

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

Bomtempo, Fabrícia Vieira Silva
Carreiro, Solange Cristina
Pimenta, Raphael Sanzio
Guarda, Emerson Adriano

Resumo

A produção enzimática é hoje um mercado em evidência graças a um aumento cada vez mais significativo do uso de enzimas em diversos processos industriais, como por exemplo, na fabricação do promissor etanol celulósico. Porém, o alto custo de produção, devido a fatores como dificuldade de purificação enzimática e preço elevado do substrato, ainda limita a consolidação desse mercado. Dentro desse cenário, o intuito dessa revisão foi apresentar as vantagens de uso e as propriedades desse material residual lignocelulósico, os principais pré-tratamentos ocorrentes, as celulasas e o grande potencial dos fungos em sua produção e as perspectivas de melhoria do processo produtivo através da otimização das condições de produção dessas enzimas.

Palavras-chave: Celulasas; Materiais lignocelulósicos; Superfície de resposta; Otimização de condições de cultivo.

Abstract

The enzyme production is evident today a market due to an increasingly significant increase in the use of enzymes in various industrial processes, such as in the manufacture of cellulosic ethanol promising. However, the high cost of production due to factors such as difficulty of enzyme purification and high substrate prices, still limits the consolidation of this market. In this scenario, the aim of this review was to present the advantages of use and properties of lignocellulosic waste material, the occurring pretreatments main, cellulases and the great potential of fungi in their production and the prospects for improvement of the production process by optimizing the conditions for hydrolysis and fermentation.

Keywords: cellulases; lignocellulosic materials; Response surface; Optimization of culture conditions.

Resumen

La producción de enzimas es evidente en la actualidad un mercado debido a un aumento cada vez más importante en el uso de enzimas en varios procesos industriales, tales como en la fabricación de etanol celulósico prometedor. Sin embargo, el alto costo de producción debido a factores como la dificultad de la purificación de la enzima y los altos precios de sustrato, todavía limita la consolidación de este mercado. En este escenario, el objetivo de esta revisión es presentar las ventajas de su uso y propiedades de material de residuos lignocelulósicos, los tratamientos previos que ocurren principales, celulasas y el gran potencial de los hongos en su producción y las perspectivas para la mejora del proceso de producción mediante la optimización las condiciones para la hidrólisis y la fermentación.

Palabras-clave: celulasas; materiales lignocelulósicos; de superficie de respuesta; Optimización de las condiciones de cultivo.

INTRODUÇÃO

Uma área da biotecnologia que tem movimentado milhões de dólares anualmente é a produção de enzimas, um mercado em evidência, que tem conseguido diminuir os custos de produção e aumentar cada vez mais a utilização enzimática em diversos processos industriais (ZIMMER *et al.*, 2009) como, por exemplo, o crescente uso de enzimas chamadas celulasas na hidrólise de biomassa lignocelulósica, tecnologia capaz de gerar uma gama de produtos, incluindo o biocombustível etanol, que é uma das moléculas de maior interesse atualmente (DASHTBAN *et al.*, 2010).

As celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre a celulose, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais, glicose é o que desperta maior interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro; Pereira Jr., 2010) e são obtidas principalmente através do cultivo de microrganismos celulolíticos em substrato indutor.

A celulose isolada é o principal substrato utilizado para induzir a produção de celulasas e o alto custo desse substrato é um dos principais fatores de elevação do valor final destas enzimas (DAMASO *et al.*, 2008). Isso tem impulsionado amplos esforços na busca de substratos indutores mais baratos e abundantes, como por exemplo, resíduos de produção agrícola como: bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de milho, serragem, cascas de coco, entre outros (BERLIN *et al.*, 2005; FARINAS *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2009; BINOD *et al.*, 2010).

Calcula-se que, ao longo da cadeia de abastecimento alimentar, cerca de um terço dos alimentos produzidos mundialmente transforme-se em resíduos agrícolas, e, em muitos casos, são jogados em aterros ou incinerados juntamente com outros detritos (CHAMPAGNE, 2008). No entanto, estes destinos pouco nobres têm enfrentado fortes pressões ambientais e até econômicas que culminaram no amplo estímulo ao uso desse material residual como fonte de obtenção de matéria-prima para bioconversão (FARINAS *et al.*, 2008).

