



**BEATRIZ MERCHEL PIOVESAN PEREIRA**

**“PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGO FILAMENTOSO PARA  
HIDRÓLISE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO”**

CAMPINAS

2012





UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

BEATRIZ MERCHEL PIOVESAN PEREIRA

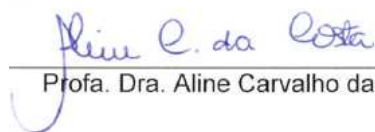
**“PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGO FILAMENTOSO PARA  
HIDRÓLISE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO”**

**Orientadora: Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa**

**Co-orientador: Dr. José Geraldo da Cruz Pradella**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de  
Mestrado em Engenharia Química da Faculdade de  
Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA BEATRIZ MERCHEL PIOVESAN PEREIRA  
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALINE CARVALHO DA COSTA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -  
UNICAMP

P414p      Pereira, Beatriz Merchel Piovesan  
              Produção de enzimas por fungo filamentosos  
              para hidrólise de material lignocelulósico / Beatriz  
              Merchel Piovesan Pereira. --Campinas, SP: [s.n.],  
              2012.

              Orientador: Aline Carvalho da Costa  
              Coorientador: José Geraldo da Cruz Pradella.  
              Dissertação de Mestrado - Universidade  
              Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia  
              Química.

              1. Trichoderma. 2. Lignocelulose. 3. Análise  
              enzimática. 4. Hidrólise. I. Costa, Aline Carvalho  
              da, 1970-. II. Pradella, José Geraldo da Cruz. III.  
              Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
              Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Enzyme production by filamentous fungus for  
                          lignocellulose hydrolysis

Palavras-chave em Inglês: Trichoderma, Lignocellulose, Enzymatic  
                                  analysis, Hydrolysis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

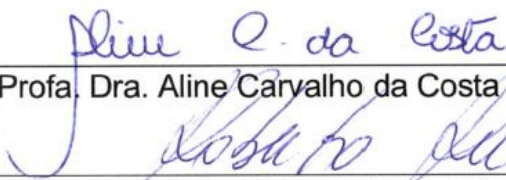
Banca examinadora: Roberto Ruller, Francisco Maugeri Filho

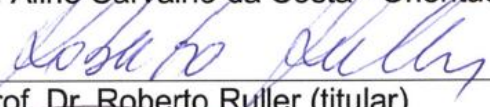
Data da defesa: 04-12-12

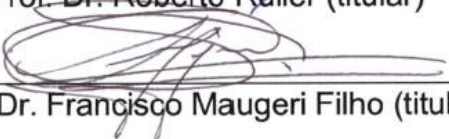
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

## Folha de aprovação

Dissertação de Mestrado defendida por Beatriz Merchel Piovesan Pereira e aprovada em quatro de dezembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa - Orientador

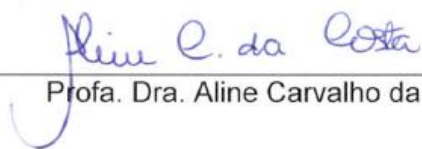
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Ruller (titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (titular)



# PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FUNGO FILAMENTOSO PARA HIDRÓLISE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Esse exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em  
Engenharia Química



---

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

(orientadora)



---

Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

(co-orientador)





## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Carvalho da Costa e Dr. José Geraldo da Cruz Pradella, pela orientação, apoio e sugestões.

Aos meus pais, Elson e Kathy, e à minha irmã Karla, pelo apoio, incentivo e carinho. Aos meus familiares, em especial meus avós Gilda e Ary e meu tio Ary Gil, pelas visitas e pelo apoio.

Ao meu namorado Leandro pelo carinho e incentivo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de fungos, Priscila da Silva Delabona, Deise Juliana da Silva Lima, Patrícia dos Santos Costa e Diogo Robl pela ajuda e companhia. A todos os meus colegas e amigos do CTBE, em especial à Elisiane Wust e ao Rogério Medina pelas análises no HPLC e à Zaira Bruna Hoffmam pelas dicas.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Borges Pimenta e ao Dr. George Jackson de Moraes e Rocha pelo fornecimento e realização das análises de composição do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. À Prof<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel e ao Diogo Robl pelo fornecimento dos fungos testados nos ensaios de co-cultivo. Ao Dr. Fábio Squina pelo fornecimento dos substratos utilizados no painel enzimático.

Ao pessoal do Laboratório da Unicamp, em especial à Luiza Martins pelas dicas e ajuda.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) pelo uso de sua infraestrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.



## RESUMO

A produção de enzimas lignocelulolíticas por *Trichoderma reesei* RUT-C30 foi otimizada em frascos agitados e bioreatores de 0,5 e 3L visando maximizar os títulos enzimáticos e produtividade volumétrica. Para isso, foram testadas como fontes de carbono (1% m/v) bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo hidrotérmico (BH) ou por explosão a vapor, com (BED) e sem (BEX) deslignificação, em meio contendo proteose peptona, tween 80 e solução salina. Celulose comercial Celufloc200 (CE) foi testada para comparação. Maior produção de enzimas celulolíticas foi obtida com a utilização de BED ( $1,38 \pm 0,11$  FPU/mL) quando em comparação com CE ( $0,78 \pm 0,14$  FPU/mL) em frascos agitados, sendo esse material utilizado como fonte de carbono nos demais ensaios. A produção de hemicelulases (xilanases) foi similar para os dois meios (em U/mL):  $18,03 \pm 1,56$  para BED e  $20,04 \pm 1,50$  para CE. A variação da concentração da solução salina, da fonte de carbono e dos nutrientes permitiu aumento da produção de enzimas celulolíticas para  $1,89 \pm 0,12$  (meio com o dobro de solução salina) e  $2,73 \pm 0,09$  (meio com 2% m/v de BED e nutrientes proporcionais) em frascos agitados. A suplementação da fonte de carbono com farelo de soja, sacarose, licor de pré-tratamento, lactose e glicerol foi estudada e farelo de soja foi selecionado como suplemento do meio. A elaboração de um meio de mistura contendo o dobro de solução salina, farelo de soja e nutrientes proporcionais à concentração da fonte de carbono (meio MIX) permitiu o aumento da produção de enzimas para, em FPU/mL:  $3,33 \pm 0,10$  (MIX15: contém 1,5% m/v de BED),  $3,78 \pm 0,33$  (MIX20) e  $3,67 \pm 0,34$  (MIX30) em frascos agitados. As atividades de xilanases foram superiores a 130 U/MI utilizando os meios de mistura. Em bioreator de 3L a produção de enzimas celulolíticas utilizando o meio MIX15 atingiu  $2,29 \pm 0,20$  FPU/mL. Para o meio padrão (BED 1% m/v) o pico de atividade obtido foi de  $1,14 \pm 0,32$  FPU/mL. O aumento da concentração da fonte de carbono em bioreator para 3% (m/v) a partir do meio MIX15 resultou no aumento da atividade celulolítica para  $4,20 \pm 0,34$  FPU/mL. Os picos de atividade de xilanases atingiram valores superiores a 180 U/mL em bioreator. O desempenho

do coquetel enzimático produzido no meio MIX15 foi avaliado na hidrólise de BED e BH, e comparado ao coquetel produzido no meio padrão e a um coquetel comercialmente disponível (Sigma). Os valores de conversão de celulose em glicose foram superiores para o coquetel MIX15 em relação aos demais coquetéis ao se utilizar 3 ou 5% de sólidos, com ou sem adição de beta-glucosidase comercial (Novozym 188).

Palavras-chave: Trichoderma, lignocelulose, análise enzimática, hidrólise.

## ABSTRACT

The production of lignocellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* RUT-C30 was optimized in shake flasks and 0.5 and 3L bioreactors to maximize the enzymatic titles and volumetric productivity. The carbon sources considered were sugar cane bagasse (1% w/v) pretreated by the hydrothermal process (BH) or steam explosion, with (BED) and without (BEX) delignification. The medium contained proteose peptone, Tween 80 and saline solution. Commercial cellulose Celufloc200 (CE) was used for comparison. Increased production of cellulolytic enzymes in flasks was obtained with BED as carbon source ( $1.38 \pm 0.11$  FPU / ml) when compared to CE ( $0.78 \pm 0.14$  FPU / ml), and this material was selected as carbon source for further studies. The production of hemicellulases (xylanases) was similar for the two carbon sources (U / mL):  $18.03 \pm 1.56$  with BED and  $20.04 \pm 1.50$  with CE. Variation of the concentration of the salt solution, carbon source and nutrients led to an increased production of cellulolytic enzymes:  $1.89 \pm 0.12$  (medium with doubled saline solution concentration) and  $2.73 \pm 0.09$  (medium with 2% w/v BED and nutrients proportional to the carbon source) in shake flasks. Supplementation of the carbon source with soybean meal, sucrose, pretreatment liquor, lactose and glycerol was studied and soybean meal has been selected as supplement. The preparation of a mixture medium containing doubled saline solution, soybean meal and nutrients proportional to the concentration of the carbon source allowed increasing the production of enzymes for (in FPU / ml):  $3.33 \pm 0.10$  (MIX15 – containing 1.5% w/v BED) ,  $3.78 \pm 0.33$  (MIX20) and  $3.67 \pm 0.34$  (MIX30) in shake flasks. Xylanase activities were higher than 130 U/mL. In a 3L bioreactor, production of cellulolytic enzymes using MIX15 medium reached  $2.29 \pm 0.20$  FPU / mL. For the standard medium (BED 1% w/v) the peak activity was  $1.14 \pm 0.32$  FPU / mL. Increasing the concentration of the carbon source in the bioreactor to 3% w/v starting from MIX15 resulted in a cellulolytic activity of  $4.20 \pm 0.34$  FPU / mL. Xylanase activity reached values higher than 180 U/mL in the bioreactor. The performance of the enzyme cocktail produced in MIX15 medium was evaluated for the hydrolysis of BED and BH, and compared to the cocktail

produced in the standard medium and to a cocktail commercially available (Sigma). The values of conversion of cellulose to glucose were higher for the cocktail MIX15 compared to the other cocktails when using 3 or 5% solids, with or without adding commercial beta-glucosidase (Novozym 188).

Keywords: Trichoderma, Lignocellulose, Enzymatic analysis, Hydrolysis.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	1
LISTA DE TABELAS .....	5
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 OBJETIVOS .....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
3.1 Etanol de segunda geração.....	11
3.1.1 Mercado.....	11
3.1.2 Custos e desafios na produção do etanol de segunda geração .....	14
3.2 Características do Material lignocelulósico.....	15
3.3 Pré-tratamento do material lignocelulósico.....	18
3.4 As enzimas que atuam sobre o material lignocelulósico .....	19
3.5 Produção de enzimas para hidrólise de material lignocelulósico .....	23
3.5.1 Microrganismos produtores .....	23
3.5.2 Influência das condições e meio de cultivo sobre a produção enzimática	25
3.6 Co-cultivo .....	29
3.7 Hidrólise enzimática .....	30
3.7.1 A hidrólise enzimática .....	30
3.7.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática .....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Microrganismos e manutenção das linhagens .....	36
4.2 Meios e condições de cultivo em frascos agitados.....	36

4.3 Ensaio em reator .....	38
4.4 Obtenção das matérias-primas utilizadas.....	40
4.5 Co-cultivo .....	41
4.6 Amostragem .....	42
4.7 Dosagem das atividades enzimáticas e proteína total .....	42
4.7.1 Atividades enzimáticas .....	42
4.7.2 Painel enzimático.....	43
4.7.3 Proteínas totais .....	44
4.8 Medida do pH.....	45
4.9 Condições das hidrólises.....	45
4.10 Análises estatísticas .....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Pré-tratamento do bagaço.....	48
5.2 Produção enzimática em frascos agitados .....	49
5.2.1 Seleção da fonte de carbono .....	49
5.2.2 Suplementação da fonte de carbono .....	51
5.2.3 Concentração de solução salina .....	54
5.2.4 Variação da concentração da fonte de carbono .....	57
5.2.5 Ensaio de mistura .....	59
5.2.6 Painel enzimático.....	65
5.2.7 Ensaio de co-cultivo .....	68
5.3 Produção enzimática em bioreator.....	72
5.3.1 Considerações preliminares .....	72
5.3.2 Suplementação da fonte de carbono .....	73
5.3.3 Ensaio de mistura (MIX).....	75



5.3.4 Considerações finais sobre os ensaios de bioreator .....	79
5.4 Hidrólise enzimática .....	80
5.4.1 Cálculos de conversão.....	80
5.4.3 Desempenho dos coquetéis enzimáticos produzidos por fermentação ....	84
5.4.4 Estudo de batelada alimentada .....	91
5.4.5 Hidrólise com massa de micélio: avaliação da presença de beta-glucosidase.....	93
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE.....	111



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da produção de etanol celulósico. Adaptado de: U.S. Department of Energy. Biomass Program. Disponível em: < <a href="http://www1.eere.energy.gov/biomass/abcs_biofuels.html#prod">http://www1.eere.energy.gov/biomass/abcs_biofuels.html#prod</a> >.....	12
Figura 2 - Gráfico típico da relação custo de enzima (eixo das ordenadas) versus produtividade volumétrica (eixo das abscissas). Fonte: Hayward <i>et al.</i> , 2000. ....	14
Figura 3 - Histórico dos mutantes de <i>Trichoderma</i> . Fonte: Kadam, 1996. ....	25
Figura 4 – temperatura ( <i>temp</i> ) e pH ótimos para hidrólise enzimática com coquetéis de diferentes microrganismos em substratos ( <i>substrate</i> ) diversos. Fonte: Tengborg, <i>et al.</i> , 2001. ....	33
Figura 5 – Reatores Bioflo115 (a) e Biostat Q plus (b) utilizados para produção de enzimas celulolíticas .....	39
Figura 6 – Variação da temperatura durante o aquecimento do reator no tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar .....	48
Figura 7 – Variação da atividade celulolítica total (FPA) durante a fermentação em diversas fontes de carbono. ....	49
Figura 8 – Variação de atividade de xilanase ao longo da fermentação em diversas fontes de carbono.....	50
Figura 9– Gráfico da variação da atividade celulolítica total durante a fermentação em BED suplementado com outros nutrientes. ....	52
Figura 10 – Perfil de atividade celulolítica com a variação da concentração de solução salina no meio.....	55
Figura 11 - Perfil de atividade de xilanases com a variação da concentração de solução salina no meio.....	55
Figura 12 – Efeito da variação da concentração da fonte de carbono sobre a produção de enzimas celulolíticas.....	58
Figura 13 - Efeito da variação da concentração da fonte de carbono sobre a produção de xilanases ao longo do cultivo.....	58
Figura 14 – Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 10g/L) e o meio simples (BED 10 g/L).....	60

Figura 15 - Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 15 g/L) e o meio com 15 g/L de BED e nutrientes porporcionais .....	61
Figura 16 - Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 20 g/L) e o meio com 20 g/L de BED e nutrientes porporcionais .....	61
Figura 17 - Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 30 g/L) e o meio com 30 g/L de BED e nutrientes porporcionais .....	62
Figura 18 - Produção de xilanases nos meios de mistura em concentrações variadas.....	64
Figura 19 – Avaliação da presença de halo de inibição no cultivo em placas. Fotos de 72h de cultivo (direita), scanners do verso das colônias em 96h de cultivo (esquerda). <i>Trichoderma reesei</i> é apresentado do lado direito da placa. No lado esquerdo da placa: (a)- <i>Colletotrichum</i> sp DR20 (b)- <i>Alternaria</i> sp. DR45 (c)- <i>Annulohyphoxylon</i> sp. DR47 (d)- <i>Penicillium</i> sp. DR49 (e)- <i>Aspergillus niger</i> DR58. Créditos das fotos: Luis Gustavo Sandoval de Sousa (CTBE).....	70
Figura 20 – Perfil comparativo de produção de celulases para o co-cultivo de <i>T. reesei</i> com DR45 e DR47 nas proporções 1:3 e o cultivo de <i>T. reesei</i> isoladamente em meio M15.....	71
Figura 21– Perfil enzimático de produção de enzimas celulolíticas (FPA) ao longo do tempo de cultivo para os ensaios de reator utilizando BED 10g/L como fonte de carbono, com e sem adição de farelo de soja (3g/L).....	73
Figura 22- Perfil enzimático de produção de enzimas celulolíticas (FPA) ao longo do tempo de cultivo para os ensaios de reator utilizando BED 10g/L como fonte de carbono, com e sem adição de farelo de soja e sacarose. ....	74
Figura 23 – Perfil de produção de enzimas celulolíticas em bioreator com variação do meio de cultivo. Resultados similares são demarcados nos retângulos.....	76
Figura 24 – Produtividade volumétrica para os ensaios em bioreator.....	77
Figura 25 – Avaliação do efeito da adição de beta-glucosidase e concentração de sólidos (1, 3 e 5%) usando enzimas comerciais e bagaço explodido e	

deslignificado (BED) em sistema de batelada. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 8%. .....	82
Figura 26 – Efeito da adição de beta-glucosidase sobre o coquetel enzimático comercial em concentrações variadas (1, 3 e 5%) de bagaço explodido e deslignificado.....	82
Figura 27 – Análise estatística dos efeitos usando Statistica: adição de beta-glucosidase e umidade do bagaço para hidrólise de BED com 5% de sólidos. O intervalo de confiança de 90% é usado como exemplo. ....	83
Figura 28 – Comparação do desempenho da hidrólise de BED (3% de sólidos) utilizando coquetel enzimático comercial (BED BAT) e coquetéis obtidos por fermentação (RUT M15 e RUT B10) com e sem adição de beta-glucosidase comercial. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 6%.....	85
Figura 29 – Comparação do desempenho da hidrólise de BED (5% de sólidos) utilizando coquetel enzimático comercial (BED BAT) e coquetéis obtidos por fermentação (RUT M15 e RUT B10) com e sem adição de beta-glucosidase comercial. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 8%.....	86
Figura 30 – Influência da presença de beta-glucosidases na hidrólise enzimática. ....	87
Figura 31 – Comparação do desempenho da hidrólise de BH (3% de sólidos) utilizando coquetel enzimático comercial (BED BAT) e coquetéis obtidos por fermentação (RUT M15 e RUT B10) sem adição de beta-glucosidase comercial. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 8%.....	88
Figura 32 – Liberação de açúcares das hemiceluloses (xilose e manose) durante a hidrólise de BED 3 e 5% utilizando coquetéis produzidos por fermentação (RUT B10 e RUT M15) e coquetel comercial.....	89

Figura 33 – Liberação de açúcares das hemiceluloses durante a hidrólise de BH 3% utilizando coquetéis produzidos por fermentação (RUT B10 e RUT M15) e coquetel comercial. ....	90
Figura 34 – Perfil de liberação de glicose (a), xilose e manose (b) na hidrólise de BED em sistema de batelada simples (BAT) e alimentada (ALIM ENZ) com 10% de sólidos. As linhas horizontais ilustram as alimentações. ....	91
Figura 35 – Influência da adição de beta-glucosidase na hidrólise de BED 10% em sistema de batelada simples e alimentada. ....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos meios de produção de enzimas testados em frascos agitados.....	37
Tabela 2 – Composição do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.....	41
Tabela 3 – Pico de atividade de xilanase e celulolítica total, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para as fontes de carbono testadas.....	50
Tabela 4 – Pico de atividade celulolítica total, de xilanases, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para BED suplementado. ....	52
Tabela 5 – Pico de atividades de FPA, xilanase, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para ensaios com variação da concentração de solução salina.(S > simples, sem aumento da concentração; D> dobro da concentração; P> pré-inóculo) .....	56
Tabela 6 – Pico de atividade celulolítica total, de xilanases, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para ensaios com variação da concentração da fonte de carbono e nutrientes .....	59
Tabela 7 – Comparação da produção de enzimas celulolíticas e produtividade volumétrica entre trabalhos da literatura. ....	63
Tabela 8 - Pico de atividade celulolítica total, de xilanases, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para ensaios de mistura. ....	65
Tabela 9 – Painel enzimático de atividades dos coquetéis produzidos nos meios BED 10 g/L e MIX 15 g/L em 120h de fermentação. ....	66
Tabela 10 – Pico de produção enzimática e proteínas totais e pH do meio de cultivo para os ensaios de co-cultivo .....	71
Tabela 11 – Picos das atividades celulolítica total (FPA), de xilanases, beta-glucosidase e proteína total para os ensaios de avaliação da suplementação em bioreator. ....	74
Tabela 12 – Picos das atividades celulolítica total (FPA), de xilanases, beta-glucosidase e proteína total para os ensaios de avaliação do meio otimizado em bioreator. ....	78

Tabela 13 – Atividades relativas típicas dos coquetéis enzimáticos testados na hidrólise.....	84
Tabela 14 – Glicose liberada (em g/L) na hidrólise de BED utilizando coquetel centrifugado (M15) e caldo de fermentação sem centrifugação (M15 FH).....	94
Tabela 15 – Xilose e manose liberadas (em g/L) na hidrólise de BED utilizando coquetel centrifugado (M15) e caldo de fermentação sem centrifugação (M15 FH). .....	95
Tabela 16 - Celobiose residual (em g/L) na hidrólise de BED utilizando coquetel centrifugado (M15) e caldo de fermentação sem centrifugação (M15 FH).....	95
Tabela 17 – Resultados numéricos para as atividades enzimáticas e proteína total do sobrenadante das amostras de ensaios de produção enzimática em bioreator .....	111



## LISTA DE SIGLAS

- EC – *Enzyme Commission number*
- CMC – carboximetilcelulose
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e aplicada
- NREL – *National Renewable Energy Laboratory*
- DR 47 – *Annulohyphoxylon* sp.
- DR 20 – *Colletotrichum* sp.
- DR 58 – *Aspergillus niger*
- DR49 – *Penicillium* sp.
- DR 45 – *Alternaria* sp.
- PDA – *potato dextrose agar* (Agar batata)
- BED – bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor e deslignificado
- BEX – bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor
- BH – bagaço de cana-de-açúcar tratado com água quente
- CE – celulose microcristalina comercial (Celufloc200)
- BED 10 – meio contendo 10 g/L de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado
- BED 15 – meio contendo 15 g/L de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado
- BED 15 prop – meio contendo 15 g/L de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado e nutrientes do meio com aumento proporcional em relação à BED 10
- MIX 10 – meio de mistura, contendo 10 g/L de BED
- BSPD – meio BED 10 no qual foi utilizado o dobro da concentração da solução salina no pré-inóculo
- BDPS – meio BED 10 com o dobro de solução salina
- BDPD – meio BED 10 com o dobro de solução salina, no qual foi utilizado o dobro da concentração da solução salina no pré-inóculo

- SemiMIX30 – meio de mistura com composição igual à de MIX15, exceto pela concentração de BED (30 g/L)
- FPA – *filter paper activity* (atividade de papel de filtro)
- B10 – coquetel enzimático produzido utilizando o meio BED 10 (meio padrão)
- M15 – coquetel enzimático produzido utilizando o meio MIX15
- M15FH – coquetel enzimático produzido utilizando o meio MIX15 sem centrifugação
- BED BAT 1% COM BETA – ensaio de hidrólise utilizando enzimas comerciais com bagaço explodido e deslignificado (BED) à 1% de sólidos, em sistema de batelada (BAT) e com adição de beta-glucosidase comercial (COM BETA)
- RUT B10 BED BAT 3% COM BETA – ensaio de hidrólise utilizando coquetel enzimático produzido no meio BED10 (RUT B10) com bagaço explodido e deslignificado (BED) à 3% de sólidos, em sistema de batelada (BAT) e com adição de beta-glucosidase comercial (COM BETA)
- RUT M15 BED ALIM ENZ 10% COM BETA - ensaio de hidrólise utilizando coquetel enzimático produzido no meio MIX15 (RUT M15) com bagaço explodido e deslignificado (BED) à 10% de sólidos, em sistema de batelada alimentada (ALIM ENZ) e com adição de beta-glucosidase comercial (COM BETA)

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por energia é crescente tanto em contexto local quanto global. Nessa conjuntura, a produção de bioetanol tem ganhado foco no Brasil e no exterior. Para aumentar a produção, a fim de alcançar as projeções de consumo, várias estratégias são propostas desde o plantio e colheita da cana-de-açúcar, passando pela engenharia genética para obter variedades mais produtivas, até a utilização dos resíduos, como o bagaço e a palha, para produção do denominado etanol de segunda geração.

A produção do etanol de segunda geração difere da produção tradicional do etanol de primeira geração. Ela requer etapas adicionais de pré-tratamento do bagaço e palha da cana-de-açúcar e hidrólise do material lignocelulósico, a fim de liberar os açúcares fermentecíveis pelas leveduras. O uso de enzimas lignocelulolíticas para efetuar a hidrólise apresenta inúmeras vantagens, como especificidade, condições brandas de reação, menor custo em material para reatores, entre outras. No entanto, a produção dessas enzimas apresenta um custo elevado, prejudicando a cadeia de produção do etanol de segunda geração.

Dessa forma, estudos visando redução de custos, utilização de matérias primas de baixo valor e maior produtividade volumétrica são essenciais para tornar viável a cadeia de produção. A produção *on site*, ou *in house*, também tem sido apresentada como estratégia de produção do etanol de segunda geração. Nesse sistema, a produção das enzimas ocorre no mesmo local em que a fermentação alcoólica, evitando custos de transporte e armazenamento. Nesse caso, pode-se focar na utilização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado também para produção enzimática, uma vez que esse material estaria disponível na usina de segunda geração.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo central estudar condições e meios de cultivo para maximizar a produção de enzimas do complexo celulolítico, responsáveis pela hidrólise de material lignocelulósico e liberação de açúcares fermentecíveis, utilizando o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* RUT-C30, mutante descrito na literatura como microrganismo hipercelulolítico.

Como objetivos específicos, buscou-se:

- Testar fontes de carbono alternativas, a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado,
- Testar concentrações variadas da fonte de carbono e nutrientes,
- Testar a suplementação da fonte de carbono,
- Avaliar a produção de enzimas e a produtividade volumétrica em bioreator,
- Avaliar o desempenho dos coquetéis enzimáticos produzidos e compará-los a coquetéis comerciais, através de hidrólise enzimática.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Etanol de segunda geração

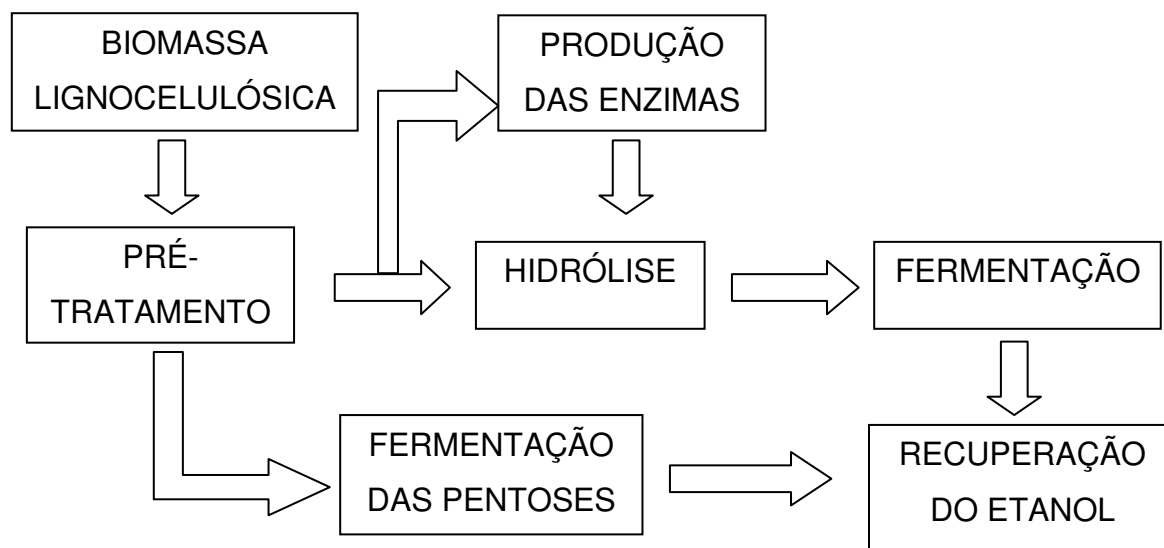
##### 3.1.1 Mercado

O suprimento de energia tem importância fundamental para a manutenção das atividades da sociedade moderna. Nesse contexto, o petróleo tem papel vital, provendo um terço da energia primária consumida no planeta. No entanto, trata-se de uma fonte não renovável de energia, o que resulta em transtornos quanto a sua possível escassez e aumento de preço. Ao mesmo tempo, a combustão ininterrupta de derivados do petróleo durante décadas resultou no acúmulo de gases responsáveis pelo efeito estufa, relacionados ao aquecimento global e possivelmente às alterações climáticas do planeta. Nesse contexto, setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais investem na busca por fontes renováveis de energia e sua viabilização econômica (BON *et al.*, 2008). Uma das fontes renováveis de energia de grande destaque é o bioetanol.

A produção de etanol de primeira geração vem crescendo nos últimos anos, tendo atingido 79 milhões de litros em 2008, com um aumento de 14,4% em relação ao ano anterior. A demanda projetada, no entanto, é bastante superior ao crescimento observado. Os EUA sozinhos deverão consumir 136 bilhões de litros até 2022. O Brasil tem como meta abastecer 5% do mercado nos próximos anos, o que significa um aumento expressivo na produção (CARVALHO, 2009).

Tal cenário energético propõe um desafio para o Brasil: o aumento da produção de etanol, visando não somente suprir o aumento da demanda no país, mas também a exportação desse combustível renovável. Para assegurar a preservação ambiental e biodiversidade, qualidade e disponibilidade de água, bem como o uso ordenado de terras para produção de alimentos, é fundamental o investimento na maior produtividade de etanol a partir da cana-de-açúcar, evitando a ocupação de mais áreas agricultáveis. Uma das possibilidades de contorno desse obstáculo seria a utilização de outras matérias-primas, de origem

lignocelulósica, para produção do biocombustível (BON *et al.*, 2008). A Figura 1 esquematiza como é realizada a produção de etanol de segunda geração ou etanol celulósico.



**Figura 1-** Esquema da produção de etanol celulósico. Adaptado de: U.S. Department of Energy. Biomass Program. Disponível em: [http://www1.eere.energy.gov/biomass/abcs\\_biofuels.html#prod](http://www1.eere.energy.gov/biomass/abcs_biofuels.html#prod)

O maior apelo pelos biocombustíveis, além do aumento da demanda mundial por energia, aumentou o interesse na produção do chamado etanol celulósico, ou de segunda-geração. Observa-se uma série de investimentos no setor, além da corrida científica e tecnológica para otimização e viabilização do processo de produção.

