

Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido

Ursula Fabiola Rodríguez-Zúñiga⁽¹⁾, Cristiane Sanchez Farinas⁽¹⁾, Victor Bertucci Neto⁽¹⁾,
Sonia Couri⁽²⁾ e Silvio Crestana⁽¹⁾

⁽¹⁾Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970 São Carlos, SP. E-mail: ursula@cnpdia.embrapa.br, cristiane@cnpdia.embrapa.br, victor@cnpdia.embrapa.br, crestana@cnpdia.embrapa.br ⁽²⁾Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas, nº 29.501, Guaratiba, CEP 23020-470 Rio de Janeiro, RJ. E-mail: sonia.couri@gmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção enzimática de celulasas pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido de diferentes substratos. Foram avaliados os substratos sólidos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo e misturas entre os substratos. Em substrato com 90% de bagaço e 10% de farelo de soja, avaliaram-se os efeitos do conteúdo de umidade (60, 70 e 80%, base úmida) e da suplementação com os meios indutores da atividade enzimática: sacarose, Mandels & Weber básico, Mandels & Weber modificado, com acréscimo de carboximetilcelulose, e Czapeck Dox. As maiores atividades de celulase total e endoglucanase, em farelo de trigo, foram obtidas após 72 horas de cultivo: 0,4 e 21,0 UI g⁻¹, respectivamente. Observou-se expressivo aumento nas atividades enzimáticas na medida em que se aumentou a proporção de farelos no substrato, em comparação à fermentação com bagaço de cana apenas. O conteúdo de umidade de 50% foi insuficiente para conseguir completa hidratação do bagaço de cana, e a umidade ideal varia de acordo com o meio utilizado para suplementação e encontra-se entre 70 e 80%. O meio de Mandels & Weber modificado apresenta o melhor resultado como indutor da atividade enzimática.

Termos para indexação: bagaço de cana-de-açúcar, energia renovável, etanol celulósico, hidrólise enzimática, lignocelulose.

***Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation**

Abstract – The objective of this work was to evaluate cellulase enzyme production by the filamentous fungus *Aspergillus niger* by solid-state fermentation of different substrates. The solid substrates sugarcane bagasse, wheat bran, soybean meal, and their mixtures were evaluated. The effects of substrate moisture contents (60, 70, and 80% in humid basis) and of the supplementation with culture media: sucrose, basic Mandels & Weber, modified Mandels & Weber, with the addition of carboxymethyl cellulose, and Czapeck Dox, were evaluated in substrate with 90% bagasse and 10% soybean meal. The highest total cellulose and endoglucanase activities, in wheat bran, were obtained after 72 hours: 0.4 and 21.0 IU g⁻¹, respectively. There was an expressive increase in enzymatic activities as the proportion of bran in the substrate increased, in comparison to fermentation with sugarcane bagasse only. The 50% moisture content was insufficient to fully hydrate sugarcane bagasse, and the ideal humidity varies according to the medium used for supplementation and is between 70 and 80%. The modified Mandels & Weber medium shows the best result as an inductor of enzymatic activity.

Index terms: sugarcane bagasse, renewable energy, cellulosic ethanol, enzymatic hydrolysis, lignocellulose.

Introdução

Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela utilização de resíduos agrícolas para obtenção de combustíveis renováveis, como o etanol celulósico. No Brasil, apesar da grande produção de etanol a partir da sacarose de cana, a produção de álcool derivado de lignocelulose também é uma alternativa viável e sustentável, principalmente no contexto de iminente crise energética mundial (Mussatto et al., 2010).

Atualmente, o excedente de bagaço de cana-de-açúcar disponível para produção de etanol de segunda

geração se situa entre 7 e 10% do total de bagaço gerado no Brasil. Na safra de 2010/2011, a produção total de bagaço de cana-de-açúcar foi estimada em 163 milhões de toneladas. Os excedentes de bagaço de cana-de-açúcar podem atingir 50%, após adequada otimização do sistema de combustão em destilarias autônomas (Bressan Filho, 2011).