Os resíduos agrícolas são materiais fibrosos, oriundos de biomassa vegetal formada principalmente por polímeros de glicose e lignina que podem resultar na geração de inúmeros insumos de alto valor comercial (KIRAN, *et al.*, 2014). O uso desses resíduos na produção enzimática tem sido largamente estudado devido ao grande interesse comercial pelos produtos gerados na ação enzimática como: etanol, proteína isolada, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, etc. (PANDEY; SOCCOL, 1998). Assim, um rápido desenvolvimento biotecnológico tem possibilitado o aproveitamento dessa biomassa

lignocelulolítica residual para síntese de bioprodutos de alto valor agregado (DASHTBAN *et al.*, 2010).

A degradação da biomassa celulósica e de outras fibras de parede celular vegetal ocorre naturalmente no ambiente pela ação de um conjunto de organismos, especialmente fungos filamentosos, que crescem sobre esse substrato e através da produção de celulases, hidrolisam os polissacarídeos estruturais (KHAN *et al.*, 2007). Observando esse potencial natural dos microrganismos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de possibilitar a produção destas celulases em larga escala e viabilizar a obtenção de compostos químicos renováveis advindos de resíduos lignocelulósicos (KANG *et al.*, 2004; JORGENSEN *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2014)

Alguns trabalhos realizados vêm mostrando que a ação conjunta de enzimas aumenta consideravelmente a rentabilidade dos processos produtivos (BERLIN *et al.*, 2005), o que reforça o uso de microrganismos, já que estes podem produzir concomitantemente uma série de enzimas e gerar extratos enzimáticos extremamente eficientes. No entanto, como a produção envolve cultivo microbiano, uma série de percalços pode limitar esse processo (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010) assim, a fim de diminuir gargalos como: dificuldade de manutenção dos fatores físicos, encontro de substratos ideais para cada enzima, quantidade de água livre necessária, entre outros, têm sido exaustivamente estudados processos de otimização das condições de cultivo utilizando ferramentas estatísticas como a superfície de resposta. Esse recurso pode viabilizar a produção enzimática, diminuir custos e aumentar o rendimento (LATIFIAN *et al.*, 2007).

Enfim, seguindo essa linha de desenvolvimento, que busca aliar viabilidade e tecnologia de processos à qualidade ambiental, o intuito dessa revisão foi apresentar as vantagens e propriedades de uso desse material residual lignocelulósico, os principais pré-tratamentos ocorrentes, as celulases e o grande potencial dos fungos na produção destas e as perspectivas de melhoria do processo produtivo através da otimização das condições de hidrólise e fermentação.

Materiais lignocelulósicos

Chamados também de biomassa lignocelulósica, são provenientes direta ou indiretamente do processo de fotossíntese (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2008), sendo eles, um recurso natural essencial para o funcionamento das sociedades industriais, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma economia global mais sustentável (HU, 2008).

O material lignocelulósico é amplamente disponível na natureza em forma de resíduos de produção agrícola, atividade que cresce anualmente e exige, cada vez mais, o aproveitamento de

dessa biomassa residual. Este aproveitamento, além de evitar a acumulação do material na natureza, contribui para o controle da poluição, proporciona melhores condições de saúde pública e pode também gerar uma série de produtos de interesse comercial (MACHADO; ABREU, 2006). Devido a essa grande disponibilidade, os resíduos lignocelulósicos têm sido largamente utilizados na produção de polpas nas indústrias de papéis, de proteína para ração, em meios tecnológicos de alimentação, sendo ainda uma aposta para a geração de energia através da produção de etanol (BALLESTEROS, 2001).

De acordo com Pandey *et al.* (2000), materiais lignocelulósicos tem uma estrutura química formada basicamente de celulose (32-50%), hemicelulose (19-25%) e lignina (23-32%), além de uma pequena parte de ácidos orgânicos e sais minerais. De forma geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina. Essa variação nas quantidades dos componentes lignocelulósicos é justificada, pois, assim como a forma e o tamanho da parede celular dos materiais lignocelulósicos variam de espécie para espécie, sua composição química também se apresenta distinta entre representantes lignocelulósicos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Dos componentes do material lignocelulósico, destaca-se a celulose que é o principal componente da parede celular dos vegetais. Esta é encontrada em plantas sob a forma de microfibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e entre 100 a 40.000 nm de comprimento, tendo entre 2.000-25.000 resíduos de glicose (BROWN JUNIOR *et al.*, 1996)

Celulose

A celulose destaca-se entre os componentes do material lignocelulósico pois pode ser hidrolisada e fermentada por métodos simples e usuais para produção de etanol (SCATENA; SCREMIN-DIAS, 2006). Em 2007, 606 milhões de toneladas de biomassa lignocelulósica foram geradas no país, destas, cerca de 105 milhões de toneladas correspondem à fração celulósica (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Essa porção celulósica é um homopolissacarídeo de ocorrência natural, corresponde a aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, sendo a principal fonte de carbono, elemento base dos componentes orgânicos. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99% (RABELO, 2007).

