

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM CELULASES FÚNGICAS

PROCESS OPTIMIZATION OF SACCHARIFICATION OF SUGAR CANE BAGASSE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS WITH CELLULASE FROM FUNGI

Carina Langaro¹
Salah Din Mahmud Hasan²
Mônica Lady Fiorese³
Paola Marchiori Munheiro⁴
Julcimari Caroline Schossler Deak⁵
Camila Fochesatto⁶
Laís Cristina Bertual⁷
Dahiane Gabriela Cecchin Gebert⁸

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de hidrólise enzimática da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar. Para isso foram usadas enzimas celulases produzidas pelos fungos *Trichoderma* sp, oriundo do bioma amazônico, e *Aspergillus niger*, cepa local. A otimização da hidrólise foi feita empregando-se a metodologia de superfícies de resposta, que se passa em planejamentos experimentais sequenciais. Assim, foi feito um *screening* inicial das variáveis de processo, utilizando o planejamento de Plackett-Burman, sendo as seguintes variáveis estudadas na cinética enzimática da celulose: concentração do substrato, concentração de extrato enzimático, temperatura, pH, tempo de incubação e agitação. Após, foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) visando ajustar um modelo matemático nas condições otimizadas do processo. Os melhores resultados de açúcares redutores fermentescíveis obtidos a partir da hidrólise enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram $AR = 0,112 \text{ g.L}^{-1}$ a partir da celulase de *Trichoderma* sp. e $AR = 0,129 \text{ g.L}^{-1}$ com a celulase de *A. niger*.

Palavras-chave: enzimas. resíduos agroindustriais. fungos lignocelulolíticos. Otimização.

Abstract: The objective of this research was to evaluate the process of hydrolysis of cellulose present in the sugar- cane bagasse. Cellulase enzymes from fungi *Trichoderma* sp, coming from the Amazon biome, and a local strain of *Aspergillus niger*, were used. The optimization was accomplished by means of response surface methodology, which is based on sequential experimental designs. Thus, an initial screening was done using the Plackett-Burman planning, for the main factors involved in the enzymatic kinetics of cellulose, i.e., substrate concentration, enzyme extract concentration, temperature, pH, incubation time and agitation. After, the response surface methodology for optimization of the process was used as to fit a mathematical model at optimized process conditions. The best results of fermentable reducing sugars obtained from the enzymatic hydrolysis of cellulose from pretreated sugarcane bagasse were $AR = 0,112 \text{ g.L}^{-1}$ with cellulase of *Trichoderma* sp. and $AR = 0,129 \text{ g.L}^{-1}$ with cellulase of *A. niger*.

Keywords: enzymes. agro-industrial residues. lignocellulolytic fungi. optimization

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Eng. Química. Rua Faculdade, 645. Toledo/PR. Cep 85903000 E-mail: carinalangaro@hotmail.com. Tel.: 45-3379-7036

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: salahdmh@gmail.com

³ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: mlfiorese@gmail.com

⁴ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: pmunheiro@hotmail.com

⁵ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: juci.deeak@hotmail.com

⁶ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: camila_fochesatto@hotmail.com

⁷ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: laisbertual@hotmail.com

⁸ Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Dep. Engenharia Química – E-mail: dahiaane@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A geração mundial de resíduos lignocelulósicos anual resulta na poluição do meio ambiente além da perda de materiais valiosos que podem ser bioconvertidos em produtos de maior valor agregado (Howard *et al.*, 2003; Sánchez, 2009). No Brasil a indústria sucroalcooleira e as agroindústrias de modo geral são uma excelente representação do desenvolvimento do País. Por outro lado, gera-se uma altíssima quantidade de resíduos como o bagaço de cana de açúcar e as palhas e cascas provenientes de grãos como milho, trigo, soja, entre outros. Dentre as várias biomassas disponíveis, a biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima promissora devido a sua abundância, disponibilidade e baixo custo (Kang *et al.*, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2010).

A possibilidade de se produzir combustíveis derivados da maior fonte de carbono existente no planeta, a lignocelulose, incentivou grandes investimentos na indústria de biocombustíveis recentemente (Bansal *et al.*, 2009).