A hidrólise enzimática é uma rota tecnológica promissora para a bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar, por apresentar elevada capacidade de integração nas instalações industriais existentes

(Mussatto et al., 2010). No entanto, a produção de etanol de segunda geração, em escala comercial, é atualmente limitada pelo alto custo das celulases, enzimas usadas na hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis (Siqueira et al., 2010). Nesse sentido, os custos das celulases podem ser reduzidos por meio de melhoramento genético dos microrganismos e do uso de resíduos como matéria prima, com conseqüente aumento da especificidade enzimática (Singh et al., 2009; Castro et al., 2010; Maeda et al., 2011). Além disso, a utilização de tecnologias alternativas no processo, como a fermentação em estado sólido, é amplamente discutida para maior produtividade enzimática e redução dos custos de produção (Singhania et al., 2010; Siqueira et al., 2010).

A fermentação em estado sólido é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (Rahardjo et al., 2006). Atualmente, aproximadamente 90% dos preparados enzimáticos industriais são realizados por processos de fermentação submersa e, na maioria das vezes, com microrganismos geneticamente modificados (Castro & Pereira Júnior, 2010; Singhania et al., 2010). Contudo, a fermentação em estado sólido ainda é vantajosa, pois, além de simular o hábitat natural de microrganismos fúngicos selvagens (Hölker et al., 2004), apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (Singhania et al., 2010).

A produtividade enzimática da fermentação em estado sólido, como todo processo biotecnológico, é definida pelo microrganismo e as condições de cultivo. O fungo filamentoso *Aspergillus* é o melhor produtor de exo e endoglicosidases, e é reconhecido pelas elevadas concentrações de β -glicosidases, o que representa uma vantagem no processo de sacarificação da biomassa (Singh et al., 2009; Castro et al., 2010).

Parâmetros como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação (Singhania et al., 2010). O nível de umidade varia de acordo com o ecossistema formado entre o microrganismo e o substrato. Baixos níveis de umidade levam à inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, à ineficiente utilização do substrato. Em contrapartida, o excesso de umidade resulta na diminuição da

porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam a respiração microbiana (Hölker et al., 2004).

Diversos meios de suplementação são usados para suprir os requerimentos nutricionais dos microrganismos, em termos de carbono, nitrogênio, fósforo, vitaminas e minerais (Vries & Visser, 2001). Além disso, o sistema celulolítico da maioria das linhagens fúngicas precisa ser induzido pela presença do substrato (celulose). Gong & Tsao (1979) relataram diversas fontes de celulose complexa (resíduos lignocelulósicos) e açúcares simples (gentiobiose, sofrorose e lactose) como indutoras da produção de celulases em fermentação submersa. A resposta das células fúngicas aos diferentes meios varia com a concentração e o tipo de indutor, o que requer o estudo das exigências nutricionais do microrganismo para estimular uma efetiva biossíntese enzimática e atingir expressivas produtividades de celulases (Vries & Visser, 2001). O complexo enzimático produzido também deve apresentar balanço adequado entre os três principais grupos de enzimas componentes do complexo de celulases (Singh et al., 2009; Castro et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção enzimática de celulases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, em diferentes substratos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Agroenergia, da Embrapa Instrumentação Agropecuária, em São Carlos, SP, em 2009.

Os substratos sólidos usados nas fermentações foram o bagaço de cana-de-açúcar, o farelo de soja e o farelo de trigo, com granulometria entre 1–4 mm. Tanto o farelo de soja quanto o farelo de trigo são largamente utilizados como substratos na fermentação em estado sólido, por seu alto teor nutricional e suas propriedades texturais (Pandey et al., 2000; Hu et al., 2011). O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela empresa Edra Eco Sistemas Ltda. (São Paulo, SP), e os farelos foram adquiridos comercialmente. Todos os substratos foram armazenados, até utilização, em sacos de plástico a -18°C . A composição dos substratos quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e proteínas foi analisada no Laboratório de Nutrição Animal, da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos,

SP, segundo Goering & Van Soest (1970) e Van Soest (1963). Os resultados da composição dos substratos estão descritos na Tabela 1.

