semi-sólida. 2003. 85f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química). Centro de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

COELHO, M. A. Z., **Purificação da Poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* 3T5B8**. Tese de M. Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, 1993.

COONEY, C.L. Growth of microorganisms. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise**. 1981, v. 1, 75-112.

CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

COSTA, C. J., MEDEIROS, N., SILVA, N. L., LIMA FILHO, J. L., DA SILVA, M. P. C. Utilização de meios nutritivos regionais no cultivo de *Aspergillus oryzae*, para a produção de amilase, celulase, lipase e protease. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 1997. **Anais...** Recife : UFPE, 1997. 210 p.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8.** 1993. 198f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DARTORA, A. B. et al. Seleção de fungos filamentosos e estudo de diferentes indutores para produção de pectinase em processo semi-sólido. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, Fortaleza, **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Fortaleza, 2000, v. 3. p. 9101-9101.

DA SILVA, R., YIM, D. K., PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109111, 1994.

DRAETTA, I. S., LOBO FILHO, M. Celulases de basidiomicetos: purificação e caracterização. **Coletânea do ITAL**, v. 11, p. 163-184, 1980.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial Fermentação em Estado Sólido. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. vol.2.

DE PAULA, E.H.; AZEVEDO, M. O. . Biodegradação de resíduos agroindustriais pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* II Análise da expressão gênica sob condições de indução direta e indireta. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996.

DIAZ-GODINEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and

submerged fermentation: a comparative study. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 271- 275, 2001.

DOELLE, H. W. Joint venture capital investment for clean technologies and their problems in developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n.12: p. 445 – 450, 1996.

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

EMBRAPA. Tecnologias. 2004. Disponível em:

www.cnpq.embrapa.br/tecnologias/quersabermas/500p/P256.html). Acesso em: 23 de Janeiro de 2004.

FARIA, F.S.E.D.V. Influência de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e na elaboração de fermentados de caju (*Anacardium occidentale*, L.) em diferentes condições de fermentação. 1994. 99f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FELLOWS, P. **Tecnologia del procesado de los alimentos: principios e practicas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FENNEMA, O. **Food chemistry**. New York: Marcel Decker, 1996.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIM, A. C. R., CHAVESALVES, V. M., COELHO, J. L. C., SILVA, D. O., ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 15-18, 1996.

FONTANA, R. C.; SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. Efeito das concentrações de pectina e glicose sobre a formação de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. In: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. **Anais...** Recife: ____, 2005. CD.

FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; DEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargil, 2001, 221 p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 1).

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

GILKES, N. R.; LANGSFORD, M. L.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. Jr.; WARREN, R. A. J. **Mode of action and substrato specificities of cellulases from cloned bacterial genes**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 259, n. 16, p. 10455-10459, 1991.

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

GOKHALE, D. U. Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 137,138, 1986.

GONG, C. S., TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Process**, v. 3, p. 111-139, 1975.

GOUKA, R.J.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**., v. .47, p. 1–11, 1997.

GUTIERREZ-CORREA, M., TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

GUPTA, A., MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and betaglucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Process**, v. 13, n. 4, p. 166-169, 1997.

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.

IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. An alternative to the Guggenheim, Anderson and De Boer model for the mathematical description of moisture sorption isotherms of foods. **Food Research International**, v. 28, n. 3, p. 317-321, 1995.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos/coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4 ed 2008.

ISRAEL M. C., **Utilização do Resíduo do Processamento do Palmito para a Produção de Enzimas Hidrolíticas por Fungos do Gênero *Polyporus***, Dissertação de mestrado, Blumenau, p.17, 2005.

IYAYI, A.E. (2004) Changes in the cellulose, sugar and crude protein contents of agro-industrial by-products fermented with *Aspergillus niger*. *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. *Afr. J. Biotech.* 3, 186–188

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p.1-5, 2000.

JUHASZ, T. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochem.* 40, 3519–352, 2005.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR. A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDEL W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 21. p. 493-521.