A biomassa lignocelulósica contém altos teores de celulose e outros polissacarídeos em sua constituição química, podendo ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis (Scheufele, 2012). Recentemente, há a necessidade de fontes energéticas de origem renovável, devido à diminuição dos combustíveis fósseis, viabilizando a conversão das biomassas lignocelulósicas via enzimas hidrolíticas.

As etapas envolvidas na produção de biocombustíveis (etanol de segunda geração) e compostos químicos a partir de biomassa lignocelulósica consistem de preparo do material, pré-tratamento visando a quebra da lignina, fracionamento, hidrólise enzimática da celulose (sacarificação), fermentação dos açúcares obtidos na etapa de hidrólise, recuperação do produto obtido (etanol de segunda geração).

A sacarificação é a etapa crítica na produção do açúcar fermentescível. Os procedimentos usados no pré-tratamento são essenciais para a remoção da hemicelulose da lignina, para reduzir a cristalinidade da celulose e para aumentar a porosidade dos materiais (Hsu *et al.*, 2011). A sacarificação enzimática da celulose pode ser considerada como um método ambientalmente amigável e que substitui os tratamentos com ácido sulfúrico.

O complexo celulásico secretado por fungos filamentosos por fermentação em estado sólido ou por fermentação submersa é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases (Delabona *et al.*, 2013). Estas três classes de enzimas, individualmente, acarretam alterações bastante diferenciadas na estrutura supramolecular da celulose, mas por apresentarem propriedades complementares, descrevem um alto grau de sinergismo (ou ação cooperativa) durante a hidrólise ou sacarificação da celulose (Chundawat *et al.*, 2011).

O processo de hidrólise da celulose pode ser afetado por diversos fatores como pH, temperatura, agitação, concentração de enzima e de substrato, etc. e a técnica convencionalmente utilizada para a sua otimização é a avaliação univariável. Entretanto, esse tipo de método é demorado e pouco eficiente no que diz respeito a avaliação da interação entre os efeitos das variáveis (Garai e Kumar, 2013).

Assim, este trabalho se justifica pela utilização da metodologia de superfícies de resposta cuja finalidade é a identificação das condições ótimas da hidrólise enzimática com vistas a obtenção de açúcares fermentescíveis.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de hidrólise enzimática da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar. Para isso foram usadas enzimas celulases produzidas pelos fungos *Trichoderma* sp, oriundo do bioma amazônico. Como objetivo específico buscou-se a otimização do processo de hidrólise enzimática considerando planejamentos fatoriais sequenciais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SUBSTRATO

Foi utilizado como substrato da hidrólise enzimática o bagaço de cana-de-açúcar oriundo de usina sucro-alcooleira da região de Paranavaí-PR. O bagaço foi previamente submetido a tratamento alcalino oxidativo, com solução de peróxido 1%, no pH 11,5, após retirada do conteúdo solúvel do resíduo lignocelulósico por meio de lavagem com água destilada, conforme método adaptado de Aguiar (2010).

2.2 EXTRATO ENZIMÁTICO

Dois extratos enzimáticos de celulase foram testados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar:

- extrato de celulase obtido após fermentação em estado sólido (FES) do bagaço de cana-de-açúcar com o fungo *Trichoderma* sp, 1382 do bioma amazônico. Esse fungo foi cedido pelo INPA – Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas, sendo reativado em meio caldo Sabouraud (SAB) em incubadora *shaker* (Solab SL 222/CFR) a 28 °C durante 7 dias. As condições de fermentação utilizadas foram: adição de nutrientes ao bagaço conforme meio de Mandels & Weber (1969), preparada em tampão fosfato 50mM pH 7,0, temperatura de 30°C, umidade na proporção sólido-liquido de 1:9. A concentração inicial de esporos utilizada foi de 1.10^7 esporos.g⁻¹.

- extrato de celulase obtido após fermentação em estado sólido (FES) do bagaço de cana-de-açúcar com o fungo *Aspergillus niger*, cepa local isolada do solo, cedida pelo Laboratório de Bioquímica, Unioeste, Cascavel/PR. O fungo foi reativado em meio Agar Batata Dextrose (PDA) em estufa microbiológica (Quimis) a 30°C durante 7 dias. As condições de fermentação utilizadas foram as mesmas do fungo *Trichoderma* sp. 1382.