Os Estados Unidos são um dos países com investimento mais expressivo no setor. No ano 2000, o Departamento de Energia dos Estados Unidos (*United States Department of Energy, USDOE*) iniciou parcerias para acelerar o desenvolvimento tecnológico e tornar viável economicamente a produção de etanol a partir de resíduos do milho. O Departamento assinou um acordo com o Laboratório Nacional de Energias Renováveis (*National Renewable Energy Laboratory, NREL*) e também com as duas empresas líderes mundiais em produção de enzimas, Novozymes e Genencor, com a liberação de um montante de 17,1 milhões de dólares (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Em setembro de

2011, o Secretário de Energia dos Estados Unidos anunciou a liberação de 105 milhões de dólares para uma das primeiras plantas em escala comercial de etanol celulósico. A planta emprega resíduos de milho (DEPARTAMENTO DE ENERGIA DOS ESTADOS UNIDOS, 2011).

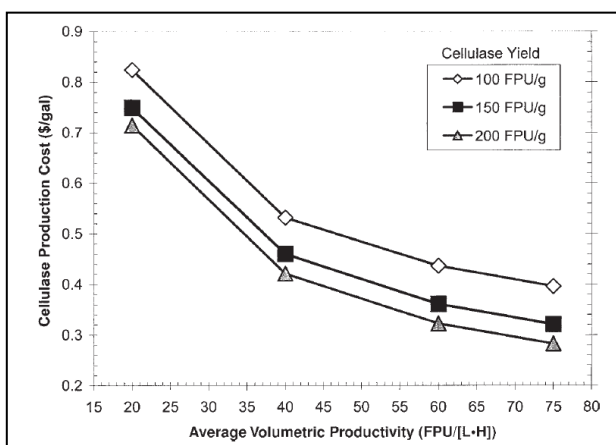
A empresa canadense Iogen Corporation, considerada uma das líderes mundiais na produção de etanol de celulose, recebeu, de maneira similar às outras empresas citadas, financiamento para o desenvolvimento de tecnologia de produção de etanol a partir de biomassas (palhas de trigo, cevada de aveia e talo de milho). Em 2000, o governo do Canadá financiou a construção da até então única planta demonstrativa de produção de bioetanol celulósico do mundo. Em 2002, o grupo Royal Dutch Shell investiu 46 milhões de dólares canadenses na Iogen (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Em 2004 foi inaugurada a primeira planta comercial de demonstração para produção de etanol celulósico a partir de resíduos da agroindústria (IOGEN CORPORATION, 2011).

Na América Latina, têm destaque os investimentos no Brasil, uma vez que esse é um dos países líderes na produção de etanol de primeira geração. Segundo a UNICA, o total de novos investimentos na produção do setor de cana-de-açúcar, no Brasil, é estimado em 48 milhões de reais entre 2009 e 2012, sendo o quarto maior investimento projetado (atrás de petróleo e gás, mineração e indústria siderúrgica) (ROCHA, 2009). Diversas empresas privadas, laboratórios nacionais e centros de pesquisa do país, como a Alellyx, Canavialis, Aracruz Celulose, Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Embrapa e o Centro de Tecnologia Canavieira investem expressivamente em pesquisa para produção de etanol de segunda geração (CARVALHO, 2009). Nesse ano de 2012, a GraalBio anunciou a construção da primeira planta comercial de etanol celulósico no Brasil, além de uma planta piloto e um Centro de Pesquisa em Campinas, SP (GraalBio, 2012).

### 3.1.2 Custos e desafios na produção do etanol de segunda geração

Na produção do etanol celulósico, os custos mais expressivos não estão relacionados à matéria-prima empregada, se essa for composta essencialmente de resíduos. Os custos de processo, por sua vez, representam cerca de 67% do custo total de uma planta de etanol celulósico (WYMAN, 2007). Em torno de 40% dos custos projetados do etanol celulósico estão relacionados à liberação de açúcares das hemiceluloses e da celulose, nas operações combinadas de pré-tratamento, produção de enzimas, e hidrólise enzimática (YANG e WYMAN, 2007).

A etapa de produção das enzimas empregadas na hidrólise do material lignocelulósico é considerada uma das mais dispendiosas na cadeia de produção do etanol de segunda geração (LYND, *et al.*, 1991; WYMAN, 2007). Estudos apontam a produtividade e a carga enzimática como os parâmetros com maior influência no custo de produção de enzimas e nos custos relativos de produção de etanol (BARTA *et al.*, 2010; PRADELLA, *et al.*, 2009; HIMMEL *et al.*, 1999). Uma curva típica da relação entre custo das enzimas e produtividade volumétrica é apresentada na Figura 2.



**Figura 2** - Gráfico típico da relação custo de enzima (eixo das ordenadas) versus produtividade volumétrica (eixo das abscissas). Fonte: Hayward *et al.*, 2000.



As celulasas podem responder por 27 até 40% do custo do processo (DUFF e MURRAY, 1996). Estudos recentes de Klein-Marcuschamer e colaboradores (2011) afirmam que o custo de produção de enzimas é de fato muito maior do que afirmado na literatura e esforços são necessários para reduzir sua contribuição para os custos globais da produção de etanol celulósico. A redução de custos passaria pela escolha de substratos de menor valor para produção enzimática, redução dos tempos de fermentação, aumento da produção e redução da complexidade do processo. O estudo da aplicação de substratos de baixo valor, e que induzam altos títulos enzimáticos, é, portanto, fundamental. Materiais celulósicos cristalinos comercialmente disponíveis, como Solka Floc e Avicel, são bons indutores de atividade enzimática, no entanto, apresentam altos custos (DUFF e MURRAY, 1996). Outros materiais lignocelulósicos podem ser usados como indutores da produção de enzimas, a custos menores, como palha de arroz (SUKUMARAN *et al.*, 2009), farelo de trigo, espigas de milho (ASLAM *et al.*, 2010), resíduos da indústria de madeira (RECZEY *et al.*, 1996), polpa de beterraba (OLSSON *et al.*, 2003).

Outra forma apontada para redução de custos do complexo enzimático é o emprego do processo '*in house*', ou '*on site*' de produção. Nesta rota de processamento, a produção de enzimas ocorre dentro da própria destilaria, assim como a hidrólise do material pré-tratado para produção dos açúcares que serão fermentados em etanol pela levedura (PRADELLA *et al.*, 2009). O uso do mesmo material para produção de enzimas e hidrólise pode apresentar um menor custo, já que o transporte e estocagem por longos períodos são evitados (TOLAN, 2002). Além disso, o cultivo do fungo no mesmo material que será hidrolisado pode ser uma forma de induzir a produção de enzimas específicas para aquele material (BAKER *et al.*, 1997; JORGENSEN e OLSSON, 2006, SIPOS, *et al.*, 2010).

### **3.2 Características do Material lignocelulósico**

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, representando 50% da biomassa terrestre. O termo se refere à

composição da parede celular das plantas, a qual é constituída por uma matriz dura e fibrosa, na qual fibras flexíveis (celulose e hemiceluloses), e também pectina, são envoltas por uma matriz de lignina, uma macromolécula tridimensional de natureza aromática. Além desses componentes, os materiais lignocelulósicos apresentam, em menor quantidade, resinas, taninos, ácidos graxos e fenóis, bem como compostos nitrogenados, e alguns sais minerais (BON *et al.*, 2008).

Os resíduos agroindustriais de composição lignocelulósica mais importantes são, segundo Bon *et al.*(2008), o bagaço e palha de cana-de-açúcar, sabugo e palha de milho, palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada e lixos baseados em papel.

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é o principal subproduto da indústria sucroalcooleira (ALCARDE, 2011), e uma das biomassas residuais predominantes no país (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Trata-se de um resíduo fibroso da extração do caldo pelas moendas. A quantidade de bagaço produzido vai depender do teor de fibra da cana-de-açúcar processada. Em geral, uma tonelada de cana processada resulta em aproximadamente 280 quilos de bagaço. (ALCARDE, 2011). Atualmente, parte do bagaço é queimada para produção de energia elétrica nas usinas, mas esse material tem grande potencial para produção de etanol celulósico. Baseado nos dados apresentados, e na produção de cana-de-açúcar do país (UNICA, 2011), é possível estimar a produção de bagaço de cana-de-açúcar na safra de 2008/09 em 159 milhões de toneladas, uma quantidade expressiva de material com potencial para ser utilizado na produção de etanol de segunda geração.

A forma e o tamanho da parede celular dos materiais lignocelulósicos variam de espécie para espécie, e sua composição química também é distinta entre representantes lignocelulósicos. De maneira geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida das hemiceluloses e, por fim, da lignina. 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 (MANSFIELD *et al.*, 1999; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

A celulose é um polímero linear, que contém até 15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. As cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, rígidas e em forma de fita. Essa associação forma as fibrilas, altamente ordenadas, que por sua vez, formam as fibras de celulose. As fibrilas apresentam regiões de alta cristalinidade (cadeias de glicana firmemente ligadas em paralelo) e de menor grau de ordenação (amorfias) (BON *et al.*, 2008; BROWN JR.; 2004). Na celulose nativa, o grau de polimerização varia conforme a origem, e fibras de diferentes plantas terão diferentes tamanhos e dimensões. A celulose apresenta regiões com falhas, poros, rachaduras e nós, que são mais suscetíveis ao ataque químico ou mecânico (IOELOVICH, 2008).

As hemiceluloses são compostas de cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldo-hexoses, como glicose, manose e galactose. Existem ainda substituintes como grupos acetila, L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico e ácido 4-O-metilglicurônico. A variedade de ligações e ramificações é responsável pelas diferentes conformações das moléculas das hemiceluloses, as quais fazem a ligação entre celulose e lignina. As hemiceluloses são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses não contêm regiões cristalinas (BON *et al.*, 2008). A hemicelulose mais abundante na natureza é a xilana (DHIMAN *et al.*, 2008).

A lignina, em conjunto com as hemiceluloses e pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como ligante entre componentes da parede celular. É o maior depósito natural de componentes aromáticos, com valioso potencial de aplicação na indústria química. A estrutura da lignina é complexa e não-uniforme, apresentando grande resistência ao ataque microbiano (BON *et al.*, 2008).

Na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), os polissacarídeos encontrados são arabinoxilanos, beta-glucanos e pectinas, com ramificações principalmente de arabinanos. No fracionamento dos tecidos da planta, os monossacarídeos glucose e xilose são encontrados em maior quantidade, seguido de arabinose e galactose. (SILVA, A. M., 2005).

### **3.3 Pré-tratamento do material lignocelulósico**

O pré-tratamento do material lignocelulósico é uma etapa essencial quando se considera a hidrólise enzimática de biomassa. Esse tem como finalidade alterar sua estrutura nativa, facilitando a ação posterior das enzimas (BON *et al.*, 2008; MOSIER *et al.*, 2005). A escolha do pré-tratamento adequado deve levar em conta fatores como a sua compatibilidade com o restante do processo, o material a ser tratado, o coquetel enzimático e os organismos empregados (YANG e WYMAN, 2007).

Os tratamentos empregados podem remover em proporções variáveis as hemiceluloses e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade. Um tratamento eficiente é aquele que contribui para o emprego de uma menor quantidade de enzima na etapa de hidrólise enzimática, uma vez que torna o material mais acessível para a atuação das enzimas, reduzindo os custos globais de produção (BON *et al.*, 2008).

Vários requisitos são importantes na escolha de um pré-tratamento eficiente, que incluem não só a possibilidade de facilitar a ação de catalisadores biológicos, como também a preservação da fração hemicelulósica, minimização da geração de inibidores de processos enzimáticos e fermentativos, baixos custos e consumo energético, assim como possibilidade de aproveitamento da lignina (BON *et al.*, 2008, MOSIER *et al.*, 2005, YANG e WYMAN, 2007).

Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, biológicos ou combinações (BON *et al.*, 2008). Como exemplos têm-se: organosolv (ZHAO, *et al.*, 2009), tratamento com ácido ou água (SILVA, 2009), tratamento por explosão a vapor (RAMOS, 2003), tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, com cal

(RABELO *et al.*, 2007), tratamento com fungos (DILLON e CAMASSOLA, 2008), explosão com CO<sub>2</sub>, tratamento alcalino, deslignificação oxidativa, ozonólise (SUN e CHENG, 2002). Cada processo apresenta características distintas quanto ao produto gerado e potencialidades de aplicação. Wyman *et al.* (2005) foram um dos primeiros grupos a empregar variados pré-tratamentos considerados tecnologias de ponta, para um mesmo material lignocelulósico. Foram testados pré-tratamentos com amônia (*ammonia fiber explosion* ou AFEX), empregando reciclo (*ammonia recycle percolation* ou ARP), com água, com ácido sulfúrico diluído e cal.

### **3.4 As enzimas que atuam sobre o material lignocelulósico**

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, na qual o valor de x varia com a celulase avaliada. As celulases são biocatalisadores específicos que agem para a liberação de açúcares, sendo que a glicose é o que apresenta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

As celulases são uma mistura complexa de enzimas que atuam de maneira sinérgica a fim de degradar a celulose (BON *et al.*, 2008). O sinergismo é observado também na degradação de material lignocelulósico, pela atuação conjunta das celulases e enzimas acessórias, como xilanases, beta-glucosidase e feruloil esterases. Foi demonstrado que a mistura dessas enzimas em determinadas proporções pode ter um efeito até de duplicação da atividade enzimática medida (GOTTSCHALK, *et. al*, 2010).

As celulases começaram a ser estudadas no período da Segunda Guerra Mundial, nos Estados Unidos, com os trabalhos de Elwyn T. Reese e Mary Mandels (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Elwyn Reese foi responsável pelo isolamento do fungo *Trichoderma viride* QM 6a, mais tarde renomeado *Trichoderma reesei* QM 6a em sua homenagem, até adquirir a denominação *Hypocrea jecorina*. Elwyn Reesse e Mary Mandels trabalharam de maneira

pioneira no estudo das celulases, e da degradação microbiana de substratos celulósicos modelos (BAYER, 2009). No século XXI o interesse no estudo das celulases foi novamente alavancado devido à possibilidade de aplicação na produção de etanol combustível (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

A produção de celulases em escala industrial, de forma geral, iniciou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos (melhora as propriedades sensoriais de massas), e no processamento de bebidas (promove a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final). Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas indústrias: têxtil, nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamiento e desbotamento do brim); de polpa e papel (modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas); e em lavanderia (para aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, e amenizar o desgaste das roupas) (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Na década de 90, as celulases, juntamente com as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas. No Brasil, em 2008, apenas considerando-se importações e exportações brasileiras, as celulases movimentaram cerca de 1,35 milhões de dólares. Uma das mais emergentes aplicações das enzimas do complexo celulolítico atualmente é a hidrólise de biomassas. As matérias-primas de origem lignocelulósica contêm de 20 a 60% de celulose, que pode ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado para a obtenção de uma imensa gama de produtos, que abrange desde bicombustíveis, como o etanol de segunda geração, até polímeros (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Bon *et al.*(2008) afirmam que as celulases podem ser divididas em dois grupos, conforme seu sítio de ação na celulose: endoglucanases e exoglucanases (ou celobiohidrolases).

As endoglucanases (EC 3.3.1.4) hidrolisam de maneira randômica as regiões internas na molécula de celulose, com mais afinidade por regiões amorfas. Sua atuação resulta na formação de celo-oligosacarídeos com graus variados de polimerização, com o consumo de uma molécula de água e formação de um novo terminal redutor e outro não redutor (BON *et al.*, 2008). Trata-se da enzima responsável por iniciar a hidrólise. Essa enzima reduz o grau de polimerização da molécula de celulose (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase e glucano-hidrolase. A glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) participa da hidrólise primária da fibra de celulose e é responsável pela amorfogênese, um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando a desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulasas (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). O fenômeno da amorfogênese é observado nos estágios iniciais da hidrólise da celulose, e tem a contribuição de outras enzimas, como as expansinas e swoleninas (ARANTES e SADDLER, 2010). A celobiohidrolase ainda pode ser dividida em dois tipos: I e II. As exoglucanases do tipo I hidrolisam terminais redutores, e do tipo II, terminais não redutores. As celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) sofrem inibição pelo produto da sua hidrólise, no caso, a celobiose (BON *et al.*, 2008).

A degradação da celulose é completada com a ação da celobiase ( $\beta$ -glucosidase – EC 3.2.1.21) para quebra do dímero de glicose, a celobiose. A celobiase sofre inibição pelo seu produto de hidrólise. O nível correto dessa enzima em uma preparação enzimática evita a inibição das celobiohidrolases, bem como a liberação do produto de interesse, a glicose, na maior quantidade possível (BON *et al.*, 2008; ZHANG, *et al.*, 2010).

A hidrólise da celulose pelas celulasas envolve a adsorção das enzimas à superfície do substrato e a hidrólise do substrato propriamente dita em açúcares

fermentescíveis. Uma enzima do complexo celulolítico sozinha é incapaz de realizar tal hidrólise, sendo necessária a ação sinérgica das demais enzimas celulolíticas, bem como a  $\beta$ -glucosidase (BON *et al.*, 2008). A ação sinérgica das enzimas lignocelulolíticas foi estudada por Gottshalk *et al.* (2010). Conforme a proporção de extratos enzimáticos provenientes de *Aspergillus awamori* e *Trichoderma reesei* em mistura, diferentes atividades enzimáticas e perfis de hidrólise são obtidos, uma vez que cada fungo possui um conjunto diferente de enzimas (entre endoglucanases, celobiohidrolases, xilanases, beta glucosidases, e feruloil esterases). Tais enzimas atuam de forma sinérgica no material lignocelulósico (GOTTSHALK *et al.*, 2010).

As xilanases são hemicelulases que atuam sobre as xilanas, polissacarídeos mais abundantes na natureza depois da celulose. As endoxilanases (EC 3.2.1.8) e beta-xilosidases (EC 3.2.1.37) são as principais enzimas envolvidas na hidrólise da xilana, mas também têm importância as acetil esterases, feruloil esterases, arabinosidases, responsáveis pela liberação das cadeias ligadas à xilana. Como no caso das celulases, uma atuação sinérgica das xilanases é necessária para a hidrólise completa da xilana (DHIMAN *et al.*, 2008). Apesar das enzimas terem como importante característica a especificidade pelo substrato, diversos autores apontam para a ação promíscua de algumas xilanases, capazes de atuar não somente sob hemiceluloses, mas também sobre celuloses (KELLETT *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 2011).

Para hidrólise de material lignocelulósico, a atuação de diversas enzimas é necessária. Além das celulases e das xilanases, outras hemicelulases podem estar envolvidas no processo de degradação da biomassa lignocelulósica, tais como: mananases (EC 3.2.1.78), beta-xilosidases (EC 3.2.1.37), beta manosidases (EC 3.2.1.25), alfa-arabinosidases (EC 3.2.1.55), alfa-glucuronidases (EC 3.2.1.139), feruloil esterases (EC 3.1.1.73) e acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72). (SIPOS *et al.* 2010).

Para caracterização de coquetéis enzimáticos com relação à atividade de endo e exoglucanases são empregados, em geral, os substratos carboximetilcelulose (CMC) e celulose microcristalina (AviCel), respectivamente.



Para a medida da atividade celulolítica total utiliza-se, tanto no meio acadêmico quanto comercialmente, o papel de filtro Whatman número 01 como substrato, conforme o método descrito por Ghose (1987), recomendado pela União Internacional de Química pura e aplicada (sigla em inglês, IUPAC). Tal método foi padronizado a partir dos estudos de Mandels *et al.* (1976), os quais foram republicados pela revista *Biotechnology for Biofuels* no ano de 2009 (EVELEIGH *et. al*, 2009), dada a recente retomada no estudo das celulases. O método é o mesmo utilizado pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), laboratório de renome tanto nos Estados Unidos como em todo o mundo (ADNEY e BAKER, 1996).

A atividade de beta-glucosidase pode ser determinada pelo método recomendado pela IUPAC (Ghose, 1987), empregando celobiose como substrato. No entanto, a grande maioria dos autores tem preferido a aplicação de um método mais sensível e simples, embora com maior custo, para medida dessa atividade, que utiliza p-nitrofenol-beta-glucosídeo como substrato.

Para a medida de atividade das xilanases, a IUPAC não estabelece um único método, mas traz uma coletânea dos métodos empregados por diversos laboratórios de renome em todo o mundo. Tal coletânea pode ser encontrada no artigo de Ghose e Bisaria (1987).

### **3.5 Produção de enzimas para hidrólise de material lignocelulósico**

#### **3.5.1 Microrganismos produtores**

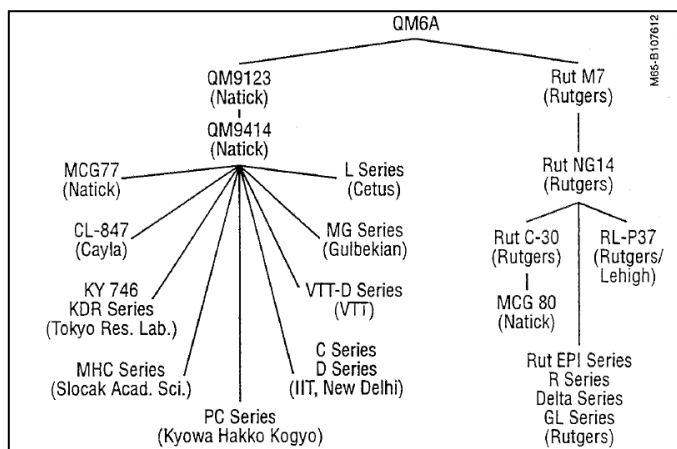
As celulases podem ser produzidas por bactérias, como as espécies aeróbias de actinomicetos, anaeróbias ou anaeróbias facultativas, como do gênero *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, ou ainda por fungos, como os do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (BON *et al.*, 2008, KADAN, 1996). Fungos filamentosos, no entanto, são preferidos para produção de enzimas comerciais, em relação a bactérias e leveduras, pelo maior rendimento obtido (AHAMED e VERMETTE, 2008a, KADAN, 1996).

Entre os fungos celulolíticos, *Trichoderma reesei* secreta um dos mais estudados complexos de celulases (AHAMED e VERMETTE, 2008a). O sistema de celulases de *T. reesei* apresenta as três classes de enzimas: 1-4-beta-D-glucano celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), endo-1-4-beta-D-glucanases (E.C.3.2.1.4) e 1-4-beta-D-glucosidase (E.C.3.2.1.21). Apesar da proporção das enzimas variar conforme a fonte de carbono empregada, o fungo *T. reesei* secreta quantidade suficiente de todas as enzimas necessárias para hidrolisar materiais celulósicos, com maior ou menor eficiência (KADAN, 1996). A proporção de celobiohidrolases (CBH1) em *Trichoderma* é expressiva, chegando a representar até 80% das celulases produzidas (SALOHEIMO E PAKULA, 2012; LO, 2008). No entanto, a quantidade de beta-glucosidase secretada naturalmente pelo fungo é freqüentemente considerada insuficiente e/ou limitante para hidrólise eficiente do material lignocelulósico, motivando a aplicação de estratégias como a adição dessa enzima proveniente de outras fontes (ZHANG, *et al.*, 2010), ou, de outra forma, a aplicação de co-cultivo (AHAMED e VERMETTE, 2008b; WEN *et al.*, 2005), e o desenvolvimento de cepas recombinantes de *Trichoderma* contendo genes que codificam para beta-glucosidase (MA *et al.*, 2011).

O fungo *T. reesei* sofre inibição catabólica pelo produto final da hidrólise, a glicose. Tal inibição é conhecida como repressão catabólica, um mecanismo para evitar gastos desnecessários de energia em caso de disponibilidade de fontes de carbono facilmente assimiláveis (KADAN, 1996). O fungo *Trichoderma reesei* apresenta cerca de 200 genes que codificam para glicosil hidrolases, e as famílias envolvidas na degradação de celuloses e hemiceluloses são encontradas em número significativamente inferior ao observado em outros fungos celulolíticos. A eficiência desse fungo se dá não pela diversidade de enzimas, mas pela eficácia na maquinaria de produção enzimática (SALOHEIMO e PAKULA, 2012).

*T. reesei* Rut-C30 é considerado um dos melhores fungos celulolíticos (AHAMED e VERMETTE, 2008a). A cepa mutante foi obtida após três rodadas de mutação, pelo tratamento com luz ultravioleta e mutação química (MONTENECOURT E EVELEIGH, 1979; PETERSON E NEVALAINEN, 2012) e está entre as mais estudadas até hoje pelas suas propriedades hipercelulolíticas,

e resistência à repressão catabólica. O mutante RUT-C30 apresenta um sistema eficiente de secreção de proteínas, associado a mudanças ocorridas no retículo endoplasmático e no sistema de Golgi oriundas da mutação (PETERSON E NEVALAINEN, 2012). A Figura 3 mostra o quadro evolutivo do desenvolvimento de cepas mutantes de *Trichoderma sp.*



**Figura 3** - Histórico dos mutantes de *Trichoderma*. Fonte: Kadam, 1996.

### 3.5.2 Influência das condições e meio de cultivo sobre a produção enzimática

A concentração, a natureza, e a forma de adição das fontes de carbono no sistema de fermentação têm influência no desempenho do processo de produção de celulasas. Por exemplo, a produção de enzimas em *Trichoderma* tem forte relação com a morfologia do fungo. Parâmetros como o tamanho do inóculo e a composição do meio de cultivo têm influência direta sobre a morfologia de *Trichoderma reesei* Rut-C30 (DOMINGUES *et al.*, 2000; AHAMED e VERMETTE, 2009). O espectro de enzimas produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* depende da composição do meio; em meios complexos derivados de plantas, ocorrerá a indução de celulasas e hemicelulasas (SALOHEIMO e PAKULA, 2012).

Os primeiros estudos da influência do meio de cultivo sobre a produção de celulasas para *Trichoderma sp.* datam das décadas de 50 e 60, especialmente pelos trabalhos de Mary Mandels, Ewelyn Reese e associados. Mandels e Reese (1957, 1960) observaram que lactose, celulose e ésteres de celulose eram

indutores da síntese de enzimas celulolíticas. Mandels *et al.* (1962) verificaram que sofrorose, um dissacarídeo de glicose ligado na posição  $\beta$  1-2, encontrado como uma impureza em glicose comercial, era o mais potente indutor da síntese dessas enzimas em *Trichoderma viride*. Reese *et al.* (1969) confirmaram o caráter indutivo do complexo celulolítico por substratos relacionados, ou seja, indução por celulose e lactose. Por outro lado, produtos da hidrólise, como celobiose e glicose, produziram fraca indução ou não induziram síntese de celulasas em *Trichoderma*. Mais tarde, Ilmén *et al.* (1997) demonstraram que glicose promoveu bom crescimento de *T. reesei* QM9414, mas exerceu uma forte repressão da síntese de celulasas, agindo ao nível da transcrição dos genes que codificam essas enzimas, mesmo quando sofrorose era adicionada ao meio de cultura. Os mesmos autores identificaram que tanto a fonte de carbono sorbitol quanto glicerol foram consideradas “neutras”, não apresentando comportamento indutor ou repressor, mas que, quando utilizadas em presença de celobiose, sofrorose ou celulose, induziram a síntese de celulasas. A sofrorose apresenta um alto custo, o que limita sua aplicação industrial (LO, 2008).

A lactose é um dissacarídeo de galactose e glicose, capaz de induzir a produção de celulasas, como demonstrado por Mandels e Reese (1960), e posteriormente por diversos outros autores, como Collen *et al.* (2005). Lo *et al.* (2010b) modelaram a hidrólise de lactose por *T. reesei*, demonstrando seu efeito indutor sobre celulase e lactase, em sistema contínuo e batelada. Recentemente, Hartl *et al.* (2007) demonstraram que a via de metabolismo de  $\beta$ -D-galactose, um dos açúcares provenientes da hidrólise de lactose, está associada em *T. reesei* com a formação de celulasas.

Fontes de nitrogênio orgânico como extrato de levedura no meio de cultura têm sido apontadas como responsáveis pela melhora da síntese de celulase (Ahamed e Vermette, 2008a), embora seu mecanismo de ação seja questionado como indutor. De fato, Ilmén *et al.* (1997) demonstraram não haver indução de enzimas celulolíticas a nível genético pela adição de nitrogênio orgânico ao meio, atribuindo este melhoramento ao aumento da quantidade de massa celular, apenas, e conseqüente maior produção de enzimas.

Mach e Zeilinger (2003) apresentam uma mini revisão sobre moléculas estudadas nas últimas décadas para indução de celulases e xilanases pelo gênero *Trichoderma*, e o mecanismo pelo qual ocorre a indução. Celulose, xilana e misturas de polímeros provenientes de plantas são apontados como indutores. Como tais polímeros não são capazes de atravessar a membrana das células, acredita-se que os oligossacarídeos liberados dos polímeros são de fato os indutores da síntese enzimática (MACH e ZEILINGER, 2003).

Dessa forma, alguns autores estudaram a indução com oligossacarídeos, provenientes de pré-tratamentos do material lignocelulósico ou de resíduos de hidrólise enzimática. Lo *et al.* (2010a) estudaram o cultivo contínuo de *T. reesei* empregando hidrolisado ácido a fim de induzir a produção de enzimas. Reczey *et al.* (1996) estudaram a aplicação de resíduos da hidrólise de madeira pré-tratada por explosão a vapor para produção de enzimas por *T. reesei*, obtendo bons rendimentos.

A produção de enzimas do complexo celulolítico para hidrólise e posterior produção de etanol de segunda geração pode se tornar mais barata pelo emprego de material lignocelulósico como fonte de carbono, no lugar de celulose pura. Por conter celulose em sua composição, tais materiais também apresentam efeito indutor na síntese de enzimas. Além disso, o complexo enzimático formado, em alguns casos, pode apresentar correlação com a fonte de carbono empregada, com influência na sua performance hidrolítica sobre aquele material (JORGENSEN e OLSSON, 2006). Baseados nisso, diversos autores estudaram a aplicação de fontes de carbono lignocelulósicas na produção de enzimas.

Sukumaran *et al.* (2009) estudaram a produção de celulases em fermentação sólida, empregando bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e biomassa de *hyacinth*. Bigelow e Wyman (2002) aplicaram o sistema de batelada alimentada na produção de celulases por *T. reesei* com resíduos líquidos e sólidos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado termicamente com água. Olsson *et al.* (2003) usaram como fontes de carbono para crescimento de *T. reesei* polpa de beterraba e polpa de beterraba pré-tratada para remoção de hemiceluloses e

lignina, e obtiveram maiores níveis enzimáticos ao empregar misturas dos substratos.

A composição do meio de cultivo também tem influência na produção de xilanases, e determinados componentes podem induzir sua produção em maior ou menor grau. Meios ricos em xilana, assim como compostos como sorbose, xilooligosacarídeos e lignocelulósicos induzem a produção de xilanases (DHIMAN *et al.*, 2008).

