



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Priscila Aparecida Casciotori

Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei*
e *Myceliophthora thermophila* e Aplicação na Sacarificação do
Bagaço de Cana-de-Açúcar

São José do Rio Preto
2015

Priscila Aparecida Casciotori

Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei*
e *Myceliophthora thermophila* e Aplicação na Sacarificação do
Bagaço de Cana-de-Açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto
2015

Casciotori, Priscila Aparecida.

Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar / Priscila Aparecida Casciotori. -- São José do Rio Preto, 2015
99 f. : il., tabs.

Orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações Industriais. 3. Celulase. 4. Sacarificação. 5. Fermentação em estado sólido. 6. Bagaço de cana. 7. Bioetanol. I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca do IBILCE
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Priscila Aparecida Casciatori

Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei*
e *Myceliophthora thermophila* e Aplicação na Sacarificação do
Bagaço de Cana-de-Açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Michel Brienzo
UNESP – Rio Claro

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
7 de maio de 2015

Dedico este mestrado a minha irmã Fernanda Perpétua Casciari, fonte de inspiração e exemplo na carreira acadêmica. Tenho muito orgulho de ser sua irmã!

A vitória desta conquista dedico com todo meu amor, unicamente, a você!

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda sabedoria e da felicidade plena; por ser meu amparo nos momentos de dificuldade; por colocar em meu coração a certeza de que “tudo posso naquele que me fortalece”; pela presença constante em minha vida; por sempre conduzir meus passos e iluminar minha estrada.

A minha mãe Ana Maria Marques Casciotori, que sonhou junto comigo e me deu amor e força para que eu pudesse realizar mais essa conquista. Obrigada mãe, pelo seu apoio incondicional ao longo da minha vida escolar, sei que dei bastante trabalho e chorei muitos dias. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Você é minha fortaleza!

Ao meu pai Aparecido Donizetti Casciotori, por tudo que você me deu e ensinou. Obrigada pai pela sua generosidade e simplicidade. Pelo amor incondicional, pelo carinho e afeto. Não encontro palavras que consigam te agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Muito obrigada!

A minha irmã Fernanda Perpétua Casciotori, por sua colaboração no desenvolvimento deste trabalho com disponibilidade, competência e destreza incomuns, pelas sábias sugestões que contribuíram imensamente no desfecho dos temas centrais deste trabalho, além do carinho de uma irmã. Saiba que a maior dificuldade do meu mestrado foi ficar um ano longe de você.

Ao meu namorado e amigo Vinicius Augusto Frassatto, pela compreensão, admiração, incentivo e paciência; por fazer parte da minha vida. Sem você tudo seria menos bonito e mais complicado na minha caminhada.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo privilégio e oportunidade concedidos, e, sobretudo, pela confiança, por todo empenho, sabedoria, compreensão, motivação e incentivo para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo pela ajuda, dedicação e assessoria.

A minha velha companheira de quatro patas Bianca, por me ensinar com o seu enorme coração a conhecer os próprios limites, a perceber o tempo do outro e a amar incondicionalmente.

A todas as minhas amigas e amigos do laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores e do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada que sempre estiveram presentes, me ajudando, incentivando ou trabalhando junto comigo com carinho e colaboração. Em especial ao amigo Olavo Micali Perrone, que participou de forma mais efetiva neste trabalho, pela paciência e auxílio em todas as etapas deste mestrado.

À Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, em especial ao Programa de Pós Graduação em Química, que proporcionou oportunidade e infra-estrutura necessárias.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Química, Profa. Dra. Márcia Cristina Bisinoti, por conduzir o programa com fiel dedicação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro com bolsa de Mestrado (proc. MS 2013/01756-1).

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e todos que de alguma maneira fazem parte da minha vida acadêmica ou pessoal. Muito obrigada!

“A ciência pode purificar a religião de erros e superstições. A religião pode purificar a ciência de idolatrias e erros absolutos.”

(Papa João Paulo II)

RESUMO

Celulases são essenciais para a hidrólise de materiais lignocelulósicos visando à produção de etanol de segunda geração. A fermentação em estado sólido é um processo que proporciona altas concentrações de enzimas que podem ser aplicadas nessa hidrólise. O objetivo do presente trabalho foi produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas empregando os fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* por fermentação em estado sólido em biorreator de leito empacotado e aplicar essas enzimas, combinadas ou não, na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. Foram empregados bagaço *in natura*, bagaço pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino e bagaço com pré-tratamento hidrotérmico. A produção de enzimas foi avaliada pelas atividades CMCase, atividade sobre papel de filtro (FPU), xilanase e β -glicosidase. Para os experimentos de sacarificação com extratos dos fungos não combinados, foi adotado um planejamento de superfície de resposta central composto com 5 repetições do ponto central, tendo como fatores o volume de extrato enzimático e o tempo de hidrólise. Os resultados com os dois extratos indicaram como ótimos um volume de 7,0 mL e 6 horas de hidrólise para os bagaços *in natura*, pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino e com pré-tratamento hidrotérmico, exceto o extrato de *M. thermophila* que resultou em 5,0 mL e 6,8 horas para o bagaço hidrotérmico. Os melhores resultados de conversão em glicose com os dois extratos foram obtidos com o bagaço pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino, tendo sido de 34,0 % para *M. thermophila* e de 21,2 % para *T. reesei*. A partir destes resultados, foi elaborado um planejamento fatorial completo para os experimentos de hidrólises empregando coquetéis enzimáticos. Os fatores empregados foram composição (1:1; 1:3; 3:1) e temperatura (45, 55, 65 °C e alternada). O melhor resultado foi obtido pela combinação de 75 % do extrato de *T. reesei* com 25 % de *M. thermophila* aplicado a 55 °C no bagaço pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino, resultando em 41,6 % de conversão, levando, portanto, à conclusão de que houve efeito sinérgico entre as enzimas no processo de sacarificação.

Palavras-Chave: Celulases. Sacarificação. Pré-tratamento. Fermentação em estado sólido. Bioetanol.

ABSTRACT

Cellulases are essential for the hydrolysis of lignocellulosic materials aiming to the production of second generation ethanol. The solid-state fermentation is a process that allows obtaining high concentrations of enzymes which can be applied in this hydrolysis. The purpose of the current work was producing cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by employing the fungi *Trichoderma reesei* and *Myceliophthora thermophila* by solid-state fermentation in packed-bed bioreactor and apply these enzymes, combined or not, in the saccharification of sugarcane bagasses. Bagasse in natura, bagasse pretreated with ozone and ultrasound irradiation in alkaline medium and bagasse with hydrothermal pretreatment have been employed. The enzymes production was evaluated by CMCase, filter paper activity (FPU), xylanase and β -glucosidase activities. For the saccharification experiments with extracts from both fungi no-combined, it has been adopted a central-composed response surface design with 5 replications of the central point, having as factors the volume of enzyme extract and the duration of hydrolysis. The results with both extracts indicated as optimal a volume of 7,0 mL and 6 hours of hydrolysis for the bagasses in natura, pretreated with ozone and ultrasound irradiation in alkaline medium and with hydrothermal pretreatment, except the extract of *M. thermophila* that resulted in 5,0 mL and 6,8 hours for the hydrothermal bagasse. The best results of conversion in glucoses with both extracts were obtained with the bagasse pretreated with ozone and ultrasound irradiation in alkaline medium, which have been 34,0 % for *M. thermophila* and 21,2 % for *T. reesei*. From these results, it has been elaborated a full factorial design for the hydrolysis experiments employing enzymatic cocktails. The factors used were composition (1:1; 1:3; 3:1) and temperature (45, 55, 65 °C and alternated). The best result was obtained by combination of 75 % of the extract from *T. reesei* with 25 % from *M. thermophila* applied at 55 °C in the bagasse pretreated with ozone and ultrasound irradiation in alkaline medium, resulting 41,6 % of conversion, leading, therefore, to the conclusion that there was synergic effect between the enzymes in the saccharification process.