A celulose pode ter sua estrutura classificada em três níveis organizacionais: o primeiro é definido pela sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, de fórmula

geral (C₆H₁₀O₅)_n; o segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares; já o terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina, estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes (DING; HIMMEL, 2006; SANTOS *et al.*, 2012) Essas ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez, e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, que são estruturas ordenadas que se associam formando as fibras de celulose com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão ligadas paralelamente, até as regiões amorfas (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

A resistência da celulose, mais o envoltório de lignina, proporcionam à essa macromolécula grande resistência à hidrólise, que é considerado o maior desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010). Deste modo, apesar das inúmeras possibilidades de utilização do material lignocelulósico, seu aproveitamento ainda é oneroso e necessita de largos estudos e investimentos a fim de otimizar as diversas etapas envolvidas.

Segundo Champagne (2008), os resíduos lignocelulósicos agrícolas apresentam composição físico-química complexa, que oferece resistência ao ataque químico ou bioquímico e dificulta sua conversão em materiais com alto valor agregado, através da hidrólise. Portanto, o maior obstáculo para o aproveitamento celulósico permanece sendo a relação custo-benefício da produção de açúcares fermentescíveis a partir dessa biomassa recalcitrante de difícil hidrólise (ZHANG, 2008). De acordo com Laser *et al.* (2002), disponibilizar os açúcares fermentescíveis envolve a hidrólise das fibras de celulose e hemicelulose e ainda uma quebra da lignina que envolve essas fibras, isso torna o processo mais oneroso pois, para conversão em açúcares são exigidos processos térmicos, químicos ou enzimáticos. Segundo Champagne (2008), essa conversão depende geralmente do pré-tratamento da fibra de celulose, da seleção de enzimas e das condições operacionais. Estes fatores irão variar, dependendo da fonte de matéria-prima residual.

Pré-tratamento do material lignocelulósico

Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente a atuação microbiana sobre o material (CASTRO; PEREIRA-JR, 2010). Assim, os substratos lignocelulósicos, com sua

estrutura complexa e compacta, precisam passar por um pré-tratamento, que torna a hidrólise mais eficiente, uma vez que aumenta a susceptibilidade dos polissacarídeos ao ataque enzimático. (MOSIER *et al.*, 2005; KUO; LEE 2009; LI *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2012; SILVA, 2012).

De acordo com Ferreira Filho (1996), a técnica do pré-tratamento é necessária e tem o intuito de aumentar a susceptibilidade da celulose através da remoção da lignina e redução da cristalinidade da estrutura celulósica. Esse pré-tratamento é realizado na maioria dos materiais lignocelulósicos antes do processo de hidrólise, com o objetivo de remover a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais, bem como, evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os microrganismos fermentadores (SUN; CHENG, 2005).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subsequentes, esses métodos podem ser classificados em quatro categorias: físico, químico, biológico e combinado (RABELO *et al.*, 2008). Um pré-tratamento ideal é aquele que produz fibras reativas, preserva a utilidade da fração hemicelulósica e não libera compostos que inibam significativamente a fermentação (LYND *et al.*, 1996). Ele é um dos passos mais caros no processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, uma vez que requer o uso de vapor e produtos químicos, além da necessidade de reatores resistentes à corrosão (LASER *et al.*, 2002).

Vários pré-tratamentos têm sido propostos para a lignocelulose visando melhorar a acessibilidade das enzimas à celulose já esses materiais pré-tratados apresentam rendimentos mais significativos que sem tratamento (LAVARACK *et al.*, 2002; NEUREITER *et al.*, 2002; MARTÍN *et al.*, 2007; RABELO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; RABELO *et al.*, 2009).

Após o pré-tratamento, com a celulose já disponibilizada, é possível realizar a hidrólise, esse processo tem duas vias mais conhecidas e usadas: hidrólise ácida e hidrólise enzimática, a ácida é o mais antigo processo de hidrólise conhecido, utiliza ácido concentrado para romper as ligações entre as glicoses e foi muito estudada, mas, desvantagens como a alta formação de inibidores da fermentação, o enorme gasto energético e o alto consumo de ácido e de sulfato de cálcio para neutralização, foram limitantes para o uso do processo em escala industrial (COLETÂNEA, 1981).