A forma de produção de enzimas pode variar entre cultivo submerso ou semi-sólido. No caso do cultivo submerso, mais largamente empregado, os sistemas de batelada, batelada alimentada e contínuo são estudados. O sistema em batelada alimentada freqüentemente apresenta maior vantagem em termos de produtividade. Mohagheghi *et al.* (1989) estudou uma mistura de celulose e xilose como fonte de carbono (50 g/L total inicial) em sistema de batelada alimentada, atingindo 12,5 FPU/mL, 57% superior ao sistema em batelada. A produtividade foi até 25% superior nesse sistema. O aumento da proporção xilose:celulose acima de 1:3 na alimentação, no entanto, resultou em supressão da atividade enzimática.

Outros parâmetros que influenciam o crescimento e produção de enzimas por *T. reesei* são o pH, temperatura, agitação e oxigênio dissolvido. Ferreira *et al.* (2009) e Juhasz *et al.* (2004) estudaram o efeito do pH sobre a produção de enzimas por *T. reesei* Rut C-30 em frascos agitados, propondo formas de controle do pH com a adição de soluções tamponantes ao meio. Lejeune e Baron (1995) estudaram o efeito da agitação sobre o crescimento e produção de enzimas por *T. reesei*. Altas agitações foram prejudiciais para produção enzimática, independente do substrato empregado (celulose microcristalina ou lactose).

A adição de tween 80 ao meio de cultivo aumenta a permeabilidade da membrana celular, facilitando a secreção das enzimas e conseqüentemente aumentando a síntese enzimática, resultando em maiores títulos enzimáticos (REESE e MAGUIRE, 1969; DOMINGUES *et al.*, 2000). Domingues *et al.* (2000) demonstraram a existência de uma correlação entre a adição de tween 80 ao meio e uma morfologia dispersa e sem formação de pellets, mais favorável para produção enzimática.

### 3.6 Co-cultivo

Na natureza, materiais lignocelulósicos são degradados mediante a ação cooperativa de diversas espécies de microrganismos (KATO *et al.*, 2004; GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999). Apesar de muitos organismos serem capazes de crescer em materiais celulósicos, e produzir enzimas capazes de degradá-los, poucos apresentam um sistema celulolítico completo, que atue sobre as porções cristalinas da celulose (GARCIA-KIRCHNER *et al.*, 2002).

Fermentações em sistema de co-cultivo são aquelas nas quais o inóculo consiste de dois ou mais microrganismos. A degradação e metabolização de substratos ocorrem pela atividade metabólica combinada das cepas empregadas. Tal forma de fermentação pode ser utilizada para a produção de antibióticos, enzimas, alimentos fermentados, aditivos de alimentos como carotenóides e aromas, substâncias antimicrobianas, biorremediação, entre outros (AHAMED e VERMETTE, 2008b; BADER *et al.*, 2010).

No caso da produção de enzimas, o co-cultivo oferece uma alternativa na obtenção de sistemas enzimáticos balanceados para sacarificação eficiente de materiais lignocelulósicos (GARCIA-KIRCHNER *et al.*, 2002). Além disso, o co-cultivo pode resultar na melhor utilização do substrato, aumento da produtividade, maior capacidade de adaptação para mudanças de condições de cultivo, melhor resistência a contaminações (AHAMED e VERMETTE, 2008b).

Diversos autores estudaram o co-cultivo na produção de enzimas celulolíticas, em grande parte combinando os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus sp.*, na busca por um complexo enzimático mais eficiente. Ahamed e Vermette (2008b) obtiveram um aumento da produção de enzimas através da completa e eficiente utilização dos componentes do meio de cultivo empregado no co-cultivo de *T. reesei* e *A. niger*. Wen *et al.* (2005) também buscaram obter um complexo celulolítico equilibrado empregando *T. reesei* em co-cultivo com *A. phoenicis*. O grupo de Wei *et al.* (1992) empregou o co-cultivo de *T. reesei* QM9414 e *Hypoxylon stygium* a fim de buscar um aumento na produção de beta-glucosidase. Garcia-Kirchner *et al.* (2002) empregaram o co-cultivo de *Penicillium*

*sp.* e *A. terreus* buscando maior conteúdo protéico e maior produção de celulases, beta-glucosidase e xilanases em relação ao cultivo individual. Os complexos enzimáticos obtidos através do co-cultivo também foram mais eficientes na sacarificação de material lignocelulósico, com valores aproximadamente 50% superiores em relação aos complexos obtidos por fermentação simples dos dois fungos.

### **3.7 Hidrólise enzimática**

#### **3.7.1 A hidrólise enzimática**

A sacarificação ou hidrólise da celulose pode ser conduzida de duas formas principais: por tratamento químico (empregando ácido diluído ou concentrado) ou por rota enzimática, com o uso de enzimas celulolíticas. A utilização de celulases na hidrólise apresenta vantagens, já que emprega condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos além da elevada especificidade, eliminando a chance de formação de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

O custo de produção dos biocatalisadores ainda é alto, apesar disso, a rota enzimática apresenta pontos de economia no processo em relação ao tratamento químico, tanto considerando o custo energético, como metalúrgico, uma vez que os equipamentos podem ser confeccionados com materiais menos nobres (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

No que se refere à condução da hidrólise enzimática, há grande variação nos valores das cargas de enzimas utilizadas e nas concentrações máximas de produto obtidas durante as hidrólises. Castro e Pereira Jr. (2010) afirmam que isso é resultado das distintas metodologias de quantificação de celulases utilizadas pelos autores, que ora se baseiam nas definições de atividade fornecidas pelos fornecedores das enzimas, outras vezes se referem à definição clássica reportada por Ghose (1987), ou ainda utilizam suas próprias metodologias. Além disso, são



empregadas diferentes técnicas analíticas na determinação da concentração dos açúcares liberados, e diferentes concentrações de substrato no sistema, fator diretamente relacionado à taxa de diluição dos hidrolisados à carga enzimática.

Para uma melhor hidrólise enzimática é imprescindível o pré-tratamento do material. A adsorção das celulasas em substratos celulósicos insolúveis é facilitada quando estes são submetidos previamente a tratamentos que removem frações indesejáveis nesse processo (lignina e hemicelulose), aumentam a área superficial exposta à ação enzimática e reduzem a cristalinidade do glicopolissacarídeo (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). Segundo Yang e Wyman (2007), o pré-tratamento deve ser tal que forme uma celulose altamente digestível, permitindo rendimentos de hidrólise superiores a 90% em períodos de no máximo cinco dias, preferencialmente três, com cargas enzimáticas de até 10 FPU/ g de substrato. O tempo de hidrólise de cinco dias sugerido pelos autores, no entanto, é muito alto, e análises mais recentes sugerem 48 horas ou menos como desejável. Outro recurso para o aumento da eficiência de hidrólise é a adição de surfactantes ao meio reacional, para promover maior adsorção das celulasas ao polímero celulósico (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). O custo da adição de surfactantes em alta quantidade pode ser, no entanto, proibitivo.

A hidrólise enzimática da celulose, de maneira geral, tem o rendimento aumentado com incrementos na carga enzimática, até uma concentração limite, a partir da qual não é interessante continuar adicionando enzimas ao processo, pois os sítios da matriz do substrato já se encontram saturados pelos biocatalisadores (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Quanto maior a carga de sólidos da hidrólise, mais enzima é requerida, e em geral os rendimentos são menores. Tengborg *et al.* (2001) obtiveram rendimento próximo de 70% para 5% de sólidos, sendo aumentada para quase 80% com concentração de sólidos de 2%, utilizando a mesma carga enzimática (FPU/g de substrato). Menor rendimento foi observado para concentração de sólidos de 10%.

Em muitos casos, é necessária a suplementação dos preparados enzimáticos com  $\beta$ -glucosidase, e outras enzimas acessórias, para reduzir a

inibição de endo- e exoglucanase por seus produtos de hidrólise (especialmente celobiose) e aumentar a conversão final do substrato em glicose. Enzimas acessórias como xilanases, pectinases e feruloil esterases têm efeito positivo sobre os rendimentos da hidrólise (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; GOTTSALK *et al.*, 2010, KOVACS *et al.*, 2009a; ZHANG, *et al.*, 2010; BERLIM *et al.*, 2006).

A interação entre enzimas e substrato na hidrólise é extremamente complexa. Isso ocorre, pois se trata de um sistema envolvendo multicomponentes, tanto em termos dos biocatalisadores quanto do substrato, que é insolúvel (sistema heterogêneo). Além disso, uma grande variação das propriedades do substrato é observada, e mudanças nessas propriedades ocorrem ao longo da hidrólise (LYND, 1996). Na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, altas taxas de hidrólise são observadas nos estágios iniciais de hidrólise e após um tempo observa-se redução nessas taxas, bem como redução da atividade enzimática, sendo a redução da atividade de celobiohidrolases especialmente importante. Regiões mais acessíveis são hidrolisadas nos estágios iniciais de hidrólise, enquanto frações mais resistentes permanecem intactas no decorrer da hidrólise (WANG *et al.*, 2006).

Kovacs *et al.* (2009b) estudaram uma abordagem original e não usual na hidrólise enzimática, comparando o uso de enzimas livres e micélio fúngico, demonstrando a existência de enzimas atuando presas na parede celular, pelo aumento observado no rendimento da hidrólise quando o micélio era utilizado.

### 3.7.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é influenciada pela temperatura e pH, parâmetros que têm influência diretamente sobre a atividade das enzimas. A Figura 3 mostra faixas de temperaturas e pH ótimos para diversos microrganismos, incluindo *T. reesei*.

organism	substrate	temp (°C)	pH
<i>T. reesei</i>	solka floc	40–50	4.5–5.0
<i>T. viride</i>	pulp	45	4.8
		55	4.5
<i>T. viride</i> , <i>A. niger</i>	wheat straw	45	4.8
<i>T. reesei</i>	<i>Antigonum leptopus</i> leaves, sugar cane leaves	50	4.5
<i>T. reesei</i>	bagasse	50	5.0
<i>T. viride</i> , <i>A. ustus</i>	bagasse	50	4.8–5.4
<i>T. viride</i>	birch-to-furfural process waste	45 > 12 h 55 < 12 h	5.0
<i>T. reesei</i>	solka floc	50–55	3.8–4.8
<i>T. reesei</i> , <i>A. niger</i> <sup>a</sup>	willow	40	4.8
<i>T. viride</i>	waste paper	50	4.8
<i>T. reesei</i>	solka floc	50	4.8
<i>T. viride</i>	sawmill waste	50	5.0
<i>T. viride</i> , <i>A. aculeatus</i>	rice straw	45	4.5
<i>T. viride</i> , <i>A. wentii</i>	bagasse	50	4.8
<i>T. viride</i> , <i>A. niger</i> <sup>b</sup>	carboxymethyl cellulose (CMC)	50	4.8

**Figura 4** – temperatura (*temp*) e pH ótimos para hidrólise enzimática com coquetéis de diferentes microrganismos em substratos (*substrate*) diversos. Fonte: Tengborg, *et al.*, 2001.

Os fatores que influenciam no rendimento da hidrólise enzimática da celulose vêm sendo estudados há algumas décadas. Estudos recentes em geral confirmam postulações mais antigas, pelo emprego de tecnologias mais avançadas de análise. Os fatores mais reportados com efeito no rendimento de hidrólise, além da carga enzimática e nível de beta-glucosidase e/ou beta xilosidases adicionado, são características físico-químicas do material hidrolisado, tais como porosidade, cristalinidade, grau de polimerização, quantidade de lignina e hemiceluloses. A influência desses parâmetros não é ainda completamente compreendida, apesar do grande número de trabalhos sobre o tema. Mansfield *et al.* (1999) apresentaram uma extensa revisão sobre o assunto, apontando os aspectos contraditórios existentes na literatura sobre o tema.

Pela natureza heterogênea da reação, a adsorção das enzimas na celulose é uma das etapas importantes que determinam a taxa de hidrólise do material. A

afinidade das enzimas vai depender das propriedades estruturais do material empregado (LEE *et al.*, 1982).

Grethlein (1985) demonstrou que o pré-tratamento tem efeito sobre o material lignocelulósico, aumentando sua porosidade. Esse autor demonstrou que, de forma geral, pré-tratamentos mais severos resultam em aumento do volume dos poros, o que explicaria aumentos nas taxas iniciais de hidrólise. O mesmo autor sugere que a área superficial específica (área/volume ou massa) do material seja determinada em lugar unicamente do volume dos poros, por ser mais facilmente correlacionada com a acessibilidade enzimática. Maiores rendimentos iniciais de hidrólise foram obtidos em materiais com maior área superficial. A secagem do material pré-tratado tem um efeito negativo sobre a área superficial, resultando na sua diminuição. Mais tarde, Grethlein e Converse (1991) reafirmaram a proporcionalidade existente entre área superficial do material pré-tratado e taxas iniciais de hidrólise. Tais autores observaram em seus estudos não haver correlação entre presença de lignina, cristalinidade do material e rendimento de hidrólise para os pré-tratamentos estudados. Apesar disso, a remoção da lignina pode causar redistribuição do material, aumentando sua porosidade (MANSFIELD *et al.*, 1999; MOONEY *et al.*, 1998), o que correlacionaria indiretamente a ausência de lignina com melhores rendimentos de hidrólise, em alguns casos. A presença de lignina também é apontada como negativa por adsorver irreversivelmente as celulases (MANSFIELD *et al.* 1999), no entanto, esse fato depende do tipo de lignina do material, o que explica os resultados contraditórios obtidos por diversos autores.

Mooney *et al.* (1998) estudaram o efeito da presença de lignina e porosidade sobre a adsorção das enzimas e hidrólise enzimática em diversos materiais lignocelulósicos. Tais autores observaram que a adsorção das enzimas ao substrato apresentava correlação com a estrutura da fibra e com a área superficial específica, no entanto, não garantia a sua digestibilidade. O tamanho dos poros também tem influência sob esse parâmetro. Ohgren *et al.* (2007) obtiveram melhores rendimentos de hidrólise com a remoção da lignina da biomassa pré-tratada por explosão a vapor. No entanto, os mesmos autores

questionaram se esse aumento de rendimento (em glicose) devido à deslignificação, por diminuir o rendimento em xilose, seria favorável economicamente.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e manutenção das linhagens

A cepa de *Trichoderma reesei* Rut-C30 (ATCC 56765) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). As cepas de *Annulohyphoxylon* sp. (DR47), *Colletotrichum* sp. (DR20), *Aspergillus niger* (DR58), *Penicillium* sp. (DR49) e *Alternaria* sp. (DR45) foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel e pertencem à coleção de cultura de fungos endofíticos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro/UFPR). As cepas foram conservadas em geladeira, a 8°C, em placas de Petri contendo meio PDA (*potato dextrose Agar*), sendo realizado o repique a cada quatro meses.

### 4.2 Meios e condições de cultivo em frascos agitados

Para manutenção da cepa e formação dos esporos foi utilizado o meio PDA. Placas de Petri foram inoculadas com o microrganismo de interesse e mantidas até esporulação, a 29°C por 4 a 8 dias, em estufa (Fanem 502) e em seguida estocadas em geladeira até o uso. A suspensão de esporos foi obtida pela adição de 20 mL de Tween 80 0,1% previamente esterilizado ao meio e raspagem da placa.

A composição do meio de pré-inóculo utilizado nos experimentos foi a seguinte: 10 g/L de celulose microcristalina comercial (Celufloc200; Celuflok Ind & Com de Celulose Ltda, Brasil), 10 g/L de glicose, 1 g/L de proteose peptona, 0,1% (v/v) de tween 80. Após autoclavagem a 121°C por 20 minutos, 5% (v/v) de solução salina 20x concentrada e 10% (v/v) de suspensão de esporos com mínimo de  $10^5$  esporos/mL foram adicionados ao meio.

A solução salina (SS) empregada foi a solução descrita por Mandels e Reese (1957), 20x concentrada, em g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  28; uréia 6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6;  $\text{CaCl}_2$  6;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,028;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,032;

CoCl<sub>2</sub> 0,04. Para o preparo da solução, o pH foi ajustado para 5,0. A solução salina foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 min e estocada em geladeira até o uso.

O meio de pré-inóculo foi cultivado por 72 h a 29°C, 200 rpm (shaker Innova New Brunswick Scientific, USA) e adicionado ao meio de produção de enzimas. O meio de produção de enzimas foi mantido a 29°C, 200 rpm (shaker Innova New Brunswick Scientific, USA), durante o tempo de análise. Os ensaios de produção de enzimas foram realizados no mínimo em duplicata. A composição dos meios de produção de enzimas testados é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** – Composição dos meios de produção de enzimas testados em frascos agitados.

Número de referência do ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nome de referência do ensaio	BED 10 (meio padrão)	BED 15	BED 20	BED 15 prop	BED 20 prop	BED 30 prop	MIX 10	MIX 15	MIX 20	MIX 30
BED* (g/L)	10	15	20	15	20	30	10	15	20	30
Proteose Peptona (g/L)	1	1	1	1,5	2	3	1	1,5	2	3
Tween (% v/v)	0,1	0,1	0,1	0,15	0,2	0,3	0,1	0,15	0,2	0,3
Pré-inóculo (% v/v)	10	10	10	15	20	30	10**	15**	20**	30**
Solução de sais 20x (% v/v)	5	5	5	7,5	10	15	10	15	20	30
Farelo de soja (g/L)	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3

\* BED ou a fonte de carbono indicada

\*\*pré inóculo com o dobro de SS

Para os ensaios em frascos agitados utilizou-se 200 mL de meio em Erlenmeyer de 1L de volume total.

Utilizou-se o meio de produção de enzimas 'BED 10' (Tabela 1) para o teste da fonte de carbono. Para o cultivo em escala de bancada foram testadas como fontes de carbono:

- Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, deslignificado (BED) e não deslignificado (BEX),

- Bagaço pré-tratado com água quente (BH),
- Celufloc200, celulose microcristalina comercial (CE).

Para suplementação da fonte de carbono foram estudados farelo de soja, sacarose, glicerol, lactose e licor proveniente do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar. A complementação da fonte de carbono foi testada em BED, na proporção de 1:3 (complemento: BED), ou seja, 1,5 g de BED e 0,5 g (ou mL) de complemento em 200 mL de meio.

A variação da concentração de solução salina foi testada em BED com concentração no meio de 10 g/L (meio 1 da Tabela 1). Foram testados os meios: BSPD (pré-inóculo com o dobro de solução salina e meio de produção padrão), BDPS (pré-inóculo padrão e meio de cultivo de enzimas com o dobro de solução salina), e BDPD (ambos o pré-inóculo e o meio de produção com o dobro, em volume, de solução salina).

A variação da concentração da fonte de carbono, nutrientes e pré-inóculo foram estudadas em BED, em frascos agitados, conforme descrito na Tabela 1.

### 4.3 Ensaio em reator

Foram realizados ensaios de produção enzimática em bioreatores de 3L e 0,5L (Figura 5).



(a)



(b)



**Figura 5** – Reatores Bioflo115 (a) e Biostat Q plus (b) utilizados para produção de enzimas celulolíticas

Nos ensaios em biorreator (Bioflo 115, New Brunswick Scientific, USA equipado com o programa de aquisição de dados BioCommand) foi utilizada como fonte de carbono bagaço explodido e deslignificado (BED). O pH foi mantido em 5,0 com adição automática de ácido e base ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,4 M e  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  1:3 (v:v)). Foram utilizados os volumes de 1L a 1,5 L em reator de 3L de volume total. A temperatura foi mantida em 29°C para todos os experimentos e oxigênio dissolvido mantido em um valor mínimo de 20% da saturação com ar pela variação automática da agitação (mínima de 200 RPM) e aeração (mínima de 0,3 L/min). Anti-espumante FluentCane 114 Poliglicol (DOW Chemicals) foi adicionado manualmente quando necessário.

A variação do meio de cultivo foi estudada em biorreator Bioflo 115 de 3L total. Foi testado o meio BED10, sobre o qual se estudou a adição de farelo de soja e sacarose como suplementos ao meio de cultivo, e a interação entre os suplementos. O meio MIX15 (referência 8 da Tabela 1) também foi testado em biorreator no volume de 1L de meio, em duplicata, e o aumento da fonte de carbono para 30g/L e 50g/L (semiMIX30 e semiMIX50) foi estudado a partir do meio MIX15. O sistema de batelada alimentada foi estudado partindo-se do meio semiMIX30, com 4 adições de sólidos em 45, 53, 69 e 77 horas até 50 g/L final da fonte de carbono.

O ensaio semiMIX30 foi realizado também em reator Biostat Q plus (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) de 0,5 L para avaliar a reprodutibilidade do ensaio em outro sistema de bioreatores. Utilizou-se 0,35L de volume de meio e para ajuste de pH (mantido em 5,0) foram utilizadas soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 M e  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  1:5 (v:v), adicionadas automaticamente. Anti-espumante diluído 1:1 em água foi adicionado manualmente quando necessário. A temperatura foi mantida em 29°C para todos os experimentos e oxigênio dissolvido mantido em um valor mínimo de 20% da saturação com ar pela variação automática da agitação (mínima de 200 RPM) e aeração (mínima de 0,3 L/min).

Foram avaliadas a produção enzimática em termos da atividade celulolítica total (FPA), de xilanase e de beta-glucosidase, produtividade (em FPU/L.h) e proteína total do sobrenadante de centrifugação (conforme descrito em 3.7). O crescimento do fungo foi acompanhado por microscopia óptica.

#### **4.4 Obtenção das matérias-primas utilizadas**

As matérias-primas: bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor deslignificado (BED) e não deslignificado (BEX) foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. George Jackson de Moraes e Rocha do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. De maneira simplificada, para o pré-tratamento de BEX, o reator de 5000L foi fechado pneumaticamente e pressurizado com vapor fluente até atingir uma pressão de 15,7 kg/cm<sup>2</sup>, mantendo-se pressurizado durante 7 minutos (pressão final 15,3 kg/cm<sup>2</sup> equivalente a 200°C). Após este tempo o reator foi despressurizado subitamente, tendo a abertura total da válvula em aproximadamente 15 segundos. O bagaço foi lavado e seco ao ar livre. Para BED, utilizou-se procedimento similar, seguido de deslignificação alcalina com solução de 1% de NaOH (m/v) a 100°C por 30 minutos seguido de separação do material por centrifugação. Após os pré-tratamentos todos os materiais foram lavados com água até pH perto da neutralidade, secos ao ar livre e cominuidos em moinho (Fritsch - Pulverizette, Alemanha) munido de peneira de malha Tyler N° 35.

O tratamento do bagaço com água quente – tratamento hidrotérmico – para obtenção de BH foi realizado no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) segundo protocolo estabelecido pelo grupo de pesquisa da Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Borges Pimenta (reator Parr modelo 4848 de 2L, 190°C, 10 minutos). O bagaço utilizado foi proveniente da Usina da Pedra.

A composição dos bagaços pré-tratados foi determinada pelo grupo de pesquisa do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, segundo metodologia ainda não publicada, modificada junto ao Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL), a partir de Sluiter *et al.* (2008 a, b, c, d, e). A

composição do licor do pré-tratamento foi determinada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC Dionex Ultimate 3000). A amostra foi filtrada (Sepak C18, Waters). Os açúcares foram medidos utilizando coluna Aminex HPX-87H 300 mm X 7,8 mm X 9 µm, temperatura 50°C, fluxo 0,5 mL/min, detector Shodex IR na temperatura de 40°C, fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M, volume de injeção 50 µL. Furfural e hidroximetilfurfural foram medidos utilizando coluna C18, 150 mm x 4,6 mm x 3 µm, temperatura ambiente, detecção por UV 274 nm, fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 10 µL e fase móvel Água: Acetonitrila 8:1 com 1% de ácido acético (v/v). A composição do bagaço pré-tratado de diferentes formas é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>
BH	74,0 ± 1,3	6,0 ± 0,5	26,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1
BEX	56,88 ± 0,46	10,84 ± 0,10	29,26 ± 1,50	4,62 ± 0,03
BED	77,89 ± 0,23	7,09 ± 0,11	16,22 ± 0,02	4,91 ± 0,08

O farelo de soja foi adquirido da empresa Claro Agropecuária, São Carlos, SP. Os demais suplementos da fonte de carbono utilizados foram: glicerina P.A. (FMAIA Gold), lactose P.A. (INLAB) e sacarose P.A. (Synth).

#### 4.5 Co-cultivo

Para os ensaios de co-cultivo, cinco cepas de microrganismos (*Annulohyphoxylon* sp. DR47, *Colletotrichum* sp. DR20, *Aspergillus niger* DR58, *Penicillium* sp. DR49, *Alternaria* sp. DR45) foram testadas em placas de Petri para verificação da presença de halo de inibição em crescimento com *Trichoderma reesei* RUT-C30. Essas linhagens foram pré-selecionadas para produção de β-glucosidase em trabalho publicado por Robl *et al.* (2012). Os fungos foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel e pertencem à coleção de cultura de fungos endofíticos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro/UFPR).

Para o ensaio de halo de inibição, os fungos foram inicialmente cultivados em separado em placas de Petri a 29°C até um crescimento uniforme, em seguida, discos de diâmetro constante foram cortados e colocados em uma nova placa, sendo um disco de *T. reesei* RUT-C30 e um disco do fungo testado. As placas foram mantidas a 29°C e o crescimento dos fungos foi observado diariamente. Duas cepas (DR47 e DR45) foram selecionadas para serem testadas em cultivo em frascos agitados, nas proporções de inóculo de 1:1, 2:1, 3:1 (*T. reesei*: fungo testado), totalizando 10% v/v. Para os ensaios de co-cultivo foi utilizado o meio otimizado em frascos agitados MIX15 (meio 8 da Tabela 1).

#### **4.6 Amostragem**

Amostras (5 a 10 mL) foram retiradas durante o período de cultivo do fungo e centrifugadas a 10.000 rpm, 10°C, por 15 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) para as dosagens enzimáticas, de proteínas e medida do pH.

#### **4.7 Dosagem das atividades enzimáticas e proteína total**

##### **4.7.1 Atividades enzimáticas**

A atividade enzimática celulolítica total foi dosada no sobrenadante da centrifugação pelo método da atividade de papel de filtro (*filter paper activity* – FPA) descrito por Ghose (1987), modificado de forma a reduzir a escala de reação em 10 vezes, visando redução do uso de reagente e otimização de tempo. O açúcar redutor foi medido pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959), empregando glicose como padrão. A atividade de papel de filtro, segundo Ghose (1987), é definida de forma que atividades inferiores a 0,37 FPU/mL não podem ser obtidas, a menos que a amostra seja concentrada previamente. No entanto, devido ao volume reduzido de cada amostra, o processo de concentração torna-se inviável. Sendo assim, valores inferiores a 0,37 FPU/mL foram necessariamente

obtidos por aproximação, utilizando proporcionalidade, a fim de permitir uma comparação entre os dados.

A atividade da enzima beta-glucosidase foi dosada empregando p-nitrofenol-beta-glucosídeo (Sigma Aldrich, MO) como substrato. O ensaio foi composto de 80  $\mu\text{L}$  de substrato (p-nitrofenol-beta-d-glucosídeo 1mM) e 20  $\mu\text{L}$  de enzima diluída, incubados por 10 min a 50 °C. A reação foi parada com adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Ca}_2\text{CO}_3$  1M, e a absorbância foi determinada a 400 nm em leitora de placas.

A atividade de hemicelulases foi determinada empregando xilana de *birchwood* como substrato. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços como descrito: 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da centrifugação diluído foi adicionado a 40  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 50  $\mu\text{L}$  do substrato 0,5% (m/v). A mistura foi mantida a 50°C por 10 minutos. O açúcar redutor foi medido pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959), pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de reagente. Xilose foi empregada como padrão. A atividade foi calculada como recomendado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, sigla em inglês, IUPAC (GHOSE, 1987).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar um  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/produto por minuto, nas condições do ensaio.

#### 4.7.2 Painel enzimático

Para os meios de produção de enzimas BED 10 g/L e MIX 15 g/L foi realizado um painel enzimático de avaliação do desempenho dos coquetéis frente a variados substratos comerciais. A atividade enzimática dos coquetéis produzidos em 96h e 120h de cultivo foi medida frente aos seguintes substratos: (0,5% w/v): avicel, celulose microcristalina, carboximetil celulose (cmc), sigmacell, açúcar de beterraba (sugarbeet), arabinogalactana de lariço (*larch arabinogalactan*), arabinana linear, pectina, 1-4-b-d-manana, glucomanana, amido de batata, laminarina, xiloglucana, liquenana, xilana de bétula (*birch wood xylan*), xilana de

faia (*beechwood xylan*), galactomanana, b-glucano, arabinano desramificado (*debranched arabinan*). Foram usados substratos com alto grau de pureza (ex: Sigma-Aldrich, Megazyme). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços contendo 50  $\mu\text{L}$  do substrato, 40  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, 10  $\mu\text{L}$  de amostra. Após 10 minutos de reação a 50°C (30 minutos para os substratos celulósicos), 100  $\mu\text{L}$  de DNS foram adicionados e o açúcar redutor liberado foi medido pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

Também foram testados os substratos paranitrofenil glicosídeos (1 mM): p-nitrophenyl-beta-D-xilopiranosídeo (pnpx), 4-nitrofenil-alfa-l-arabinofuranosídeo (pnpa), e p-nitrofenil-beta-D-celobiosídeo (pnpc). Foram usados substratos com alto grau de pureza (Sigma-Aldrich). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços contendo 50  $\mu\text{L}$  do substrato, 40  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8, 10  $\mu\text{L}$  de amostra. Após 10 minutos de reação a 50°C, 100  $\mu\text{L}$  de carbonato de cálcio 1M foram adicionados e procedeu-se a leitura a 400 nm.

Os ensaios foram realizados com auxílio do sistema automatizado de pipetagem epMotion 5075 da Eppendorf. A leitura das placas foi realizada em leitora de placas Tecan Infinite 200 Pro. As atividades foram calculadas com base em uma curva de calibração de glicose.

#### 4.7.3 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada empregando o método recomendado para o reagente preparado da Bio-Rad (Protein Assay Reagent Concentrate) para placas de 96 poços. O método é baseado no método de Bradford (1976), mas emprega o reagente concentrado, e a leitura da cor formada após a reação é realizada em leitora de placas. Albumina de soro bovina foi utilizada como padrão.

#### 4.8 Medida do pH

A medida do pH foi realizada como acompanhamento da fermentação em frascos agitados, utilizando pHmetro digital (Metrohm 827 pH Lab) previamente calibrado com soluções tampão padrões pH 4,0 e 7,0 (Synth).