Keywords: Cellulases. Saccharification. Pretreatment. Solid-state fermentation. Bioethanol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coeficiente linear da curva padrão na Equação (3.1)
a_w	Atividade de água
A	<i>Trap A</i> na Equação (3.2)
Abs	Absorbância lida em nm na Equação (3.1)
AR	Açúcares redutores
ART	Açúcares redutores totais
ADS	Agar Sabouraud Dextrose
Avicel	Celulose microcristalina
b	Coeficiente de extinção em $\mu\text{mol/mL}$ na Equação (3.1)
B	<i>Trap B</i> na Equação (3.2)
BC	Bagaço de cana
BDA	Agar Batata Dextrose
BGL	β -glicosidases
b.u	Base úmida
C1	Componente responsável pelo inchaço e ruptura da celulose
Cx	Componente que representa atividade endoglucanase
C_{glicose}	Concentração de glicose na Equação (3.3)
CA	Casca de arroz
CBH	Celobiohidrolase
CBM33	Enzimas da família de enzimas com módulos de ligação ao
carboidrato 33	
CDH	Celobiose desidrogenase
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulases
CTBE	Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol
D	Diluição do extrato enzimático na Equação (3.1)
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EG	Endoglucanases
F	Razão volume de água e massa de substrato na Equação (3.1)
f	Fração de celulose no material hidrolisável na Equação (3.3)

FA	Farelo de arroz
FE	Fator estequiométrico na Equação (3.3)
FES	Fermentação em estado sólido
FPU	Atividade papel de filtro
FS	Farelo de soja
F _{Sm}	Fermentação submersa
FT	Farelo de Trigo
<i>FTIR-ATR</i>	<i>Fourier transform infrared spectroscopy - Attenuated Total Reflectance</i>
G	Guaiacilpropano
GH	Glicosil hidrolase
g _{ss}	Grama de substrato sólido seco
<i>HPAEC-PAD</i>	<i>High performance anionic exchange chromatography – Pulsed amperometric detection</i>
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
kHz	Quilohertz
M	<i>Myceliophthora thermophila</i>
MPa	Megapascal
m _{hidrolisável}	Massa de material hidrolisável na Equação (3.3)
m/m	massa por massa
m/v	massa por volume
N	Normalidade do Na ₂ S ₂ O ₃ na Equação (3.2)
NERL	National Renewable Energy Laboratory
NR	Não reportado
PA	Palha de arroz
p-H	p-Hidroxifenilpropano
PMOs	Polissacarídeos mono-oxigenases
pNPG	4-nitrofenol-beta-D-glicopiranosídeo
POAs	Processos oxidativos avançados
S	Siringilpropano
S ₂ vegetal	Camada dominante da parede secundária da parede celular vegetal
T	<i>Trichoderma reesei</i>

t	Tempo em minutos
t/ha	Toneladas por hectare
U	Unidade de atividade enzimática
UNICA	União da Indústria de cana-de-açúcar
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta
V	Volume de enzima na Equação (3.1)
v	Volume total da solução adicionada à hidrólise na Equação (3.3)
v/v	volume por volume
X	Porcentagem de glicose convertida na Equação (3.3)

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Comparação entre vários estudos com microrganismos produtores de celulase (Fonte: ZANELATO, 2011).....	15
Tabela 2.2. Produção de enzimas pelos fungos <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Myceliophthora thermophila</i> por FES.....	24
Tabela 3.1. Planejamento experimental central composto dos ensaios de hidrólise enzimática.....	43
Tabela 4.1. Produção de enzimas fibrolíticas por linhagens do fungo <i>Myceliophthora</i>	48
Tabela 4.2. Produção de enzimas fibrolíticas por linhagens do fungo <i>Trichoderma</i>	51
Tabela 4.3. Atividades dos preparados enzimáticos provenientes da mistura dos extratos obtidos dos diferentes módulos do biorreator.....	54
Tabela 4.4. Teores de açúcares redutores e glicose (obtida por conversão) dos hidrolisados enzimáticos. Os bagaços de cana <i>in natura</i> e pré-tratados foram hidrolisados com o extrato produzido pelo fungo <i>Myceliophthora thermophila</i>	55
Tabela 4.5. Teores de açúcares redutores e glicose (obtida por conversão) dos hidrolisados enzimáticos. Os bagaços de cana <i>in natura</i> e pré-tratados foram hidrolisados com o extrato produzido pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i>	59

Tabela 4.6. Teores de açúcares redutores e glicose (obtida por conversão) dos hidrolisados enzimáticos. Os bagaços de cana *in natura* e pré-tratados foram hidrolisados com o complexo enzimático comercial Prozyn®66

Tabela 4.7. Liberação de açúcares redutores e percentual de conversão na hidrólise do bagaço *in natura* empregando os coquetéis enzimáticos.....73

Tabela 4.8. Liberação de açúcares redutores e percentual de conversão na hidrólise de bagaço pré-tratado com O₃+ US + NaOH empregando os coquetéis enzimáticos.....76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1. Estrutura da parede celular vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2003).....	7
Figura 2.2. Representação estrutural da organização da fibra lignocelulósica (GRAMINHA et al., 2008).....	8
Figura 2.3. Representação esquemática de unidades estruturais precursoras da lignina (PINTO 2010).....	11
Figura 2.4. Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).....	14
Figura 2.5. Representação das extremidades não-redutora e redutora da molécula de celulose (RAMOS, 2003).....	17
Figura 2.6. Novo mecanismo proposto de degradação enzimática da celulose (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).....	20
Figura 2.7. Classificação de biorreatores de FES (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).....	25
Figura 2.8. Clivagem das ligações duplas da lignina pelo ozônio (NASCIMENTO et al., 1998).....	28
Figura 3.1. Configuração do biorreator de leito fixo com 10 módulos de 10 cm de altura cada, totalizando 1 m de comprimento.....	38
Figura 4.1. Substrato colonizado por <i>Myceliophthora thermophila</i> no biorreator.....	46

- Figura 4.2.** Atividades celulolíticas em função do comprimento do biorreator (1 m de comprimento total, fungo *Myceliophthora thermophila*, 240 L/h): (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPU; (d) β -glicosidase.....47
- Figura 4.3.** Substrato colonizado por *Trichoderma reesei* no biorreator.....49
- Figura 4.4.** Atividades celulolíticas em função do comprimento do biorreator (1 m de comprimento total, fungo *Trichoderma reesei*, 240 L/h): (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPU; (d) β -glicosidase.....50
- Figura 4.5.** Comparação das enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo termofílico *M. thermophila* (—■—) e pelo fungo mesofílico *T. reesei* QM9414 (—●—): (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPU; (d) β -glicosidase.....52
- Figura 4.6.** Superfície de resposta dos resultados obtidos com o *Myceliophthora thermophila*. Hidrólise expressa em ART em função do tempo de hidrólise e volume de extrato enzimático empregado: (a) para o bagaço *in natura*; (b) para o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH; (c) para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico.....57
- Figura 4.7.** Superfície de resposta dos resultados obtidos com o *Trichoderma reesei*. Hidrólise expressa em ART em função do tempo de hidrólise e volume de extrato enzimático empregado: (a) para o bagaço *in natura*; (b) para o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH; (c) para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico.....61
- Figura 4.8.** Teores de açúcares redutores liberados por ação dos extratos brutos produzidos pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414 na sacarificação do bagaço de cana: (a) *in natura*; (b) pré-tratado com O₃ + US + NaOH; (c) com pré-tratamento hidrotérmico.....64

- Figura 4.9.** Teores de açúcares redutores liberados na sacarificação do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados por ação dos extratos brutos produzidos pelo fungo: (a) *Myceliophthora thermophila* I-1D3b; (b) *Trichoderma reesei* QM9414.....68
- Figura 4.10.** Teores de açúcares obtidos por *HPAED-PAD* para os diferentes tipos de tratamento do bagaço de cana por ação dos extratos brutos produzidos pelo fungo: (a) *Myceliophthora thermophila* I-1D3b; (b) *Trichoderma reesei* QM9414.....70
- Figura 4.11.** Teores de ART liberados na sacarificação do bagaço de cana *in natura* pela ação dos coquetéis enzimáticos.....73
- Figura 4.12.** Análises estatísticas dos resultados da hidrólise do bagaço de cana *in natura* por ação dos coquetéis enzimáticos: (a) Box-Plot; (b) Efeitos principais de composição e temperatura; (c) Efeito de interação entre composição e temperatura.....74
- Figura 4.13.** Teores de açúcares redutores liberados na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH por ação dos coquetéis enzimáticos.....76
- Figura 4.14.** Análises estatísticas dos resultados da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH por ação dos coquetéis enzimáticos: (a) Box-Plot; (b) Efeitos principais de composição e temperatura; (c) Efeito de interação entre composição e temperatura.....77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	Bioetanol.....	4
2.2	Biomassa vegetal.....	5
2.2.1	Biomassa lignocelulolítica.....	6
2.2.2	Celulose.....	9
2.2.3	Hemicelulose.....	10
2.2.4	Lignina.....	10
2.3	Enzimas.....	12
2.3.1	Celulases.....	13
2.3.1.1	Endoglucanases.....	16
2.3.1.2	Exoglucanases.....	17
2.3.1.3	β -glicosidases.....	18
2.3.2	Enzimas oxidativas na degradação da celulose.....	18
2.3.3	Hemicelulases.....	20
2.4	Fermentação no estado sólido.....	21
2.5	Biorreatores de leito fixo para fermentação no estado sólido.....	24
2.6	Pré-tratamento do material lignocelulósico.....	26
2.6.1	Processos oxidativos avançados.....	27
2.6.2	Pré-tratamento hidrotérmico.....	29
2.7	Sacarificação enzimática.....	31
2.7.1	Interação sinérgica e os coquetéis enzimáticos.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	Microrganismos e substratos.....	36
3.2	Fermentação em reator de leito empacotado.....	37
3.3	Determinação da atividade enzimática.....	39
3.4	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	41
3.5	Hidrólise enzimática.....	42