O microrganismo utilizado para fermentação foi a linhagem de *A. niger* F12, pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ. Os esporos de manutenção foram preservados em tubos de ensaio, com tampas rosqueadas, em solo estéril, e estocados a -18°C . A ativação foi realizada em duas fases de transferência. Inicialmente, os esporos foram transferidos dos tubos para um meio básico formulado de acordo com Couri & Farias (1995), e incubados por cinco dias em estufa a 30°C . Os conídios crescidos e ativados na pectina cítrica foram ressuspensos pela adição de 10 mL de solução estéril do surfactante Tween 80 a $0,3\%$ m v⁻¹ (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Frascos cônicos, com meio de sabugo de milho previamente esterilizado, foram submetidos à inoculação com 1 mL da suspensão de conídios. Após a inoculação, os meios foram incubados em estufa por cinco dias a 32°C , período no qual foram verificadas a formação de micélio aéreo e a esporulação. Para inoculação, foram adicionados 100 mL de solução surfactante estéril de Tween 80 a $0,3\%$ m v⁻¹, em cada frasco contendo os esporos crescidos em sabugo de milho. Em seguida, a suspensão dos esporos foi separada das partículas de sabugo mediante filtração com gaze. O volume de inóculo para fermentação foi determinado em microscópio com câmara de Neubauer e calculado para a concentração final de 10^7 esporos por grama de substrato sólido. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave a 1 atm por 15 min.

As fermentações em estado sólido para produção de celulasas a partir do bagaço de cana foram realizadas em frascos cônicos de 500 mL contendo 5 g do substrato sólido, com umidade ajustada pela adição do meio de suplementação de nutrientes, conforme estabelecido em cada etapa experimental. As fermentações foram conduzidas a 32°C , em estufa com recirculação de ar, até extração enzimática (Couri & Farias, 1995).

Tabela 1. Conteúdo (%) de celulose, hemicelulose, lignina e proteína dos substratos usados na fermentação em estado sólido.

Substrato	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Proteína
Bagaço de cana-de-açúcar	46,62	26,51	21,70	1,52
Farelo de soja	34,59	18,13	9,78	43,22
Farelo de trigo	10,86	28,88	4,89	17,61

A primeira etapa do experimento consistiu na avaliação da cinética de produção pelo monitoramento da atividade enzimática de celulase total e endoglucanase, a cada 24 horas, por quatro dias, segundo Couri et al. (2000).

Na segunda etapa experimental, foram testadas misturas de bagaço de cana-de-açúcar com farelo de trigo e farelo de soja, nas proporções de 0 a 60% em massa. A umidade do substrato foi de 50%, e o tempo de fermentação foi definido com base no experimento anterior.

Como o bagaço de cana-de-açúcar apresenta elevada capacidade de absorção de líquidos, foram realizados testes de saturação com adição de 20 a 90% de água, para seleção do intervalo de umidades a serem avaliadas. Em seguida, foram definidas as umidades 60, 70 e 80% para adição dos diferentes meios nutrientes. Os meios de cultura para suplementação utilizados foram: sacarose (Pinto, 1998), Mandels & Weber básico (Mandels & Weber, 1969), Mandels & Weber modificado, com acréscimo de carboximetilcelulose, e Czapeck Dox (Chandra et al., 2007). A composição dos meios de cultura está descrita na Tabela 2.

Para extração das enzimas celulasas, adicionou-se ao meio fermentado 10 mL g⁻¹ de tampão acetato de

Tabela 2. Composição dos meios de complementação usados para indução da atividade enzimática na fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger*.