KANG, S.W. et al. (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 91, 153–156

MAHESH C., ALOK K., NEELAM S. S., SHAIENDRA S. G., MAHENDER P. D., RAJINDER S. S., Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases, *Bioresource Technology*, 1659–1662, Índia, 2009.

Md. Z. ALAM, A.A. MAMUN, I.Y. QUDSIEH, S.A. MUYIBI, H.M. SALLEH, N.M. OMAR, Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor, *Biochemical Engineering Journal* (2008).

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 116120, 1997.

MENEZES, T. J. B., DE LAMO, P. R., ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. **Coletânea do ITAL**, v. 7, p. 91-96, 1976.

MENEZES, T. J. B., HENNIES, P. T. Influência do prétratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.

MILAGRES, A. M. F., BORGES, L., AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. **Anais do SHEB**, n. 4, p. 261269, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.

MINAMI, N.M.; KILIKIAN, B.V. Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. **Journal of Chromatography**, v. 711, p. 309– 312, 1998.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61 – 138, 2000.

MITTIDIARI, S. SCHRANK, A. VAINSTEIN, M. H., Produção de Enzimas Hidrolíticas para Formulação de Detergentes Biodegradáveis. In: SEMINÁRIO

BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. , 5., 2002, Brasília (DF). **Anais**. Brasília (DF), 2002.

MONTIEL-GONZÁLEZ, A.M. et al. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2085-2090, 2004.

MORAIS S. A. L., NASCIMENTO E. A. e MELO D. C., Análise da madeira de *Pinus oocarpa* PARTE I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis, R. Árvore, Viçosa-MG, v.29, n.3, p.461-470, 2005.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNECCO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L.; PINTO, S. A. A. Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização in natura. Rev. Bras. Frutic., v.23, n.3, Jaboticabal, Dec. 2001.

MUHAMMAD S., ROQUYA S., AQEEL A., SHAKEEL A. K. - Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and Ph, Department of Microbiology, University of Karachi, Karachi 75270, Pakistan - New Biotechnology _ Volume 00, Number 00 _ February 2009 RESEARCH PAPER ELSEVIER.

MURTHY, M.; KARANTH, N.; RAO, K. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation. **Adv. App. Microb.**, v.38, p.99-147, 1993.

NEDER, R. N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo : Nobel, 1992. 138 p.

NOVO NORDISK. **Celluclast 1,5 L**: ficha técnica. [Curitiba],1996. 3 p.

ORBERG, P. K. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon, 1981.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005. 294p.

OSHIMA, K., CHURCH, M. B. Industrial mold enzymes. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 67 – 70, 1923.

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

PANDEY, A. Recente process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109 – 117, 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LEON, J. A. R. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech, 2001.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271-1278, 2002.

PAULI, G. Upzing, How to create more income, create more jobs and eliminate pollution. **Special advanced edition for the Third World Congress on Zero Emissions**. 1997.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia I**. São Paulo: Mc Graw – Hill, 1980, v. 1,

PELCZAR, **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998. cap. 10. p. 258-271.

PENA, R. S.; RIBEIRO, C.C; GRANDI, J. G. Aplicação de modelos matemáticos bi e triparamétricos na predição das isotermas de adsorção de umidade de guaraná (*Paullinia cupuna*) em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p. 8-11, 2000.

PERAZZO NETO, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus indica* Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. 130f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro.

PEREIRA JR., N. Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química. EQ/UFRJ, Prêmio Abiquim de Tecnologia 2006.

PESSOA, M.L.A.; ANDRADE, S.A.C.; SALGUEIRO, A.A.; STAMFORD, T.L.M. Aproveitamento de subproduto industrial de óleos vegetais para produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* DM 644. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, Campinas, 2003.

PETER, W.S.; CHIOU, S.W.; CHIU, C.R. Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Chin.- Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 171-182, 2001.

PINTO, G. A. S., Produção de tanase por *Aspergillus niger*. 2003. 180f. Tese (Doutor em ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pósgraduação de Tecnologia de Processos. Rio de Janeiro.