3.6	Determinação quantitativa de açúcares redutores	44
3.7	Quantificação, por <i>HPAEC-PAD</i> , dos teores de açúcares liberados pela ação enzimática.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1	Produção de enzimas celulolíticas em reator de leito empacotado.....	46
4.1.1	Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b.....	46
4.1.2	Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> QM9414	49
4.1.3	Comparação da produção de enzimas celulolíticas pelos fungos <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b e <i>Trichoderma reesei</i> QM9414	52
4.2	Hidrólise enzimática do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado.....	53
4.2.1	Hidrólise empregando o extrato enzimático produzido por <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b.....	54
4.2.2	Hidrólise empregando o extrato enzimático produzido por <i>Trichoderma reesei</i> QM9414.....	59
4.3	Análise comparativa da hidrólise enzimática.....	63
4.3.1	Extratos produzidos por fungos termofílico e mesofílico.....	63
4.3.2	Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	67
4.4	Determinação dos teores de glicose, xilose e celobiose por <i>HPAEC-PAD</i> ..	69
4.5	Sacarificação do bagaço de cana empregando coquetéis enzimáticos produzidos por <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Myceliophthora thermophila</i>	72
4.5.1	Aplicação dos coquetéis enzimáticos no bagaço de cana <i>in natura</i>	72
4.5.2	Aplicação dos coquetéis enzimáticos no bagaço de cana pré-tratado com O ₃ + US + NaOH	75
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	80
5.1	Conclusões.....	80
5.2	Sugestões	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A preocupação global com o esgotamento das jazidas de combustíveis fósseis e com o efeito estufa requer busca por alternativas energéticas renováveis. Neste contexto, a produção de combustíveis limpos, como o bioetanol, em larga escala é mundialmente interessante. O desenvolvimento tecnológico de uma matriz energética limpa e renovável é estratégico para o Brasil, bem como para outros países, e as enzimas celulolíticas chamam atenção da comunidade científica e industrial, tendo em vista sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos, resíduos da agroindústria, na cadeia de produção do etanol de segunda geração.

No Brasil, uma matéria-prima abundante para conversão a etanol de segunda geração é o bagaço da cana-de-açúcar, resíduo da produção do etanol de primeira geração. O bagaço de cana é predominantemente constituído por celulose, hemicelulose e lignina, sendo assim uma potencial fonte de açúcares fermentescíveis (PANDEY et al., 2000). A produção brasileira de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 650 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (UNICA, 2015), o que gerou cerca de 160 milhões de toneladas de bagaço, o que denota o potencial de biomassa conversível a etanol no país. No entanto, a produção de álcool a partir do bagaço de cana tem como fator limitante sua recalcitrância. Diante disso, pré-tratamentos químicos, físicos e/ou biológicos têm sido propostos, com o intuito de se facilitar o acesso das celulasas aos seus substratos e obter maiores rendimentos na sacarificação enzimática.

O processo envolvendo a conversão dos materiais lignocelulósicos a etanol combustível consiste basicamente em quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação do produto. O pré-tratamento é essencial para desestruturar o material lignocelulósico tornando as fibras de celulose e hemicelulose mais acessíveis às enzimas. Por sua vez, as enzimas são responsáveis por hidrolisar as fibras em açúcares fermentescíveis, que finalmente poderão ser utilizados pelas leveduras na etapa de fermentação e produção do etanol.

Várias tecnologias de pré-tratamento, sozinhas ou em combinação, têm sido propostas na literatura. Pré-tratamentos empregando soluções diluídas de ácidos e/ou de bases são recomendados, respectivamente, para solubilização da

hemicelulose e para deslignificação do material, e em geral são combinados com tratamento a quente. O tratamento hidrotérmico é um dos métodos mais comuns de pré-tratamento da biomassa, o qual pode ser descrito como um processo termoquímico. Nesse processo a água, sob temperaturas e pressões elevadas, é usada para fracionar a biomassa vegetal em seus constituintes através da clivagem dos complexos lignina-carboidrato, além de romper as ligações glicosídicas dos polissacarídeos. O ozônio, poderoso agente oxidante e solúvel em água, também pode ser empregado no pré-tratamento químico da biomassa lignocelulósica (CANILHA et al., 2012). A ozonólise é um tipo de processo oxidativo avançado e sua ação se deve à exposição do material a ozônio. O principal efeito deste pré-tratamento é a remoção da lignina e parte das hemiceluloses, favorecendo o aumento da digestibilidade enzimática do material pré-tratado (QUESADA; RUBIO; GOMEZ, 1999; GARCÍA-CUBERO et al., 2009). A ozonólise apresenta como vantagens em relação ao tratamento hidrotérmico a ausência da despolimerização da celulose, a solubilização da lignina em níveis acima de 70 % e a efetiva deslignificação em condições brandas de reações (SANTOS, 2013).

Para converter os carboidratos das cadeias de celulose ou hemicelulose do bagaço a açúcares fermentescíveis, pode-se optar pela rota química ou enzimática. A via química é eficiente e rápida, mas gera resíduos tóxicos que devem ser tratados, aumentando o número de operações, consumindo energia e tornando o processo pouco competitivo. A via enzimática emprega condições amenas na reação de hidrólise e é livre de resíduos perigosos, porém é mais lenta e tem como uma das principais barreiras processos eficientes e viáveis de produção de enzimas a custo que não inviabilize seu uso (MISHIMA et al., 2006).

Sabe-se que a degradação enzimática completa de moléculas complexas como hemiceluloses e celulosas, além de pectinas e proteínas presentes na biomassa nativa do bagaço de cana, requer a ação de várias enzimas atuando sinergicamente. Ademais, fatores como inibição enzimática contribuem para dificultar o processo de hidrólise. Diante disso, novas estratégias vêm surgindo na tentativa de aumentar o rendimento da hidrólise e uma explorada no presente trabalho é a consorciação de diferentes enzimas atuando de forma sinérgica sobre a biomassa. Neste sistema dificuldades e barreiras que uma enzima não vencer serão contornadas e ou complementada pela ação de outra enzima não sujeita à mesma situação, aumentando a eficiência global do processo.

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo eficiente para obtenção de enzimas hidrolíticas, as quais podem ser utilizadas na hidrólise enzimática, mas ainda enfrenta dificuldades de aplicação em larga escala. Assim, estudos sobre a produção de celulases em biorreatores são relevantes, englobando isolamento e identificação de microrganismos produtores, análise da produção enzimática, avaliação da eficiência na sacarificação dos substratos desejáveis e preparação de diferentes coquetéis enzimáticos.

O objetivo geral desta dissertação foi agrupar os conhecimentos e a experiência do grupo de trabalho na área para produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas empregando os fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* por fermentação em estado sólido, bem como aplicar essas enzimas, combinadas ou não, na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom (US) em meio alcalino (NaOH) e com pré-tratamento hidrotérmico.

Os objetivos específicos do estudo foram os seguintes:

- Produzir as enzimas em biorreator de leito empacotado com 1 m de comprimento e 7,62 cm de diâmetro;
- Avaliar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* no biorreator;
- Avaliar a eficiência destes extratos puros na hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados;
- Avaliar a eficiência de um combinado enzimático na sacarificação do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino;
- Quantificar os açúcares redutores liberados no processo de hidrólise.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioetanol

O etanol tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo em razão da elevação dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição. O etanol é um biocombustível produzido a partir de vários tipos de matéria-prima vegetal. Comparado aos combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia e de contribuir para a redução das emissões gasosas. O Brasil encontra-se em uma posição favorável no que se refere à produção de etanol, sendo o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar do mundo e ocupando posição de liderança na tecnologia de sua produção (PACHECO, 2011). A produção brasileira de etanol na safra 2013/2014 foi cerca de 25 bilhões de litros de etanol total, apresentando um aumento de aproximadamente 20 % em relação à safra 2012/2013 (UNICA, 2015).