Componente	Concentração (g L ⁻¹)	
	Mandels & Weber	
Ureia		0,30
Peptona		0,75
Extrato de levedura		0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄		1,40
Minerais ⁽¹⁾		2,70
	Mandels & Weber + carboximetilcelulose	
Carboximetilcelulose		5,00
	Sacarose	
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		20,00
(NH ₄) ₂ SO ₄		3,50
Minerais ⁽²⁾		1,06
	Czapeck Dox + carboximetilcelulose	
Carboximetilcelulose		5,00
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		30,00
NaNO ₃		2,00
Minerais ⁽³⁾		2,00

⁽¹⁾ 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,30 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,40 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; 1,40 mg L⁻¹ de ZnSO₄; 5,00 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; 2,00 mg L⁻¹ de CoCl₂.6H₂O; 1,60 mg L⁻¹ de MnSO₄.5H₂O. ⁽²⁾ 1 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ de KCl; 5,0 mg L⁻¹ de ZnSO₄; 23 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; 6 mg L⁻¹ de CuSO₄.6H₂O; 20 µg L⁻¹ de MnSO₄.5H₂O. ⁽³⁾ 1 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,50 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,50 g L⁻¹ de KCl; 0,01 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O.

sódio a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,5. A homogeneização foi realizada em câmara rotativa por 1 hora a 120 rpm e 32°C . Em seguida, o material foi filtrado a vácuo e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min.

Após cada etapa experimental, os sobrenadantes das soluções enzimáticas foram analisados para quantificação das atividades de celulase total e endoglucanase, segundo Ghose (1987), tendo-se utilizado, como substratos, papel de filtro e carboximetilcelulose, respectivamente. A concentração de açúcares redutores produzidos, expressa em glicose, foi determinada pelo método do ácido dinitrossalicílico (Miller, 1959). A unidade de atividade enzimática (UI) foi considerada como aquela que libera $1 \mu\text{mol}$ de açúcar redutor correspondente, por minuto de reação, a 50°C . Todos os experimentos e os ensaios foram realizados em duplicata, e os valores finais representam a média \pm erro-padrão de duas determinações.

Resultados e Discussão

De acordo com o perfil da cinética de produção enzimática por *A. niger* na fermentação em estado sólido de farelo de trigo durante o período de 96 horas de cultivo, a produção máxima de celulase total e endoglucanase ($0,4$ e $13,0 \text{ UI g}^{-1}$, respectivamente) foi observada após 72 horas (Figura 1). Esse período de cultivo foi selecionado para extração e comparação da produtividade, nas demais etapas do experimento. O tempo de 72 horas de fermentação em estado sólido para o fungo *A. niger* é interessante para fins comerciais quanto à produção de celulases, em comparação ao tempo de cultivo de outros fungos celulolíticos. Portanto, a produtividade em celulase total, de $0,13 \text{ UI}$ por dia, observada após três dias de processo, apresenta a mesma ordem de grandeza que a de outras espécies fúngicas produtoras de celulases. O fungo *Trichoderma reesei* QMY-1 precisou de 14 dias de fermentação em estado sólido para atingir atividades de $6\text{--}6,5 \text{ UI}$ de celulase total por grama, com produtividade de $0,43 \text{ UI}$ por dia (Chahal, 1985). Em cultivos com o fungo *Penicillium decumbens*, foram observados valor de atividade celulásica em torno de $0,4 \text{ UI}$ por grama de substrato e produtividade de $0,08 \text{ UI}$ por dia, após cinco dias de fermentação em estado sólido, em farelo de trigo (Sun et al., 2008). De acordo com Umikalsom et al. (1997), *Chaetomium globosum* apresentou produtividades de $0,14$ e

$1,0 \text{ UI}$ por dia em celulase total e endoglucanase, respectivamente, após dez dias de fermentação, tendo como substrato fibra deslignificada do fruto de palma. Assim, a produtividade observada no presente trabalho, após três dias de processo, representa uma vantagem em relação a outros microrganismos que precisam de maior tempo de fermentação em estado sólido, para atingir atividades enzimáticas equivalentes.