#### 4.9 Condições das hidrólises

Para os ensaios de hidrólise, foram utilizados Erlenmeyes de 50 mL, contendo de concentrações variáveis de bagaço, 0,02% de azida sódica, 10 FPU/g bagaço, com ou sem adição de beta-glucosidase (Novozym 188, Novozymes) 20 CBU/g de bagaço (1CBU  $\approx$  3 U), e tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 até um volume de 20 mL. Os frascos foram mantidos em agitador rotativo (Excella E24, New Brunswick Scientific, USA) a 50°C, 250 rpm, por 96 horas. Todos os ensaios de hidrólise foram realizados em duplicata, e os resultados são apresentados como médias.

Os coquetéis enzimáticos produzidos em 120h de fermentação nos meios de cultivo BED 10g/L e MIX 15g/L (meios 1 e 8 da Tabela 1) foram testados em relação à sua capacidade hidrolítica em BED e BH. Seu desempenho foi comparado a enzimas comercialmente disponíveis. As enzimas comerciais utilizadas foram celulase de *T. reesei* ATCC 26921 (Sigma-Aldrich) e beta-glucosidase Novozyme 188 (Novozymes). Foram testadas as concentrações de sólidos de 1%, 3%, 5% e 10% total, em sistema de batelada a batelada alimentada. Os ensaios foram realizados com e sem adição de beta-glucosidase.

Para o coquetel enzimático MIX15 foi realizado um ensaio de avaliação de batelada alimentada na hidrólise. Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar BED como material de hidrólise. A hidrólise foi iniciada com 3% de sólidos e carga enzimática de 10 FPU/g bagaço, com adição de beta-glucosidase comercial (20 CBU/g bagaço). Foram realizadas mais seis adições de sólidos, juntamente com as enzimas na mesma carga enzimática, sendo as quatro primeiras adições de

0,2g e as demais de 0,4g, totalizando 2g ao final da hidrólise (10% de sólidos totais adicionados).

O desempenho do caldo de fermentação (sem centrifugação) produzido no meio MIX15 (120h de fermentação) foi avaliado para hidrólise de BED, e comparado ao coquetel enzimático centrifugado nas mesmas condições. Para isso, testaram-se duas condições de hidrólise: condição A (23,6 FPU/g de bagaço e 10% de sólidos) e condição B (10 FPU/g de bagaço e 23,6% de sólidos). Para a condição B, foi utilizada alimentação de sólidos, iniciando com  $\approx 3\%$  de sólidos (1g em 30mL de reação), seguido de 5 alimentações, sendo a primeira de 2g (em 1 hora de hidrólise), e as demais de 1g (em 2h, 3h, 19h e 21h de hidrólise). Os valores de atividade para o caldo de fermentação foram medidos após centrifugação de uma alíquota do material, portanto, enzimas eventualmente aderidas ao bagaço ou à parede celular do fungo não são detectadas. Após a medida das atividades enzimáticas, o caldo de fermentação foi mantido a 50°C com azida sódica 0,02% por cinco horas até o início da adição de sólidos para a hidrólise. Tal procedimento teve como objetivo garantir a morte celular do fungo, verificada através de raspagem de uma alíquota do material em placa de Petri contendo PDA e incubação à 29°C. Não foi adicionada beta-glucosidase comercial para realização desses ensaios.

Amostras de 2mL foram retiradas a cada 24 horas, centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min (Centrifuge 5418, Eppendorf), filtradas (Sepak C18, Waters) e analisadas quanto ao açúcar liberado em HPLC Dionex Ultimate 3000 coluna Aminex HPX-87H 300 mm X 7,8 mm X 9  $\mu$ m, temperatura 50°C, fluxo 0,5 mL/min, detector Shodex IR na temperatura de 40°C, fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M, volume de injeção 50  $\mu$ L.

#### **4.10 Análises estatísticas**

Quando julgado necessário, foi realizada uma análise estatística dos valores de resposta dos experimentos. Para comparação entre grupos de experimentos foram utilizados os testes de comparação de médias Scott-Knott,



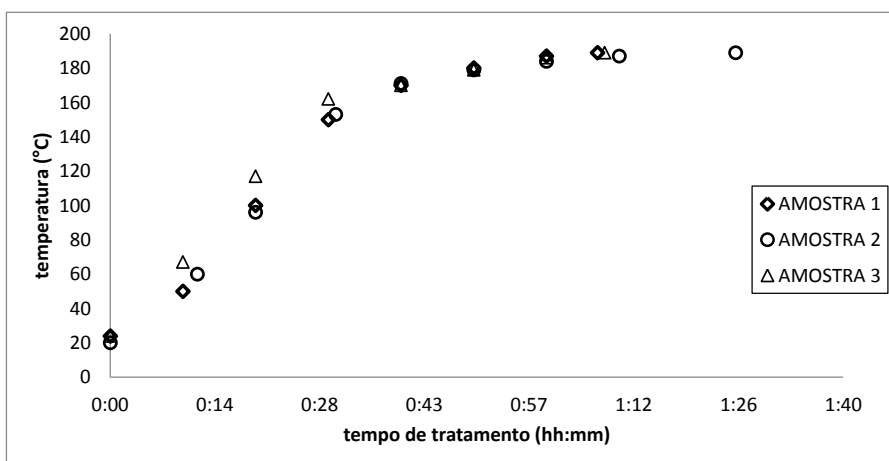
Tukey e Duncan, através do programa de fácil utilização SASM-Agri, desenvolvido pelo grupo de Canteri *et al.* (2001). Para análise de planejamento de experimentos foi empregado o programa Statistica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Pré-tratamento do bagaço

A medida da composição do licor proveniente do pré-tratamento hidrotérmico foi realizada em HPLC. Os resultados indicaram a presença de 0,36 g/L de glicose, 6,52 g/L de xilose, 0,21 g/L de celobiose, 0,68 g/L de arabinose, 2,41 g/L de ácido acético, 0,32 g/L de ácido fórmico, 3,09 g/L de furfural e 0,13 g/L de hidroximetilfurfural.

A alteração da temperatura durante o aquecimento do bagaço submetido ao tratamento hidrotérmico é considerada lenta em relação ao tempo de tratamento (10 minutos a 190°C). Para garantir maior homogeneidade do material, as bateladas foram monitoradas com relação à rampa de temperatura de aquecimento. Os resultados são demonstrados na Figura 6. Nas três bateladas realizadas não foi observada grande diferença entre as rampas de aquecimento, e o material obtido foi misturado de maneira homogênea para uso posterior. A rampa de resfriamento não foi considerada, uma vez que o material é resfriado rapidamente de maneira manual.

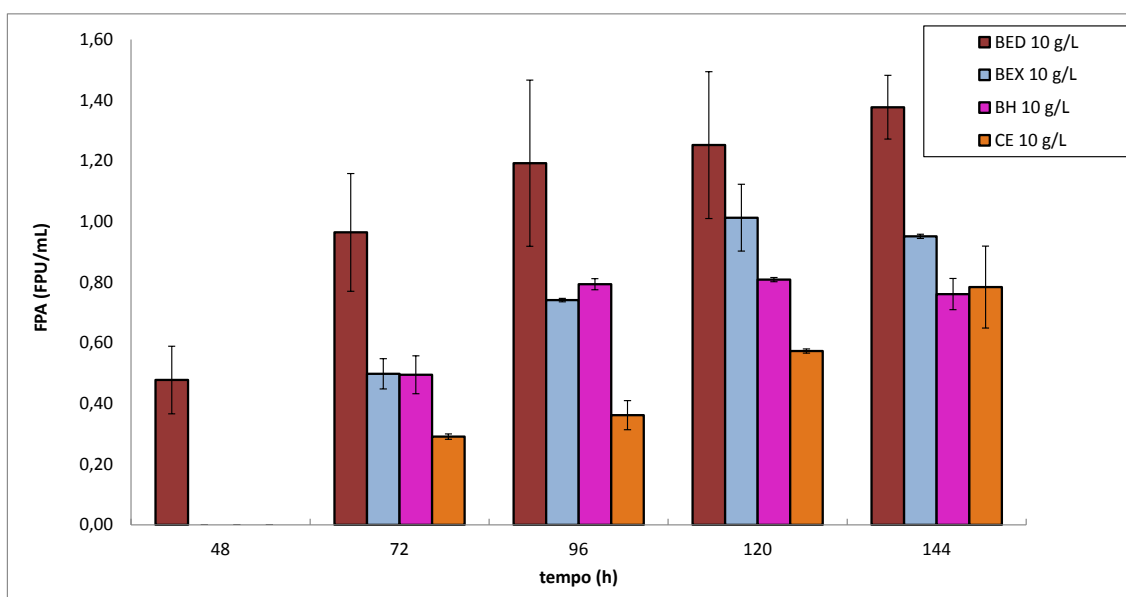


**Figura 6** – Variação da temperatura durante o aquecimento do reator no tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

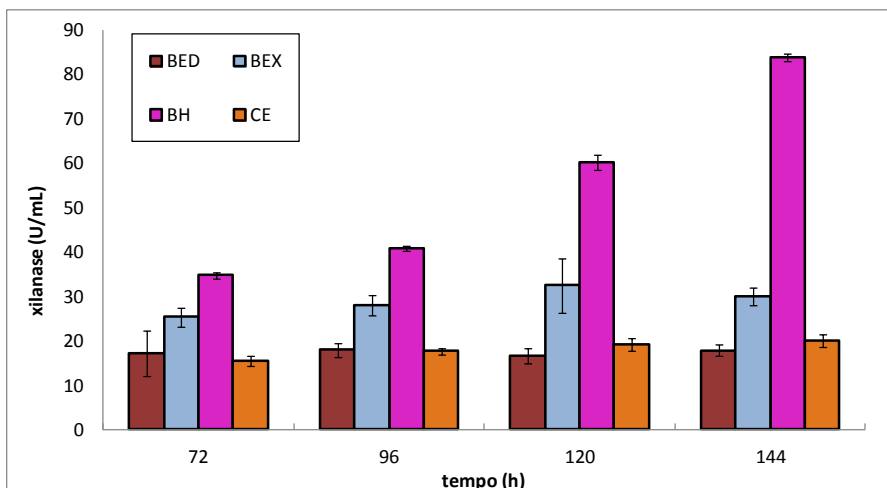
## 5.2 Produção enzimática em frascos agitados

### 5.2.1 Seleção da fonte de carbono

Considerando que a produção enzimática por *Trichoderma sp.* tem influência do meio de cultivo empregado (MANDELS E REESE, 1957, 1960,1962; JUHASZ *et al.*, 2005; JUN *et al.*, 2011; ADAV *et al.*, 2012), foram testados quatro materiais como fontes de carbono tendo como objetivo incremento do título enzimático. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por diversos métodos foi testado como fonte de carbono para produção de enzimas por *T. reesei* RUT-C30, visando à indução da produção de enzimas lignocelulolíticas, e a possibilidade de aplicação da técnica de produção *on site*, junto à planta de etanol de segunda geração. Para comparação, foi testada celulose microcristalina comercial Celufloc200. Os resultados obtidos para atividade celulolítica total (FPA) e atividade de xilanases para as fontes de carbono testadas são demonstrados nas Figuras 7 e 8.



**Figura 7** – Variação da atividade celulolítica total (FPA) durante a fermentação em diversas fontes de carbono.



**Figura 8** – Variação de atividade de xilanase ao longo da fermentação em diversas fontes de carbono.

Os resultados para os picos de produção de celulases, xilanas, e proteína total, assim como a variação de pH no período de fermentação estudado são apresentados de forma resumida na Tabela 3. A atividade de beta-glucosidase foi inferior a 1 U/mL para todos os ensaios, e não é apresentada.

**Tabela 3** – Pico de atividade de xilanase e celulolítica total, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para as fontes de carbono testadas

Fonte de carbono	Pico de atividade de celulase (FPU/mL)	Pico de atividade de xilanase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	Variação de pH
BED	1,38 ± 0,11	18,03 ± 1,56	0,81 ± 0,05	2,75 – 3,27
BEX	1,01 ± 0,11	32,57 ± 6,15	0,73 ± 0,02	3,78 – 4,16
BH	0,81 ± 0,01	84,01 ± 0,82	0,68 ± 0,02	5,88 – 6,36
CE	0,78 ± 0,14	20,04 ± 1,50	0,60 ± 0,01	2,71 – 2,82

De forma geral, no intervalo de fermentação estudado, a produção de celulases (medida pela atividade FPA) foi superior em BED (Figura 7). A produção de proteínas também foi superior em BED, muito embora essa fonte de carbono não tenha induzido com a mesma eficiência a produção de xilanas (Figura 8),

tendo um resultado similar à celulose pura (CE). A partir desses resultados, BED foi selecionado como fonte de carbono para os ensaios subsequentes. De forma geral, as atividades mostraram-se consideravelmente superiores no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BED, BEX e BH) em relação à celulose cristalina (CE), demonstrando o potencial do bagaço pré-tratado para emprego na produção de celulases.

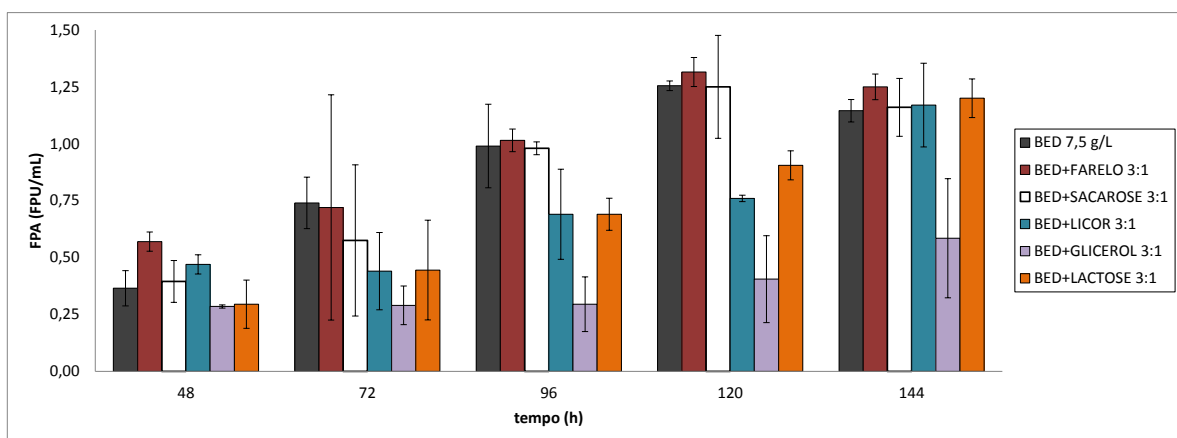
Observou-se maior produção de xilanases em BH, muito embora o conteúdo de hemicelulose em BEX seja superior (Tabela 2). Considerando que o pH tem influência sobre a produção enzimática (FERREIRA *et al.*, 2009), em especial sobre as xilanases, possivelmente o pH mais básico em BH favoreceu a produção dessas enzimas.

### 5.2.2 Suplementação da fonte de carbono

Após a seleção do bagaço explodido e deslignificado (BED) como fonte de carbono, estudou-se a suplementação com farelo de soja, lactose, glicerina, licor de pré-tratamento e sacarose em frascos agitados, a fim de verificar a resposta da atividade enzimática frente à modificação dos nutrientes disponíveis. A escolha dos suplementos foi feita tendo em vista a disponibilidade, acessibilidade, custo e dados da literatura. O farelo de soja é um subproduto da indústria, apresenta um custo reduzido e induz atividade de xilanases (MACIEL, 2006). Assim como o farelo de soja, a lactose é um produto de valor reduzido, e induz a produção de celulases por *Trichoderma reesei* (LO *et al.*, 2010). O licor de pré-tratamento é produzido como subproduto no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar pelo processo hidrotérmico (conforme descrito no item 4.4). A sacarose é pouco estudada na produção de celulases, e a sua adição em meio contendo bagaço pré-tratado aumentou significativamente a produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma harzianum* (DELABONA, *et al.*, 2012). O glicerol foi estudado para *T. reesei* QM9414, como fonte de carbono não repressora para produção de celulases em meio contendo uma fonte de carbono indutora (ILMEN *et al.*, 1997).

Dessa forma, tais materiais foram selecionados para estudo como suplementos da fonte de carbono.

A figura 9 mostra a variação da atividade celulolítica total em amostras retiradas ao longo do período de fermentação estudado. Os ensaios de suplementação foram realizados em duplicata.



**Figura 9**– Gráfico da variação da atividade celulolítica total durante a fermentação em BED suplementado com outros nutrientes.

Os resultados para os picos de atividades de xilanases e celulase, proteína total máxima obtida e variação de pH durante a fermentação, para os meios suplementados com nutrientes são expostos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Pico de atividade celulolítica total, de xilanases, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para BED suplementado.

Suplemento	Pico de atividade de FPA (FPU/mL)	Pico de atividade de xilanase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	Varição de pH
Sem suplemento	1,25 ± 0,02	25,51 ± 1,11	0,77 ± 0,09	2,78 – 3,42
Farelo de soja	1,32 ± 0,06	34,29 ± 2,97	1,01 ± 0,03*	3,75 – 4,95
Sacarose	1,25 ± 0,23	26,39 ± 0,81	0,85 ± 0,03	2,94 – 3,71
Lactose	1,20 ± 0,08	16,90 ± 5,64	0,81 ± 0,06	2,81 – 3,46

Glicerol	0,59 ± 0,26	16,58 ± 3,19	0,52 ± 0,18	2,6 – 3,84
Licor de pré-tratamento	1,17 ± 0,18	24,02 ± 2,28	0,84 ± 0,04	3,04 – 3,64

\* a metodologia utilizada na medição de proteína no sobrenadante não distingue entre proteínas derivadas do farelo de soja e enzimas.

Os maiores valores de atividade de FPA foram obtidos com o meio suplementado com farelo de soja (Figura 9). No entanto, os Testes de Médias (Scott-Knott e Duncan) realizados com auxílio do programa SASM-Agri com os valores de FPA dos ensaios com meios suplementados e não suplementado (BED 7,5 g/L) em 120h de cultivo revelaram diferença significativa à 90% de confiança somente entre os grupos A (BED7,5; farelo; sacarose), B (lactose; licor), e C (glicerol). As diferenças das médias entre ensaios do mesmo grupo foram consideradas não significativas. A suplementação de BED com farelo de soja e sacarose foi considerada, portanto, neutra em relação à atividade de FPA, e a suplementação com os demais nutrientes tiveram efeito negativo sobre a atividade. Para atividade de xilanase, porém, os Testes de Médias (Scott-Knott e Duncan) revelaram diferença significativa a 90% de confiança entre o meio suplementado com farelo de soja e o meio não suplementado. A suplementação com sacarose e licor foi considerada neutra, e a suplementação com lactose e glicerol teve efeito negativo sobre a atividade.

A suplementação com lactose é sugerida na literatura (MANDELS e REESE, 1960; COLLEN *et al.*, 2005; LO *et al.*, 2010b) para aumento da produção enzimática. No entanto, a produção de enzimas empregando BED como fonte de carbono e lactose como suplemento resulta em uma produção tardia, o que impacta negativamente sobre a produtividade. Adicionando licor do pré-tratamento como suplemento observou-se um perfil atrasado de produção, similar à quando se adicionou lactose, o que poderia ser atribuído à presença de furfural no licor de pré-tratamento. Zsolt e Zacchi (2000) observaram um efeito negativo sobre a produção de enzimas por *Trichoderma reesei* quando se adicionava furfural ao meio de cultivo, no entanto, esses autores estudaram concentrações a partir de 0,4 g/L, e a concentração utilizada no ensaio foi bastante inferior (<0,001 g/L).

O alto desvio entre os valores de FPA das duplicatas no terceiro dia de fermentação se deve provavelmente ao fato de que, no período do segundo ao terceiro dia de fermentação, ocorre o início da mudança na morfologia micelial do fungo, na qual o micélio longo e pouco ramificado é substituído por um micélio mais curto, ramificado, e com maior capacidade de produção de celulases (VELKOVSKA, *et al.*, 1997). Nesse período em que ocorre a mudança do perfil do fungo, de crescimento intenso para produtor de celulases, diferenças entre grupos de experimentos podem ser mais expressivas.

O aumento da produção enzimática no meio com farelo de soja foi atribuído ao aumento da disponibilidade de nutrientes para o crescimento do fungo. Como sugerido por Ilmén *et al.* (1997), o aumento do nitrogênio orgânico não induz a produção de enzimas, mas aumenta a massa celular, resultando em maior produção. A sacarose não demonstrou efeito inibidor sobre a produção de enzimas celulolíticas, muito embora seja um açúcar mais facilmente assimilado pelo fungo do que o açúcar proveniente da quebra da celulose do bagaço. Quando sacarose e farelo de soja foram estudados como única fonte de carbono disponível, não houve produção mensurável de enzimas celulolíticas (dados não mostrados).

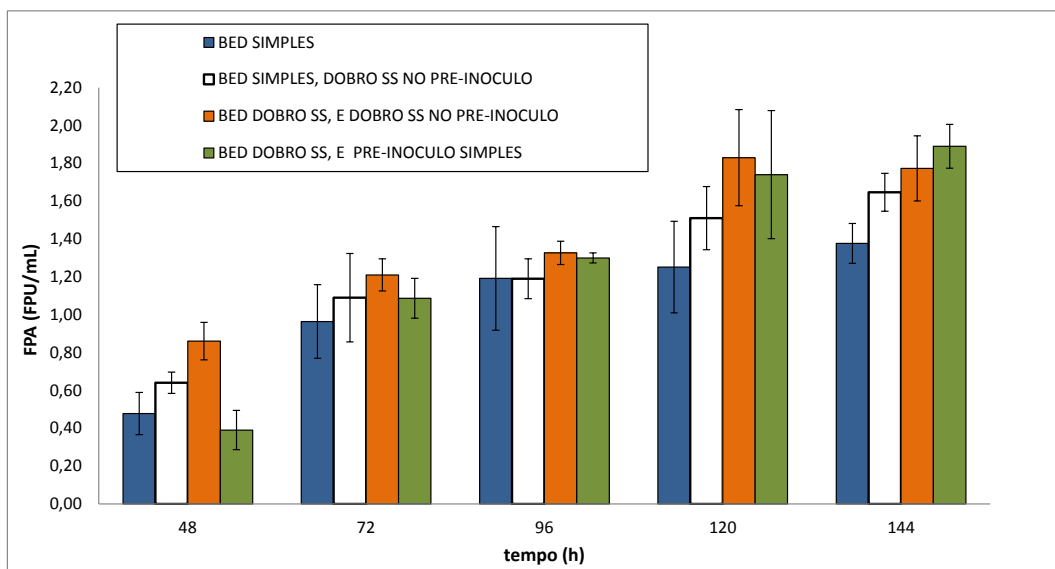
A partir dos resultados obtidos, e considerando a escassez de trabalhos da literatura empregando os nutrientes testados para produção de enzimas celulolíticas, farelo de soja e sacarose foram selecionados para serem avaliados como suplementos em biorreator, uma vez que o efeito da flutuação pH é eliminado nesse sistema, pelo controle automático em um valor fixo pré-definido.

### 5.2.3 Concentração de solução salina

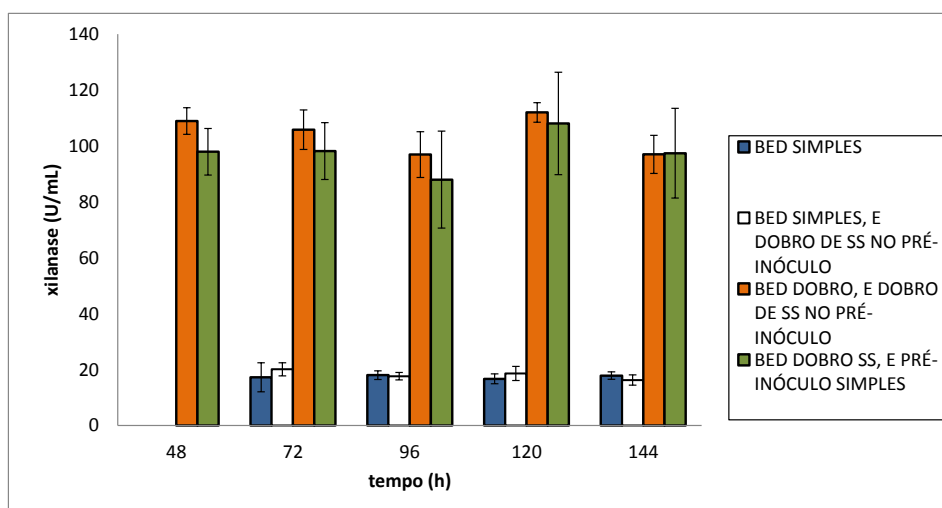
Grande parte dos trabalhos da literatura envolvendo produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos do gênero *Trichoderma* emprega a solução de sais desenvolvida e testada por Mandels e Reese, 1956 e 1969, sem modificações (AHAMED E VERMETTE, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2000; GOTTSCHALK *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2009; JUHASZ, 2004, OLSSON *et al.*, 2003; BIGELOW e



WYMAN, 2002). Nesse trabalho, a concentração da solução salina de Mandels adicionada ao meio foi variada a fim de verificar sua influência sobre a produção enzimática. Para isso, dobrou-se o volume adicionado de solução salina no meio de pré-inoculo, e/ou no meio de produção enzimática. Os resultados para o perfil de produção de enzimas lignocelulolíticas são apresentados em termos das atividades celulolítica e xilanolítica totais (Figuras 10 e 11).



**Figura 10** – Perfil de atividade celulolítica com a variação da concentração de solução salina no meio.



**Figura 11** - Perfil de atividade de xilanases com a variação da concentração de solução salina no meio

A Tabela 5 apresenta um resumo dos picos de atividade de xilanase e FPA, além da proteína total máxima obtida e a variação do pH ao longo do cultivo.

**Tabela 5** – Pico de atividades de FPA, xilanase, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para ensaios com variação da concentração de solução salina. (S > simples, sem aumento da concentração; D> dobro da concentração; P> pré-inóculo)

Meio	Pico de atividade de FPA (FPU/mL)	Pico de atividade de xilanase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	Variação de pH
BS, PS (BED 10)	1,38 ± 0,11	18,03 ± 1,56	0,81 ± 0,05	2,75 – 3,27
BD, PS	1,89 ± 0,12	108,04 ± 18,09	0,96 ± 0,03	3,9 – 5,59
BS, PD	1,65 ± 0,10	18,63 ± 2,54	0,91 ± 0,01	2,84 – 3,11
BD, PD	1,83 ± 0,25	111,97 ± 3,47	1,03 ± 0,08	4,16 – 5,75

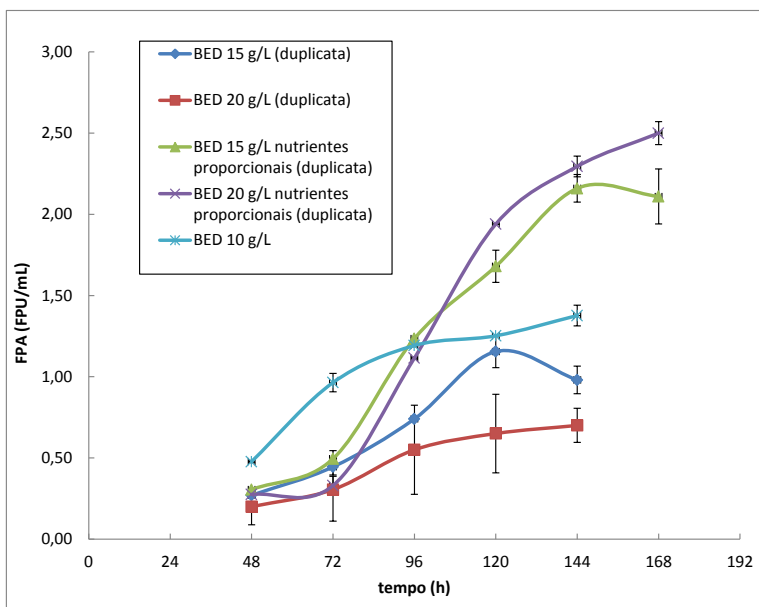
De forma geral, observou-se um efeito positivo do aumento de solução salina no meio de cultivo e/ou no pré-inóculo sobre a FPA (Figura 10). Em 120h de cultivo, os testes de Média (Scott-Knott e Duncan) revelaram diferença significativa a 90% de confiança entre as atividades FPA dos ensaios sem e com o dobro de solução de sais no meio de produção de enzimas, ou seja, não houve diferença significativa pelo aumento da concentração de solução de sais no pré-inóculo, mas somente no meio de produção de enzimas. Em 144h de cultivo, os testes de Médias revelaram diferença significativa entre o ensaio BED 10 (sem aumento da concentração de sais) e os demais, indicando haver um efeito positivo do aumento da solução de sais no meio em tempos maiores de cultivo.

O aumento da concentração de solução de sais no meio de produção enzimática teve efeito positivo sobre produção de proteínas totais (Tabela 5). Maior atividade de xilanases foi observada para os meios de cultivo com o dobro de solução salina, independentemente do pré-inóculo (Figura 11), estatisticamente comprovado pelos testes de Tukey, Scott-Knott e Duncan. Observou-se um efeito na atividade de xilanases em conjunto com a oscilação do pH, sendo que valores

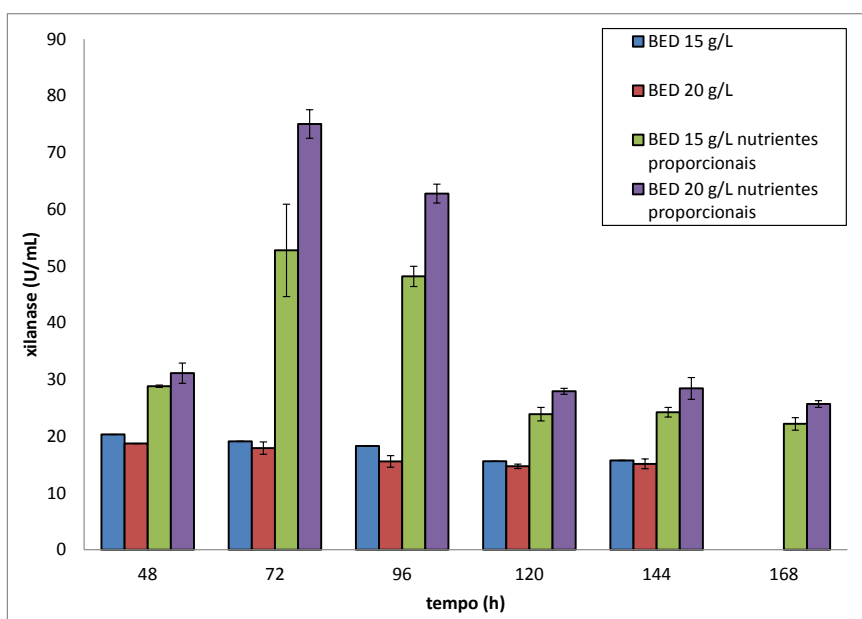
mais básicos de pH favoreceram a atividade dessas enzimas, atingindo picos de mais de 100 U/mL. De maneira similar aos experimentos de avaliação da fonte de carbono e dos suplementos (5.2.1 e 5.2.2), a atividade de xilanase parece sofrer maior influência do pH do que a FPA. Conforme Jun *et al.* (2011), a expressão de duas xilanases típicas de *Trichoderma reesei* ocorre em pH mais básicos, indo de acordo aos resultados observados. Há indicação de que o efeito da solução de sais sobre a produção enzimática estaria relacionado ao efeito tamponante observado quando se utiliza maior concentração da solução salina.