O etanol convencional, também denominado etanol de primeira geração, é obtido pela fermentação de açúcares extraídos de plantas alimentares como cana-de-açúcar, milho, trigo e beterraba açúcareira, usando um processo de fermentação similar ao usado para obter cerveja e vinho, tendo sacarose e amido como fontes de carbono de partida. O etanol celulósico, ou de segunda geração, tem como matéria-prima açúcares provenientes da quebra das cadeias de celulose e hemicelulose, utilizando biomassa residual, não alimentar – como caules, folhas e cascas – que são sobras, uma vez que o produto de interesse já tenha sido extraído, assim como outras culturas que não são utilizadas para nutrição. No Brasil, uma matéria-prima abundante para conversão a bioetanol de segunda geração é o bagaço de cana-de-açúcar, que hoje tem parte empregado na geração de energia elétrica, mas ainda grande parte permanece na usina causando problema de depósito pelo grande volume de área ocupada.

O Brasil iniciou em 2014 a produção de etanol de segunda geração em escala industrial, tendo, atualmente, duas usinas em operação e outra em construção para a fabricação do biocombustível. O etanol 2G, como está sendo chamado, é a principal aposta nacional para aumentar a oferta do produto sem que seja preciso elevar a área plantada de cana-de-açúcar. Isso porque o etanol 2G brasileiro será

produzido da celulose obtida da palha e do bagaço da cana-de-açúcar, as sobras do processo atual de produção de etanol. Calcula-se que, com essa tecnologia, seja possível elevar em até 50 % a produção atual de 25 bilhões de litros de álcool combustível no país (INCT, 2013).

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve o pré-tratamento do bagaço, em que ocorre a desestruturação do material lignocelulósico; a hidrólise dos carboidratos de cadeia longa, em que ocorre a liberação dos açúcares fermentescíveis; a fermentação dos açúcares por leveduras até o etanol; e finalmente a destilação, em que o etanol é separado do caldo fermentado. Na hidrólise, as estruturas moleculares da celulose e da hemicelulose são quebradas, liberando carboidratos de cinco (xilose e arabinose, por exemplo) ou seis (glicose, manose e galactose, dentre outros) carbonos. A hidrólise dos materiais lignocelulolíticos pode ocorrer por via química, principalmente a ácida que além de agressiva, pode gerar subprodutos inibidores de fermentação, ou por via enzimática, utilizando enzimas em condições mais amenas e livres de resíduos indesejáveis (MISHIMA et al., 2006). No entanto, o processo enzimático ainda não é economicamente viável, pois o custo das enzimas comerciais é alto e a eficiência ainda é baixa. Neste contexto, mostram-se relevantes as pesquisas por mais enzimas hidrolíticas microbianas, além dos estudos dos processos fermentativos visando à produção em maior escala.

2.2 Biomassa vegetal

A biomassa vegetal é geralmente composta por celulose, hemicelulose, lignina, lipídeos, proteínas, extrativos, açúcares simples, amido, água e cinzas, sendo os três primeiros os principais constituintes, que pode ser considerada como a massa orgânica dos materiais biológicos vegetais (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006). A biomassa fornece aproximadamente 14 % do consumo global de energia sendo, portanto, a quarta maior fonte de energia do mundo, logo após do carvão, petróleo e gás natural (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009).

Para satisfazer diferentes necessidades energéticas, a biomassa é utilizada para geração de eletricidade, combustíveis para veículos e fornecimento de calor para processos industriais (BRIDGEWATER, 1999). A biomassa é a única fonte de carbono, dentre as fontes de energia renovável, eficiente no armazenamento da

energia solar e capaz de ser convertida em combustíveis sólidos, líquidos e gasosos através de diferentes processos (OZBAY et al., 2001).

Uma grande variedade de recursos de biomassa encontra-se disponível na Terra para a conversão em bioprodutos. Dentre esses recursos pode-se incluir a madeira e seus resíduos, os subprodutos das safras agrícolas e os resíduos agroindustriais, rejeitos do processamento de alimentos, materiais de origem marinha (plantas aquáticas e algas) e os dejetos municipais e industriais (BALAT et al., 2009).

A maior parte da energia produzida a partir de biomassa utiliza a madeira e seus resíduos (64 %), seguida dos rejeitos sólidos municipais (24 %), agrícolas (5 %) e gases de aterros sanitários (5 %) (BALAT, 2008). Entretanto, alguns tipos de biomassa podem ser cultivados com o propósito específico de produção energética, tais como a cana-de-açúcar, milho, beterraba açúcareira, grãos, algas marinhas, entre outros (DEMIRBAS, 2005a). Neste caso, é de suma importância que a colheita tenha um alto rendimento de material seco por unidade de área plantada (toneladas/hectares), resultando em uma diminuição das áreas necessárias ao plantio, bem como no custo de produção da energia a partir desta biomassa (DEMIRBAS, 2005b).

Para a criação de novos biomateriais todos os recursos podem ser utilizados e, para isso, é necessário um entendimento completo da composição da matéria-prima, seja ela a planta inteira ou algum de seus constituintes, de modo que os elementos funcionais desejados possam ser obtidos e utilizados na produção de bioprodutos (HOWARD et al., 2003).

2.2.1 Biomassa lignocelulolítica

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto fibroso de natureza lignocelulósica proveniente dos processos de extração do suco pela moagem da cana-de-açúcar, sendo composto por aproximadamente 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina (PANDEY et al., 2000). Trata-se de um tipo de biomassa vegetal que apresenta grande heterogeneidade morfológica sendo constituída principalmente de fibras (função estrutural), vasos (elementos de condução) e parênquima (função de armazenamento) (SANJUAN et al., 2001).

Devido ao baixo teor de cinzas (2,4 %), o bagaço de cana apresenta uma grande vantagem para o processo de bioconversão por microrganismos quando comparado com outros resíduos, como a palha de arroz e de trigo, que contêm aproximadamente 17,5 e 11 % de cinzas, respectivamente. Além disso, em comparação com outros resíduos agroindustriais, o bagaço de cana pode ser considerado um rico reservatório de energia solar devido ao seu alto rendimento (aproximadamente 80 t/ha, em comparação com 1, 2 e 20 t/ha para trigo, gramíneas e árvores, respectivamente) e capacidade de regeneração anual (PANDEY et al., 2000).

A parede celular vegetal é uma estrutura biológica complexa constituída por polímeros e outras moléculas cujas proporções e organização estrutural variam de acordo com o tipo e a idade. Encontra-se dividida em lamela média, parede primária e parede secundária, sendo que esta última compreende-se em 3 camadas: S_1 , S_2 e S_3 como é possível observar na Figura 2.1.

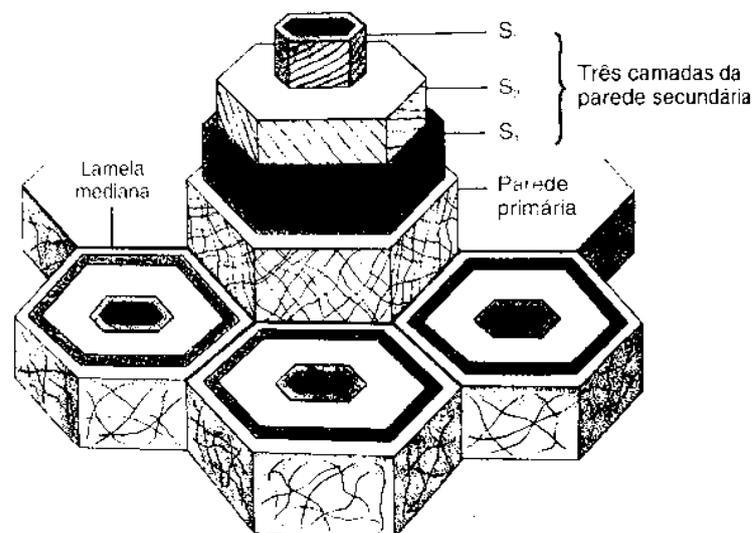


Figura 2.1. Estrutura da parede celular vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2003).

A parede celular primária é constituída basicamente por blocos de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas estruturais. As fortes microfibrilas de celulose cristalina encapsulam a célula em uma estrutura de malha e a hemicelulose se associa intimamente com as microfibrilas de celulose, fortalecendo a estabilidade (TEERI et al., 2007). As pectinas unem-se por ligações cruzadas covalentes e iônicas para formar redes estruturais independentes, mas com sinergismo com a rede de celulose/hemicelulose (CHANLIAUD et al., 2002). As propriedades físicas da

hemicelulose e pectina são largamente determinadas pela natureza e abundância de cadeias laterais, e dependem das concentrações locais de sais ligados ionicamente e covalentemente (como cálcio e boro) e potenciais agentes ligantes, como os ácidos ferúlico e cumárico (GRABBER et al., 2004). Variando as estruturas ou o meio químico desses polímeros, as propriedades mecânicas das paredes celulares podem ser alteradas durante os estágios de desenvolvimento e em diferentes tecidos da planta (BURGERT, 2006).