Na etapa seguinte, avaliou-se o bagaço de cana-de-açúcar complementado com os substratos farelo de soja e farelo de trigo, importantes fontes de proteína (Tabela 1). O farelo de trigo também é a fonte de carbono mais utilizada, por induzir uma ampla variedade de enzimas celulolíticas (Couri et al., 2000; Hu et al., 2011). Embora o bagaço de cana-de-açúcar apresente os maiores teores de celulose, sua utilização como fonte de carbono é dificultada pela presença da lignina. Houve relação direta entre o aumento na proporção dos farelos (de 0 a 60% em massa) e as atividades enzimáticas avaliadas após 72 horas de cultivo (Figura 2). O valor máximo de atividade de celulase total ($0,4 \text{ UI g}^{-1}$) foi verificado no substrato composto por 60% de farelo de soja e 40% de bagaço de cana-de-açúcar, atividade 12 vezes maior que a obtida com 100% de bagaço de cana-de-açúcar ($0,03 \text{ UI g}^{-1}$). Foi observado acréscimo de 26 vezes na atividade de endoglucanase

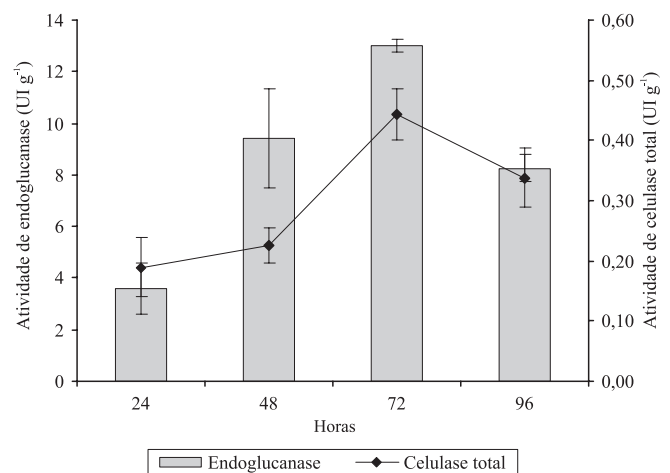


Figura 1. Atividades de celulase total e endoglucanase, em função do tempo, na fermentação semissólida de farelo de trigo com *Aspergillus niger*. Umidade de 50% atingida com solução de sulfato de amônia a $0,09\%$ (m v^{-1}) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Os valores das atividades enzimáticas representam a média \pm desvio-padrão de duas determinações.

(8,0 frente a 0,3 UI g⁻¹) na mistura com 60% de farelo de trigo, na fermentação em estado sólido. No entanto, a comparação desses resultados com os de outros estudos é limitada, em virtude da grande variedade de microrganismos utilizados e das condições de fermentação. Todas essas variáveis originam um amplo intervalo de valores na literatura. Singhvi et al. (2011), por exemplo, relataram atividades de celulase e endoglucanase superiores a 60 e 360 UI g⁻¹, respectivamente, ao avaliar mutantes de *Penicillium*, após sete dias de fermentação em estado sólido de farelo de trigo. Farzaneh et al. (2011) observaram atividades celulásicas de 0,21 UI g⁻¹ após três dias de cultivo de *Acidothermus cellulolyticus*, em fermentação em estado sólido.

Para utilizar o bagaço de cana-de-açúcar como substrato principal com potencial de desenvolvimento para produção de celulases específicas (Singh et al., 2009; Castro et al., 2010; Maeda et al., 2011), optou-se por continuar as etapas seguintes do experimento com concentração mínima dos outros substratos na mistura. A partir dos resultados

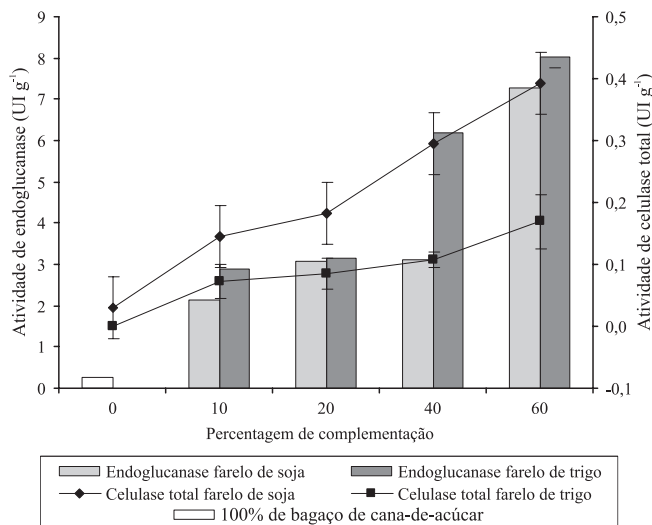


Figura 2. Atividade de celulase total e endoglucanase na fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*, em substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar complementado com diferentes proporções de farelo de soja e farelo de trigo, em meio de suplementação de Czapeck Dox, com adição de 5 g L⁻¹ de carboximetilcelulose e umidade de 50%, base úmida. Os valores das atividades enzimáticas representam a média±desvio-padrão de duas determinações.