#### 5.2.4 Variação da concentração da fonte de carbono

A concentração da fonte de carbono foi avaliada em frascos agitados, com a finalidade de aumentar o título enzimático. Primeiramente, testou-se o aumento da concentração da fonte de carbono, mantendo os demais nutrientes constantes. Foram testadas as concentrações de bagaço explodido e deslignificado de 15 e 20g/L, e os resultados foram comparados ao ensaio com concentração padrão (10g/L). Em seguida, foram testados meios com o aumento dos nutrientes do meio de cultivo, assim como da concentração do pré-inóculo adicionada, visando manter constantes os valores das proporções entre os componentes do meio, da mesma forma que realizado pelo grupo de Reczey (1996). A composição completa dos meios utilizados é apresentada na Tabela 1 (números de referência 2 a 5). Os resultados de atividade celulolítica total e de xilanases são apresentados nas Figuras 12 e 13.



**Figura 12** – Efeito da variação da concentração da fonte de carbono sobre a produção de enzimas celulolíticas



**Figura 13** - Efeito da variação da concentração da fonte de carbono sobre a produção de xilanases ao longo do cultivo.

Os picos de atividade celulolítica e de xilanases são resumidos junto aos picos de produção de proteínas e oscilação do pH de cultivo para os meios testados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Pico de atividade celulolítica total, de xilanases, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para ensaios com variação da concentração da fonte de carbono e nutrientes

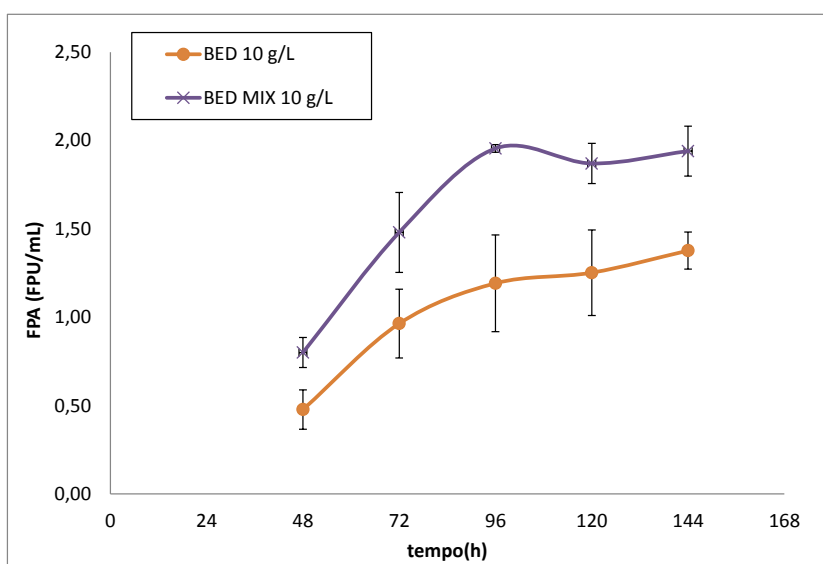
Meio	Pico de atividade de FPA (FPU/mL)	Pico de atividade de xilanase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	Varição de pH
BED 15 g/L	1,16 ± 0,04	20,30 ± 0,02	0,73 ± 0,02	2,75 – 3,05
BED 20 g/L	0,70 ± 0,13	18,70 ± 0,03	0,58 ± 0,01	2,54 – 2,97
BED 15 g/L + nutrientes proporcionais	2,16 ± 0,08	52,75 ± 8,13	1,08 ± 0,06	3,10 – 4,65
BED 20 g/L + nutrientes proporcionais	2,73 ± 0,09	75,04 ± 2,71	1,13 ± 0,08	3,16 – 5,4

O aumento da concentração da fonte de carbono e demais nutrientes do meio de cultivo teve efeito positivo sobre a produção de enzimas do complexo celulolítico. Observou-se uma diminuição da produção enzimática com o aumento da concentração da fonte de carbono, individualmente, de 10 para 15 e 20 g/L. No entanto, com o aumento proporcional dos demais nutrientes do meio de cultivo, observou-se aumento significativo da atividade celulolítica total a partir de 96h de cultivo (Figura 12). As atividades de xilanases (Figura 13) e o pico de produção de proteínas (Tabela 6) também foram superiores para os meios com concentração maior da fonte de carbono e dos demais nutrientes em conjunto. De maneira similar aos demais ensaios em frascos agitados, a produção de xilanases foi superior nos meios com pH mais elevado.

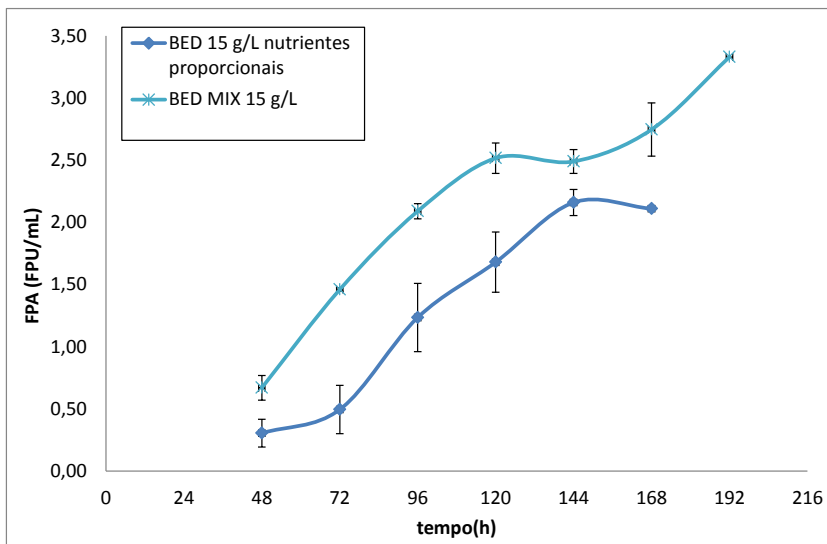
#### 5.2.5 Ensaio de mistura

A partir dos resultados obtidos em relação à avaliação da concentração da fonte de carbono, nutrientes e inóculo (5.2.4), solução de sais (5.2.3) e suplementos (5.2.2), foi realizado um experimento de mistura, empregando as

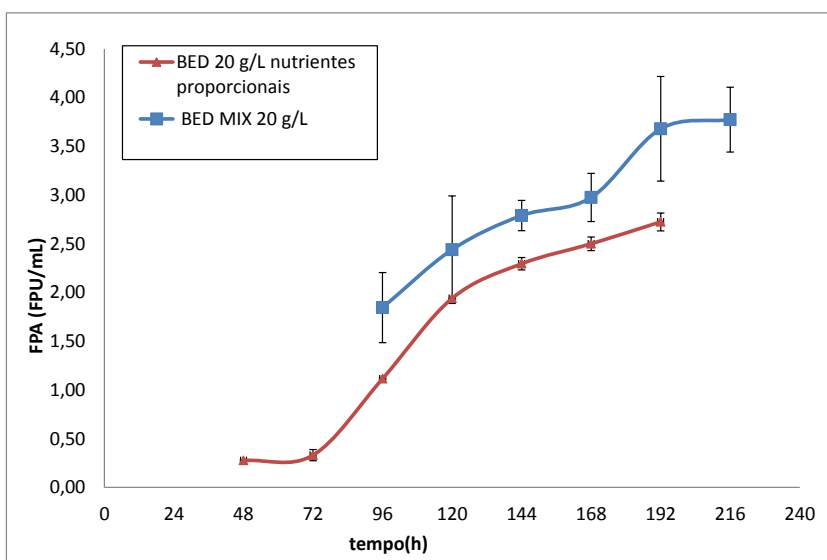
condições consideradas mais favoráveis à produção enzimática em conjunto, em variadas concentrações de teste. Para os experimentos de mistura, foi utilizado pré-inóculo contendo concentração dobrada de solução salina, bagaço explodido e deslignificado como fonte de carbono, farelo de soja e peptona como fontes de nitrogênio, tween 80, e solução salina com concentração dobrada. A composição completa dos meios é apresentada na Tabela 1 (meios MIX 10, MIX15, MIX 20 e MIX30, referências 7 a 10). Os resultados obtidos para atividade celulolítica total utilizando os meios MIX são apresentados nas figuras 14 a 17.



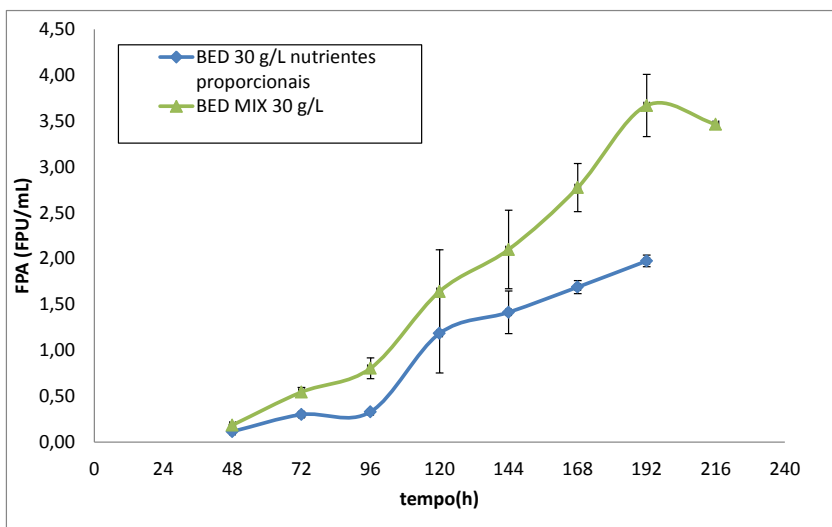
**Figura 14** – Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 10g/L) e o meio simples (BED 10 g/L)



**Figura 15** - Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 15 g/L) e o meio com 15 g/L de BED e nutrientes porporcionais



**Figura 16** - Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 20 g/L) e o meio com 20 g/L de BED e nutrientes porporcionais



**Figura 17** - Comparação dos perfis de produção de enzimas celulolíticas dos ensaios com o meio de mistura (MIX 30 g/L) e o meio com 30 g/L de BED e nutrientes proporcionais

Foi possível aumentar a produção de enzimas do complexo celulolítico (FPA) com ajuste do meio de cultivo empregando os meios de mistura MIX10, MIX15, MIX20 e MIX30 (Figuras 14 a 17). A produtividade, expressa em FPU/L.h, importante parâmetro na determinação do custo de produção de enzimas e consequentemente na cadeia de produção de etanol (PRADELLA, 2009) teve um acréscimo quando foram utilizados os meios de mistura. Valores de produtividade próximos de 20 FPU/L.h foram obtidos no emprego dos meios MIX10, MIX15 e MIX20, em 96h de cultivo, em comparação com os valores em torno de 12 FPU/L.h para BED10, BED15prop, BED20prop, no mesmo tempo de fermentação. Para o meio MIX30, a produtividade de 19 FPU/L.h foi atingida em 192 horas de cultivo, enquanto que o máximo obtido para o meio BED30prop foi de 10 FPU/L.h no mesmo tempo de cultivo.

Em 120h de cultivo os testes estatísticos aplicados (Tukey e Scott-Knott) não apontaram diferença significativa entre os valores das atividades FPA dos meios MIX 10, 15, 20 e 30. O meio MIX15 apresentou maior produtividade em 120h de cultivo, assim como maior conversão de substrato, e foi selecionado para ensaios de partida de fermentação em bioreator e para os ensaios de hidrólise de material pré-tratado.



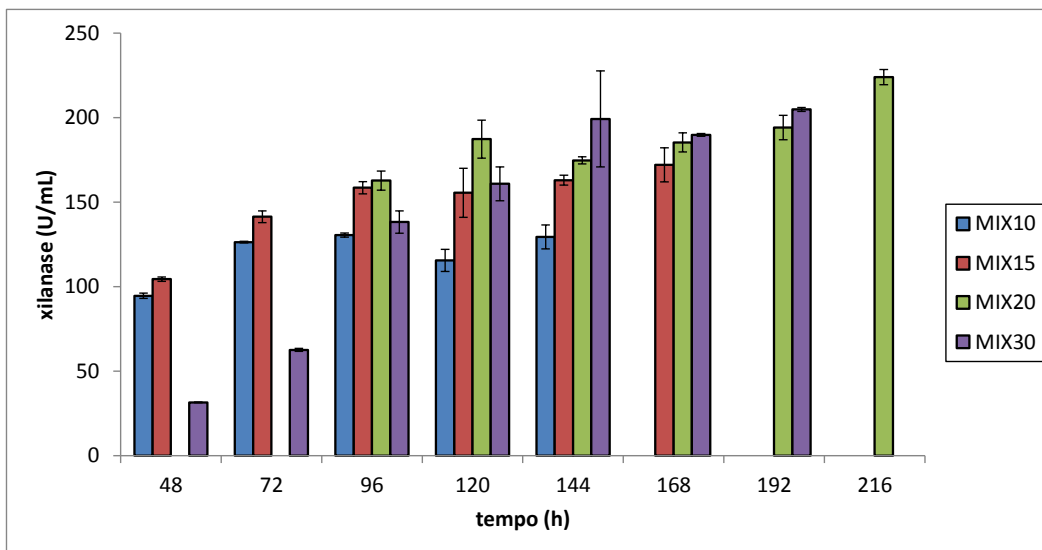
O aumento da concentração para 30 g/L (MIX30) não foi considerado favorável à produção enzimática. Apesar de a produção enzimática atingir um pico de mais de 3,5 FPU/mL com esse meio, a produção foi tardia, resultando em um impacto negativo sobre a produtividade.

Os resultados obtidos para atividade celulolítica total empregando os meios otimizados foram superiores aos obtidos por diversos autores que utilizaram meios de composição celulósica (Tabela 7). Foi possível melhorar a produtividade, atingindo valores expressivos de atividade em tempos menores de cultivo.

**Tabela 7** – Comparação da produção de enzimas celulolíticas e produtividade volumétrica entre trabalhos da literatura.

Fungo	Meio de cultivo e condições	pico de FPA (FPU/mL)	Produtividade volumétrica no pico de atividade (FPU/L.h)	conversão de substrato (FPU/g)	Referência
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 e <i>Aspergillus niger</i> (co-cultivo)	celulose e extrato de levedura, alimentação com lactose	7,1	59,17	142	Ahamed e vermette, 2008
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	celulose e extrato de levedura, alimentação com lactose	5,02	41,83	25,1	Ahamed e vermette, 2008
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	celulose	0,7	9,21	70	Bigelow e wyman 2002
<i>Trichoderma harzianum</i>	BED + sacarose	1,21	16,81	121	Delabona et al., 2012
<i>Trichoderma reesei</i> NCIM 1052	aguapé (planta aquática <i>Eichhornia crassipes</i> )	0,22	0,61	22	Deshpande et al. 2009
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	celulose, extrato de levedura e peptona	2,2	18,33	220	Domingues et al., 2000
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	palha de milho, glicose e sulfato de amônia	2,5	20,83	83,33	Fang et al., 2010
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	lactose, glicose e peptona (meio tamponado)	1,8	18,75	36	Ferreira et al., 2009
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	lactose, extrato de levedura e licor de milho	1,2	10	40	Gottschalk et al., 2010
<i>Trichoderma reesei</i> L27	celulose	10	59,52	200	Hayward et al. 2000
<i>Penicillium brasilianum</i>	salgueiro pré-tratado por explosão a vapor	0,59	3,58	16,48	Jorgensen e olsson, 2005
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	celulose, extrato de levedura e peptona (meio tamponado)	1,52	9,05	152	Juhasz et al., 2004
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	palha de milho pré-tratada por explosão a vapor	1,2	7,14	109,09	Juhaz et al. 2005
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	abeto pré-tratado por explosão a vapor e farelo de soja	0,53	5,52	35,33	Kovacs et al, 2009
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	xilose e celulose (batelada alimentada)	12,5	37,2	50	Mohagheghi et al. 1990
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	salgueiro pré-tratado por explosão a vapor	2,8	19,44	93,33	Reczey et al., 1996
<i>Penicillium echinulatum</i>	lactose e celulose	1,5	8,93	150	Sehnm et al., 2006
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	madeira pré-tratada por explosão a vapor	4,3	29,86	215	Shin et al. 2000
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	palha de milho pré-tratada por explosão a vapor	1,3	6,77	130	Sipos et al. 2010

A atividade de xilanases foi medida a cada 24 horas para os meios MIX10 a MIX30, e os resultados da produção ao longo do período de cultivo estudado são demonstrados na Figura18.



**Figura 18** - Produção de xilanases nos meios de mistura em concentrações variadas.

O emprego dos meios de mistura (MIX10 a MIX30) resultou em maiores atividades de xilanase (Figura18), atingindo valores entre 100 e mais de 200 U/mL, bastante superiores às atividades obtidas em relação aos meios iniciais não otimizados, como BED 10g/L. Para um nível de confiança de 90%, em 120 e 144 horas de cultivo, o teste de médias de Scott-Knott não revelou diferença significativa entre os valores de atividade de xilanase para os meios MIX10 a MIX30. Para os testes de Tukey e Duncan, em 120 horas de cultivo, os tratamentos MIX30 e MIX15 foram considerados iguais entre si, e houve diferença significativa entre os tratamentos MIX10 e MIX20. Em 144 horas de cultivo, os testes de Duncan e Tukey apontaram diferença significativa entre os ensaios MIX30 e MIX10, e o grupo com MIX15 e MIX20, dentro do qual não houve diferença significativa.

Os picos de atividades de celulases, xilanase, e beta-glucosidase, além da proteína total máxima do sobrenadante de centrifugação, e a variação de pH do

meio no período de cultivo estudado para os meios MIX são apresentados de maneira resumida na Tabela 8.

**Tabela 8** - Pico de atividade celulolítica total, de xilanases, proteína total máxima e variação do pH no período de cultivo estudado para ensaios de mistura.

Meio	Pico de atividade de FPA (FPU/mL)	Pico de atividade de xilanase (U/mL)	Pico de atividade de beta-glucosidase (U/mL)	Proteína total máxima* (mg/mL)	Varição de pH
MIX 10	1,94 ± 0,15	130,55 ± 1,25	1,38 ± 0,08	1,12 ± 0,06	5,18 – 5,93
MIX 15	3,33 ± 0,10	172,05 ± 10,12	1,76 ± 0,10	1,21 ± 0,01	4,96 – 6,0
MIX 20	3,78 ± 0,33	223,96 ± 4,52	2,52 ± 0,03	1,25 ± 0,01	5,38 – 5,7
MIX 30	3,67 ± 0,34	226,19 ± 18,38	3,13 ± 0,05	1,25 ± 0,04	5,56 – 6,5

\* O método de medida da proteína total não distingue as proteínas presentes no farelo de soja

Os meios de mistura (MIX10 a MIX30) apresentaram atividade de beta-glucosidase superior aos demais meios estudados (Tabela 8), o que provavelmente contribuiu de maneira positiva para aumentar os valores de FPA, visto que a enzima beta-glucosidase está envolvida no processo de fragmentação da celulose, convertendo a celobiose liberada em unidades de glicose. Parte do aumento é atribuído à oscilação do pH de cultivo em torno de valores mais favoráveis à atuação da enzima, superiores à 4,5. Quando o pH do meio de cultivo atinge valores inferiores à 3,0 (como em BED 10g/L), a atividade de beta-glucosidase deixa de ser detectada (MERCHEL *et al.*, 2011).

### 5.2.6 Painel enzimático

A parede celular da cana-de-açúcar apresenta, em sua composição, polissacarídeos como arabinoxilanos, betaglucanos, mananas e pectinas, com ramificações de arabinanos (SILVA, A. M., 2005). Muito embora após o pré-tratamento desse material a celulose seja o maior constituinte restante, e o foco de

atuação das celulases, enzimas de maior potencial econômico para o etanol de segunda geração, outras frações de polissacarídeos ainda podem ser encontradas. Dessa forma, enzimas denominadas acessórias podem ser produzidas no coquetel enzimático quando se utiliza bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Tais enzimas podem contribuir na hidrólise do material lignocelulósico, melhorando a acessibilidade da celulose pelas celulases (GOTTSHALK *et al.*, 2010). Com base na composição da parede celular da cana-de-açúcar foi realizado um painel de atividades enzimáticas para os complexos enzimáticos produzidos por *T. reesei* RUT-C30 nos meios BED 10 g/L e MIX15 g/L com a finalidade de estudar a presença de enzimas com capacidade de atuação sobre substratos comerciais variados. Os resultados foram expressos em termos de atividade (U/mL) e atividade específica (U/mg de proteína do coquetel), relativas a uma curva padrão de glicose (Tabela 9).

**Tabela 9** – Painel enzimático de atividades dos coquetéis produzidos nos meios BED 10 g/L e MIX 15 g/L em 120h de fermentação.

Substrato	atividade (U/mL)		atividade específica (U/mg proteína)	
	BED 10g/L	BED MIX 15g/L	BED 10g/L	BED MIX 15g/L
Avicel	0,43	0,35	0,55	0,35
Celulose microcristalina	0,28	0,44	0,36	0,44
Carboximetil celulose (Cmc)	0,57	0,70	0,73	0,69
Sigmacell	0,13	0,28	0,16	0,27
Açúcar de beterraba	0,00	0,01	0,00	0,01
Arabinogalactana de lariço ( <i>Larch arabinogalactan</i> )	0,00	0,00	0,00	0,00
Arabinana linear	0,00	0,02	0,00	0,02
Pectina	0,06	0,20	0,08	0,19
1-4-b-d-manana	0,43	3,31	0,55	3,26
Glucomanana	3,98	7,75	5,16	7,62
Amido de batata	0,01	0,17	0,01	0,17
Laminarina	0,01	1,92	0,02	1,89
Xiloglucana	3,84	4,69	4,99	4,61
Liquenana	8,60	9,76	11,16	9,59
Xilana de bétula ( <i>Birch wood xylan</i> )	4,37	6,01	5,68	5,91

Xilana de faia ( <i>Beechwood xylan</i> )	6,80	8,66	8,83	8,51
Galactomanana	0,60	5,81	0,78	5,71
B-glucano	10,39	11,45	13,49	11,25
Arabinana desramificada	0,00	0,07	0,01	0,07
Pnpx	3,50	1,53	4,55	1,51
Pnpa	0,62	1,24	0,80	1,22
Pnpc	1,00	2,87	1,30	2,82

Observou-se, de forma geral, um desempenho superior do coquetel enzimático produzido em meio MIX15 em relação ao meio B10, tanto em atividade global quanto em atividade específica. (Tabela 9). Os resultados do painel enzimático apontaram para a existência de uma quantidade maior de enzimas do complexo lignocelulolítico em MIX15.

Como esperado, em ambos os meios foi detectada atividade sobre os substratos baseados em celulose: avicel, celulose microcristalina, cmc e sigmacell, uma vez que é esperado que *T. reesei* expresse endoglucanases e celobiohidrolases quando cultivado em meios contendo celulose (como bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado). A atividade de MIX15 foi superior empregando p-nitrofenil-beta-D-celobiosídeo (pnpC) como substrato, indicando maior presença de exoglucanases nesse coquetel.

Não foi observada atividade relevante de nenhum dos coquetéis sobre os substratos: açúcar de beterraba, arabinogalactana, arabinana linear e arabinana desramificada, indicando a princípio não haver presença das enzimas que atuam sobre esse material (arabinofuranosidase e arabinase). A não indução dessas enzimas em ambos os meios poderia indicar que o material utilizado como fonte de carbono na fermentação (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado) não apresenta uma proporção de arabinanas capaz de provocar a indução enzimática. No entanto, em contrário a essa afirmação, foi detectada atividade sobre pnpA (4-nitrofenil-alfa-l-arabinofuranosídeo), substrato artificial para arabinofuranosidase. O fungo *T. reesei* é capaz de expressar arabinofuranosídeses (JUN *et al.*, 2011; SALOHEIMO E PAKULA, 2012). Provavelmente, houve expressão basal dessa

enzima, insuficiente para degradar substratos mais complexos como o açúcar de beterraba.

Observou-se maior diferença de atividades entre B10 e MIX15 nos substratos: 1-4-b-D-manana, glucomanana e galactomana. O meio MIX15 apresenta farelo de soja em sua composição, diferente do meio B10. O farelo de soja contém beta-mananas, polissacarídeos compostos de manose, galactose e glicose, que podem corresponder a até 2% de sua composição (OTT, 2005). A presença do farelo de soja no meio MIX15 pode ter induzido a produção de enzimas (manosídeses e mananases) que atuam sobre os substratos comerciais compostos por mananas.

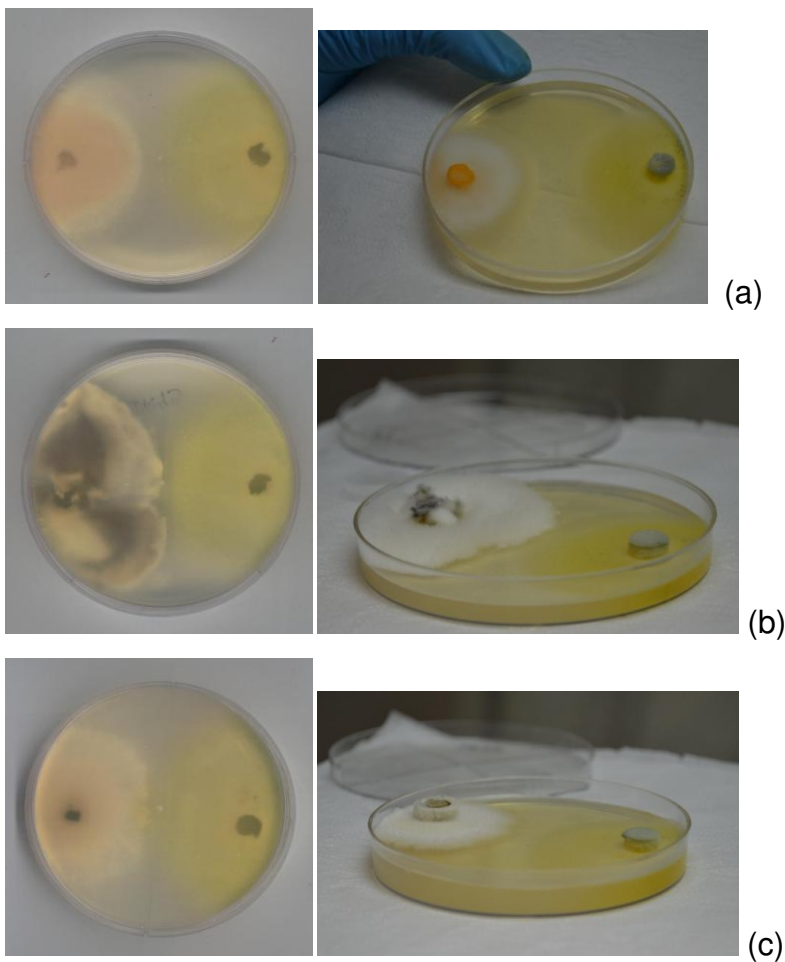
A atividade sobre laminarina também foi superior para o meio MIX15. A laminarina é um polissacarídeo formado principalmente por poli ( $\beta$ -Glc-[1  $\rightarrow$  3]) com algumas ligações intercadeias e pontos de ramificação do tipo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6), sendo substrato para a enzima laminarase (Fonte: Sigma-Aldrich). Beta-glucanases também podem atuar sobre esse substrato. Da mesma forma, observou-se atividade superior do coquetel MIX15 sobre liquenana ((1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ - e (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -polissacarídeo) e beta-glucano, sobre os quais são capazes de atuar as celulases.

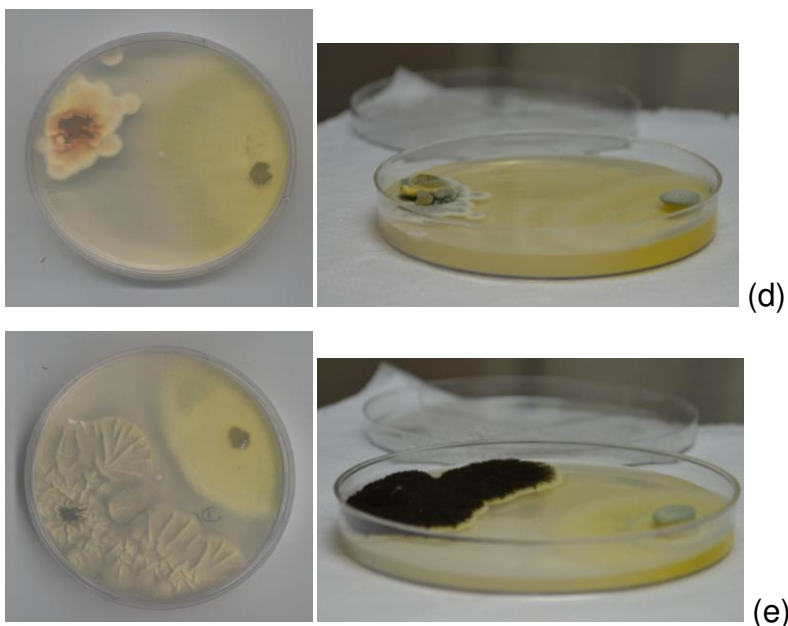
Em relação às enzimas acessórias, em ambos os coquetéis foi observada atividade de xilanases, xiloglucanases, e xilosídeses (substratos *beechwood* e *birchwood* xilanas, xiloglucana e pnpX, respectivamente), sendo que o resultado foi superior para o coquetel produzido em MIX15 para xilanases e xiloglucanases. Para o substrato pnpX, houve maior atividade no coquetel produzido em B10. Pectinase foi expressa em maior quantidade no coquetel produzido em MIX15, provavelmente pela presença de farelo de soja em sua composição, uma vez que esse substrato é rico em pectina, chegando a 10% (OTT, 2005).