Após as fermentações, os complexos (extratos) enzimáticos da celulase foram obtidos por extração com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, na proporção 1:17 em incubadora *shaker* (Solab SL 222/CFR) por 2h, a 35°C e agitação de 150 rpm. Os extratos enzimáticos foram analisados e obtiveram as seguintes atividades enzimáticas (AE) Fpasicas: 0,167 U.mL⁻¹ para o extrato obtido de *Trichoderma* sp. 1382. e 0,098 U.mL⁻¹ para o extrato obtido de *Aspergillus niger*.

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática realizada nos experimentos com bagaço de cana-de-açúcar seguiu os preceitos da determinação de atividade enzimática total (FPase) do complexo celulásico, que usa papel filtro como substrato, conforme descrito por Ghose (1987). Os testes de hidrólise enzimática foram realizados em tubos de ensaio, nos quais foram adicionados o substrato bagaço de cana pré-tratado, na quantidade adequada a cada experimento do planejamento experimental e 4 mL de tampão citrato 50 mM no pH especificado.

Os tubos foram dispostos em banho-maria ultratermostático à temperatura especificada no planejamento experimental por alguns minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de solução de extrato enzimático na concentração do planejamento e os tubos mantidos a temperatura constante (40, 50 ou 60°C) em banho aquecido termostático durante 30, 60 ou 90 min de incubação, a agitação foi realizada manualmente a cada 5 ou 10 min (ou sem agitação nenhuma). Terminada a incubação os ensaios foram submetidos à determinação de açúcares redutores (AR). Os testes de hidrólise foram feitos para ambos os extratos enzimáticos seguindo planejamentos experimentais.

2.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

Visando analisar e selecionar os parâmetros que influenciam a hidrólise enzimática, foi feito primeiramente um planejamento experimental fatorial saturado do tipo Plackett-Burman (1946), no qual foram testadas as variáveis concentração de substrato (X_1), concentração de extrato enzimático na hidrólise (X_2), temperatura (X_3), pH da solução tampão utilizada (X_4), tempo de incubação de hidrólise (X_5) e agitação (X_6). A Tabela 1 apresenta os níveis reais e codificados das variáveis. No planejamento foi também feita uma quadruplicata no ponto central para auxiliar no cálculo do erro experimental.

Tabela 1. Especificação dos níveis das variáveis avaliadas no planejamento Plackett-Burman, PB12, da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Variável	Nível		
	-1	0	1
Conc. substrato (X_1 , g.L ⁻¹)	10	20	30
Conc. de extrato enzimático (X_2 , % v.v ⁻¹)	5,5	11,0	16,6
Temperatura (X_3 , °C)	40	50	60
pH (X_4)	4	5	6
Tempo incubação (X_5 , min)	30	60	90
Agitação manual (X_6 , min)	0	5	10

O tempo de hidrólise (t) foi baseado na determinação de AE em papel filtro, conforme Ghose (1987), a qual utiliza o tempo de 60 min, de forma que utilizou-se este como nível central no planejamento. A influência da concentração de extrato enzimático foi avaliada e a concentração do substrato foi variada para obter a quantidade de sólido utilizada por ensaio na hidrólise, o fator limitante é a sua concentração máxima, a qual apresenta consistência muito elevada para valores maiores que os utilizados.

Seguindo a metodologia de superfícies de resposta, as variáveis que se mostraram significativas do planejamento PB12 sobre a hidrólise (p-valor < 0,05) foram submetidas a um delineamento composto central rotacional (DCCR). Esse tipo de planejamento ajusta um modelo teórico não linear as respostas obtidas nos experimentos do planejamento. O ajuste segue um modelo de segunda ordem conforme a Equação (1), para duas variáveis:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{12}X_1X_2 \quad (1)$$

Onde Y é a resposta predita de açúcares redutores (g.L⁻¹), X_1 e X_2 os parâmetros (variáveis) que foram significativos no PB12, B_0 é o valor constante do intercepto, B_1 e B_2 os coeficientes lineares de X_1 e X_2 , respectivamente, B_{11} e B_{22} os coeficientes quadráticos de X_1 e X_2 e B_{12} o coeficiente da interação entre as variáveis X_1 e X_2 .