Já a hidrólise enzimática é o processo mais promissor e conta com ação de enzimas celulolíticas (celulases). Nela há maior produção de monossacarídeos do que na hidrólise ácida, porque a celulase catalisa somente as reações de hidrólise (PARISI, 1989). Esse tipo de hidrólise da celulose representa uma alternativa importante para a produção de açúcares fermentescíveis

usando resíduos agroindustriais, por se tratar de um processo limpo e específico (MARTÍN *et al.*, 2007; RABELO *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; SILVA, 2012).

Degradação enzimática e as celulases

A hidrólise enzimática envolve clivagem de polímeros de celulose e hemicelulose utilizando enzimas (TAHERZADEH; NIKLASSON, 2004). Avanços recentes em tecnologia enzimática, para a conversão de biomassa celulósica em açúcares, trouxeram progressos significativos na pesquisa de etanol lignocelulósico, que é um dos mais importantes produtos gerados a partir desse tipo de biomassa. De acordo com Rodrigues (2009), a hidrólise enzimática é considerada de grande potencialidade, pois proporciona maiores rendimentos, é realizada sob pressão ambiente e temperaturas moderadas (50-60°C), não forma subprodutos indesejáveis, e ainda possibilita a utilização de técnicas avançadas de biotecnologia para sua otimização. No entanto, apesar de uma série de vantagens, esse tipo de hidrólise ainda enfrenta vários gargalos tecnológicos, o principal deles é o elevado custo das enzimas (celulases) utilizadas no processo.

Os três maiores grupos de celulases que estão no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (SUN; CHENG, 2002). Segundo Ghose (1987) e Zhang *et al.* (2006), endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, também são conhecidas como celulases totais ou enzimas do papel de filtro – FPase.

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose em regiões amorfas, diminuindo seu grau de polimerização e criando, então, novas extremidades de cadeia. Exoglucanases (celobiohidrolases) agem em sequência em tais extremidades, ou seja, são capazes de se ligar aos domínios cristalinos e liberar celobiose ou glicose das extremidades. A hidrólise completa da celulose ocorre, então, pela ação das β -glicosidases, as quais hidrolisam a celobiose e outras celodextrinas em glicose (MUÑOZ *et al.*, 2001; FRENCH, 2009).

A endoglucanase é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, de acordo com Guimarães *et al.* (2002), uma enzima endoglucanase típica é capaz de clivar as ligações ao longo da fibra de celulose, diminuindo rapidamente o grau de polimerização do substrato. Em razão das cadeias de glicana ainda estarem associadas ao resto da fibra depois da quebra de uma ligação, um ataque do tipo endo leva um tempo maior para a geração de produtos solúveis.

Olsson (1996) afirma que as endoglucanases podem atuar na redução da força das fibras de celulose, hidrolisando randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos

terminais, sendo um terminal redutor e um não redutor. Um terminal redutor é formado quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre e um não redutor ocorre quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente.

Já as exoglucanases parecem catalisar a maioria das clivagens nas ligações durante a sacarificação de celulose cristalina e são, geralmente, o componente principal das preparações de celulase, especialmente no caso das enzimas comerciais derivadas de fungos (LIU *et al.*, 2011).

As β -glicosidases podem ser intracelulares ou extracelulares e são encontradas em todos os domínios de organismos existentes, essas enzimas catalisam a hidrólise de dissacarídeos e glicosídeos conjugados a partir da extremidade não redutora (CAIRNS; ESEN, 2010).

Na natureza, a degradação da biomassa celulósica e de outras fibras de parede celular vegetal é realizada pela mistura dessas celulasas produzidas por um conjunto de organismos, incluindo fungos e bactérias. Observando esse potencial natural dos microrganismos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de possibilitar a produção destas celulasas em larga escala e viabilizar a obtenção de compostos químicos renováveis advindos de resíduos lignocelulósicos (KHAN *et al.*, 2007). De acordo com Kuhad *et al.* (2011) a facilidade de induzir uma grande diversidade de microrganismos como fungos e bactérias a sintetizarem celulasas durante o seu crescimento em materiais celulósicos fez com que essas enzimas se tornassem biocatalisadores de ampla aplicação industrial.

Wood e Garcia-Campayo (1990) e também Tuor *et al.* (1995), ressaltaram que uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulolíticos é a hidrólise enzimática usando microrganismos que produzem enzimas específicas capazes de hidrolisar a celulose. Os gêneros de microrganismos mais conhecidos e estudados na produção dessas enzimas são *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* e *Aspergillus* (SUN; CHENG, 2002).

Fungos filamentosos na produção extratos enzimáticos celulolíticos

Os gêneros fúngicos são os mais explorados comercialmente devido à capacidade de secretarem altos níveis de proteína, podem produzir mais que 100 g L⁻¹ e também, devido à possibilidade de suas enzimas atuarem naturalmente de maneira bastante efetiva na hidrólise da biomassa (CHUNDAWAT *et al.*, 2011).