### 5.2.7 Ensaio de co-cultivo

O co-cultivo é usado como alternativa na produção de enzimas celulolíticas por *T. reesei* dado sua conhecida baixa produção de beta-glucosidase (MA *et al.*,

2011; AHAMED e VERMETTE, 2008b). Tendo em vista esse fato, foram selecionadas cinco linhagens de fungos com potencial produção de beta-glucosidase a partir dos resultados obtidos por Robl *et al.* (2012) como candidatos potenciais para estudo de co-cultivo com *T. reesei* RUT-C30. Os fungos foram avaliados quanto à presença de halo de inibição por crescimento em placas contendo PDA, visando eliminar candidatos não compatíveis com *T. reesei* RUT-C30. Os resultados do crescimento em placas são demonstrados na Figura 19 (a-e).





**Figura 19** – Avaliação da presença de halo de inibição no cultivo em placas. Fotos de 72h de cultivo (direita), scanners do verso das colônias em 96h de cultivo (esquerda). *Trichoderma reesei* é apresentado do lado direito da placa. No lado esquerdo da placa: (a)- *Colletotrichum* sp DR20 (b)- *Alternaria* sp. DR45 (c)- *Annulohyphoxylon* sp. DR47 (d)- *Penicillium* sp. DR49 (e)- *Aspergillus niger* DR58. Créditos das fotos: Luis Gustavo Sandoval de Sousa (CTBE)

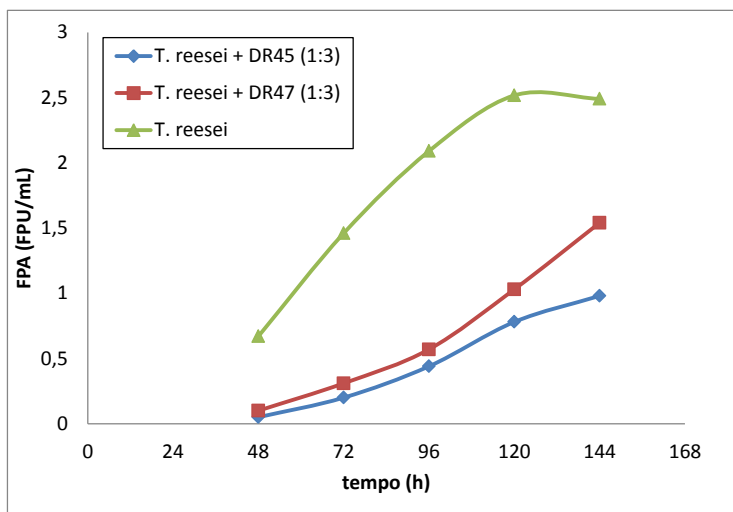
A avaliação visual da presença de halo de inibição em 72h, 96h e 144h de crescimento não apontou inibição entre nenhum dos fungos testados e o fungo *T. reesei*. Dessa forma, a seleção dos fungos para os ensaios de fermentação foi baseada em resultados obtidos por Robl *et al.* (2012) quanto à atividade de beta-glucosidase. Os ensaios de co-cultivo foram realizados com as cepas que apresentaram melhor desempenho, com menor quantidade de resultados na literatura: *Alternaria* sp. (DR45) e *Annulohyphoxylon* sp. (DR47). Os ensaios de fermentação foram realizados com o meio que apresentou melhores resultados de produção (MIX15) para o cultivo de *T. reesei* isoladamente. As proporções de inóculo foram variadas com base em trabalhos da literatura (GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999; AHAMED E VERMETTE, 2008; GARCIA-KIRCHNER *et al.*, 2002; YUSOFF *et al.*, 2000). Os picos de produção foram obtidos em 144h de cultivo, e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.



**Tabela 10** – Pico de produção enzimática e proteínas totais e pH do meio de cultivo para os ensaios de co-cultivo

Ensaio	Pico de FPA (FPU/mL)	Pico de xilanase (U/mL)	Pico de atividade de beta-glucosidase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	pH em 144h
Dr45 1:1	0,60	17,09	0,84	0,63	5,91
Dr45 1:2	0,77	22,92	1,16	0,81	5,96
Dr45 1:3	0,98	24,76	1,19	0,86	5,89
Dr 47 1:1	1,13	54,31	0,93	0,92	5,78
Dr47 1:2	1,31	53,49	0,90	0,92	5,98
Dr47 1:3	1,54	53,35	0,86	0,99	5,73

A Figura 20 mostra o perfil de produção de celulasas ao longo do tempo de cultivo estudado, para as melhores condições obtidas, em comparação ao cultivo de *T. reesei* isoladamente.



**Figura 20** – Perfil comparativo de produção de celulasas para o co-cultivo de *T. reesei* com DR45 e DR47 nas proporções 1:3 e o cultivo de *T. reesei* isoladamente em meio M15.

Para os ensaios de co-cultivo com os fungos testados, observou-se o aumento dos valores de atividade celulolítica total com o aumento da proporção de inóculo de *T. reesei* RUT-C30 (Tabela 10). Apesar do desempenho do ensaio com a linhagem DR47 ter sido superior ao ensaio com DR45, ambos foram significativamente inferiores ao resultado obtido cultivando-se o fungo *T. reesei* RUT-C30 sozinho no mesmo meio de produção (Figura 20). Nos cultivos com a linhagem DR47 houve formação intensa de espuma no meio, o que poderia ser responsável pelo efeito negativo de carreamento de proteínas, as quais não estariam sendo detectadas nos ensaios enzimáticos. Também foi verificado um pH inicial elevado em todos os ensaios de co-cultivo, o que poderia prejudicar a produção de enzimas de interesse nesse sistema.

Diversos autores (AHAMED e VERMETTE, 2008; GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999) obtiveram aumento dos valores de atividade celulolítica ao empregar o sistema de co-cultivo de *T. reesei* e fungos do gênero *Aspergillus*. Wei *et al.* (1992) obteve um aumento significativo da produção de beta-glucosidase ao empregar co-cultivo de *T. reesei* QM9414 e *Hypoxylon stygium*. Para os fungos e para as condições utilizadas nos experimentos, no entanto, o sistema de co-cultivo não se mostrou vantajoso.

### **5.3 Produção enzimática em bioreator**

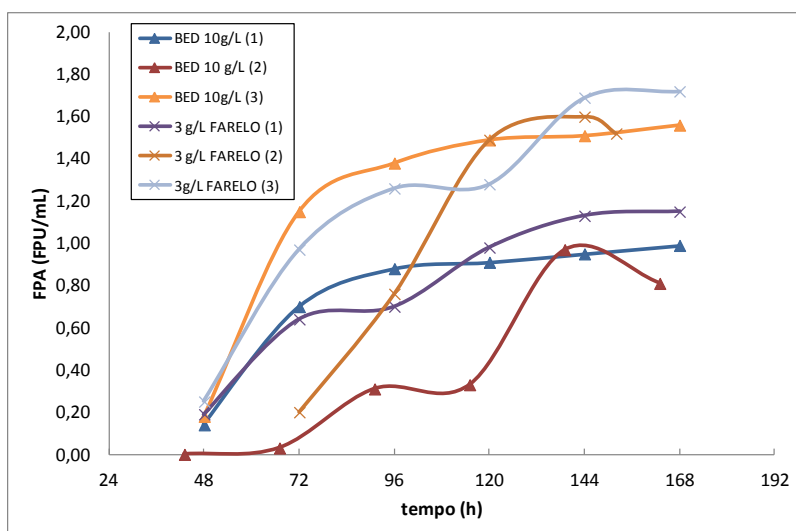
#### **5.3.1 Considerações preliminares**

Ao longo da condução dos experimentos para a dissertação de Mestrado, foram preparados 37 ensaios em bioreator Bioflo 115 e 3 ensaios em bioreator Biostat Q plus. Apesar do grande número de ensaios preparados, parte desses foi descartada e não foi considerada para fins de análise, por problemas diversos ocorridos ao longo dos experimentos, tais como contaminação inicial (autoclavagem ineficiente), contaminação posterior (durante as etapas de inóculo ou retirada de amostra), queda de energia por período prolongado, ou problemas diversos na condução do ensaio (agitação insuficiente, problemas no fornecimento

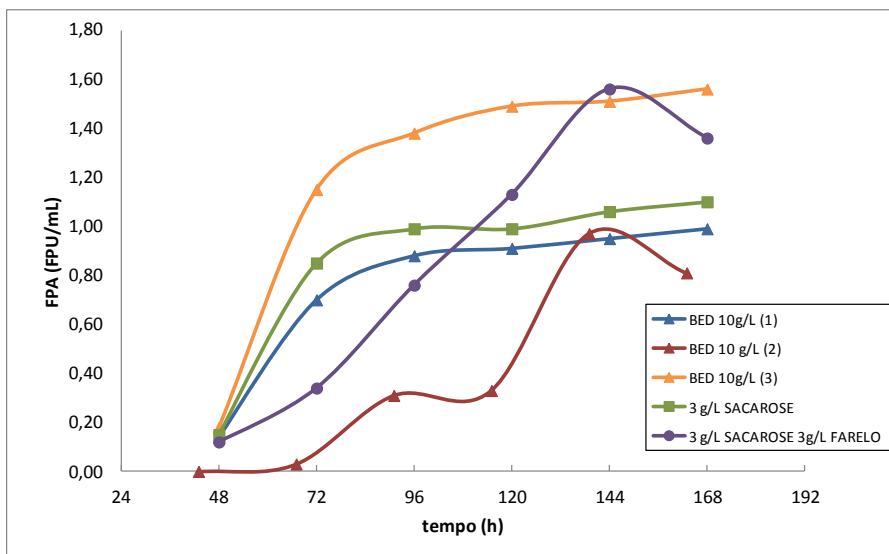
de ar comprimido). O monitoramento de contaminação foi realizado por microscopia óptica, ao longo do cultivo, e as quedas de energia puderam ser acompanhadas pelo sistema informatizado de captura de dados acoplado ao reator Bioflo115 (programa BioCommand).

### 5.3.2 Suplementação da fonte de carbono

O efeito da suplementação do meio contendo bagaço explodido e designificado (BED) com farelo de soja e sacarose foi estudado em bioreator. Utilizou-se o meio padrão testado em frascos agitados, contendo 10g/L de BED, peptona como fonte de nitrogênio principal, tween 80 e solução salina, suplementado com 1,5 ou 3 g/L farelo de soja e sacarose. Os resultados para o perfil de produção de celulases, em FPU/mL, ao longo do tempo, são demonstrados nas Figuras 21 e 22.



**Figura 21**– Perfil enzimático de produção de enzimas celulolíticas (FPA) ao longo do tempo de cultivo para os ensaios de reator utilizando BED 10g/L como fonte de carbono, com e sem adição de farelo de soja (3g/L)



**Figura 22-** Perfil enzimático de produção de enzimas celulolíticas (FPA) ao longo do tempo de cultivo para os ensaios de reator utilizando BED 10g/L como fonte de carbono, com e sem adição de farelo de soja e sacarose.

Observou-se não haver efeito expressivo sobre a atividade celulolítica total pela adição de farelo de soja e sacarose, separada ou conjuntamente ao meio de fermentação em bioreator, nas concentrações estudadas. Os valores de FPA sofreram grande oscilação entre ensaios, dessa forma, os resultados não foram apresentados como médias, mas sim como os valores reais obtidos. As possíveis razões para a oscilação dos dados no bioreator são apresentadas nas considerações finais (item 5.3.4).

A Tabela 11 mostra os picos de atividade celulolítica total, de xilanases e beta-glucosidase, e o máximo de proteína total do sobrenadante de centrifugação obtidos para os ensaios de produção enzimática em bioreator.

**Tabela 11** – Picos das atividades celulolítica total (FPA), de xilanases, beta-glucosidase e proteína total para os ensaios de avaliação da suplementação em bioreator.

Ensaio	Pico de FPA (FPU/mL)	Pico de xilanase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	Pico de beta-glucosidase (U/mL)
BED 10g/L (1)	0,99 (168h)	111,04 (144 h)	0,87 (144 h)	0,37 (96 h)
BED 10 g/L (2)	0,97 (144h)	124,46 (144 h)	1,16 (144 h)	0,30 (168 h)

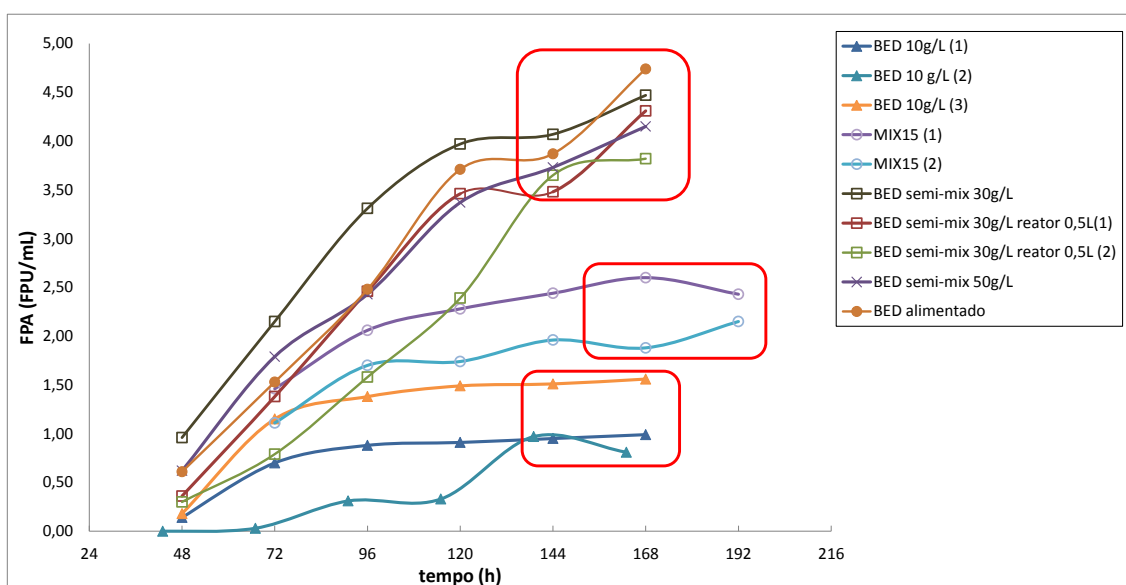
BED 10g/L (3)	1,56 (168h)	196,20 (144h)	1,27 (120h)	0,76 (120h)
+ sacarose 3g/L	1,10 (168h)	69,72 (144 h)	0,82 (144 h)	0,46 (96 h)
+ farelo de soja 3g/L (1)	1,15 (168h)	108,56 (96 h)	0,72 (144 h)	0,28 (168 h)
+ farelo de soja 3g/L (2)	1,60 (144h)	165,81 (144 h)	1,04 (144 h)	1,35 (168 h)
+ farelo de soja 3g/L (3)	1,72 (168h)	188,31 (96h)	1,26 (168h)	0,76 (120h)
+farelo de soja+sacarose 3g/L	1,56 (144h)	148,35 (144 h)	1,04 (144 h)	0,55 (168 h)

Observaram-se valores de atividade de xilanases superiores para os ensaios de reator (Tabela 11) em relação aos ensaios em frascos agitados. Tal fato foi atribuído ao controle de pH do sistema de fermentação em biorreatores, que impede que o pH atinja valores ácidos prejudiciais para a atividade das enzimas. Menor valor de atividade de xilanases foi observado para o ensaio com adição de sacarose. Para os demais, o pico de atividade oscilou entre 108 e 196 U/mL. O pico de atividade de beta-glucosidase oscilou entre 0,28 e 1,35 U/mL nos ensaios com e sem suplementação da fonte de carbono.

### 5.3.3 Ensaio de mistura (MIX)

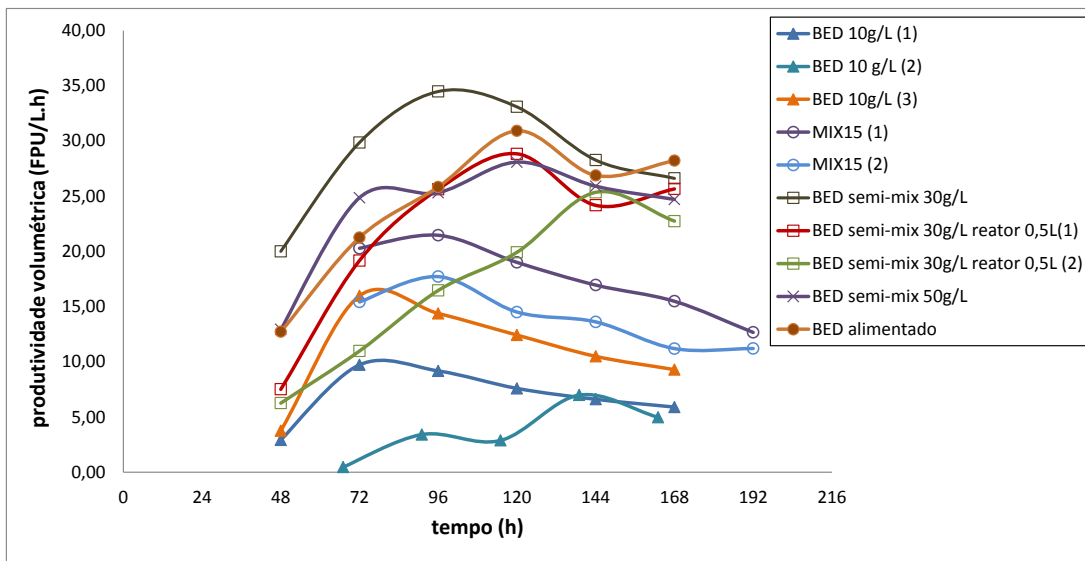
O meio otimizado em frascos agitados (MIX15), contendo bagaço explodido e deslignificado (BED) na concentração de 15g/L, além de peptona (1,5g/L), tween 80 (0,15%), farelo de soja (3g/L) e solução salina, foi testado em bioreator Bioflo115 de 3L, contendo 1L de volume de meio. Também foram testados em bioreator o aumento da fonte de carbono a partir do meio MIX15, para 30 g/L (SemiMIX30) e 50g/L (SemiMIX50). O meio semiMIX 30g/L foi testado posteriormente em um sistema de bioreator de volume menor (Biostat Q plus; Sartorius Stedim Biotech), para avaliar a reprodutibilidade dos valores e a

possibilidade de emprego de alta carga de sólidos nesse sistema. O volume desse bioreator é similar ao utilizado em frascos agitados, no entanto, o controle de pH é possível pela adição automática de ácido e base, e a construção é similar ao bioreator Bioflo115, no entanto a chicana está ausente. Em biorreator de 3L total também se estudou o sistema de batelada alimentada, partindo-se do meio SemiMIX30 até 50 g/L total de BED. Os resultados do perfil de produção de enzimas celulolíticas para os meios citados no tempo de cultivo estudado são apresentados em comparação ao meio padrão (BED 10g/L) na Figura 23.



**Figura 23** – Perfil de produção de enzimas celulolíticas em bioreator com variação do meio de cultivo. Resultados similares são demarcados nos retângulos.

A Figura 24 mostra o perfil obtido para produtividade volumétrica (expresso em FPU/L.h) para os ensaios de mistura e para o ensaio padrão.



**Figura 24** – Produtividade volumétrica para os ensaios em bioreator.

O emprego do meio de mistura MIX15 em bioreator possibilitou o aumento da atividade celulolítica total (FPA) em relação ao meio padrão (BED 10g/L), também testado em bioreator (Figura 23). No entanto, os valores obtidos foram inferiores aos observados nos ensaios em frascos agitados (item 5.2.5). Valores superiores de produtividade em relação aos ensaios com o meio não otimizado também foram obtidos (Figura 24), de maneira similar ao observado nos ensaios em frascos agitados. O aumento da fonte de carbono isoladamente, no caso do ensaio em bioreator, de 15g/L para 30 g/L teve efeito positivo sobre a atividade enzimática, diferente do observado para os ensaios em frascos agitados, em que o aumento da fonte de carbono foi benéfico apenas quando acompanhado pelo aumento dos demais nutrientes do meio de cultivo (item 5.2.4). Valores próximos de 4 FPU/mL foram obtidos para os ensaios com 30 e 50 g/L da fonte de carbono, sendo que os valores foram ligeiramente menores para a maior concentração. No caso da concentração de 50 g/L, houve deposição de bagaço no fundo e laterais do reator, em especial nos primeiros dias de cultivo, devido à alta concentração de sólidos. Concluiu-se que para o reator e sistema de agitação utilizados, concentrações de sólidos superiores a 30g/L em sistema de batelada simples não são indicadas, pois resultam na presença de grandes áreas heterogêneas de depósito de sólidos no interior do reator. Para concentrações elevadas, o sistema

de batelada alimentada é mais indicado, pois nesse caso, a adição de carbono acompanha o crescimento e consumo pelo microrganismo, evitando áreas de acúmulo de sólidos no reator.

Uma vez que o ensaio com 50 g/L de fonte de carbono não permitiu a homogeneização do meio, resultando em depósito de material no reator, estudou-se o sistema de batelada alimentada partindo-se de 30 g/L (SemiMIX30) até 50 g/L total, com quatro adições de sólidos. No sistema de batelada alimentada não foi observado depósito de material no reator. A FPA máxima obtida foi 4,74 U/mL, superior aos demais ensaios. No entanto, tal atividade foi alcançada somente em 168h de cultivo, e os valores de produtividade e conversão de substrato para esse sistema não foram superiores, indicando não haver vantagem na utilização de cargas de sólidos maiores que 30 g/L, independente do sistema utilizado (batelada ou batelada alimentada). Também é possível que parte das enzimas produzidas tenha adsorvido no bagaço de cana adicionado residual, não sendo detectada nos ensaios de atividade.

A Tabela 12 mostra os picos de atividade celulolítica total, de xilanases e beta-glucosidase, e o máximo de proteína total do sobrenadante de centrifugação obtidos para os ensaios de reator empregando os meios de mistura.

**Tabela 12** – Picos das atividades celulolítica total (FPA), de xilanases, beta-glucosidase e proteína total para os ensaios de avaliação do meio otimizado em bioreator.

Ensaio	Pico de FPA (FPU/mL)	Pico de xilanase (U/mL)	Proteína total máxima (mg/mL)	Pico de beta-glucosidase (U/mL)
MIX15 (1)	2,60 (168h)	190,57 (144 h)	1,13 (192 h)	1,55 (192 h)
MIX15 (2)	2,15 (192h)	181,04 (168 h)	1,21 (168 h)	1,73 (192 h)
SemiMIX30	4,47 (168h)	237,78 (168h)	1,27 (120h)	2,34 (168h)
SemiMIX30 reator 0,5L (1)	4,31 (168h)	247,67 (168h)	1,31 (192h)	1,88 (168h)
semiMIX30 reator 0,5L (2)	3,82 (168h)	251,47 (168h)	1,28 (168h)	2,44 (168h)



SemiMIX50	4,15 (168h)	252,50 (168h)	1,26 (168h)	2,06 (168h)
BED alimentado	4,74 (168h)	331,92 (144h)	1,40 (144h)	2,69 (144h)

A otimização do meio de cultivo resultou em uma maior produção de xilanases, beta-glucosidase e proteínas totais conjuntamente com a maior produção de enzimas celulolíticas (Tabela 12). Atividades de xilanase superiores a 200 U/mL puderam ser obtidas para os meios SemiMIX30 e SemiMIX50 em bioreator. No sistema de batelada alimentada, a atividade de xilanases atingiu mais de 300 U/mL. Para beta-glucosidase, valores superiores a 2 U/mL foram obtidos.

#### 5.3.4 Considerações finais sobre os ensaios de bioreator

Observou-se uma grande oscilação nos valores obtidos para as atividades enzimáticas e produção de proteínas entre replicatas dos experimentos conduzidos em bioreator, em muitos casos superiores à oscilação observada para os ensaios conduzidos em frascos agitados. A oscilação dos dados nos ensaios de reator foi atribuída às características particulares dos experimentos realizados. Todas as fermentações foram conduzidas com material particulado (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, farelo de soja, etc.), que foi mantido em suspensão no meio de cultivo pela agitação contínua do bioreator. O crescimento do fungo filamentosso *Trichoderma reesei* ocorre provavelmente de forma aderida a essas partículas, formando biofilmes. Na natureza, o crescimento de fungos filamentosos ocorre de forma geral sobre superfícies sólidas (SINGHANIA *et al.*, 2010), o que justifica o número crescente de trabalhos empregando fermentação no estado sólido para produção de enzimas e outros bioprodutos por fungos filamentosos. A fermentação sólida, apesar de apresentar a vantagem óbvia de mimetizar o ambiente natural do fungo, podendo resultar em altos valores de produtividade volumétrica (GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999; SINGHANIA *et al.*, 2010; CHAHAL, 1985) não é facilmente escalonável, e poucos projetos em escala industrial podem ser observados, pelas dificuldades operacionais e de controle.

(GUTIERREZ-CORREA et al., 1999). Na fermentação submersa, se houver aderência do material particulado ao bioreator, haverá crescimento do fungo sobre essa superfície, resultando em áreas localizadas heterogêneas, onde pode existir gradientes de concentração, pH e principalmente disponibilidade de oxigênio. Além disso, tais áreas podem reter o produto desejado (enzimas), o que resultaria em uma oscilação observada nos dados entre replicatas de experimentos. No bioreator utilizado observou-se certa aderência do material em determinadas áreas, em especial ao redor da chicana e próximo aos sensores. A aderência do fungo sobre esse material foi observada principalmente nos primeiros dias de cultivo, quando a concentração de material particulado é maior. Parte desse problema foi minimizado pela mistura manual do material, com a agitação do vaso para desprendimento do fungo e do material aderido sempre que era observada a aderência. Em reatores de escala piloto e industrial, a razão volume do reator/área de paredes e sensores é maior do que a observada para reatores de escala de laboratório, e o efeito de aderência provavelmente não tem implicações tão significativas. Para trabalhos em escala de laboratório, no entanto, a construção do bioreator pode ser prejudicial para a captura de dados reprodutíveis em especial ao se utilizar como substrato material particulado em altas concentrações.

## **5.4 Hidrólise enzimática**

### **5.4.1 Cálculos de conversão**

Ensaio de hidrólise enzimática foram realizados para estudar a variação da concentração de sólidos no processo e o comportamento do material pré-tratado, além de avaliar o desempenho do coquetel enzimático produzido em comparação com enzimas comerciais produzidas a partir de *T. reesei*. A adição de beta-glucosidase comercial foi estudada uma vez que é conhecido que o complexo enzimático produzido por *T. reesei* é carente dessa enzima (ZHANG, et al., 2010).

A conversão de celulose em glicose foi calculada tendo em vista a umidade do bagaço determinada em balança de umidade por infravermelho Sartorius

modelo MA 35 (BED foi submetido à secagem à temperatura ambiente após o pré-tratamento, e BH foi armazenado úmido em geladeira), segundo as Equações 1 e 2:

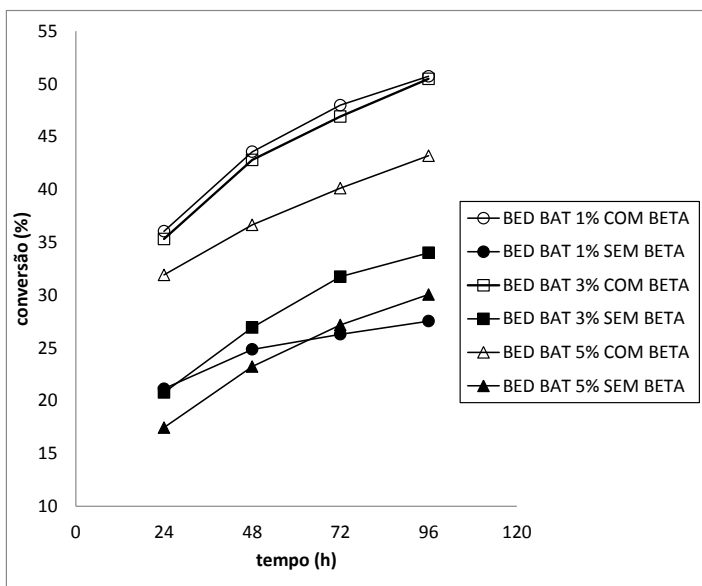
$$\text{conversão} = \frac{[\text{açúcar real}]}{[\text{açúcar teórico}]} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$[\text{açúcar teórico}] = \frac{\frac{\text{massa de bagaço pretratado seco}}{\text{volume de reação}} * \text{celulose em \%}}{0,9} \quad \text{Equação 2}$$

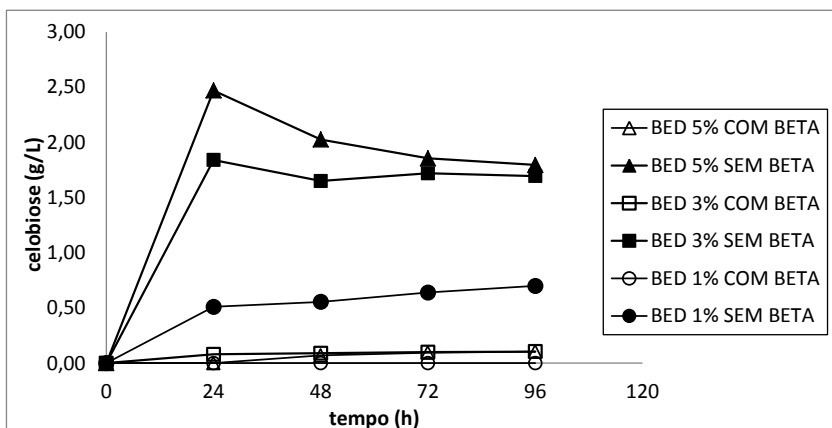
O valor de 0,9 na Equação 2 corresponde ao fator de conversão aproximado de celulose em glicose.

#### 5.4.2 Ensaio preliminares com coquetéis enzimáticos comerciais

Foram realizados ensaios preliminares para avaliar a concentração de sólidos, adição de beta-glucosidase e umidade do bagaço, utilizando o coquetel enzimático de *T. reesei* comercialmente disponível. Para o bagaço deslignificado (BED) foram estudadas concentrações de 1%, 3% e 5%. Os resultados são demonstrados nas Figuras 25 e 26.



**Figura 25** – Avaliação do efeito da adição de beta-glucosidase e concentração de sólidos (1, 3 e 5%) usando enzimas comerciais e bagaço explodido e deslignificado (BED) em sistema de batelada. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 8%.



**Figura 26** – Efeito da adição de beta-glucosidase sobre o coquetel enzimático comercial em concentrações variadas (1, 3 e 5%) de bagaço explodido e deslignificado.