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada na regressão dos dados experimentais e das superfícies de resposta. A qualidade do ajuste do modelo quadrático foi expresso pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo teste F.

Os resultados obtidos de AR na hidrólise enzimática para os planejamentos foram analisados no *software* STATISTICATM (v. 8.0, Tulsa, USA) onde foi realizada uma estimativa dos efeitos das variáveis e suas interações sobre a resposta analisada, considerando o nível de significância de 5%. A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições de hidrólise e fornecer um modelo matemático adequado para as respostas de AR. Modelos obtidos com baixos valores de R^2 são desconsiderados para fins de otimização, servindo apenas para atestar a influencia das variáveis sobre a resposta (Barros Neto *et al.*, 2010, Rodrigues e Iemma, 2009).

Para cada ensaio do planejamento foi feito um controle utilizando água no lugar do

extrato enzimático. A diferença de AR entre o ensaio do planejamento e o controle, deve-se à glicose liberada no meio devido a hidrólise do bagaço pela enzima.

O método de determinação da concentração de açúcares redutores consistiu numa adaptação do método colorimétrico proposto por Miller (1959). A determinação de atividade enzimática total (FPase) do complexo celulásico foi adaptado conforme o método de atividade enzimática em papel filtro (padrão) preconizado por GHOSE (1987)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 observa-se a matriz do planejamento saturado PB12 de Plackett e Burman para 6 variáveis, com quadruplicata no ponto central, com as variáveis nas suas formas codificadas (-1, 0 e +1). Os resultados obtidos para cada ensaio são os açúcares redutores (AR) liberados na hidrólise enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato enzimático obtido com o fungo *Trichoderma* sp. e também com o fungo *A. niger*.

Tabela 2. Matriz do planejamento saturado Plackett-Burman PB12 para 6 variáveis

Ensaio	Substrato X ₁ (g.L ⁻¹)	Enzima X ₂ (v.v ⁻¹)	Temper. X ₃ (°C)	pH X ₄	t _{inc} X ₅	Agitação X ₆	AR (g.L ⁻¹) <i>Trichoderma</i>	AR (g.L ⁻¹) <i>A. niger</i>
1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,010	0,007
2	1	1	-1	1	-1	-1	0,105	0,057
3	-1	1	1	-1	1	-1	0,013	0,024
4	1	-1	1	1	-1	1	0,010	0,013
5	1	1	-1	1	1	-1	0,017	<u>0,095</u>
6	1	1	1	-1	1	1	0	0,051
7	-1	1	1	1	-1	1	0	0,041
8	-1	-1	1	1	1	-1	0,010	0,027
9	-1	-1	-1	1	1	1	0,007	0,010
10	1	-1	-1	-1	1	1	0,044	0,077
11	-1	1	-1	-1	-1	1	0,091	0,037
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,027	0,007
13	0	0	0	0	0	0	<u>0,112</u>	0,030
14	0	0	0	0	0	0	<u>0,125</u>	0,037
15	0	0	0	0	0	0	<u>0,098</u>	0,030
16	0	0	0	0	0	0	<u>0,112</u>	0,040

3.1 PB12 PARA O TRICHODERMA SP.

A análise estatística dos efeitos das seis variáveis sobre a resposta AR pode ser observada no gráfico de Pareto (Figura 1a), para a hidrólise feita a partir do extrato enzimático obtido com o fungo *Trichoderma* sp. Verifica-se que nenhuma variável se mostrou significativa (p-valor > 0,05). No gráfico de Pareto, para ser considerado significativo o efeito de uma variável, a coluna horizontal deve ultrapassar a linha tracejada à direita.