POLAKOVIC, M.; BRYJAC, J. Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 57-63, 2004.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca.** 2002, 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.127-135, 2003.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N. , BANO, Z. Biopotentialities of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v.37, p.223-361, 1992.

RAJEEV K. S., REETA R. S., GINCY M. M., PANDEY A. - Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology - Renewable Energy 34 (2009) 421–424, India - Contents lists available at ScienceDirect.

RAJOKA, M. I., MALIK, K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 21-27, 1997.

RAMANA MURTHY, M. V., KARANTH, N. G., RAGHAVA RAO, K. S. M. S. Biochemical Engineering Aspects of solid-state fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, v. 38, p.99-146,1993.

RANGANA, S., **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New Delhi: Tata McGraw- Hill, Publishing Company Limited, p. 94-95, 1979.

RIZZATTO, M. L.; GOMES, E.; MONTE ALEGRE, R Pectinase production by solid-state fermentation of orange bagasse by *Penicillium italicum* and *Aspergillus niger*. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais doXXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001.

ROBISON, T.; NIGAM, P. Biorreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.197 – 203, 2003.

ROBSON, L. M. & CHAMBLISS, G. H., **Cellulases of bacterial origin**. *Enzyme and Microbial Technology* 11:626-644, 1989.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; Práticas de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. *Micologia Veterinária. Prática 8*. Seropédica, 2002.

ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., GEOFFROY, F., SAUCEDO-CASTANEDA, G., 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.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil.** Revista Brasil. Bot., V.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004

RUGGIERO C., 2002. Disponível em: www.todafruta.com.br. Acessado em: 09 de Fevereiro de 2008 as 22:11.

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Glucoamylase immobilized on montmorillonite: synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. **Catalysis communications**, v. 6, n. 8, p. 525-530, 2005.

SANT'ANA JR., G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. (Coord.) **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 14. p.351-362.

SANTOS, S. F. M.; **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato.** 2007. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL W.; BORZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.) **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.** 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 2. p. 5- 18 e cap 8. p. 179-192.

SERAFINI, R.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

SERMANNI, G. G.; PORRI, A. **The potentiality of solid state biotransformation of lignocellulosic materials.** Chimica oggi. Março: 15 – 19, 1989.

SILVA, R.N.; ASQUIERI, E.R.; FERNANDES, K.F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1155-1159, 2005.

SILVA, J. D. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. São Paulo: Editora UFV, 1998, 166 p.

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

SOUZA R. L. A., Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo do maracujá como substrato, p. 70 – Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2008.

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 – XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Recife, Pernambuco 14 a 17 de Setembro de 2008.

SPIER, M.R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas _-amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUHET, M. I. Enriquecimento protéico do resíduo da industrialização do abacaxi (*Ananas comosus Merrill*) por fermentação utilizando fungos filamentosos. Tese de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 1999).

TANUJA, S.; SRINIVAS, N.D.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GOWTHAMAN, M.K. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amiloglicosidase. *Process Biochemistr*, v. 32, n. 8, p. 635-641, 1997.

TEIXEIRA, D. E., COSTA, A. F., SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. *Scientia Forestalis*. V. 52, p.29-34, dez.1997.

THIEMANN, J. E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referência às celulases. In: Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá. P. 107 – 131, 1985.

THORSEN, T.S.; JOHNSEN, A.H.; JOSEFSEN, K.; JENSEN, B. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1764, p. 671-676, 2006.

TIMMERMANN, E.O. Multilayer sorption parameters: BET or GAB values? *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 220, n. 1-3, p. 235-260, 2003.

TIMMERMANN, E. O.; CHIRIFE, J.; IGLESIAS, H. A. Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering*, v. 48, n.1, p.19 -31, 2001.

TONINI, R. C. G.; **Utilização da Bainha Mediana de Palmito (*Euterpe edulis* Mart. – Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler, 125p.; Dissertação de Mestrado, Faculdade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau 2004.**

TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulose. *Biotechnology Bioengineering*, n.6, p.207 – 219, 1976.