Para o coquetel enzimático testado, observou-se maior conversão para concentração de sólidos de 3% (Figura 25). Ao se adicionar beta-glucosidase comercial, os valores de conversão para 1% e 3% foram similares. Observou-se um efeito considerável de aumento da conversão pela adição de beta-glucosidase na hidrólise, como era esperado, uma vez que o complexo enzimático produzido

por *T. reesei* é carente dessa enzima (ZHANG, *et al.*, 2010) importante na conversão final de celobiose em glicose, como pode ser observado na Figura 26.

Diferente de BH, o material BED sofreu secagem e foi estocado por um período longo, resultando em alteração em sua composição (o teor de celulose original em torno de 89% caiu para um valor aproximado de 77%). Assume-se que pode ter havido também alteração na estrutura das fibras, o que comprometeria os resultados de hidrólise e rendimento. Sathitsuksanoh *et al.* (2011) observaram em seus experimentos que dependendo do método de secagem utilizado, o rendimento de hidrólise era muito prejudicado, com redução maior que 25%. A secagem pode resultar no colapso da estrutura do material (SATHITSUKSANOH *et al.*, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2010) e redução da área superficial (GRETHLEIN, 1985). Por esse motivo, a umidade do bagaço foi estudada para BED.

Para a concentração de 5% de sólidos, utilizando enzimas comerciais, estudou-se o efeito da umidade sobre a hidrólise, uma vez que o material BED foi seco após o pré-tratamento e BH não foi submetido à secagem. Para isso, BED foi mantido durante sete dias em contato com tampão citrato 50 mM, pH 4,8 e a hidrólise desse material foi comparada com BED misturado ao tampão somente no momento da hidrólise. Simultaneamente, foi estudada a adição de beta-glucosidase à hidrólise. Para esse estudo, foram usadas enzimas comerciais. Os dados foram submetidos à análise estatística usando o programa Statistica, e verificou-se que ambas as variáveis foram consideradas significativas a 90 e 95% de confiança, no entanto, somente a adição de beta-glucosidase foi considerada significativa a 99% de confiança. (Figura 27).

Effect Estimates; Var.:DV\_1; R-sqr=,98463; Adj:,9731 (Design2.sta)  
 2\*\*(2-0) design; MS Pure Error=,289525  
 DV: DV\_1

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(4)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	16,51500	0,190238	86,81215	0,000000	16,10944	16,92056	16,51500	0,190238	16,10944	16,92056
(1)umidade	1,50000	0,380477	3,94242	0,016925	0,68888	2,31112	0,75000	0,190238	0,34444	1,15556
(2)beta	5,85500	0,380477	15,38859	0,000104	5,04388	6,66612	2,92750	0,190238	2,52194	3,33306
1 by 2	0,74500	0,380477	1,95807	0,121824	-0,06612	1,55612	0,37250	0,190238	-0,03306	0,77806

**Figura 27** – Análise estatística dos efeitos usando Statistica: adição de beta-glucosidase e umidade do bagaço para hidrólise de BED com 5% de sólidos. O intervalo de confiança de 90% é usado como exemplo.

#### 5.4.3 Desempenho dos coquetéis enzimáticos produzidos por fermentação

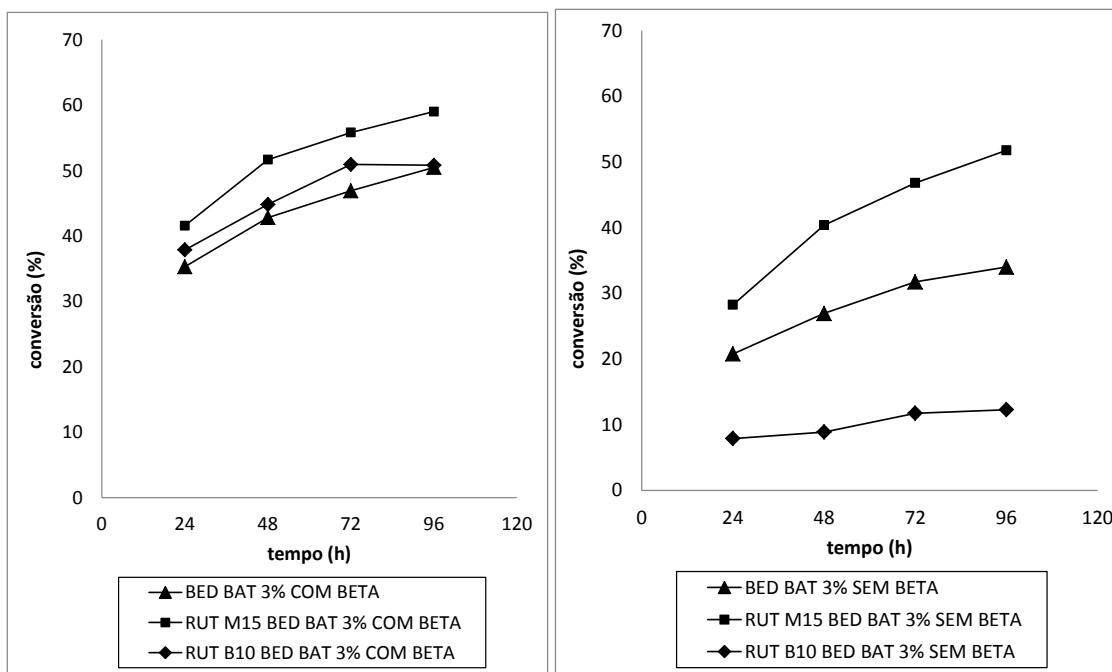
Os coquetéis enzimáticos produzidos utilizando os meios BED 10 g/L e MIX 15 g/L (referências 1 e 8 da Tabela 1, respectivamente) foram testados quanto ao seu desempenho na hidrólise de bagaço explodido e deslignificado (BED) e bagaço hidrotérmico (BH), e comparados ao coquetel enzimático de *T. reesei* comercialmente disponível (Sigma). Para todos os ensaios foi utilizada uma carga enzimática comum de 10 FPU/g sólidos. Os estudos foram realizados com e sem a adição de beta-glucosidase. A Tabela 13 mostra a proporção relativa aproximada das atividades dos coquetéis em relação à atividade de FPA.

**Tabela 13** – Atividades relativas típicas dos coquetéis enzimáticos testados na hidrólise

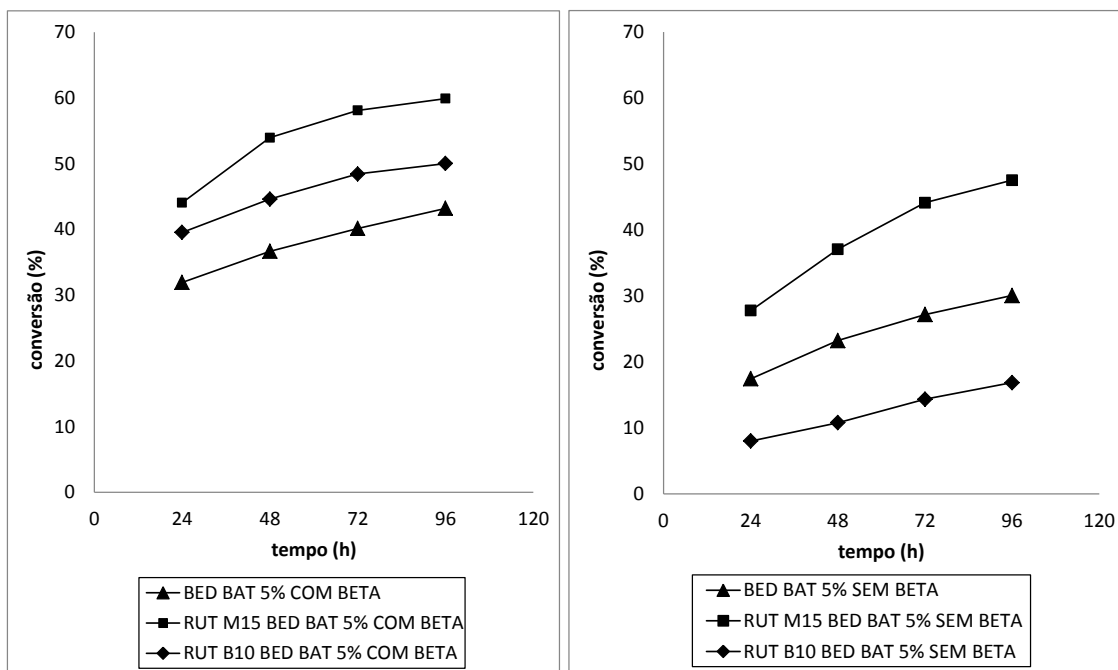
Coquetel enzimático	Xilanase/FPA (U/FPU)	Beta-glucosidase/FPA (U/FPU)
Sigma	5,79	0,88
B10	12,63	0,03
M15	60,00	1,10
M15 FH	65,40	0,96

Embora tenha sido observada uma queda na conversão com o aumento de 3% para 5% de sólidos usando enzimas comerciais (Figura 25), foram realizados estudos com os coquetéis enzimáticos obtidos por fermentação empregando concentrações de sólidos a partir de 3%, uma vez que concentrações de sólidos maiores e cargas enzimáticas menores, aliadas a baixos tempos de hidrólise são necessários para tornar o processo economicamente viável. Alguns trabalhos sugerem cargas de 5 FPU/g, 20% de sólidos e conversão de 70% em cinco dias de hidrólise como meta para redução expressiva de custos do processo (KLEIN-MARCUSSCHAMER, et al., 2011). Segundo Pradella *et al.* (2009), há necessidade de aplicação de baixas cargas enzimáticas, inferiores a 15 FPU/g, para viabilização do processo de produção de etanol de segunda geração.

Os resultados para liberação de glicose na hidrólise enzimática para os coquetéis enzimáticos são apresentados em comparação ao coquetel enzimático comercial nas Figuras 28 e 29.



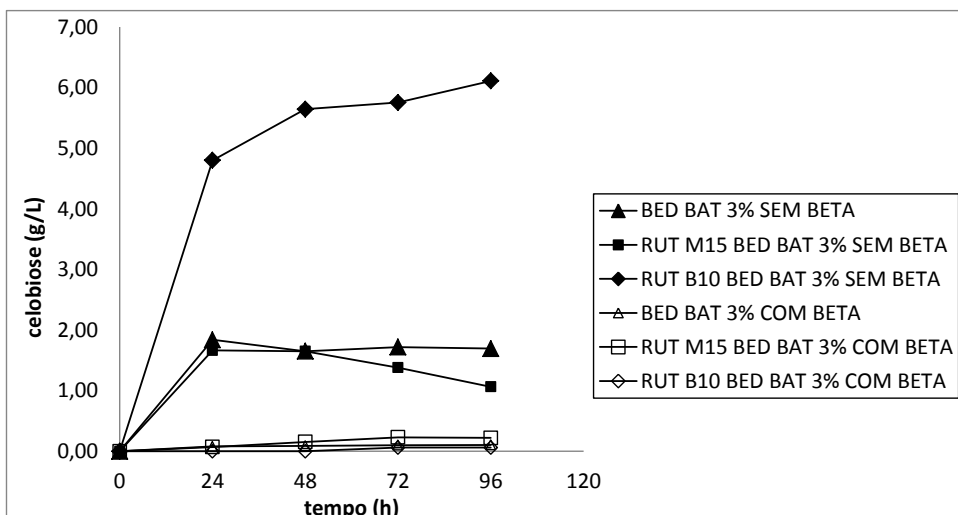
**Figura 28** – Comparação do desempenho da hidrólise de BED (3% de sólidos) utilizando coquetel enzimático comercial (BED BAT) e coquetéis obtidos por fermentação (RUT M15 e RUT B10) com e sem adição de beta-glicosidase comercial. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 6%.



**Figura 29** – Comparação do desempenho da hidrólise de BED (5% de sólidos) utilizando coquetel enzimático comercial (BED BAT) e coquetéis obtidos por fermentação (RUT M15 e RUT B10) com e sem adição de beta-glucosidase comercial. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 8%.

Para concentração de sólidos de 3% e 5% observou-se um desempenho na hidrólise significativamente superior para o coquetel enzimático obtido com o meio otimizado MIX 15 g/L. (Figuras 28 e 29). O desempenho do coquetel B10, produzido em meio não otimizado, por outro lado, foi inferior ao coquetel comercial, sem a adição de beta-glucosidase. O desempenho de todos os coquetéis foi favorecido pela adição de beta-glucosidase, sendo que para o coquetel B10 (produzido com o meio BED 10g/L), a adição de beta-glucosidase resultou em melhora expressiva e desempenho superior ao coquetel enzimático comercial, indicando haver carência dessa enzima em B10. Tal resultado condiz com as medidas de atividade de beta-glucosidase ao longo da fermentação e composição do coquetel por *Trichoderma reseei* no meio BED 10 g/L (Tabela 13). A carência de beta-glucosidase no coquetel B10 resultou em maior acúmulo de celobiose durante a hidrólise quando comparado aos demais coquetéis, como pode ser observado na Figura 30.

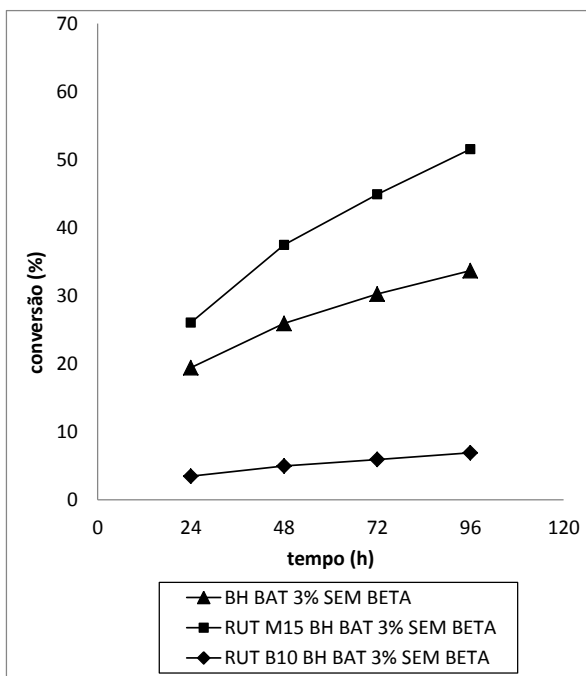




**Figura 30** – Influência da presença de beta-glicosidases na hidrólise enzimática.

O acúmulo de celobiose na hidrólise enzimática com o coquetel B10 sem adição de beta-glicosidase comercial (Figura 30) foi observado em todas as condições de hidrólise testadas (BED 3 e 5% e BH 3%). Até 7,58 g/L de celobiose residual foram observados ao se utilizar esse coquetel. A adição de beta-glicosidase comercial foi suficiente para reduzir a celobiose residual para valores inferiores à 0,6 g/L para todos os coquetéis testados.

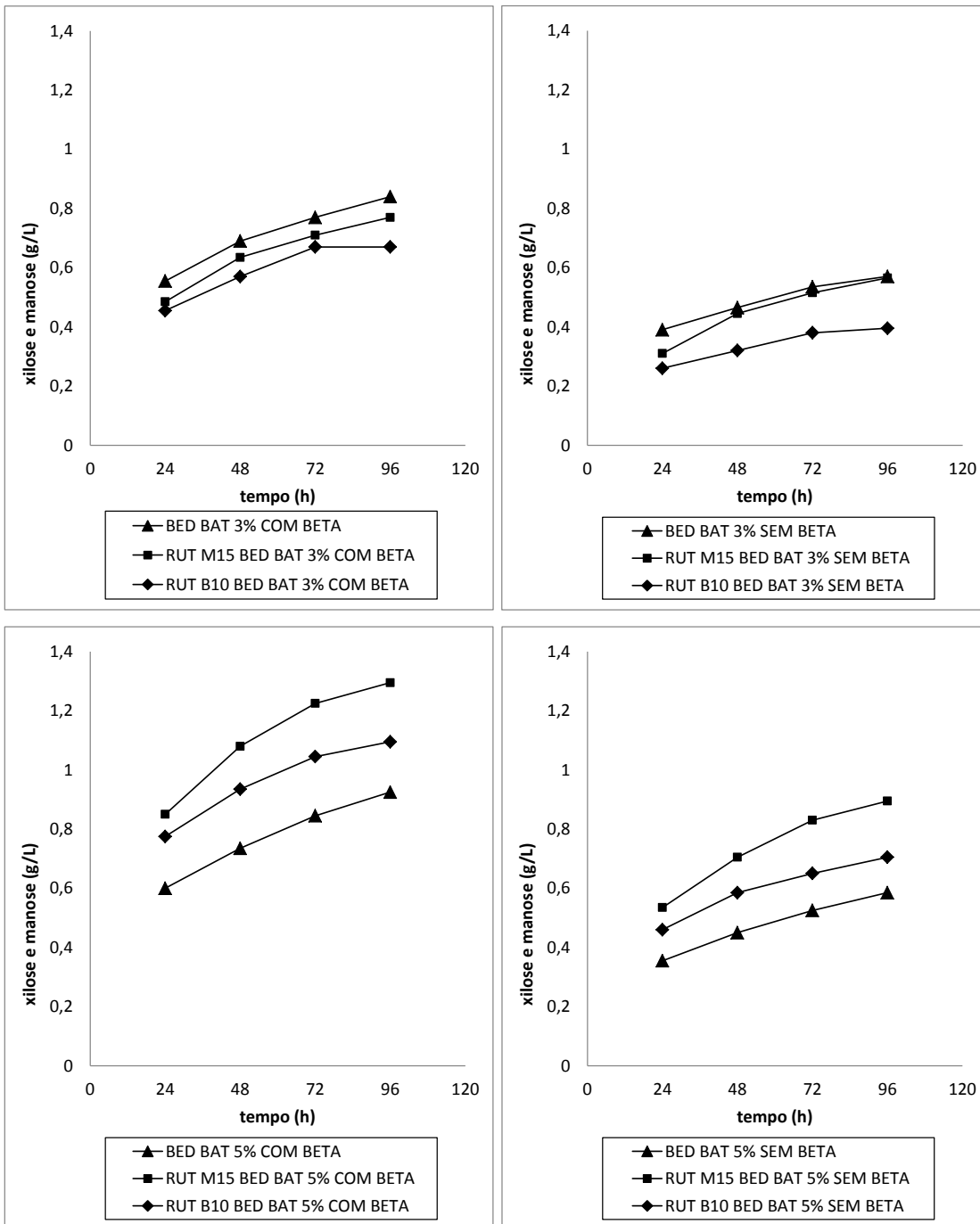
Os coquetéis foram testados em bagaço pré-tratado hidrotermicamente (BH) a fim de se verificar o desempenho da hidrólise sobre outro tipo de pré-tratamento do bagaço. Os resultados de conversão são apresentados na Figura 31.



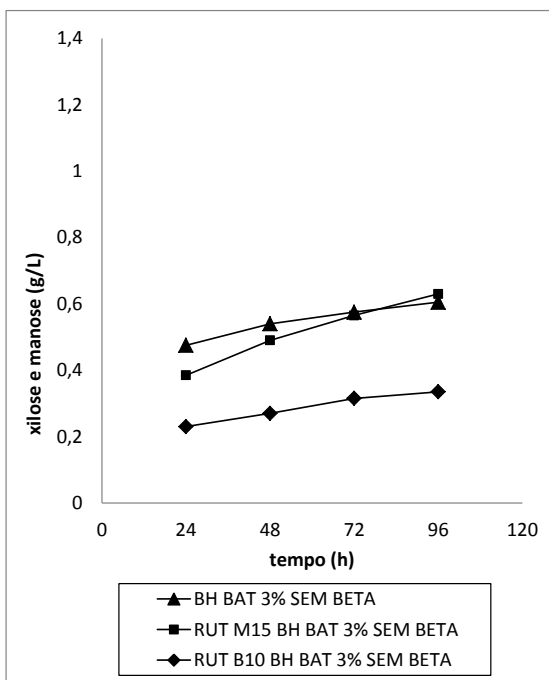
**Figura 31** – Comparação do desempenho da hidrólise de BH (3% de sólidos) utilizando coquetel enzimático comercial (BED BAT) e coquetéis obtidos por fermentação (RUT M15 e RUT B10) sem adição de beta-glucosidase comercial. A barra de erro com os valores dos desvios padrão foi omitida para facilitar a visualização. Todos os desvios foram inferiores a 8%.

Na hidrólise de BH, com carga de sólidos de 3% (Figura 31), observou-se um perfil de hidrólise similar ao obtido para BED, indicando que o coquetel produzido no meio otimizado (RUT M15) apresenta bons resultados, superiores ao coquetel comercial testado, também em materiais pré-tratados por outras formas.

Os resultados para liberação de açúcares das hemiceluloses na hidrólise são apresentados nas Figuras 32 e 33. Os resultados são expressos como um somatório de xilose e manose uma vez que a metodologia empregada não permite a separação destes dois compostos.



**Figura 32** – Liberação de açúcares das hemiceluloses (xilose e manose) durante a hidrólise de BED 3 e 5% utilizando coquetéis produzidos por fermentação (RUT B10 e RUT M15) e coquetel comercial.

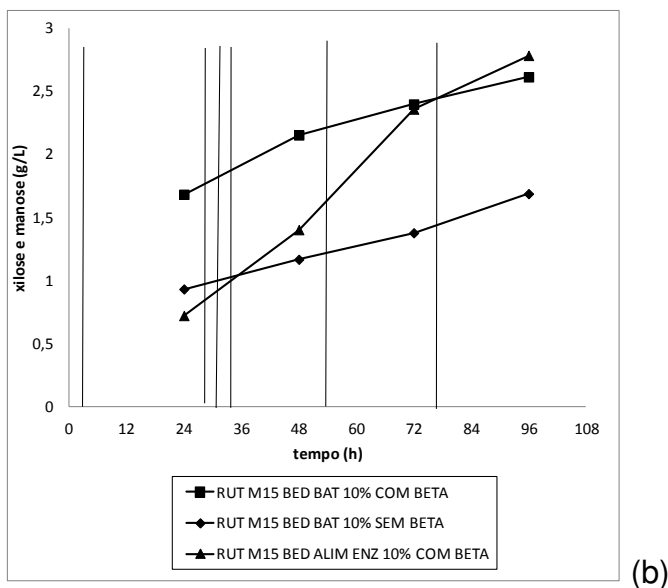
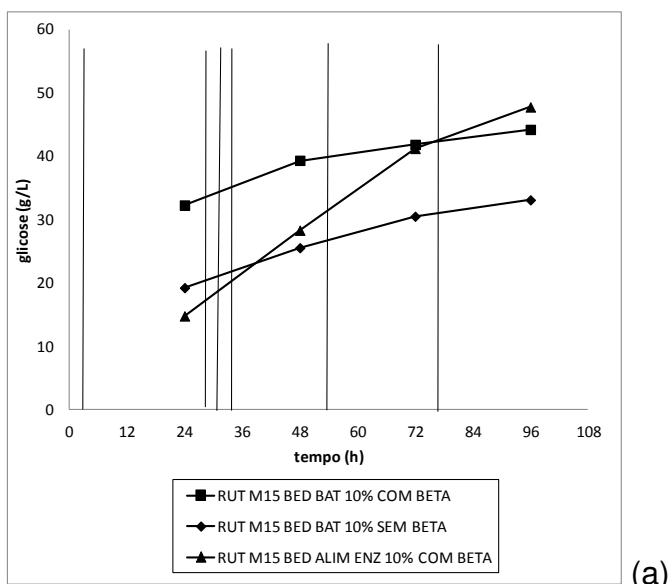


**Figura 33** – Liberação de açúcares das hemiceluloses durante a hidrólise de BH 3% utilizando coquetéis produzidos por fermentação (RUT B10 e RUT M15) e coquetel comercial.

Para uma carga de sólidos de 3% de BED, a liberação de açúcares das hemiceluloses foi similar para todos os coquetéis estudados, com um máximo de 0,85 g/L de açúcar liberado (Figura 32), apesar da maior proporção xilanase/FPA presente no coquetel MIX15 (Tabela 13). Para 5% de sólidos, o desempenho dos coquetéis obtidos por fermentação foi superior ao coquetel comercial, resultando na liberação máxima de 2,60 g/L (MIX15) e 1,10 g/L (B10). Quando se utilizou bagaço hidrotérmico (BH), o desempenho do coquetel MIX15 foi similar ao coquetel comercial (Figura 33). Foi observada diferença entre os ensaios com e sem adição de beta-glucosidase comercial (Novozym 188), muito embora essa enzima não esteja relacionada à liberação de açúcares da hemicelulose. Não foi observada atividade residual de xilanases no coquetel Novozym 188, permanecendo inexplicada a diferença obtida entre os ensaios.

#### 5.4.4 Estudo de batelada alimentada

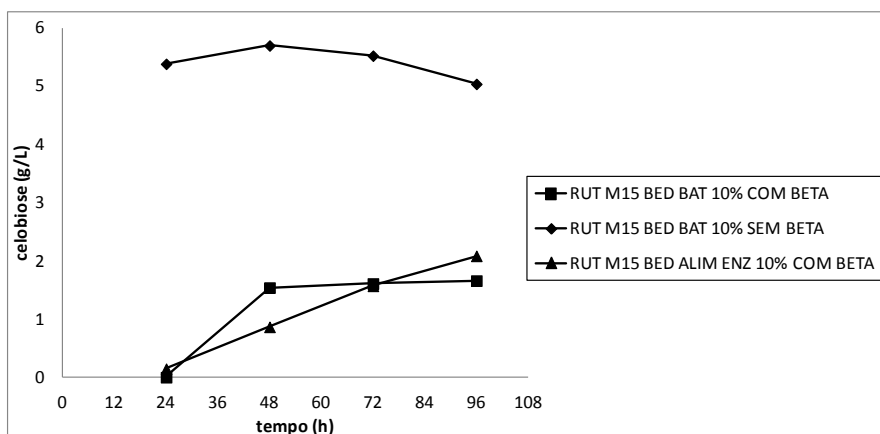
Para o coquetel enzimático com melhor desempenho na hidrólise foi testada uma concentração de sólidos de 10%, com e sem adição de beta-glucosidase e no sistema de batelada e batelada alimentada. Os resultados são demonstrados em termos da liberação de glicose, em g/L (Figura 34).



**Figura 34** – Perfil de liberação de glicose (a), xilose e manose (b) na hidrólise de BED em sistema de batelada simples (BAT) e alimentada (ALIM ENZ) com 10% de sólidos. As linhas horizontais ilustram as alimentações.

A batelada alimentada é sugerida como estratégia para a obtenção de maiores concentrações de açúcar quando se utilizam altas concentrações de sólidos, evitando problemas de viscosidade e agitação elevadas (ZHANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2010; JORGENSEN *et al.*, 2006). No estudo de batelada alimentada com o coquetel MIX15, foram realizadas seis adições de sólidos e enzima, sendo as últimas duas com uma carga maior. A quantidade de enzima total adicionada foi igual à utilizada na batelada simples com adição de beta-glucosidase. A inclinação das curvas na Figura 34 sugere que a adição de sólidos e enzimas ao longo da hidrólise na batelada alimentada mantém a velocidade de liberação de açúcares da matriz celulósica. No entanto, a quantidade de açúcares liberada é menor até a adição da última batelada, uma vez que há menos substrato e enzima presentes, embora a razão substrato/enzima seja mantida constante. O sistema de batelada alimentada favoreceu a conversão final de celulose em glicose. Ao final do período de hidrólise (96h), foram observados valores de conversão de 41,46%, 55,38% e 59,82% para: batelada sem beta, batelada com beta e batelada alimentada, respectivamente. Um perfil similar foi obtido para hidrólise de hemiceluloses.

A Figura 35 mostra a presença de celobiose residual ao longo da hidrólise para os ensaios com 10% de BED.



**Figura 35** – Influência da adição de beta-glucosidase na hidrólise de BED 10% em sistema de batelada simples e alimentada.

Para a hidrólise de BED a 10% de sólidos com o coquetel MIX15 sem adição de beta-glucosidase comercial a concentração de celobiose residual foi bastante elevada, atingindo 5,7g/L. (Figura 35) A adição de beta-glucosidase comercial reduziu os níveis de celobiose, no entanto, verificou-se a presença de celobiose residual (até 1,6 g/L), diferente dos ensaios a 3 e 5% de sólidos, indicando que em concentrações de sólidos maiores, a carga de enzima adicionada (em U/g sólido) deve ser maior.

Um sistema de batelada alimentada com adições em tempos menores de hidrólise poderia favorecer mais substancialmente o desempenho da hidrólise. A viabilidade de aplicação do sistema de batelada alimentada deve ser verificada tendo em vista a concentração de sólidos desejada, dificuldades operacionais e tempo de hidrólise desejado.

#### 5.4.5 Hidrólise com massa de micélio: avaliação da presença de beta-glucosidase

Na cadeia de produção de etanol de segunda geração, os custos das várias etapas necessárias para liberação dos açúcares da matriz lignocelulósica são bastante significativos. Klein-Marcuschamer e colaboradores (2011) afirmam que para redução expressiva dos custos globais de produção de etanol, a simplificação do processo de produção de enzimas e hidrólise é necessária. Os custos operacionais dessas etapas são expressivos, sendo os custos de investimento em capital (material e manutenção) em torno de 50% do total.

Dentro dessa necessidade de redução de custos das etapas do processo, alguns autores buscam soluções alternativas. Barta *et al.* (2010) afirmam que a forma mais econômica de aplicar as enzimas produzidas seria usando diretamente a massa de fermentação, contendo enzimas, micélio, e resíduos de substrato, a fim de evitar etapas custosas de remoção de células, concentração e purificação. Kovacs e colaboradores (2009b) sugeriram a aplicação de produção *on-site* de enzimas, utilizando o caldo de fermentação bruto nas etapas posteriores de produção de etanol. Segundo Kubicek e Messner (*in* Kovacs *et al.*, 2009b), a razão para a baixa secreção de beta-glucosidase pelo fungo *T. reesei* seria pela

presença da enzima fortemente presa à parede celular do fungo. Quando esses autores utilizaram como estratégia o uso do caldo de fermentação para a hidrólise do bagaço, o desempenho na hidrólise foi em torno de 170% superior ao sobrenadante do fermentado, e os níveis de celobiose detectados foram significativamente menores.

Tendo em vista os resultados obtidos por esses autores, um experimento de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (BED) foi elaborado empregando o caldo de fermentação produzido no meio MIX15, e comparado à hidrólise utilizando o coquetel produzido no mesmo meio, após centrifugação. Foram utilizadas duas condições de concentração de sólidos e carga enzimática: condição A (23,6 FPU/g de bagaço e 10% de sólidos) e condição B (10 FPU/g de bagaço e 23,6% de sólidos). Para a condição B, foi utilizada alimentação de sólidos.

Os resultados para glicose liberada nos ensaios de hidrólise utilizando coquetel centrifugado e o caldo de fermentação são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** – Glicose liberada (em g/L) na hidrólise de BED utilizando coquetel centrifugado (M15) e caldo de fermentação sem centrifugação (M15 FH).