apresentados na Figura 2, a mistura composta por 10% de farelo de soja e 90% de bagaço de cana-de-açúcar atingiu atividades de 0,14 UI g⁻¹, em celulase total, e de 2,2 UI g⁻¹ em endoglucanase (entre cinco e oito vezes a produtividade da fermentação com 100% de bagaço de cana-de-açúcar). A escolha do farelo de soja para complementar o bagaço de cana-de-açúcar baseou-se nos maiores valores obtidos para atividade de celulase total, análise enzimática que mede a atividade sinérgica das endoglucanases, exoglucanases e β-glicosídeos, componentes do coquetel de celulases. O farelo de soja também apresenta as maiores concentrações de proteína e celulose (Tabela 1). Sun et al. (2008) observaram que o elevado teor em componentes amiláceos no farelo de trigo pode atuar como inibidor na síntese das celulases, em decorrência da indução preferencial de enzimas amilases.

Nos experimentos anteriores, observou-se que a umidade utilizada (50%) foi insuficiente para conseguir uma completa hidratação do substrato. O nível de umidade adequado na fermentação em estado sólido é variável e dependente da natureza do material, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (Pandey et al., 2000; Hölker et al., 2004). Valores excessivos de líquido na matriz sólida levam à redução da porosidade, o que diminui a difusão do oxigênio. No entanto, baixos níveis de umidade no substrato comprometem a difusão de nutrientes e de oxigênio, e levam ao acúmulo de metabólitos inibitórios do microrganismo (Pandey et al., 2000; Hölker et al., 2004).

Houve efeito positivo da umidade na produção de celulases, com maior ênfase nos meios de Mandels & Weber (básico e modificado), em virtude da maior concentração de nutrientes na sua formulação (Figura 3). Como a produtividade obtida com 60% de umidade, nos meios Mandels & Weber básico e de sacarose, foi pouco representativa (<0,05 UI g⁻¹), seus valores não foram apresentados na Figura 3.

As diversas fontes de nitrogênio orgânico (ureia, peptona e extrato de levedura) no meio de Mandels & Weber (Tabela 2) intensificaram as atividades de celulase total (Figura 3). Khowala & Sengupta (1992), ao avaliar a seletividade de *A. niger* em diversas fontes suplementares de nitrogênio, observaram a promoção do crescimento e a síntese de celulases, na

seguinte sequência: ureia>peptona>NaNO₃>extrato de levedura. Apesar da principal fonte de carbono microbiano na fermentação em estado sólido ser representada pelo substrato sólido, o efeito indutor de compostos de menores massas moleculares, como a carboximetilcelulose (meio de Mandels & Weber modificado) e a sacarose, tem sido registrado na literatura e no ambiente industrial da fermentação submersa (Castro & Pereira Júnior, 2010). Mandels & Reese (1960) compararam o efeito de diversos oligo e polissacarídeos na indução de celulasas de *T. viride*, expressas por suas atividades de endoglucanase, com maior potencial observado com lactose, nigerose, lichenana, glucana de cevada e, principalmente, soforose.

No presente trabalho, as maiores atividades foram obtidas com o meio de Mandels & Weber modificado, com adição do indutor carboximetilcelulose (Figura 4). Nessas condições, as atividades de celulase total e de endoglucanase foram 0,4 e 21,0 UI g⁻¹, respectivamente, valores que representam acréscimos de 2,6 e 4 vezes, nas respectivas atividades enzimáticas obtidas no meio de Mandels & Weber, sem adição do indutor.