As paredes secundárias contêm cadeias poliméricas das paredes primárias e são lignificadas nos estágios posteriores de formação do vegetal como mostra a Figura 2.2. As microfibrilas de celulose são depositadas nas paredes secundárias por um processo altamente organizado, levando a uma estrutura hierárquica com três camadas (S_1 , S_2 e S_3). Na camada dominante, S_2 , as microfibrilas de celulose são muito alinhadas, contribuindo para a resistência mecânica do vegetal (TEERI et al., 2007).

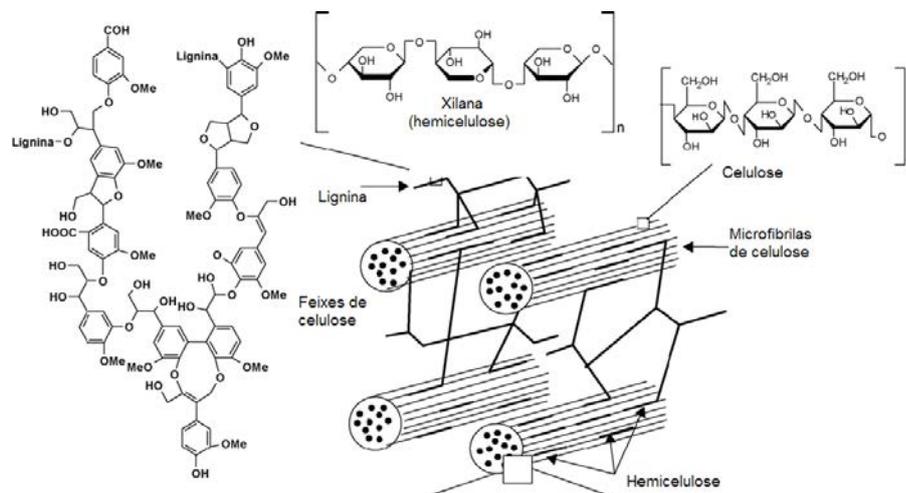


Figura 2.2. Representação estrutural da organização da fibra lignocelulósica (GRAMINHA et al., 2008).

A lignina é o principal componente não-carboidrato da biomassa vegetal. É depositada na rede de carboidratos da parede celular durante o crescimento da parede secundária. Trata-se de uma substância complexa formada por polímeros aromáticos naturais, sendo a fonte mais abundante na natureza (PINTO, 2010). Encontra-se covalentemente ligada à hemicelulose, através de ligações éster com a xilana, formando uma complexa matriz que envolve as microfibrilas de celulose. A propriedade física mais importante dessa macromolécula orgânica é a rigidez, que

não apenas promove força aos tecidos da planta, mas também previne o colapso dos elementos condutores de água e previne o ataque de microorganismos celulolíticos à parede celular da planta (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Sendo assim, a estrutura básica de toda biomassa lenhosa consiste essencialmente de três polímeros: celulose, hemiceluloses e lignina no tronco, folhagem e casca. A proporção entre esses três constituintes varia entre as espécies, e ainda há diferenças entre as madeiras duras e moles. As madeiras duras possuem uma maior proporção de celulose, hemicelulose e extrativos que madeiras moles, porém estas possuem uma maior proporção de lignina. De maneira geral, as madeiras duras contêm aproximadamente 43-47 % de celulose, 25-35 % de hemicelulose, 16-24 % de lignina e 2-8 % de extrativos, enquanto a proporção das madeiras moles é de 40-44 % de celulose, 25-31 % de lignina, 25-29 % de hemicelulose e 1-5 % de extrativos (RYDHOLM, 1965).

2.2.2 Celulose

A celulose é o principal componente da biomassa da planta e, como tal, é o polímero orgânico mais abundante do planeta. Constitui aproximadamente 50 % da biomassa vegetal, representando uma das fontes mais importantes para obtenção de açúcares fermentescíveis. Está amplamente distribuída na natureza, ocorrendo tanto nas plantas primitivas como nas altamente evoluídas e, geralmente, encontra-se associada a outras moléculas como hemicelulose e lignina (MACHUCA, 1991). É um homopolissacarídeo linear que consiste de unidades de glicose (D-glucopiranoose) unidas entre si por ligações glicosídicas β -(1,4). O final da cadeia de glicose com um carbono anomérico que não está ligado a outro resíduo de glicose é conhecido como extremidade redutora do polímero. A outra extremidade do polímero é conhecida como não redutora (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON; 2005).

As cadeias paralelas unem-se para formar uma estrutura agregada e insolúvel na maioria dos solventes que varia de comprimento e largura, devido à linearidade da cadeia de celulose, bem como ao grande número de grupos hidroxilas e sua capacidade de formar ligações de hidrogênio. Essa fibra de celulose apresenta regiões amorfas, menos regulares e regiões cristalinas, altamente ordenadas e de difícil degradação, as quais são formadas pela configuração paralela das cadeias

lineares, o que implica na formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, contribuindo para a insolubilidade da celulose e sua baixa reatividade, tornando-a mais resistente à hidrólise ácida e enzimática, dificultando a entrada de água e modificando a elasticidade das fibras (RAMOS, 2003; DA SILVA; GOMES; FRANCO, 1997; BOBBIO; BOBBIO, 2003; NELSON; COX, 2004).

2.2.3 Hemicelulose

A hemicelulose é definida como a fração da parede celular que pode ser extraída com álcali (MOHR; SCHOPFER, 1995). As hemiceluloses das plantas são polissacarídeos cuja natureza química varia de tecido para tecido e de espécie para espécie. Estes polissacarídeos são formados por diversas pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glucurônico e ácidos galacturônicos), frequentemente acetilados e formando cadeias ramificadas (MARTÍNEZ et al., 2005).

As hemiceluloses estão estruturalmente mais relacionadas com a celulose do que a lignina e são depositadas na parede celular nos primeiros estágios da biosíntese. Elas são derivadas principalmente de cadeias de pentose, e atuam como um material cimentante, mantendo unidas as micelas e fibras de celulose (DEMIRBAS, 2008). A xilana é o principal polímero desta fração, e consiste num polissacarídeo composto de resíduos de xilose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas, contendo ramificações de pentoses e hexoses. É o segundo polissacarídeo mais abundante em vegetais e calcula-se que esteja entre as três primeiras fontes de carbono orgânico renovável (BEG et al., 2001; KATAPODIS; CHRISTAKOPOULOU; CHRISTAKOPOULOU, 2006).

O aproveitamento eficiente da xilana é imprescindível quando se deseja utilizar a biomassa lignocelulósica para processos de bioconversão, seja nos processos para a fermentação alcoólica ou para a indústria de alimentos na produção do adoçante xilitol (DA SILVA, 1992).

2.2.4 Lignina

A lignina é o principal componente não-carboidrato da biomassa da planta. É depositada na rede de carboidratos da parede celular durante o crescimento da

parede secundária. Trata-se de uma molécula complexa formada por compostos aromáticos naturais (LORA; GLASSER, 2002; SUHAS; CARROTT; RIBEIRO CARROTT, 2007).

Essas macromoléculas tridimensionais de origem fenilpropanóica são constituídas de unidades básicas de p-hidroxifenilpropano (p-H), guaiacilpropano (G) e siringilpropano (S). A estrutura resultante é uma macromolécula complexa com uma grande variedade de grupos funcionais como é possível observar na Figura 2.3. Devido a essas estruturas complexas, as ligninas formam polímeros com regiões amorfas (TSUJINO; KAWAMOTO; SAKA, 2003; POUTEAU et al., 2003).

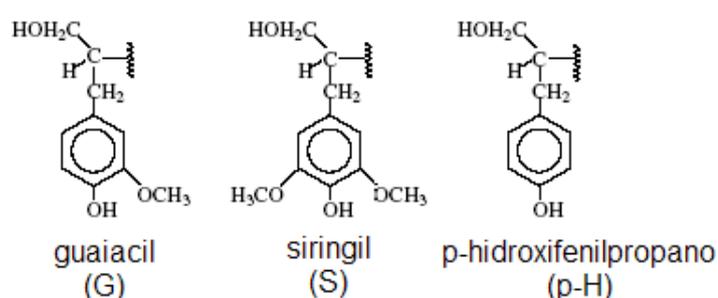


Figura 2.3. Representação esquemática de unidades estruturais precursoras da lignina (PINTO 2010).