Os maiores resultados de AR foram observados no ponto central. É prática comum, ao se iniciar qualquer planejamento, colocar no ponto central aquelas condições do processo que apresentaram até então os melhores resultados e então estabelecer faixas de variação (níveis -1 e +1) para as variáveis de modo a se avaliar se isso irá surtir algum efeito no resultado. No caso do planejamento PB12, para o extrato de *Trichoderma*, o fato de nenhuma variável ter-se mostrado significativa, indica que os níveis centrais das variáveis foram corretamente especificados, não havendo variação significativa dos resultados fora destes níveis (Rodrigues e Iemma, 2009). Assim, o estudo da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando complexo enzimático obtido do fungo *Trichoderma* sp. foi finalizado e considerou-se, para a faixa estudada, que o melhor resultado é aquele obtido a partir dos seguintes parâmetros, considerando o nível central do planejamento no qual se obteve AR = 0,112 g.L⁻¹ como valor médio para a hidrólise: concentração substrato: 20 g.L⁻¹, concentração de extrato

enzimático: 11,0 % v.v⁻¹, temperatura: 50°C, pH: 5,0, tempo de reação: 60 min e agitação: manual com intervalos de 5 min. Resultados semelhantes de atividade e AR foram obtidos por Scheufele et al. (2012).

3.2 PB12 PARA O A. NIGER

Para os resultados de AR obtidos com o extrato enzimático oriundo do fungo *A. niger*, foi possível verificar (Figura 1b) que as variáveis concentração de extrato enzimático na hidrólise e pH se mostraram significativas ($p < 0,05$). O maior resultado (0,095 g.L⁻¹) de AR foi observado no ensaio número 5 (Tabela 2).

Dessa forma, a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando complexo enzimático obtido do fungo *A. niger*, foi melhor conduzida a partir das seguintes condições (ensaio 5): concentração substrato: 30 g.L⁻¹, concentração de extrato enzimático na hidrólise: 16,6% v.v⁻¹, temperatura: 40°C, pH: 6,0, tempo de reação: 90 min, agitação: sem agitação.

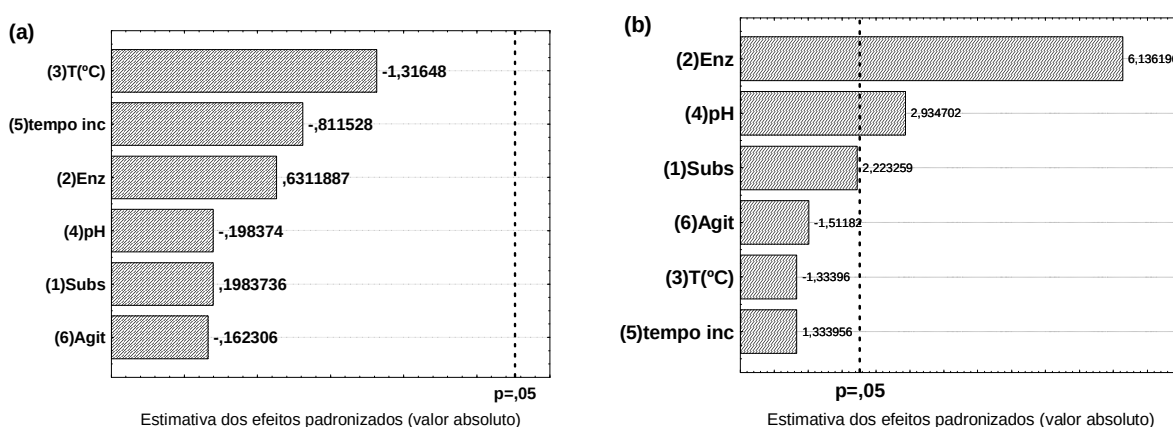


Figura 1. Gráfico de Pareto do planejamento Plackett-Burman PB12 para o extrato enzimático obtido de (a) *Trichoderma sp.* e (b) *Aspergillus niger*