TRINDADE, V.; DANIEL, M. R.; CASTILHO, L. R.; COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996.

UMIKALSON, M. S., ARIFF, A. B., SHAMSUDDIN, Z. H., TONG, C. C., HASSAN, M. A., KARIN, M. I. A. Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium*

globosum using delignified oil palm emptyfruitbunch fibre as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 590-595, 1997.

UPDEGRAFF, D. M. **Semimicro determination of cellulose in biological materials.** Analytical Biochemistry, V.32, p.420-424, December 1969.

VENTURA A. M., LIMA R. T., Production of cellulase by a wild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm emptyfruitbunch fibre as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 590-595, 1997.

VICTOR, O.T. et al. (2003) Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corn cob. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 150– 152

VIEIRA, G. R. T.; **Estudo das condições de cultivo “in vitro” de *Polyporus tricholoma* Mont para incrementar a produção de substâncias antibacterianas.** 2005. 121p.; Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2005.

VLAEV, S. D., DJEJEVA, G., RAYKOVSKA, V., SCHÜGERL, L. Cellulase production by *Trichoderma* sp grown on corn fibre substrate. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 561-565, 1997.

VILLEN, R.A. **Biotechnologia: histórico e tendências.** Disponível em: <<http://www.hottopos.com>>. Acesso em: 20 de março de 2007.

VITTI, L. S. S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana.** Piracicaba, 1988. 108 p. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

VITTOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.). **Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos.** 1. ed., v. 4. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 14. p. 387-418.

VITOR HUGO DE OLIVEIRA/EMBRAPA, Disponível em: www.cajucultura.com.br,
Acessado em: 09 de Fevereiro de 2008 as 20:08.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza:
Acribia, 1995. 228 p.

WALLIS, G.L.F.; SWIFT, R.J.; ATTERBURY, R.; TRAPPE, S.; RINAS, U.;
HEMMING, F.W.; WIEBE, M.G.; TRINCI, A.P.J.; PEBERDY, J.F. The effect of *pH* on
glucoamilase production, glycosilation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*.
Biochimica et Biophysica Acta, v.1527, p. 112-122, 2001.

WIKIPEDIA FOUNDATION INC, The Free Encyclopedia. *Aspergillus niger*.
Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger#Industrial_use>.
Acesso em: 23 abr. 2006.

XIONG, H. et al. - Influence of pH on the production of xylanase by *Trichoderma reesei*
Rut C-30. *Process Biochem.* 39, 729–733, 2004

ZILÁ R. A., SUELI C. M. M., ZILDA MARIA A. R. e ELIANA M. G.F. **Pesq.
agropec. bras. vol.35 no.3 Brasília Mar. 2000 - PRODUÇÃO DE INÓCULO DE
ALTERNARIA CASSIAE.**

ZHENG, Z.; SHETTY, K., **Cranberry processing waste for solid state fungal
inoculant production.** *Proc. Biochem.*, v.33, pp.323-329, 2000.

ANEXO I

(Procedimento de preparação do meio básico formulado no
laboratório do CTAA)

O meio foi preparado dissolvendo a pectina em água destilada sob agitação vigorosa. Posteriormente, os outros componentes foram adicionados, e o volume do balão aferido. O meio foi então levado à fervura para cozimento do Agar e depois distribuído em tubos de ensaio (18x180mm), nos quais foram adicionados 20mL do meio e tampados com rolhas de algodão envolvidos em gaze. O meio foi então esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 0,5 atm e, ainda quente, inclinado.

Os conídios, com o auxílio da alça de platina foram retirados do solo e transferidos para o meio e incubados por cinco dias em estufa a 30°C, e mantidos sob refrigeração por um período máximo de quatro meses, obtendo-se assim o primeiro repique.