Segundo Menezes (1997), os fungos são os principais microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas sendo que, as principais espécies envolvidas na síntese de celulasas incluem, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium*

sp (BISARIA; GHOSE, 1981) e *Humicola* sp (DA SILVA *et al.*, 1994). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* sp também são produtoras de xilanases e celulases, assim como diversas espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de β -glicosidase (STEVENS; PAYNE, 1977).

Muitos estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela combinação de enzimas para obtenção de complexos celulolíticos mais eficientes (ZHOU *et al.*, 2009) ou pelo melhoramento de espécies através de métodos de engenharia genética (IMAI *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2004; JORGENSEN *et al.*, 2005). Hernández-Salas *et al.* (2009), estudando a degradação de bagaço de cana e bagaço de agave, constataram, ao comparar ensaios de hidrólise do bagaço de cana feitos com enzimas isoladas a um ensaio feito com uma preparação com coquetel enzimático de fungo filamentoso, um aumento de 175% no rendimento de açúcares redutores ao usarem combinação enzimática.

Alguns trabalhos realizados vêm mostrando que a ação conjunta de celulases e hemicelulases resulta em uma maior produção de glicose quando comparada com as celulases sozinhas, em função da retirada da hemicelulose que recobre as fibrilas de celulose melhorando o acesso das celulases (BERLIN *et al.*, 2005), o que reforça o uso de fungos filamentosos para síntese de enzimas, já que esses microrganismos naturalmente produzem uma série de catalisadores concomitantemente, podendo originar extratos enzimáticos muito mais eficientes.

Rosgaard *et al.* (2006) avaliaram o efeito da combinação de celulases comerciais com os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos termófilos *Chaetomium thermophilum*, *Thielavia terrestris*, *Thermoascus aurantiacus*, *Corynascus thermophilus* e *Myceliophthora thermophila* na hidrólise da palha de cevada pré-tratada com vapor e os resultados mostraram que, quando se adiciona uma pequena quantidade (10 %) dos extratos enzimáticos dos fungos testados à mistura de Celluclast e β -glicosidase (Novozym®,188), é possível duplicar a liberação de glicose quando comparado com a hidrólise utilizando somente a mistura de celulases comerciais.

Zhang *et al.* (2009) investigaram a adição de enzimas acessórias, β -glicosidase, xilanase e pectinase à celulase comercial (Spezyme CP) para aumentar a conversão da celulose e hemicelulose do sabugo de milho pré-tratado com amônia e relataram aumento da conversão pelas duas enzimas adicionadas, porém afirmam que a adição da pectinase tornou a conversão mais efetiva, suplementação com 0,12 mg de pectinase/g de glucana aumentou o rendimento de glicose em 7,5 % e de xilose em 29,3 %.

Produção de enzimas fúngicas

Para a atual síntese de enzimas são utilizados processos que podem ser conduzidos tanto em meio aquoso, chamado de Fermentação Submersa (FS), quanto em meio semissólido, processo nomeado Fermentação em Estado Sólido (FES) (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Na FS os microrganismos são cultivados em meio aquoso homogêneo, rico em nutrientes. Esta técnica é majoritariamente utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura e facilidade na recuperação das enzimas extracelulares (SINGHANIA *et al.*, 2010). Couto e Sanroman (2006) destacam vantagens da FS como a relativa facilidade de cultivo em grande escala devido à homogeneidade do meio e a possibilidade de controle dos parâmetros do processo.

No entanto, segundo Viniestra-González *et al.* (2003), embora as enzimas comerciais sejam produzidas através do processo de (FS), a produção enzimática que mais se aproxima do que acontece naturalmente no ambiente, é a Fermentação em Estado Sólido (FES).

A FES é um processo onde o cultivo ocorre em um substrato contendo umidade apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, isto é, isento de água livre (CHAHAL, 1985; MADAMWAR *et al.*, 1989; DUENAS *et al.*, 1995). De acordo com Holker *et al.* (2004) e Farinas *et al.* (2008), o uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula seu habitat natural. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de FS. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH.

Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada ao menor volume de efluente produzido, à possibilidade de conduzir o processo em condições semiestéreis e à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido. Essa biomassa serve como suporte para o crescimento fúngico, como indutores da produção enzimática e conseqüentemente, como fonte de carbono e energia para o processo, além disso, os meios utilizados no preparo da FES muitas vezes apresentam um menor custo e menor probabilidade de contaminação, devido à menor quantidade de água utilizada (FARINAS *et al.*, 2008).