3.3 DCCR PARA O A. NIGER

Visando otimizar o experimento de hidrólise do bagaço com extrato de *A. niger*, foi realizado outro planejamento, centrado agora nas condições do ensaio 5, descritas anteriormente, alterando apenas os valores das variáveis concentração de extrato enzimático e pH, através de um planejamento do tipo DCCR – delineamento composto central rotacional, conforme Tabela 3, onde foram aumentadas as faixas de estudo da concentração de extrato enzimático, X_1 (de 8,3 a 25,0 % v/v) e do pH, X_2 (de 5 a 7), devido aos efeitos positivos observados no planejamento anterior. Os melhores resultados de hidrólise (AR = 0,129 g.L⁻¹) foram obtidos com os ensaios 2 e 6 (Tabela 3), que correspondem a maiores valores de concentração de extrato enzimático e menores valores de pH. O melhor resultado do planejamento anterior de Plackett-Burman havia sido AR = 0,095 g.L⁻¹. A Tabela 4, de efeitos e coeficientes, mostra os efeitos significativos (p -valor $< 0,05$) do DCCR para os termos lineares da equação 1, que apresenta os seguintes coeficientes de determinação: $R^2 = 0,879$ e $R^2_{ajustado} = 0,779$. Considerando nível de significância de 10% o termo quadrático da concentração e a interação linear dos dois fatores passam a ser significativos ($p < 0,1$).

$$Y = 0,0829 + 0,039 \cdot X_1 - 0,0163 \cdot X_1^2 - 0,023 \cdot X_2 - 0,0069 \cdot X_2^2 - 0,022 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (1)$$

Tabela 3. Matriz do delineamento composto central rotacional para duas variáveis para os resultados de AR a partir do extrato enzimático obtido de *A. niger*

Ensaio	Conc. Extrato Enz. X_1 (% v.v ⁻¹)	pH X_2	AR (g.L ⁻¹)
1	-1 (10,8)	-1 (5,3)	0,013
2	1 (22,5)	-1 (5,3)	0,129
3	-1 (10,8)	1 (6,7)	0,003
4	1 (22,5)	1 (6,7)	0,030
5	-1,414 (8,3)	0 (6,0)	0,003
6	1,414 (25,0)	0 (6,0)	0,129
7	0 (16,6)	-1,414 (5,0)	0,112
8	0 (16,6)	1,414 (7,0)	0,057
9	0 (16,6)	0 (6,0)	0,068
10	0 (16,6)	0 (6,0)	0,091
11	0 (16,6)	0 (6,0)	0,074
12	0 (16,6)	0 (6,0)	0,098

Tabela 4. Tabela de efeitos do DCCR para AR a partir do extrato enzimático de *A. niger*

Variável	Efeito	Erro puro	p-valor	Coefficiente	Erro padrão coef.
Média/Interc	0,082999	0,007119	0,001356	0,082999	0,007119
(1)Conc. Enz.(L)	0,079888	0,010069	0,004175	0,039944	0,005034
Conc. Enz.(Q)	-0,03262	0,011259	0,062647	-0,016309	0,005629
(2)pH (L)	-0,04627	0,010069	0,019368	-0,023134	0,005034
pH (Q)	-0,01398	0,011259	0,302542	-0,006991	0,005629
1L x 2L	-0,04404	0,014238	0,053592	-0,022019	0,007119

A análise de variância (Tabela 5) indica que o modelo (eq. 1) é válido no nível de significância de 5%, com $F_{\text{Calc}} > F_{\text{Tab}}$ para o modelo da regressão quadrática e com $F_{\text{Calc}} < F_{\text{Tab}}$ para a falta de ajuste, apesar da baixa relação entre F_{Calc} e F_{Tab} (Barros Neto, 2010). A validação do modelo pela ANOVA pode ser reforçada pelo comportamento observado no gráfico dos resíduos versus valores preditos pelo modelo (Figura 2.a), onde os resíduos encontram-se distribuídos de forma aleatória em torno do zero, e também no gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura 2.b), onde os pontos encontram-se distribuídos no intervalo (-2 a +2), evidenciando a ausência de *outliers* (Montgomery, 1997). A Figura 3 apresenta a superfície de resposta que melhor representa os resultados do planejamento DCCR, onde se observa que os maiores rendimentos de sacarificação do bagaço de cana, em termos de AR obtidos da hidrólise enzimática com extrato de *A. niger*, são obtidos a partir de valores superiores de concentração de extrato enzimático e com valores mais baixos de pH, dentro da faixa estabelecida para estas variáveis no planejamento DCCR (Scheufele, 2012). As mesmas conclusões são observadas no gráfico de contorno (Figura 4).