Partindo do primeiro repique, foi obtido o segundo repique. Para tanto, com auxílio da alça de platina os esporos foram transferidos para o meio básico, descrito anteriormente, e incubados a temperatura de 30°C durante cinco dias. Cada repique pôde ser mantido sob refrigeração por um período de quatro meses e seguindo este procedimento cada suspensão de conídios no solo somente pôde ser usada 4 ou 5 vezes, e depois descartada.

O meio de sabugo de milho é um meio usado para produção de grande quantidade de conídios. O sabugo é apropriado para este fim, uma vez que o fungo cresce em uma superfície maior e conseqüentemente aumenta a esporulação. Foi preparado de acordo com protocolo da Embrapa/CNPAT, no qual primeiro prepara-se as seguintes soluções:

Solução A: pesou-se 20g de fosfato de potássio monobásico, dissolveu em água destilada e transferi para um balão volumétrico de 100mL e aferiu.

Solução B: pesou-se 3,96g de sulfato de zinco e dissolveu em um pouco de água destilada. Adicionou-se 4,60g de sulfato de ferro, 0,01g de sulfato de manganês e 0,5mL de ácido sulfúrico (95 – 97%). Após completa dissolução, avolumou-se a 100mL com água destilada.

Solução umidificante: Pesou-se 2,8g de peptona em um pouco de água destilada, transferiu-se para um balão volumétrico de 50mL. Adicionou-se 0,19mL da solução A e 0,025mL da solução B, avolumou-se e homogeneizou.

Foram pesados 4,6g de sabugo de milho seco e moído (com granulometria de aproximadamente 1 cm) e adicionado 6mL da solução umidificante, para cada erlenmeyer de 125mL. O frasco foi tampado com tampão de algodão envolvido com gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave por 1 hora a 1 atm.

Para inoculação do meio de sabugo de milho foram transferidos 10mL de uma solução 0,3% (v/v) de Tween 80 para tubos com microrganismo de segundo repique. Com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram desprendidos, homogeneizados e transferidos 1mL para cada frasco contendo o sabugo. Os frascos foram agitados e incubados em estufa a 30°C por um período de 5 dias. Após este período os frascos foram armazenados sob refrigeração por um período máximo de três meses e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação.

Nos frascos de sabugo com esporos foram adicionados 40 mL de solução 0,3% v/v de Tween. Após agitação os esporos foram transferidos para erlenmeyer estéril com auxílio de gaze estéril. A quantificação da suspensão obtida foi feita através de contagem dos esporos em Câmara de Neubauer espelhada. O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se um inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato sólido fixada nos 11 experimentos listados na matriz de planejamento.

ANEXO II

(Definições para cada termo da Equação 3.9)

$$\text{Atividade(U/mL)} \rightarrow \frac{\text{g}}{\text{L} \times \text{h}} \times \frac{1\text{mol}}{180\text{g}} \times \frac{1\mu\text{mol}}{10^{-6}\text{mol}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} \times \frac{1\text{h}}{60\text{s}}$$

$$\rightarrow \frac{1\mu\text{mol}}{180 \times 10^{-6} \times 1000 \times 60(\text{mL} \times \text{s})} \rightarrow 1\mu\text{mol} \times \frac{1000 \times 60 \times 180}{1000000} \rightarrow$$

$1\mu\text{mol} \times 100 \times 10$
$18 \times 60(\text{mL} \times \text{s})$

APÊNDICE

(Dados relativos aos experimentos executados)