Apesar de a FES ser meio favorável para o crescimento de fungos filamentosos, muitos gargalos ainda precisam ser superados para que se consolide o uso dessa técnica nos processos produtivos, já que a síntese enzimática industrial em larga escala exige maior controle dos fatores envolvidos no crescimento do microrganismo e da sua capacidade de produzir enzima

(SINGHANIA *et al.*, 2010). Neste sentido, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos (LIU e TZENG 1998; ELIBOL 2003; ZAMBARE 2011; ZHANG; SANG, 2012; CASPETA *et al.*, 2014) a fim de diminuir percalços como a dificuldade de manutenção dos fatores físicos que influenciam o processo, a descoberta do substrato ideal para cada enzima, a quantidade de água livre necessária, entre outros. De acordo com Latifian *et al.* (2007), os processos de otimização das condições da FES podem viabilizar a produção enzimática, diminuir custos e aumentar o rendimento, por isso esse tipo de estudo tem sido objeto comum da pesquisa básica para aplicações industriais de enzimas.

Perspectivas de melhoria da produção de enzimas através da otimização das condições fermentação

O desenvolvimento e a otimização das tecnologias produtivas são de fundamental importância para viabilização e fabricação em larga escala de um produto, para dar continuidade operacional, aumentar constantemente a lucratividade e competitividade e para eliminar gargalos de um processo produtivo. Assim, inúmeros grupos de pesquisa têm focado seus esforços na otimização de parâmetros, que é o principal objetivo num processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica (LATIFIAN *et al.*, 2007; CASPETA *et al.*, 2014).

De acordo com Singh *et al.* (2014) o aumento da procura por enzimas industrialmente valiosas, juntamente com a busca constante pela seleção de melhores fontes para produção enzimática, tornou a obtenção de uma produção mais rentável quase que uma obrigação. Essa produção economicamente justificada só poderá ser obtida através de estudos que avaliem a influência de cada fator envolvido na produção e possam determinar os níveis ideais de cada um desses fatores. Segundo Silva *et al.* (2012), estudos estratégicos chamados de otimização, possibilitam avaliação abrangente de fatores envolvidos na produção e permitem o desenvolvimento de superfícies de resposta, através das quais é possível dimensionar antecipadamente a influência causada pelos fatores envolvidos no processo produtivo no rendimento final da produção.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma coleção de experiências, métodos matemáticos e inferências estatísticas, que avalia o efeito combinado de todos os elementos que participam do processo produtivo. Através de gráficos em 3D esse método possibilita uma melhor visualização dos parâmetros de interação e é capaz de determinar o ponto ótimo das variáveis envolvidas e, conseqüentemente, possibilitar o aumento de rendimento (LIU e TZENG 1998; ELIBOL 2003; ZAMBARE 2011; SINGH *et al.*, 2014).

Diversos autores têm desenvolvido seus estudos utilizando MSR. Bansal *et al.* (2012) otimizaram a produção de celulases de *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando de resíduos agrícolas e resíduos de cozinha e encontraram as condições ideais de fermentação, concluindo que esses substratos podem ser usados para produção de celulases por FES devido a produção apreciável de celulases obtida. Zhang e Sang (2012), otimizando a produção por fermentação em estado sólido de celulases por *Penicillium chrysogenum* conseguiram determinar as condições ideais e obtiveram altos níveis de atividade enzimática.

A determinação de condições ideais para os processos de produção de enzimas significam, obviamente, aumento de rentabilidade e aumento da atividade enzimática dos extratos resultantes. Saini *et al.* (2015), otimizaram a produção de celulases por *Penicillium oxalicum* e relataram aumento de atividade enzimática de 1,7 vezes após otimização das condições de cultivo e nutrição. Mekala *et al.* (2008) conseguiram aumentar a atividade em 4.7 vezes, após as melhorias no cultivo de *T. reesei*. Yang *et al* (2012) obtiveram atividade 1.6 vezes maior que antes da otimização estatística da produção celulásica por *Penicillium* sp. Tais resultados mostram que os níveis das variáveis são muito relativos e por isso devem ser diferentemente definidos de acordo com cada processo produtivo, procedimentos extremamente importantes para viabilização de produções enzimáticas.

CONCLUSÃO

Através do estudo foi possível verificar que atualmente inúmeras pesquisas têm sido direcionadas à obtenção, otimização e viabilização da produção de celulases e que a utilização de biomassa residual lignocelulósica, disponível na natureza em forma, principalmente, de resíduos de produção agrícola, tem conseguido aliar produção viável à preservação da qualidade ambiental, pois além de evitar a acumulação do material na natureza, contribui para o controle da poluição e proporciona melhores condições de saúde pública.