Tabela 5. ANOVA do planejamento DCCR

Causas de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{Calc}	p-valor
Modelo (regressão)	0,020777	5	0,0041554	8,748	
Resíduo	0,00285	6	0,000475		
Falta de ajuste	0,002242	3	0,000747	3,68614	0,156190
Erro puro	0,000608	3	0,000203		
Total	0,023627	11			

*Teste F para o Modelo: $F_{\text{Tab}}(5; 6; 0,05) = 4,39 < F_{\text{Calc}}$

**Teste F para a Falta de ajuste: $F_{\text{Tab}}(3; 3; 0,05) = 9,28 > F_{\text{Calc}}$

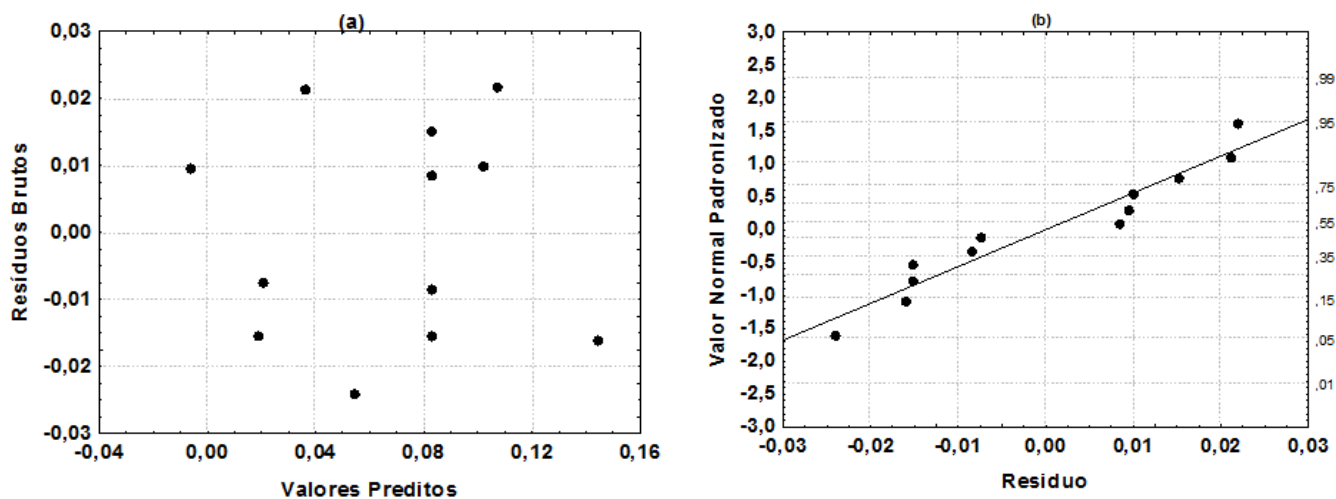


Figura 2. (a) Gráfico dos resíduos vs. valores preditos e (b) Gráfico da probabilidade normal dos resíduos, para os resultados do planejamento DCCR com extrato enzimático de *A. niger*

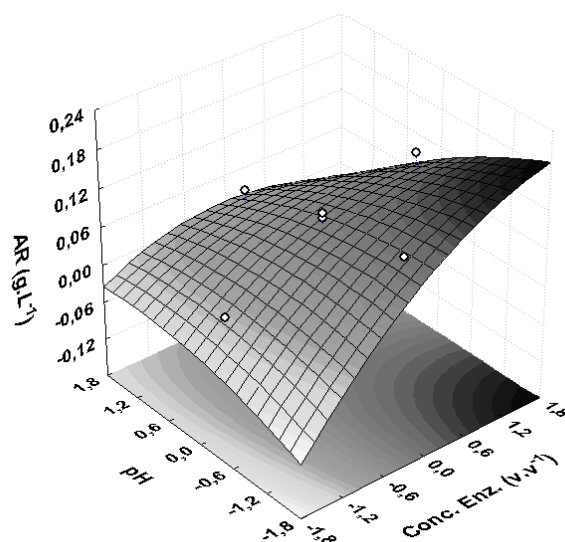


Figura 3. Superfície de resposta do planejamento DCCR com extrato enzimático de *A. niger*