Resultados dos demais experimentos para o parâmetro pH

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
1 LAVADO (45% de umidade e 0,5% de nitrogênio)	0	3,91	3,69±0,25	6,74
	7	4,00		
	20	3,89		
	30	3,95		
	44	3,55		
	54	3,50		
	68	3,36		
	72	3,35		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
2 LAVADO (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,37	3,81±0,34	9,00
	7	4,63		
	20	3,70		
	30	3,63		
	44	3,44		
	54	3,60		
	68	3,40		
	72	3,74		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
2 SEM LAVAR (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,32	3,96 ± 0,29	7,30
	7	4,59		
	20	4,11		
	30	3,79		
	44	3,73		
	54	3,82		
	68	3,74		
	72	3,54		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
3 LAVADO (65% de umidade e 0,5% de nitrogênio)	0	4,20	3,82±0,20	5,18
	7	4,21		
	20	3,85		
	30	3,79		
	44	3,79		
	54	3,58		
	68	3,57		
	72	3,59		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
4 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,45	3,69 ± 0,43	11,60
	7	4,43		
	20	3,77		
	30	3,80		
	44	3,53		
	54	3,15		
	68	3,15		
	72	3,20		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
8 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,24	3,79±0,22	5,79
	7	4,02		
	20	3,98		
	30	3,70		
	44	3,65		
	54	3,61		
	68	3,60		
	72	3,50		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
9 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,47	3,88±0,24	6,20
	7	4,25		
	20	3,79		
	30	3,89		
	44	3,63		
	54	3,73		
	68	3,72		
	72	3,58		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
10 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,46	3,70±0,45	12,29
	7	4,37		
	20	4,08		
	30	3,45		
	44	3,34		
	54	3,28		
	68	3,31		
	72	3,29		

Experimento	Tempo de Fermentação	pH	Média	Erro relativo %
11 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	4,45	3,86±0,42	10,87
	7	4,26		
	20	4,09		
	30	4,33		
	44	3,70		
	54	3,27		
	68	3,20		
	72	3,60		

Resultados dos demais experimentos para o parâmetro Umidade

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 45%	Média	Erro relativo %
1 LAVADO (45% de umidade e 0,5% de nitrogênio)	0	42,15	41,79 ± 0,93	2,23
	7	41,69		
	20	41,02		
	30	43,43		
	44	40,50		
	54	42,25		
	68	43,03		
	72	40,21		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 45%	Média	Erro relativo %
2 LAVADO (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	44,72	40,69 ± 1,33	3,29
	7	41,14		
	20	41,06		
	30	38,85		
	44	40,88		
	54	37,84		
	68	40,02		
	72	40,99		
Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 45%	Média	Erro relativo %
2 SEM LAVAR (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	44,88	43,21 ± 1,70	3,94
	7	43,01		
	20	46,01		
	30	44,34		
	44	44,41		
	54	42,23		
	68	37,62		
	72	43,16		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 65%	Média	Erro relativo %
3 LAVADO (65% de umidade e 0,5% de nitrogênio)	0	64,48	61,99 ± 1,11	1,79
	7	62,13		
	20	61,25		
	30	62,69		
	44	60,21		
	54	62,86		
	68	60,07		
	72	62,25		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 65%	Média	Erro relativo %
4 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	61,24	59,23 ± 2,00	3,39
	7	60,61		
	20	60,42		
	30	59,28		
	44	59,23		
	54	61,80		
	68	60,05		
	72	51,21		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 55%	Média	Erro relativo %
8 LAVADO (55% de umidade e 0,4% de nitrogênio)	0	52,68	51,29 ± 1,70	3,29
	7	53,90		
	20	53,85		
	30	51,21		
	44	51,17		
	54	51,47		
	68	47,42		
	72	48,59		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 69%	Média	Erro relativo %
9 LAVADO (69% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	68,69	65,87 ± 1,53	2,31
	7	64,71		
	20	64,83		
	30	67,92		
	44	65,82		
	54	62,22		
	68	67,08		
	72	65,66		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 55%	Média	Erro relativo %
10 LAVADO (55% de umidade e 1,1% de nitrogênio)	0	54,99	51,18 ± 1,75	3,42
	7	51,58		
	20	53,47		
	30	51,42		
	44	51,43		
	54	50,57		
	68	48,85		
	72	47,10		

Experimento	Tempo de Fermentação	Umidade (%) 41%	Média	Erro relativo %
11 LAVADO (41% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	40,34	38,59 ± 0,53	1,38
	7	38,46		
	20	38,37		
	30	38,76		
	44	38,79		
	54	37,25		
	68	38,38		
	72	38,33		