A adição de sacarose como fonte de carbono indutora nos meios de sacarose e Czapeck Dox foi

baseada nos trabalhos de Chandra et al. (2007). Os autores observaram que a adição de açúcares solúveis (sacarose, glicose) favorece o rápido crescimento de massa celular e promove a síntese de celulasas. Do mesmo modo, Olsson et al. (2003) usaram uma combinação de celulose e polpa de beterraba pré-tratada (fonte de sacarose) para potencializar a produção de endoglucanases. Entretanto, no presente trabalho, as concentrações de açúcar, no meio de sacarose, não favoreceram a produção enzimática. Seiboth et al. (1997) relataram que o sistema celulolítico microbiano é suscetível à repressão catabólica em concentrações excessivas de açúcares simples, como glicose, maltose e arabinose. No caso do meio Czapeck Dox modificado contendo sacarose e carboximetilcelulose, é provável que a presença desse indutor na suplementação não tenha sido suficiente para compensar o efeito repressor da sacarose em concentrações de 30 g L⁻¹, fato que foi agravado pela carência de fontes de nitrogênio orgânico. Contudo, o complexo celulolítico produzido nessa etapa, com adição de 5 g L⁻¹ de carboximetilcelulose no meio de Mandels & Weber, permitiu acréscimos nas atividades de celulase total e endoglucanase em torno de 2,5 e 10 vezes, respectivamente, em comparação à etapa anterior. Os resultados obtidos indicam a

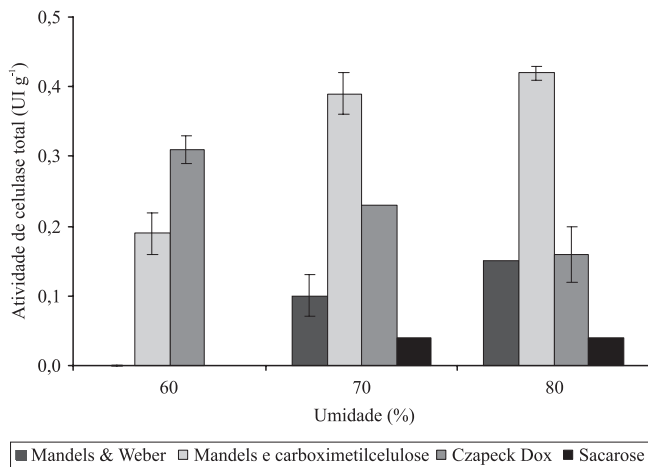


Figura 3. Efeito da umidade na atividade de celulase total na fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*, em substrato composto por 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja, com diferentes meios de suplementação, após 72 horas. Os valores das atividades enzimáticas representam a média±desvio-padrão de duas determinações.

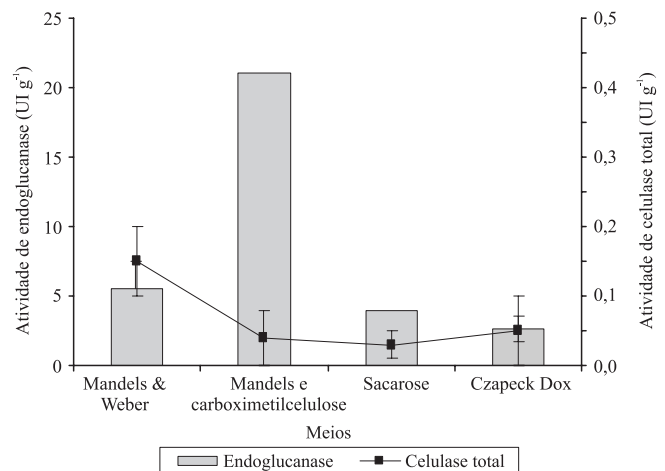


Figura 4. Efeito do meio de suplementação nas atividades de celulase total e endoglucanase na fermentação em estado sólido com *Aspergillus niger*, em substrato composto por 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja, com 80% de umidade, após 72 horas. Os valores das atividades enzimáticas representam a média±desvio-padrão de duas determinações.

necessidade de aprimoramento quanto às concentrações de fontes proteicas.