Sua estrutura principal provém dos precursores primários: álcool trans coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-para-cumário (SACON; WEISSHEIMER, 1996). A complexa matriz formada pelas ligações entre esses precursores resulta em uma grande variedade de grupos funcionais, tais como hidroxil, metoxil e carbonil, que conferem uma alta polaridade à macromolécula de lignina (FELDMAN et al., 1991).

A lignina também está covalentemente ligada à hemicelulose, através de ligações éster com a xilana, formando uma complexa matriz que envolve as microfibrilas de celulose. A propriedade física mais importante dessa macromolécula orgânica é a rigidez, que não apenas promove força aos tecidos da planta, mas também previne o colapso dos elementos condutores de água e previne o ataque de microorganismos celulolíticos à parede celular da planta (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

A concentração de lignina varia entre diferentes espécies de plantas, sendo que essa diferença de concentração é devido à proporção dos alcoóis que formam a lignina (BAURHOO; RUIZ-FERIA; ZHAO, 2008). O teor de lignina em base seca varia entre 20 e 40 % do peso nas madeiras duras e moles e de 10 a 40 % para espécies herbáceas, como o bagaço de cana-de-açúcar, a espiga de milho, casca de amendoim, casca de arroz e a palha (YAMAN, 2004).

2.3 Enzimas

A denominação enzima, proposta pelo fisiologista alemão Wilhelm Kuhne em 1867, deriva da expressão grega *en zymç*, que significa “em fermentação” (SPIER, 2005). As enzimas são substâncias orgânicas específicas constituídas por polímeros de aminoácidos que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos (FELLOWS, 1994).

Conforme Spier (2005), enzimas são majoritariamente biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária e termolábeis, responsáveis por acelerar a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, ou seja, reduzem a barreira energética dessas reações e efetuam processos metabólicos na célula viva. Ocorrem em todos os organismos vivos, sejam plantas ou animais, desde os mais simples (unicelulares) aos mais desenvolvidos (pluricelulares).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal e vegetal como, por exemplo, menor custo e maior facilidade de produção em larga escala (OLIVEIRA et al., 2006). Apesar disto, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre um determinado substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a triagem prévia das enzimas adequadas às condições nas quais serão realizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

Devido ao seu alto grau de especificidade junto ao substrato, as enzimas são largamente utilizadas no setor industrial, destacando-se as indústrias de alimentos e

bebidas, têxtil, papelaria e farmacêutica, bem como para diagnóstico laboratorial (KAPLAN; PESCE, 1996). Grande parte dessas enzimas extracelulares, de origem microbiana, é obtida a partir de processos fermentativos, entre eles o cultivo em estado sólido (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). A escolha por um substrato específico para o cultivo em estado sólido leva em consideração uma série de fatores, principalmente relacionados ao custo e à viabilidade.

O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais. Uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulósicos é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose (avicelase, carboximetilcelulases e β -glicosidase); enzimas que atuam sobre a porção hemicelulósica (xilanasas, mananases, glucanases e galactanases) e enzimas oxidativas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas, que atuam sobre a lignina (TUOR; WINTERHALTER; FIECHTER, 1995). Assim, as enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico clivam as ligações que formam os polímeros de polissacarídeos liberando hexoses e pentoses fermentescíveis a etanol, porém, enzimas acessórias como as oxidases, são importantes na eficiência do processo (ROSA, 2014).

2.3.1 Celulases

As celulases são uma classe de enzimas que possuem vasto potencial de aplicações, como aditivos alimentares, hidrólise de biomassa lignocelulósica e tratamento de resíduos (YEOMAN et al., 2010), sendo constituídas por endoglucanases (quebra celulose na região amorfa e libera celo-oligossacarídeos), exoglucanases (quebra celulose e celo-oligossacarídeos maiores e libera celobiose) e β -glicosidase (libera moléculas de glicose). Portanto, a hidrólise total da celulose somente ocorre através da ação sinérgica desses três tipos de celulases: endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase e β -glicosidase ou celobiase (Figura 2.4).

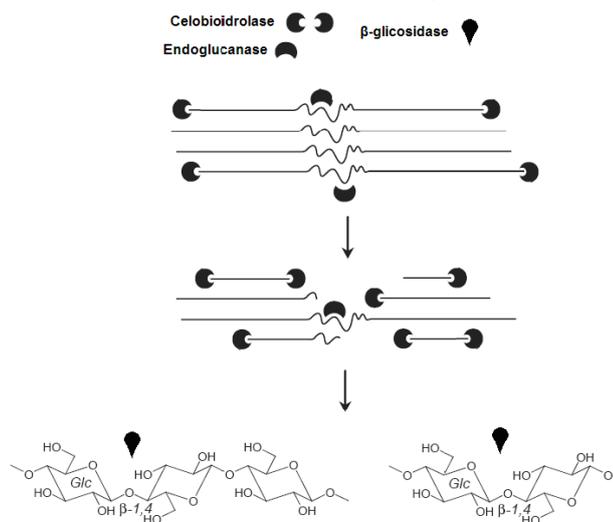


Figura 2.4. Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

As celulases microbianas são enzimas que apresentam potencial para aplicação em diversos processos biotecnológicos, destacando-se nos últimos anos a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol de segunda geração.

A produção de celulases para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos pode ser feita por fungos e bactérias. Estes microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. Embora muitas bactérias celulolíticas produzam grandes quantidades de enzimas altamente específicas, como é o caso dos anaeróbios *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens*, elas não são usadas em pesquisas para produção comercial de celulases, pois requerem condições de anaerobiose para o seu desenvolvimento e ainda apresentam uma baixa taxa de crescimento. Desta forma, os fungos filamentosos são os principais organismos pesquisados para a produção de enzimas hidrolíticas de material lignocelulósico (DUFF; MURRAY, 1996). A utilização dos fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse comercial é também vantajosa devido ao fato de estes microrganismos excretarem estas proteínas para o meio de cultura, o que facilita o processo de obtenção e eventual purificação (REIS, 2007).

Vários estudos demonstram a existência de microrganismos produtores de celulase em diversos substratos, como apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Comparação entre vários estudos com microrganismos produtores de celulase (Fonte: ZANELATO, 2011).

Microrganismo	Substrato	Preferência térmica	Referência
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	Farelo de trigo	Mesofílico	Couri et al. (2000)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	Farelo de trigo	Mesofílico	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864	Silagem de sorgo	Mesofílico	Castillo (1994)
<i>Bacillus sp.</i>	Farelo de trigo	Mesofílico	Gessesse e Mamo (1999)
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Resíduos de citronela	Mesofílico	Chandra et al. (2009)
<i>Aspergillus terreus</i> M 11	Palha de milho	Termofílico	Gao et al. (2008)
<i>Thermoascus aurantiacus miehe</i>	Bagaço de cana	Termofílico	Silva et al. (2005)
<i>Thermoascus aurantiacus miehe</i>	Farelo de trigo	Termofílico	Silva et al. (2005)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	Bagaços de cana e de laranja e farelo de trigo	Termofílico	Umsza-Guez (2009)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo	Mesofílico	Ridder et al. (1999)
<i>Trichoderma spp.</i>	Resíduos de citronela	Mesofílico	Chandra et al. (2009)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	Mesofílico	Sukumaran et al. (2009)
<i>Trichoderma reesei</i> LM-1	Silagem de sorgo	Mesofílico	Castillo (1994)

Como se vê na Tabela 2.1 encontram-se na literatura trabalhos com fungos mesofílicos, mas o uso de fungos termofílicos para a produção de metabólitos por FES tem crescido recentemente, o que se deve ao fato de esses fungos se desenvolverem em temperaturas mais elevadas, reduzindo o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos, e por produzirem enzimas termoestáveis, o que são fatores interessantes do ponto de vista da aplicação industrial destas enzimas

(GOMES et al., 2007). Além disso, sabe-se que os fungos termofílicos desenvolvem-se normalmente durante a segunda fase dos processos de compostagem natural, que é a fase de alta temperatura (acima de 40 °C) que sucede a microflora mesofílica. Nesta fase, a flora mesofílica já assimilou previamente as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos), de modo que promoveu geração de calor através das reações metabólicas exotérmicas, elevando a temperatura até acima de 40 °C, o que conseqüentemente inibe o crescimento dos mesofílicos e estimula a germinação dos esporos dos fungos termofílicos. Como nesta segunda etapa as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis já se encontram praticamente esgotadas, restam apenas os polissacarídeos constituintes da biomassa, como a celulose e hemicelulose, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares, o que justifica a boa produção destes tipos de enzimas pelos fungos termofílicos na fermentação de rejeitos agroindustriais (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000).