Resultados dos experimentos de reprodutibilidade de dados para o parâmetro AR

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)	Experimento	AR (g/L)	Experimento	AR (g/L)
5 LAVADO (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	2,08	6 LAVADO (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	2,99	7 LAVADO (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	1,69
	7	1,95		1,82		1,95
	20	1,52		0,82		1,52
	30	1,46		0,97		0,68
	44	1,01		0,93		0,62
	54	0,65		0,58		0,84
	68	1,10		0,39		0,13
	72	1,30		0,13		0,52

Resultados dos demais experimentos para o parâmetro AR

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
1 LAVADO (45% de umidade e 0,5% de nitrogênio)	0	2,21
	7	2,08
	20	1,64
	30	0,78
	44	0,93
	54	0,91
	68	0,78
	72	1,17

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
3 LAVADO (65% de umidade e 0, 5% de nitrogênio)	0	1,95
	7	1,69
	20	1,05
	30	0,49
	44	0,78
	54	0,84
	68	1,10
	72	0,26

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
2 LAVADO (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	1,82
	7	1,82
	20	1,64
	30	1,36
	44	0,78
	54	0,91
	68	0,97
	72	0,65

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
4 LAVADO (65% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	1,43
	7	1,56
	20	1,05
	30	0,78
	44	0,31
	54	0,52
	68	0,39
	72	0,45

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
8 LAVADO (55% de umidade e 0,4% de nitrogênio)	0	1,95
	7	2,34
	20	0,93
	30	0,68
	44	0,31
	54	0,84
	68	1,04
	72	1,30

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
9 LAVADO (69% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	1,30
	7	1,04
	20	0,93
	30	0,39
	44	0,47
	54	0,78
	68	0,26
	72	0,13

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
10 LAVADO (55% de umidade e 1,1% de nitrogênio)	0	1,04
	7	1,82
	20	1,64
	30	0,97
	44	0,62
	54	0,26
	68	0,78
	72	0,52

Experimento	Tempo de Fermentação	AR (g/L)
11 LAVADO (41% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	0,19
	7	0,18
	20	0,11
	30	0,17
	44	0,13
	54	0,14
	68	0,14
	72	0,12

**Resultados dos experimentos de reprodutibilidade de dados para o
parâmetro AC**

Experimento	Tempo de Fermentação	Atividade Celulolítica (U/mL)	Experimento	Atividade Celulolítica (U/mL)	Experimento	Atividade Celulolítica (U/mL)
5 LAVADO (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	0,03	6 LAVADO (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0,03	7 LAVADO (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0,00
	7	0,03		0,02		0,03
	20	0,00		0,03		0,05
	30	0,11		0,06		0,12
	44	0,00		0,03		0,02
	54	0,00		0,04		0,00
	68	0,00		,01		0,02
	72	0,00		0,00		0,00

Experimento	Tempo de Fermentação	Atividade Celulolítica (U/mL)	Experimento	Atividade Celulolítica (U/mL)
5 SEM LAVAR (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0	0,09	6 SEM LAVAR (55% de umidade e 0,75% de nitrogênio)	0,09
	7	0,02		0,10
	20	0,02		0,06
	30	0,06		0,06
	44	0,06		0,06
	54	0,05		0,00
	68	0,01		0,01
	72	0,02		0,00

Resultados do experimento 2 para o parâmetro AC

Experimento	Tempo de Fermentação	Atividade Celulolítica (U/mL)	Experimento	Tempo de Fermentação	Atividade Celulolítica (U/mL)
2 LAVADO (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	0,00	2 SEM LAVAR (45% de umidade e 1,0% de nitrogênio)	0	0,14
	7	0,02		7	0,19
	20	0,09		20	0,09
	30	0,14		30	0,14
	44	0,15		44	0,01
	54	0,05		54	0,00
	68	0,00		68	0,01
	72	0,00		72	0,02