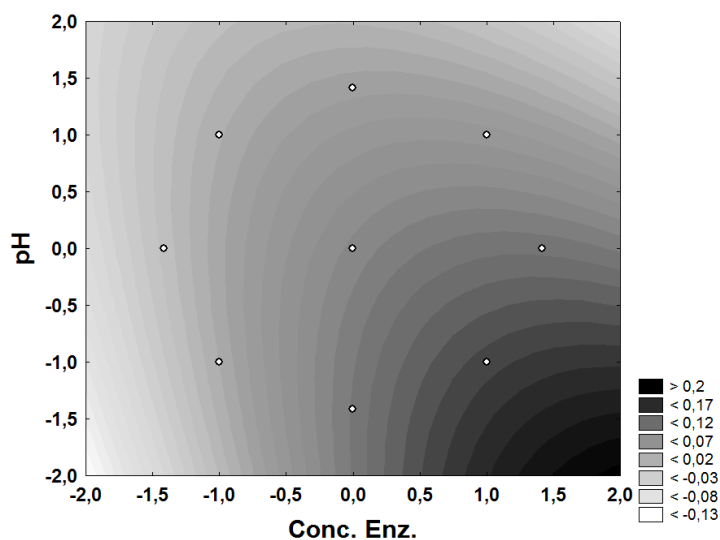


Figura 4. Gráfico de contorno do planejamento DCCR com extrato enzimático de *A. niger*.

4 CONCLUSÕES

Os melhores resultados de açúcares redutores fermentescíveis obtidos a partir da hidrólise enzimática da celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram $AR = 0,112 \text{ g.L}^{-1}$ com a celulase de *Trichoderma* sp. e $AR = 0,129 \text{ g.L}^{-1}$ com a celulase de *Aspergillus niger*. Conclui-se que os extratos enzimáticos oriundos de *A. niger*, cepa local, e de *Trichoderma* sp. do bioma amazônico apresentam níveis próximos de rendimento de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar em termos de obtenção de açúcares redutores fermentescíveis para fins de produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado). 2010.
- BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H., BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Adv.*, 27:833–848, 2009.
- BARROS NETO B., BRUNS, R.E. & SCARMINIO, I.S. Como fazer experimentos - Aplicações na ciência e na indústria. 4.ed. Editora Bookman, 2010.
- CHUNDAWAT, S.P.S., BECKHAM, G.T., HIMMEL, M.E. & DALE, B.E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 2:121–145, 2011.
- DELABONA, P.S., PIROTA, R.D.P.B, CODIMA, C.A., TREMACOLDI, C.R., RODRIGUES, A. & FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Ind. Crops Prod.*, 42:236–242, 2013.
- GARAI, D. & KUMAR, V. A Box-Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. . *Ind. Crops Prod.*, 44:352-363, 2013.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure and App. Chem.*, 59:257-268, 1987.
- HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; van RENSBURG J. E. L.; HOWARD, S.; Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol*, 2:602–619, 2003.
- HSU, C.L., CHANG, K.S., LAI, M.Z., CHANG, T.C., CHANG, Y.H. & JANG, H.D., Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulose-producing *Streptomyces* for bioethanol production. *Biomass Bioenergy*, 14:1-7, 2011.
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 91:153-156, 2004.
- FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.*, 101:8915–8922, 2010.
- MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95:391-414, 1969.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31(3):426-428, 1959.
- MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments. 4ª. Ed. – New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- PLACKETT, R.L. & BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33:305-325, 1946.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ª. Ed. – Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2009.

SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, 27:185–194, 2009.

SCHEUFELE, F.B., BUTZKE, A.S., MARRA, I.F., HASAN, S.D.M. & FIORESE, M.L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Engvista*, 14(3):310-321, 2012.

SCHEUFELE, F.B. Bioconversão de resíduos agroindustriais por micro-organismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas. Toledo: Unioeste, 2012. 118p. Dissertação (Mestrado), 2012.