REFERÊNCIAS

ARANTES V.; SADDLER J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: therole of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.

BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, v. 161, p. 29-34, 2001.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S; Carreiro, S. C; Pimenta, R. S; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

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

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER J. Evaluation of novel fungal cellulose preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme Microb Technol*, v. 37 p. 175-184, 2005.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

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

BROWN JR, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in plant science*, v. 1, p. 149-156, 1996.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 67, p. 3389-3405, 2010.

CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 49, p. 205-210, 1985.

CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T. QUEIROZ, J. H. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. *Revista Analytica*, n. 56, p. 54-74, 2012.

CASPETA, L.; CARO-BERMÚDEZ, M. A.; PONCE-NOYOLA, T.; MARTINEZ, A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, v. 113, p. 277-286, 2014.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. *Environmental Progress*, v. 27, p. 51-57, 2008.

CHUNDAWAT, S. P. S.; DONOHOE, B. S.; SOUSA, L. D.; ELDER, T.; AGARWAL, U. P.; LU, F. C.; RALPH, J.; HIMMEL, M. E.; BALAN, V.; DALE, B. E. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy Environ. Sci.*, v. 4, p. 973-984, 2011.

COLETÂNEA. *Estado-da-arte da produção de etanol a partir da madeira*. Coletânea: Tecnologia da produção de etanol a partir de materiais celulósicos. Brasília, v. 1, 1981.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A Review. *Journal of Food Engineering*, Califórnia, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S; Carreiro, S. C; Pimenta, R. S; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

DAMASO, M. C. T.; PASSIONOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 39, p. 676-681, 2008.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K. T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

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. 109-111, 1994.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 597-606, 2006.

DUENAS, R.; TENDERDY, R. P.; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by mixed fungi in solid state fermentation of bagasse. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 11, p. 333-337, 1995.

ELIBOL, M. Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) with response surface methodology. *Process. Biochem.*, v. 39, p.1057–1062, 2003.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; NETO, V. B.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, 2008.

FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and characterization of a β -glucosidase from solid-state cultures of *Humicola griseovar. thermoidea*. *Can. J. Microbiol*, v. 42, n. 1, p.1-5, 1996.

FRENCH, C. E. Review - Synthetic biology and biomass conversion: a match made in heaven? *J. R. Soc. Interface*, v. 6, p. 547–558, 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

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

HERNANDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

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

HU, T. Q. *Characterization of lignocellulosic materials*. Wiley-blackwell, 2008.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S.; Carreiro, S. C.; Pimenta, R. S.; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, p. 79–83, 2004.

JORGENSEN, H.; MORKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 42-48, 2005.

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

KHAN, M. H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme - Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 42, p. 381-386, 2007.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, J. W.; LIU, Y. U. Bioconversion of food waste to energy: a review. *Fuel*, v. 134, p. 389–399, 2014.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-10, 2011.

KUO, C. H.; LEE, C. K. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 41–46, 2009.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.; LICHWA, J.; ANTAL, M.; LYND, L. A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, v. 81, p. 33–44, 2002.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3634-3637, 2007.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, v. 23, p. 367–380, 2002.

LEE, Y. J.; CHUNG, C. H.; DAY, D. F. Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 935–941, 2009.

LI, Q.; HE, W.-C.; XIAN, M.; JUN, G.; XU, X.; YANG, J.-M.; LI, L.-Z. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3570–3575, 2009.

LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Optimization of growth medium for production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Eng.*, v. 18, p. 413–418, 1998.

LIU, D.; CHEN, X. ; YUE, Y.; CHEN, M.; WU, Q. Structure and rheology of nanocrystalline cellulose. *Carbohydrate Polymer*, v. 82, p. 329-336, 2011.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S.; Carreiro, S. C.; Pimenta, R. S.; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 741–761, 1996.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. *Revista de Política Agrícola*, n. 3, p. 74-78, 2006.

MADAMWAR, D.; PATEL, S.; PAREKH, M. Solid state fermentation for cellulase and beta-glucosidase production by *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 67, p. 424–426, 1989.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 426–432, 2007.

MEKALA, N.K., SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 151, p. 122–131, 2008.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. *Boletim da SBCTA*, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.

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

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, n. 100, p. 49–58, 2002.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 118, p. 312-331, 1996.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Bioconversion of biomass: a case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, v. 41, n. 4, p. 379-390, 1998.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 2, p. 69-80, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. *Adv. Biochemistry Eng.*, v. 38, p. 53-87, 1989.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S.; Carreiro, S. C.; Pimenta, R. S.; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

PEREIRA-JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA-ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In: _____. *Series on Biotechnology*, Rio de Janeiro, RJ: Ed. Amiga Digital UFRJ, v. 2, 2008, p. 2- 45.