Conclusões

1. As melhores atividades de celulase total e endoglucanase, de 0,4 e 21,0 UI g⁻¹, respectivamente, com o uso de farelo de trigo como substrato, são obtidas após 72 horas de cultivo.

2. Há expressivo aumento na atividade enzimática com o aumento na proporção de farelos no substrato, em comparação com a fermentação do bagaço de cana-de-açúcar apenas.

3. No substrato com 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja, as maiores atividades enzimáticas são observadas com 70 a 80% de umidade e suplementação com o meio indutor Mandels & Weber modificado com a adição de carboximetilcelulose.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Financiadora de Estudos e Projetos, pelo apoio financeiro; e à Embrapa Instrumentação Agropecuária e à Embrapa Pecuária Sudeste, pelo apoio na realização deste trabalho.

Referências

- BRESSAN FILHO, A. **A geração termoelétrica com a queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil**. Brasília: Conab, 2011. 157p.
- CASTRO, A.M. de; CARVALHO, M.L. de A. de; LEITE, S.G.F.; PEREIRA JÚNIOR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.151-158, 2010.
- CASTRO, A.M. de; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p.181-188, 2010.
- CHAHAL, D.S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.205-210, 1985.
- CHANDRA, M.S.; VISWANATH, B.; REDDY, B.R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.323-328, 2007.
- COURI, S.; FARIAS, A.X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v.26, p.314-317, 1995.
- COURI, S.; TERZI, S. da C.; SAAVEDRA PINTO, G.A.; FREITAS, S.P.; COSTA, A.C.A. da. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v.36, p.255-261, 2000.
- FARZANEH, R.; LAWRENCE, J.; HIROYUKI, K.; AMITHA, R.; JEAN, V. Selection of conditions for cellulase and xylanase extraction from switchgrass colonized by *Acidothermus cellulolyticus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164, p.793-803, 2011.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GOERING, H.K.; VANSOEST, P.J. **Forage fiber analyses, apparatus, reagents, procedures and some applications**. Washington: USDA, 1970. 20p. (USDA. Agricultural handbook, 379).
- GONG, C.S.; TSAO, G.T. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D. (Ed.). **Annual reports on fermentation process**. New York: Academic, 1979. v.3, p.111-139.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.175-186, 2004.
- HU, H.L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B.S.; WOSTEN, H.A.B.; GU, J.B.; DE VRIES, R.P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.248-252, 2011.
- KHOWALA, S.; SENGUPTA, S. Secretion of β-glucosidase by *Termitomyces clypeatus*: regulation by carbon catabolite products. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.144-149, 1992.
- MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M. de; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, p.1196-1201, 2011.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, v.79, p.816-826, 1960.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v.95, p.391-414, 1969.
- MILLER, G.L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, p.817-830, 2010.
- OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T.M.I.E.; HANSEN, K.P.; PALMQUIST, E.A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.612-619, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

- PINTO, G.A.S. **Produção de uma mistura hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa.** 1998. 107p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, p.161-179, 2006.
- SEIBOTH, B.; HAKOLA, S.; MACH, R.L.; SUOMINEN, P.; KUBICEK, C.P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.5318-5320, 1997.
- SINGH, R.; VARMA, A.J.; LAXMAN, R.S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v.100, p.6679-6681, 2009.
- 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 and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010.
- SINGHVI, M.S.; ADSUL, M.G.; GOKHALE, D.V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v.102, p.6569-6572, 2011.
- SIQUEIRA, F.G. de; SIQUEIRA, L.G. de; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FERREIRA FILHO, E.X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.64, p.20-26, 2010.
- SUN, X.N.; LIU, Z.Y.; QU, Y.; LI, X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.146, p.119-128, 2008.
- UMIKALSOM, 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 empty fruit bunch fibre as substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.590-595, 1997.
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemists**, v.46, p.829-835, 1963.
- VRIES, R.P. de; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.497-522, 2001.

Recebido em 9 de novembro de 2010 e aprovado em 12 de agosto de 2011