2.3.1.1 Endoglucanases

As enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose são as endoglucanases, que possuem a função de hidrolisar randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novas extremidades, sendo uma redutora e uma não redutora (LYND et al., 2002). As endoglucanases também atuam na rápida solubilização do polímero celulósico, reduzindo o grau de polimerização da molécula. Tal fato ocorre devido à fragmentação da cadeia polimérica em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES; EGYHÁZI; RÉCZEY, 2004). Para determinação da atividade endoglucanase o substrato preferencialmente empregado é a carboximetilcelulose (CMC), pois possui alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (CAO; TAN, 2002; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

2.3.1.2 Exoglucanases

As celobiohidrolases e as glucanohidrolases constituem o grupo das enzimas denominadas exoglucanases. Essas enzimas têm a importante capacidade de hidrolisar a cadeia celulósica, permitindo a liberação de glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002). As exoglucanases atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando dímeros de glicose (CAO; TAN, 2002). As celobiohidrolases participam da hidrólise primária da fibra celulósica e são responsáveis pelo fenômeno denominado amorfogênese, que envolve uma ruptura física do substrato, ocasionando a desestratificação das fibras em decorrência do aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases (ZHANG; LYND, 2004).

As celobiohidrolases são divididas em dois tipos. As do tipo I possuem a função de hidrolisar as extremidades redutoras e as do tipo II são responsáveis pela hidrólise dos terminais não redutores (Figura 2.5). Essas enzimas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de suma importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico – as celobiases (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

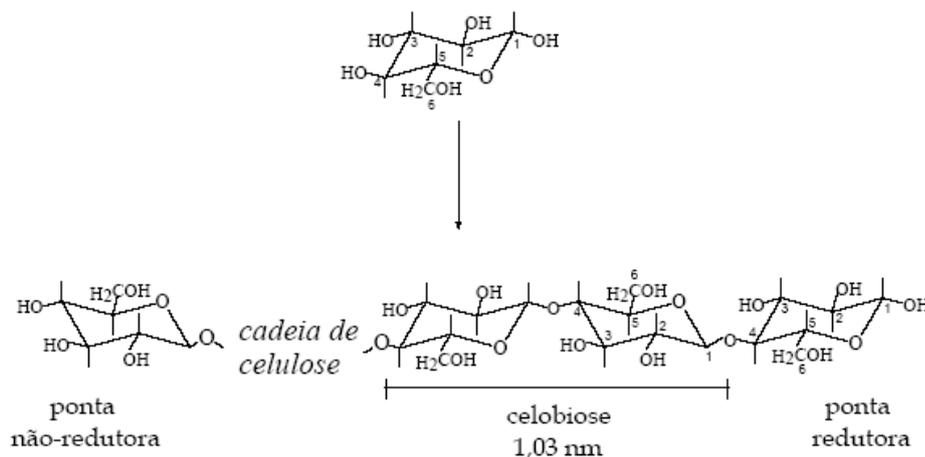


Figura 2.5. Representação das extremidades não-redutora e redutora da molécula de celulose (RAMOS, 2003).

2.3.1.3 β -glicosidases

As β -glicosidases, também denominadas celobiasas, são as enzimas responsáveis por hidrolisar celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002; LYND; ZHANG, 2002), reduzindo a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença dos dímeros de glicose (PETROVA; BAKALOVA; KOLEV, 2002) e, por sua vez, aumentando o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008). Assim como as celobiohidrolases, as β -glicosidases também são reportadas por sofrerem inibição pelo seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997).

2.3.2 Enzimas oxidativas na degradação da celulose

Atualmente, é aceita pela comunidade científica a existência de um sistema microbiano óxido-redutor de degradação da celulose em paralelo com o sistema, já elucidado, de celulasas hidrolíticas. Assim, a degradação da celulose é realizada por um complexo de enzimas hidrolíticas e oxidativas que agem sinergisticamente na transformação da molécula em monômeros e dímeros de glicose (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).

Ressalta-se que, não há relação antagônica entre os dois sistemas, uma vez que as oxidases parecem atacar as regiões altamente cristalinas da celulose em contraste às endoglucanases, que são ativas nas partes amorfas da fibra celulósica, e as celobiohidrolases, que atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina. No entanto, esse mecanismo de ação ainda não foi completamente definido. A hipótese sugerida é que ocorra um rompimento na cadeia de celulose por ação das oxidases, tornando-as mais acessíveis às celulasas hidrolíticas (KOSTYLEV; WILSON, 2012). Os biocatalisadores envolvidos na clivagem oxidativa da celulose são: polissacarídeos mono-oxigenases (PMOs), celobiose desidrogenases (CDHs) e enzimas da família de enzimas com módulos de ligação ao carboidrato 33 (CBM33) (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).

Desde a metade do século 20, pesquisadores propuseram a presença de um fator adicional não hidrolítico, o qual torna a biomassa menos recalcitrante ao ataque enzimático (REESE; SIU; LEVINSON, 1950). De acordo com o mecanismo proposto,

a hidrólise da celulose é realizada pela atividade sinérgica de dois componentes: o primeiro (C1), responsável pelo inchaço e ruptura da celulose, e o segundo (Cx), que apresenta atividade de endoglucanase. Apesar de muitos anos de pesquisa, a natureza do componente C1, permanece uma questão não esclarecida (ZHANG; LYND, 2004).

Na literatura, módulos de ligação a carboidratos, expansinas e soleninas, aparecem como potenciais candidatos responsáveis pela ruptura mediada por C1 das matrizes celulósicas altamente ordenadas (ARANTES; SADDLER, 2010). Também se incluíram nessa lista algumas proteínas fúngicas homólogas a glicosil hidrolases (GH), família 61, exibindo habilidade celulolítica crescente quando combinadas com celulasas comuns (MERINO; CHERRY, 2007). Embora o mecanismo exato de ação não esteja definido, parece que PMOs e CBM33s realizam a ação do componente C1 sugerido por Reese, Siu e Levinson (1950), rompendo as cadeias de celulose firmemente empacotadas e tornando-as mais acessíveis às celulasas hidrolíticas.

A descoberta dessas enzimas oxidativas, bem como de um novo mecanismo enzimático, é de suma importância dos pontos de vista científico e industrial, pois vai ampliar a compreensão da digestão da celulose na natureza e contribuirá para o desenvolvimento de coquetéis mais eficientes para a conversão de biomassa lignocelulósica. Entretanto, há muitos pontos científicos e técnicos que precisam ser abordados para uma introdução efetiva das oxidases em aplicações biotecnológicas.

Um esquema simplificado desse novo mecanismo de ação sobre a degradação enzimática da celulose é apresentado na Figura 2.6. O processo envolve celobiohidrolases (CBH), endoglucanases (EG), polissacarídeos mono-oxigenases (PMOs) – tipo 1 e tipo 2 – (PMO1 e PMO2, respectivamente) e β -glicosidases. A celobiose desidrogenase (CDH) é um potencial doador de elétrons para PMOs. Nesse mecanismo, endoglucanases e PMOs clivam internamente as cadeias de celulose, liberando extremidades redutoras que são direcionadas para CBHs. CBHs geram celobiose ou celobiose oxidada que são, subsequentemente, hidrolisados por β -glicosidase (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).

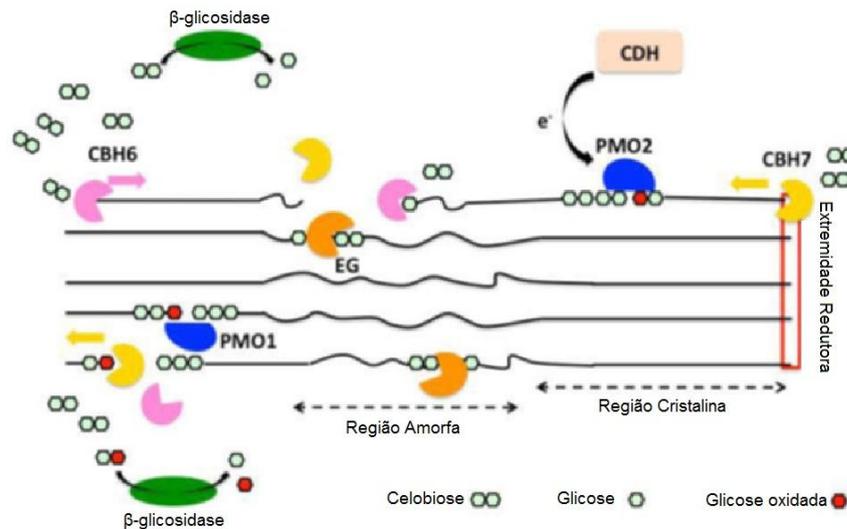


Figura 2.6. Novo mecanismo proposto de degradação enzimática da celulose (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).