RABELO, S. C. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 144, p. 87–100, 2008.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 153, p. 139–150, 2009.

RODRIGUES, M. F. A. *Produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço*. Bioenergia: Desafios e Oportunidades de Negócios. Escola Politécnica da USP, 2009.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; CHERRY, J. R.; HARRIS, P.; MEYER, A. S. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. *Biotechnology Progress*, v. 22, n. 22, p. 493–498, 2006.

SAINI, R., SAINI, J. K., ADSUL, M., PATEL, A. K., MATHUR, A., TULI, D., SINGHANIA, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*, v. 188, p. 240–246, 2015.

SANTOS, F. A.; DE QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol – revisão. *Quim. Nova*, v. XY, n. 00, p. 1-7, 2012.

SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima. In: APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. *Anatomia Vegetal*. 2 ed. Viçosa: UFV, 2006, p 109-119.

SILVA, V. F. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p. 1-15, jul./dez. 2012.

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

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K., PATEL, A. K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 46, p. 541-549, 2010.

STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeasts of genus *Trichosporon*. *Journal of General Microbiology*, v. 100, p. 381-393, 1977.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S.; Carreiro, S. C.; Pimenta, R. S.; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

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

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

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C. Ethanol from lignocellulosic materials: pretreatment, acid and enzymatic hydrolyses, and fermentation. *ACS Symp Ser*, v. 889, p. 49–68, 2004.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot-fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v. 41, n. 1, p. 1-17, 1995.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA, M. B.; PEREIRA, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 141-153, 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; NOE AGUILAR, C.; de JESÚS ROMERO-GÓMEZ, J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 157-167, 2003.

WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*. Netherlands, v. 1, n. 23, p. 147-167, 1990.

ZAMBARE, V. Optimization of amylase production from *Bacillus* sp. using statistics based experimental design. *Emir. J. Food Agric.*, v. 23, p. 37–47, 2011.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocelluloses biorefineries. *Journal. of Indust. Microb. and Biotechnology*, v. 35, p. 367-375, 2008.

ZHANG, S.; SANG, Q. Statistical optimization of cellulases production by *Penicillium chrysogenum* QML-2 under solid-state fermentation and primary application to chitosan hydrolysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 28, p. 1163–1174, 2012.

ZHANG, S.; MARÉCHAL, F.; GASSNER, M.; PÉRIN-LEVASSEUR, Z.; QI, W.; REN, Z.; YAN, Y.; FAVRAT, D. Process modeling and integration of fuel ethanol production from lignocellulosic biomass based on double acid hydrolysis. *Energy & Fuels*, v. 23, p. 1759-1765, 2009.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHAO, Y.; LU, W. J.; WANG, H. T. Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. *Chemical Engineering Journal*, v. 150, p. 411–417, 2009.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.

bioenergia em revista: diálogos, ano 7, n. 1, p. 26-44, jan./jun. 2017.

Bomtempo, F. V. S; Carreiro, S. C; Pimenta, R. S; Guarda, E. A.

Produção de extratos enzimáticos por fungos filamentosos utilizando resíduos agrícolas

ZHOU, J.; WANG, Y-H.; CHU, J.; LUO, L-Z.; ZHUANG, Y-P.; ZHANG, S-L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 819–825, 2009.

YANG, M., FAN, D.D., LUO, Y.-E., MI, Y., HUI, J., GAO, P.F. Media optimization for cellulase production at low energy consumption with response surface methodology. *Energy Source Part A*, v. 34, p. 1883–1892, 2012.

1. Bomtempo, Fabrícia Vieira Silva. E-mail: fabriciavs@gmail.com>

2. Carreiro, Solange Cristina. E-mail: solange@mail.uft.edu.br>

3. Pimenta, Raphael Sanzio. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (1998), Mestrado e Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais. Pós Doutorado em fitopatologia pelo United States Department of Agriculture (USDA). Atualmente é professor Associado da Fundação Universidade Federal do Tocantins. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em biotecnologia, ecologia Microbiana, atuando principalmente sobre biodiversidade, bioprospecção e controle biológico. Exerce o cargo de Pró-reitor de Pesquisa e pós-graduação desde agosto de 2016. E-mail: [biorapha@yahoo.com.br](mailto: biorapha@yahoo.com.br)

4. Guarda, Emerson Adriano. E-mail: emersonprof@mail.uft.edu.br>