Tempo (h)	Glicose liberada (g/L) de acordo com a condição de hidrólise			
	M15 10%	M15 FH 10%	M15 23,6%	M15 FH 23,6%
24	23,98	24,26	NE	NE
48	31,89	29,34	NE	NE
72	36,19	33,02	NE	NE
96	38,68	35,1	36,87	52,84
120	NE	NE	NE	NE
144	NE	NE	38,58	55,41

NE-não estabelecido

Os resultados para xilose e manose liberadas nos ensaios de hidrólise utilizando coquetel centrifugado e o caldo de fermentação são apresentados na Tabela 15.



**Tabela 15** – Xilose e manose liberadas (em g/L) na hidrólise de BED utilizando coquetel centrifugado (M15) e caldo de fermentação sem centrifugação (M15 FH).

Tempo (h)	Xilose e manose liberada (g/L) de acordo com a condição de hidrólise			
	M15 10%	M15 FH 10%	M15 23,6%	M15 FH 23,6%
24	1,47	1,68	NE	NE
48	1,83	2,08	NE	NE
72	2,01	2,23	NE	NE
96	2,17	2,4	2,23	3,59
120	NE	NE	NE	NE
144	NE	NE	2,44	3,73

Observou-se que para uma carga de sólidos de 10% o desempenho do coquetel enzimático centrifugado foi levemente superior em relação à liberação de glicose, enquanto que para uma carga de sólidos maior, e menor carga enzimática, o desempenho do caldo de fermentação foi superior (Tabela 14). Foi possível chegar a mais de 50 g/L de glicose após 96h de hidrólise utilizando o caldo de fermentação não centrifugado e 23,6% de sólidos. No entanto, tal valor correspondeu a apenas 23% de conversão de celulose em glicose. O desempenho do caldo de fermentação na hidrólise de hemiceluloses, representada pela liberação de xilose e manose (Tabela 15) foi superior ao coquetel centrifugado nas duas cargas de sólidos utilizadas.

Os resultados para celobiose residual nos ensaios de hidrólise utilizando coquetel centrifugado e o caldo de fermentação são apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** - Celobiose residual (em g/L) na hidrólise de BED utilizando coquetel centrifugado (M15) e caldo de fermentação sem centrifugação (M15 FH).

Tempo (h)	Celobiose liberada (g/L) de acordo com a condição de hidrólise			
	M15 10%	M15 FH 10%	M15 23,6%	M15 FH 23,6%
24	6,73	5,44	NE	NE
48	6,83	3,87	NE	NE
72	6,44	3,36	NE	NE

96	5,36	3,01	16,15	14,32
120	NE	NE	NE	NE
144	NE	NE	17,08	14,67

A hidrólise enzimática com o caldo de fermentação resultou em menores concentrações de celobiose residual (Tabela 16), no entanto, valores bastante elevados foram obtidos quando se utilizou uma carga de sólidos de 23,6%, o que indica que mesmo havendo presença de beta-glicosidase aderida à parede celular do fungo, como afirmado por outros autores (KUBICEK E MESSNER *in* KOVACS *et al.*, 2009b), a quantidade dessa enzima é insuficiente para quebra de toda a celobiose liberada no meio.

Os resultados obtidos indicaram que a utilização do caldo de fermentação sem tratamento pode ser uma estratégia para redução de custos da hidrólise quando se utilizam maiores cargas de sólidos, no entanto, a adição de beta-glicosidase pode ser necessária para evitar o acúmulo de celobiose residual e melhor aproveitamento dos açúcares da matriz lignocelulósica.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com a otimização do meio e condições de cultivo foi possível melhorar a produção de enzimas do complexo lignocelulolítico (celulases e hemicelulases), assim como a produtividade e o desempenho dos coquetéis durante a hidrólise enzimática. De maneira resumida, as conclusões acerca dos resultados obtidos foram resumidas a seguir:

- Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pode ser utilizado como fonte de carbono na produção de enzimas celulolíticas, visando à aplicação do processo on house de produção, junto à cadeia de produção do etanol de segunda geração;
- O ajuste do meio de cultivo possibilitou aumentar a produção de celulases tanto em frascos agitados (de  $1,38 \pm 0,11$  para  $3,33 \pm 0,1$  FPU/mL) quanto em bioreator (de  $1,17 \pm 0,34$  até  $4,2 \pm 0,34$  FPU/mL) em sistema de batelada;
- O ajuste do meio de cultivo possibilitou aumentar a produção de xilanases tanto em frascos agitados (de  $18,03 \pm 1,56$  para  $172,05 \pm 10,12$  U/mL) quanto em bioreator (de  $144 \pm 46$  até  $246 \pm 6,81$ ) em sistema de batelada;
- O sistema de batelada alimentada em bioreator resultou em maiores valores de atividade enzimática ( $4,74$  FPU/mL e  $332$  U/mL) em relação ao sistema de batelada simples, no entanto, a conversão de substrato foi bastante inferior;
- O sistema de co-cultivo com *Alternaria* sp. e *Annulohyphoxylon* sp. não foi considerado positivo para produção enzimática em frascos agitados, requerendo maiores estudos, em especial em bioreator;
- O coquetel enzimático obtido com o meio otimizado (MIX15) apresentou perfil de hidrólise enzimática de substratos comerciais (painel enzimático) diferenciado do coquetel obtido a partir do meio inicial (BED 10g/L), apresentando também desempenho de hidrólise de bagaço pré-tratado superior, e com maior liberação de açúcares em relação ao coquetel comercial estudado;

- Estratégias de hidrólise como batelada alimentada e uso do caldo de fermentação podem ser usadas para aumentar a conversão em açúcares, no entanto, maiores estudos são requeridos.

Para trabalhos futuros, sugere-se maiores estudos empregando batelada alimentada como estratégia para produção enzimática, assim como para hidrólise enzimática, visando à aplicação de altas cargas de sólidos. O escalonamento para reatores de escala piloto também pode ser investigado, buscando verificar a possibilidade de aplicação industrial.

Observou-se certa dificuldade na utilização dos bioreatores comercialmente disponíveis para a produção enzimática empregando material particulado (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja) e *T. reesei*, um fungo filamentosos. Dessa forma, sugere-se o estudo do projeto de reatores que favoreçam a agitação homogênea, e facilitem a retirada de amostra.

## REFERÊNCIAS

ADAV, S.S.; CHAO, L.T.; SZE, S.K. 2012 **Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation.** *Molecular e cellular proteomics*. 11 (7).

ADNEY, B.; BAKER, J. 1996 **Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP)** *Technical Report* NREL/TP-510-42628

AHAMED, A.; VERMETTE, P. 2008a **Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions.** *Biochem. Engineering Journal.*, v. 40, 399-407.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. 2008b **Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 42, 41-46.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. 2009 **Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production.** *Bioresource Technology*, 100, 5979–5987

ALCARDE, A. R. **Agencia de informação Embrapa: Cana de açúcar. Outros produtos.** EMBRAPA. Disponível em:  
<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_108\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html)> Acesso em 25 Set 2011

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. 2010 **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** *Biotechnology for Biofuels*. 2010. 3:4.

ASLAM, N.; SHIEKH, M.A.; et. al. 2010. **Expression pattern of *Trichoderma* cellulases under different carbon sources.** *Pakistan Journal of Botany.*, nº4, 42, 2895-2902.

BADER, J. MAST-GERLACH, E.; et al. 2010 **Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology.** *Journal of App. Microb.*, V. 109/2, 371-387.

BAKER J.O.; et al. 1997. **Use of a new membrane-reactor saccharification assay to evaluate the performance of cellulases under simulated SSF conditions.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65, 585-595.

BARTA, Z.; KOVACS, K.; RECZEY, K.; ZACCHI, G. 2010 **Process Design and Economics of On-Site Cellulase Production on Various Carbon Sources in a Softwood-Based Ethanol Plant**. Enzyme Research. Volume 2010, ID 734182, 8 p. doi:10.4061/2010/734182.

BAYER, E. A. 2009 **Remembering Mary (1917 to 2008): editorial introduction to the thematic series on the life and lifework of Mary Mandels, first lady of cellulase research** Biotechnology for Biofuels 2:23

BERLIM, A.; et al. 2006. **Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis**. Biotechnology and Bioengineering, 97, 287-296.

BIGELOW, M.; WYMAN, C. E. 2002 **Cellulase production on bagasse pretreated with hot water**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 98-100, 921-934.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., CORVO, M. L. 2008. **Enzimas em biotecnologia**. Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Ed. Interciência Ltda.

BRADFORD, M. M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical biochemistry, v.72, 248-254.

BROWN, JR. 2004. **Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?** Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry Special Issue: Macromolecules in the 21st Century—Otto Vogl, V, 42, 3, 487–495.

CANTERI, M.G. et al. 2001. **SASM-AGRI - Sistema Para Análise E Separação De Médias Em Experimentos Agrícolas Pelos Métodos Scott-Knott, Tukey E Duncan**. Revista Brasileira de Agrocomputação, v.1, n.2, p.18-24.

CARVALHO, H. M. 2009. **Inovações tecnológicas na produção de agrocombustíveis**: Base do Império das fontes de energia renovável. America Latina em Movimento. Agencia Lationoamericana de Informacion. Disponível em: <<http://www.alainet.org/active/32085&lang=es>> Acesso em 23 Set 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. 2010. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, 33, no1, 181-188.

CHAHAL DS. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied Environmental Microbiology**. 49, 205–210. *in*: SINGHANIA R.R *et al.*. 2010. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 541–549.

CHANG, L.; *et al.* 2011 **Characterization of a bifunctional xylanase/endoglucanase from yak rumen microorganisms** *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 1933–1942.

COLLEN, A.; SALOHEIMO, M.; *et al.* 2005 **Protein production and induction of the unfolded protein response in *Trichoderma reesei* strain Rut-C30 and its transformant expressing endoglucanase I with a hydrophobic tag.** *Biotechnology and Bioengineering*. 89, Issue 3, 335–344.

DELABONA, P. S. *et al.* 2012 **Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production.** *Bioresource Technology*, 107, 517-521.

DESHPANDE, P.; NAIR, S.; KHEDKAR, S. 2009 **Water Hyacinth as Carbon Source for the Production of Cellulase by *Trichoderma reesei*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158, 552–560.

DHIMAN *et al.* 2008 **Microbial Xylanases.** *Review Bioresources*, 3, (4), 1377-1402

DILLON, A.J.P.; CAMASSOLA, M. 2009 **Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*.** *Industrial Crops and Products*, 29, Issues 2-3, 642-647

DOMINGUES, F. C.; *et al.* 2000. **The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30.** *Enz. And Micr. Tech.*, 26, 394-401.

DEPARTAMENTO DE ENERGIA DOS ESTADOS UNIDOS. U.S. Department of Energy. Loan Programs Office. **DOE Finalizes \$105 Million Loan Guarantee for First-of-its-Kind Cellulosic Bio-Refinery in Iowa.** Disponível em: <<https://lpo.energy.gov/?p=5223>> Acesso em: 23 Set 2011.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. 1996. **Bioconversion of forest products industry waste cellulotics to fuel ethanol: a review.** *Bioresource Technology*, 55, 1—33

EVELEIGH, D.E.; *et al.* 2009 **Measurement of saccharifying cellulose.** *Biotechnology for Biofuels*, 2, 21

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X-Y. 2010 **Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02.** *Bioresource Technology*. V. 101, 11, 4111–4119.

FERREIRA, S.M.P.; *et al.* 2009. **Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut- C30 morphology and cellulase production.** *Electronic Journal of Biotechnology*. 12, no 3.

GARCIA-KIRCHNER, O.; *et al.* 2002. **Mixed submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, V. 98-100, 1105-1114.

GHOSE, T. K., 1987. **Measurement of cellulase activities.** *Pure and Applied Chemistry*, 59, nº02, 257- 268.

GHOSE, T.K.; BISARIA, V.S. 1987. **Measurement Of Hemicellulase Activities Part 1: Xylanases.** *Pure and Applied Chemistry*, V. 59, No.12, 1739—1752.

GOTTSCHALK, L.M.F.; *et al.* 2010. **Cellulases, xylanases, beta-glucosidases and ferulic esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse.** *Biochemical Engineering Journal* 51, 72-78.

GRAALBIO. 2012. **GraalBio anuncia primeira planta de etanol celulósico do Hemisfério Sul.** Disponível em: [http://graalbio.com/graalbio/wp-content/uploads/2012/05/Primeira\\_planta\\_de\\_etanol\\_celulosico.pdf](http://graalbio.com/graalbio/wp-content/uploads/2012/05/Primeira_planta_de_etanol_celulosico.pdf) Acesso em 23 Outubro 2012.

GRETHLEIN, H.E. 1985. **The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates.** *BioTechnology*, 3, 155-160.

GRETHLEIN H.E.; CONVERSE A.O, 1991. **Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood.** *Bioresource Technol.*, 36, nº1, 77–82.



GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENDERDY, R.P. 1999 **Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse.** Bioresource Technology, 68, 173-178

HARTL, L.; KUBICEK, C. P.; SEIBOTH, B. 2007 **Induction of the gal pathway and cellulase genes involves no transcriptional inducer function of the galactokinase in *Hypocrea jecorina*.** Journal of Biological Chemistry, V. 282, 18654-18659.

HAYWARD, T.K.; HAMILTON, J.; THOLUDUR, A.; MCMILLAN, J.D. 2000. **Improvements in Titer, Productivity, and Yield Using Solka-Floc for Cellulase Production.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 859-874.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C. E. 1999 **Cellulase for commodity products from cellulosic biomass.** Current opinion in Biotechnology, 10, 358-64.

IELOVICH, M. 2008. **Nanostructured cellulose:Review.** Bioresources 3 (4) 1403-1418.

ILMÉN, M.; *et al.* 1997. **Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 63. 1298-1306. 1997.

IOGEN CORPORATION. **Iogen's Cellulosic Ethanol Demonstration Plant.** Disponível em: <[http://www.iogen.ca/company/demo\\_plant/index.html](http://www.iogen.ca/company/demo_plant/index.html).> Acesso em 23 Set 2011.

JORGENSEN, H.; OLSSON, L., 2006. **Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888- Effect of substrate on hydrolytic performance.** Enzyme and Microbial Technology 38, 381-390.

JUHASZ, T.; *et al.* 2004 **Effect of pH on Cellulase Production of *Trichoderma reesei* RUT C30.** Applied Biochemistry and Biotechnology 113–116, 201-211.

JUHASZ, T., *et al.* 2005 **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** Process Biochemistry 40, 3519-3525.

JUN, H; KIESELBACH, T.; JONSSON, L.J. 2011 **Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source.** Microbial cell factories, 10:68.

KADAM, K. **Cellulase production.** In: Wyman, C, Eds. Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis Publisher, 231-252. 1996.

KATO, S.; et al. 2004. **Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic Clostridium and aerobic non-cellulolytic bacteria.** FEMS Microbiology Ecology, 51, 133–142.

KELLETT, L. E.; et al. 1990 **Xylanase B and an arabinofuranosidase from Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa contain identical cellulose-binding domains and are encoded by adjacent genes.** Biochem. J., 272, 369-376

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; POPIEL, P.O.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. 2011. **The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels.** *Biotechnology and Bioengineering*, 190, 1083-1087.

KOVACS, K.; et al. 2009a. **Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house.** *Biotechnology for Biofuels*, 2:14.

KOVACS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. 2009b **Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma autoviride*.** *Bioresource technology*. 100. 1350-1357.

KRISHNAN, C.; et al. 2010 **Alkali-Based AFEX Pretreatment for the Conversion of Sugarcane Bagasse and Cane Leaf residues to Ethanol.** *Biotechnol. Bioeng.*; 107, 441–450.

LEE, S. B.; et al. 1982. **Adsorption of Cellulase on Cellulose: Effect of Physicochemical Properties of Cellulose on Adsorption and Rate of Hydrolysis.** *The Korea Advanced Institute of Science, P.O. Box 150, Chong Ryang Ri Seoul, Korea, Biotechnology and Bioengineering.* Vol. XXIV, p. 2137-2153 (1982)

LEJEUNE, R.; BARON, G.V. 1995 **Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, N. 2, 249-258.

- LO, C.M. 2008 **Cellulase production by *Trichoderma reesei* rut c30**. Dissertação (Doutorado em filosofia). Universidade de Akron, 2008
- LO, C.M.; *et al.* 2010a **Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut-c30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligossacarides for induction**. *Bioresource technology*, 101, 717-723.
- LO, C.M.; *et al.* 2010b **Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate**. *Process Biochemistry*, 45, 1494–1503
- LYND, L.R.; *et al.* 1991. **Fuel ethanol from cellulosic biomass**. *Science*, 251, 1318- 1323.
- LYND, L.R. 1996. **Overview and evaluation of Fuel ethanol from cellulosic Biomass: technology, economics, the Environment, and policy**. *Annual Review of Energy and the Environment* 21, 403–65.
- MA, L.; *et al.* 2011 **Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens***. *Enzyme and Microbial Technology* v 49, Issue 4, 10, 366-371
- MACIEL, G.M. 2006. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, PR.
- MACH, R. L.; ZEILINGER, S. 2003 **Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 515-522.
- MANDELS, M.; *et al.* 1962 **Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*** *Journal of Bacteriology*, 83, 400-408.
- MANDELS, M.; *et al.* 1976. **Measurement of saccharifying cellulase**. *Biotechnology and bioengineering symposium* 02/1976
- MANDELS, M.; REESE, E. T., 1957. **Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals**. *Journal Bacteriology*, 73, nº2, 269–278.

MANDELS, M.; REESE, E.T. 1960 **Induction of cellulase in fungi by cellobiose** *Journal of Bacteriology* 79, 816-826.

MANSFIELD,, S.D.; MOONEY, C., SADDLER, J.N. 1999. **Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis.** *Biotechnology progress*, 15, 804-816.

MERCHEL,B.P.P. ; DELABONA, P.S. ; COSTA, A. C. ; PRADELLA, J.G.C. . **Estratégias para produção de enzimas lignocelulolíticas por *Trichoderma reesei* rut-c30 empregando bagaço de cana-de-açúcar.** In: 6 Congresso Internacional de Bioenergia, 2011, Curitiba. 6 Congresso Internacional de Bioenergia, 2011.

MILLER, G. L., 1959. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, 31, nº3, 426–428.

MOHAGHEHI, A., GROHMANN, K., WYMAN, C. E., 1990. **Production of cellulase on mixtures of xylose and cellulose in a feed-batch process.** *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 211-216.

MOONEY, C. A.; *et al.* 1998 **The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods.** *Bioresource Technology*, 64, 113-119.

MONTENECOURT, B. S. AND D. E. EVELEIGH. 1979. **Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*.** In: *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis.* Advances in Chemistry Series. R. D. Brown and L. Jurasec. San Diego, Academic Press., 181, 289-301.

MOSIER, N.; *et al.* 2005. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, V. 96, 673–686.

OHGREN, K.; *et al.* 2007 **Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover.** *Bioresource Technology*, 98, 2503–2510

OLSSON, L.; *et al.*, 2003. **Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30.** *Enzyme and Microbial Technology* 33, 612-619.

OTT, P. R. 2005 **Utilização de carboidrases em dietas para frangos de corte** (Mestrado em zootecnia). Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, 2005.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. 2012. ***Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement**. *Microbiology*. 158, 58-68.

PRADELLA, J.G.C.; *et al.* 2009. **Estudo Preliminar do Custo de Produção in house de Celulases na Biorrefinaria de Etanol de Segunda Geração**. In: Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 6pp. Natal, RN, 2 a 5 agosto.

RABELO, S.C.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. 2007 **A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production**. *Appl Biochem Biotechnology*, 144(1), 87-100.

RAMOS, L.P. 2003 **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials** *Quim. Nova*, V. 26, No. 6, 863-871.

RECZEY, K.; *et al.*, 1996. **Cellulase production by *T. reesei***. *Bioresource Technology*, 57, 25-30.

REESE, E.T.; LOLA, J.E.; PARRISH, F.W. 1969 **Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases**. *Journal of Bacteriology*, v. 100, 1151-1154.

REESE E. T.; MAGUIRE, A. 1969 **Surfactants as Stimulants of Enzyme Production by Microorganisms** *Applied microbiology*, p. 242-245.

ROBL, D.; MERGEL, C.M.; DELABONA, P.S.; PRADELLA, J.G.C.; MALDONADO, G.P. 2012. **Screening hemicellulolytic enzymes and accessory proteins from endophytic fungi for biomass degradation**. *New Biotechnology*, 29, S39.

ROCHA, L. B. 2009. **Panorama da competitividade da indústria de cana-de-açúcar no Brasil**. *International Sugar Journal*. N.1327. V. 111. 14.ed. Agra Informa Ltda. Julho, 2009.

SALOHEIMO, M.; PAKULA, T.M. 2012. **The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*)**. *Microbiology*, 158, 46-57.

SATHISUKSANOH, N.; *et al.* 2011. **Cellulose Solvent-Based Biomass Pretreatment Breaks Highly Ordered Hydrogen Bonds in Cellulose Fibers of Switchgrass**. *Biotechnology and Bioengineering*, V. 108, No. 3.

SEHNEM, N. *et al.* 2006. **Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 72, 1, 163-167.

SHIN, C.S.; *et al.* 2000 **Enzyme Production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on Various Lignocellulosic Substrates**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, 237-245.

SILVA, A.M. 2005. **Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiara decumbens* Stapf (braquiária)**. Tese (doutorado em Biologia celular e estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SILVA, V. F. N. 2009 **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

SINGHANIA, RR; SUKUMARANA, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. 2010. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases**. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 541–549.

SIPOS, B. *et al.* 2010 **Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* RUT C30 on different carbon sources**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161: 347-364

SLUITER A, *et al.* 2008a. **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples**. NREL/TP-510-4262,

SLUITER A, *et al.* 2008b. **Determination of Ash in Biomass**. NREL/TP-510-42622.

SLUITER A, *et al.* 2008c. **Determination of extractives in biomass**. NREL/TP-510-42619.

SLUITER A, *et al.* 2008d. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.** NREL/TP-510-42618.

SLUITER A, *et al.* 2008e. **Determination of sugars, by-products, and degradation products in liquid fraction process samples.** NREL/TP-510-42623.

SUKUMARAN, R. K.; *et al.* 2009. **Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production.** *Renewable energy*, 34, 421-424.

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

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. 2001 **Influence of Enzyme Loading and Physical Parameters on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Softwood.** *Biotechnol. Prog.*, 17, 110-117

TOLAN, J.S., 2002. **logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass.** *Clean. Techn. Environ. Policy*, 3, 339–345.

UNICA. **Dados e Cotações – Estatísticas.** Produção de cana-de-açúcar do Brasil . Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>> Acesso em 25 Set 2011.

VELKOVSKA, S.; MARTEN, M.R.; OLLIS, D. F. 1997. **Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30.** *Journal of Biotechnology*, v. 54. 83-94

WANG, L.; *et al.* 2006. **Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis.** *Biotechnology and bioengineering*, V. 93, 443-456.

WEI, L.; CHANG, C.; WEI, H.; LIN, C.; CHUANG, C.; JONG, S. 1992. **Production of cellulolytic enzymes from the Xylaria and Hypoxylon species of xylariaceae.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 141-146.

WEN, Z.; LIAO, W. CHENG, S. 2005. **Production of cellulose/beta-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure.** *Process Bioch.*, V. 40, 3087-3094.

WYMAN, C.E. 2007. **What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol.** Trends in Biotechnology, 25, no.4, 153-157.

WYMAN C.E., *et al.* 2005 **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies.** Bioresource Technology, 96, 1959–1966

YANG, B.; WYMAN, C. E. 2008. **Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol.** *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2, 26–40

YUSOFF, W. M. W.; *et al.* 2000. **Sugar cane bagasse degradation by mixed culture of *T. reesei* and *A. terreus* in solid substrate fermentation.** Pakistan Journal of Biological Sciences, 3, 10, 1758-1761.

ZHANG, M.; *et al.* 2010 **Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes.** Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010. 160: 1407-1414.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. 2009 **Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis.** Appl Microbiol Biotechnol, 82, 815–827

ZSOLT, S.; ZACCHI, G., 2000. **Effect of Acetic Acid and Furfural on Cellulase Production of *Trichoderma reesei* RUT C30.** Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 89.



## APÊNDICE

Os resultados numéricos obtidos para as atividades enzimáticas celulolítica total (FPA) apresentados nas Figuras 21-23, atividade de xilanases, beta-glucosidases, e proteína total no sobrenadante para os ensaios em bioreator são apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17** – Resultados numéricos para as atividades enzimáticas e proteína total do sobrenadante das amostras de ensaios de produção enzimática em bioreator

Nome do ensaio	Tempo de cultivo (h)	FPA (FPU/mL)	Produtividade (FPU/L.h)	Atividade de xilanases (U/mL)	Atividade de beta-glucosidase (U/mL)	Proteína total no sobrenadante (mg/mL)
BED 10g/L (1)	0					
	24	0,00	0,00	3,61	0,01	0,21
	48	0,14	2,92	15,30	0,03	0,20
	72	0,70	9,72	41,85	0,32	0,52
	96	0,88	9,17	101,08	0,37	0,68
	120	0,91	7,58	105,62	0,47	0,75
	144	0,95	6,60	111,04	0,57	0,87
	168	0,99	5,89	-	0,63	0,80
BED 10 g/L (2)	0					
	24					
	43	0,00	0,00	93,50	-	0,66
	67	0,03	0,45	126,66	-	0,96
	91	0,31	3,41	131,43	-	1,06
	115	0,33	2,87	110,89	0,26	1,12
	139	0,97	6,98	124,46	0,32	1,16
	163	0,81	4,97	-	0,36	-
BED 10g/L (3)	0					
	24					
	48	0,18	3,75	30,56	0,76	0,79
	72	1,15	15,97	185,85	2,25	1,04
	96	1,38	14,38	235,68	3,07	1,18
	120	1,49	12,42	221,37	3,65	1,27
	144	1,51	10,49	231,59	4,21	1,17
	168	1,56	9,29	342,37	4,61	1,21

3 g/L SACAROSE	0					
	24	0,00	0,00	4,09	0,01	0,23
	48	0,15	3,13	24,01	0,04	0,24
	72	0,85	11,81	39,30	0,42	0,61
	96	0,99	10,31	68,46	0,45	0,75
	120	0,99	8,25	69,55	0,53	0,79
	144	1,06	7,36	69,72	0,55	0,82
	168	1,10	6,55	53,16	0,52	0,76
3 g/L SACAROSE 3g/L FARELO	0					
	24	0,00	0,00	3,71	0,02	0,52
	48	0,12	2,50	3,53	0,02	0,39
	72	0,34	4,72	33,47	0,15	0,49
	96	0,76	7,92	111,98	0,62	0,84
	120	1,13	9,42	139,25	0,96	0,96
	144	1,56	10,83	148,35	1,11	1,04
	168	1,36	8,10	119,33	1,12	0,95
3 g/L FARELO (1)	0					
	24	0,00	0,00	0,31	0,01	0,42
	48	0,19	3,96	20,92	0,04	0,24
	72	0,64	8,89	83,76	0,25	0,53
	96	0,70	7,29	108,56	0,41	0,71
	120	0,98	8,17	103,97	0,52	0,71
	144	1,13	7,85	67,20	0,51	0,72
	168	1,15	6,85	54,28	0,57	0,71
3 g/L FARELO (2)	0					
	24					
	48	0,00	0,00	0,46	-	0,20
	72	0,20	2,78	24,63	-	0,29
	96	0,76	7,92	32,70	-	0,71
	120	1,49	12,42	66,91	-	1,03
	144	1,60	11,11	165,81	-	1,03
	152	1,52	10,00	-	1,35	-
3g/L FARELO (3)	0					
	24					
	48	0,25	5,21	24,29	0,65	0,55
	72	0,97	13,47	199,23	1,57	0,89
	96	1,26	13,13	227,97	2,46	1,09
	120	1,28	10,67	234,01	3,19	1,18
	144	1,69	11,74	250,41	3,86	1,11
	168	1,72	10,24	367,54	4,08	1,26

MIX15 (1)	0					
	24					
	48					
	72	1,46	20,28	158,88	-	0,85
	96	2,06	21,46	157,70	-	1,02
	120	2,28	19,00	169,85	-	1,15
	144	2,44	16,94	190,57	-	1,18
	168	2,60	15,48	189,31	-	1,13
	192	2,43	12,66	184,17	1,55	1,13
MIX15 (2)	0					
	24					
	48					
	72	1,11	15,42	132,44	-	0,71
	96	1,70	17,71	138,45	-	0,78
	120	1,74	14,50	167,60	-	1,07
	144	1,96	13,61	169,45	-	1,09
	168	1,88	11,19	181,04	-	1,21
	192	2,15	11,20	172,03	1,73	1,12
BED semi-mix 30g/L	0					
	24					
	48	0,96	20,00	30,56	0,76	0,79
	72	2,15	29,86	185,85	2,25	1,04
	96	3,31	34,48	235,68	3,07	1,18
	120	3,97	33,08	221,37	3,65	1,27
	144	4,07	28,26	231,59	4,21	1,17
	168	4,47	26,61	342,37	4,61	1,21
BED semi-mix 50g/L	0					
	24					
	48	0,62	12,92	24,29	0,65	0,55
	72	1,79	24,86	199,23	1,57	0,89
	96	2,43	25,31	227,97	2,46	1,09
	120	3,37	28,08	234,01	3,19	1,18
	144	3,73	25,90	250,41	3,86	1,11
	168	4,15	24,70	367,54	4,08	1,26
BED semi-mix 30g/L reator 0,5L (1)	0					
	24					
	48	0,36	7,50	85,87	0,23	0,24
	72	1,38	19,17	115,77	0,97	0,57
	96	2,46	25,63	198,78	1,34	0,64

	120	3,46	28,83	209,31	1,26	0,76
	144	3,48	24,17	230,31	1,82	0,76
	168	4,31	25,65	247,67	1,88	0,78
BED semi-mix 30g/L reator 0,5L (2)	0					
	24					
	48	0,30	6,25	73,94	0,13	0,20
	72	0,79	10,97	104,91	0,47	0,43
	96	1,58	16,46	186,51	1,09	0,55
	120	2,39	19,92	210,24	1,29	0,67
	144	3,65	25,35	237,27	1,98	0,76
	168	3,82	22,74	251,47	2,44	0,76
	BED alimentado	0				
24						
48		0,61	12,71	42,81	0,34	0,69
72		1,53	21,25	177,52	0,81	1,03
96		2,48	25,83	175,87	1,43	1,21
120		3,71	30,92	243,95	2,14	1,25
144		3,87	26,88	331,92	2,69	1,40
168		4,74	28,21	280,23	2,39	1,32