A descoberta do sistema celulolítico óxido-redutor que age em complementaridade com o sistema celulolítico já conhecido, muda drasticamente a compreensão da degradação enzimática da biomassa vegetal. Estudos devem ser focados em, além de reduzir a quantidade de enzima e o tempo de processamento, desenvolver novas estratégias baseadas nas propriedades destes biocatalisadores. Para a aplicação dos biocatalisadores oxidativos na produção industrial do bioetanol, a quantidade e a natureza dos agentes redutores adicionados, bem como das razões enzimáticas (hidrolíticas e oxidativas), deveriam ser otimizadas a fim de se obter a máxima taxa de conversão da celulose, mantendo-se uma carga mínima de enzimas. A composição da mistura ótima deveria também ser ditada pela composição da matéria-prima e pelas características do processo (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012). Assim, os resultados dessas pesquisas poderão contribuir de modo efetivo para a produção de bioetanol comercialmente competitivo, um objetivo almejado da indústria de biocombustíveis.

2.3.3 Hemicelulases

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal e enzimas que degradam as cadeias laterais (ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990; KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997). Assim a hidrólise das hemiceluloses ocorre de maneira aleatória, produzindo

heteroxilo-oligossacarídeos lineares e ramificados contendo cadeias laterais arabinofuranose, ácido glicurônico ou ácido 4-O-metil-glicurônico. Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes tipos de enzimas são requeridos para sua modificação e degradação enzimática. Um sistema enzimático incluindo endo e exo-xilanases, manases, β -xilosidase, α -glicuronidase e α -arabinofuranosidase torna-se necessário para a hidrólise completa desses heteroxilo-oligossacarídeos (BIELY, 1985). As principais enzimas degradadoras da hemicelulose são a endo-1-4- β -D-xilanase e a endo-1-4- β -D-manase (BIELY, 1993).

As xilanases são enzimas hemicelulolíticas responsáveis pela quebra das fortes ligações cruzadas entre a celulose e a hemicelulose. A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de clivar as cadeias laterais. A hidrólise de diferentes xilanas por xilanases rende variados produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xiloses, xilobioses e xilotriosos liberadas, assim como a natureza dos açúcares com ácido urônico substituídos (BIELY, 1985). Para a completa degradação da xilana, principal componente da fração de hemicelulose, são necessárias diversas enzimas. As endo-1,4- β -xilanases, clivam as ligações internas da cadeia principal de xilana, resultando em uma redução no grau de polimerização.

Os xilooligossacarídeos são os principais produtos formados pela ação desta enzima. As β -xilosidases atuam sobre a xilobiose e os xilooligossacarídeos, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de xilose. É uma enzima importante no processo por evitar que as endoxilanases sejam inibidas pelos seus próprios produtos de degradação. Ainda existem as exo- β -L-arabinofuranosidase (hidrolisa as ligações das ramificações de arabinoses), endo-1,5- β -L-arabinofuranosidase (ativa apenas quando próxima às arabinoses lineares), β -D-glucuronidases, endo-1,4- β -D-manases, β -manosidases, acetil xilana esterases, α -glucuronidases, α -galactosidases e esterases ácidas ferúlicas (POLIZELI et al., 2005; JORGENSEN; KUTTER; OLSSON, 2003).

2.4 Fermentação no estado sólido

A fermentação é uma ferramenta importante na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes,

biopesticidas, entre outros e trata-se de um processo que acompanha o desenvolvimento microbiano (SCHMIDELL et al., 2001; PANDEY, 2003).

De acordo com Germano et al. (2003) e Pandey (2003), o sistema de fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens em relação ao submerso (FSm), tais como: maior diversidade na utilização de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, soja, arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, etc.; menor quantidade de água, o que permite uma produção mais concentrada de metabólitos, diminuindo a formação de água residual e problemas de contaminação por bactérias durante o processo; e ainda, na maioria das vezes, apresenta maior rendimento de produção de enzimas (DINI, 2010). A seleção do substrato adequado para FES é extremamente importante, pois este material sólido atua como suporte físico, além de fornecer nutrientes ao microrganismo (PANDEY, 2003). Outra vantagem da FES é que pode ser realizada por um processo estacionário, não acarretando em custos energéticos adicionais (SANDHYA et al., 2005). Ademais, o processo de fermentação em estado sólido permite obter alta concentração de enzimas quando comparada à fermentação submersa (ZANELATO, 2011), pois é capaz de reproduzir o habitat natural de alguns microrganismos, como os fungos filamentosos (PANDEY, 2003). No entanto, a técnica de produção de celulases por FES ainda está em desenvolvimento, não se encontrando biorreatores disponíveis comercialmente para tal finalidade, sendo este um dos principais entraves para que esse processo biotecnológico seja pouco aplicado industrialmente.

O tipo de microrganismo que pode crescer e formar produtos na FES é determinado, principalmente, pela atividade de água (a_w) do meio. De acordo com Mitchell, Berovic e Krieger (2000), valores de a_w entre 0,95 e 0,98 podem ser considerados típicos para os meios da fermentação em estado sólido. Este intervalo de atividade de água é ideal para o crescimento de muitos fungos, principalmente os filamentosos, os quais geralmente possuem a condição ótima de crescimento em valores de a_w entre 0,96 e 0,98. Consequentemente, a maioria dos processos em meio sólido são conduzidos com fungos filamentosos, sendo mais comumente utilizados os Phicomycetos (*Mucor* e *Rhizopus*), Ascomycetos (*Aspergillus* e *Penicillium*) e Basidiomicetos (fungos da podridão branca) (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Nigam e Singh (1994) enfatizam que os fungos filamentosos são os microrganismos de maior importância na FES, pois estes conseguem crescer de

maneira natural em frutas, grãos e resíduos agrícolas e florestais, sendo as condições de cultivo deste tipo de processo muito próximas às condições naturais de crescimento dos fungos em seu habitat natural. A facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e a capacidade dos fungos filamentosos em produzir esporos, facilitando o preparo do inóculo e a estocagem das células na forma vegetativa por longos períodos de tempo, são outras características que os tornam mais atrativos para utilização na FES (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

O gênero *Trichoderma* possui uma distribuição bastante ampla, sendo observado no mundo inteiro, em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles compostos por matéria orgânica. Por se tratar de um microparasita necrotrófico, apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004). A atividade de biocontrole tem sido intensamente estudada e deve-se, sobretudo, à produção de enzimas extracelulares degradadoras da parede celular de diversos fungos, como as celulasas, quitinases, β -1,4-glicosidades e proteases (OLIVEIRA, S., 2010). Do ponto de vista biotecnológico, algumas espécies, como o *Trichoderma reesei*, utilizado neste trabalho, e o *Trichoderma viride*, têm sido utilizadas para a produção de celulasas em escala industrial (CORABI-ADELL; LUCON; KOIKE, 2002).

O fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* é frequentemente isolado do solo ou de massas de matéria vegetal decomposta (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1982), em que contribui para a decomposição de polissacarídeos presentes nas estruturas das plantas. Os resultados de atividades celulolíticas obtidos por Zanelato (2011) são muito promissores quando comparados aos de outros trabalhos da literatura que empregaram fungos do mesmo gênero.

Os microrganismos termofílicos, atualmente, têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de aplicação industrial. Estes microrganismos apresentam uma série de vantagens quando comparados com microrganismos mesofílicos, pois apresentam rápido crescimento, alta estabilidade das enzimas e ausência de patogenicidade. Segundo Machuca (1991), o interesse no estudo de fungos termofílicos baseia-se no fato de que estes apresentam uma elevada velocidade de crescimento e produção de celulasas, alcançando níveis superiores aos microrganismos mesofílicos.

No Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP, integrante do Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia, do qual o orientador deste trabalho é membro, tem-se utilizado o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* e o mesofílico *Trichoderma reesei* para produção de enzimas celulolíticas. Na Tabela 2.2, observam-se os resultados de Pinto (2010), que estudou a produção de enzimas celulolíticas por quatro espécies de fungos, dentre os quais *Trichoderma reesei*, através de fermentação em estado sólido em meio composto por bagaço de cana e farelo de trigo. Nota-se que o fungo mesofílico produziu quantidades intermediárias para a maioria das enzimas, além de requerer maior tempo de fermentação para produção de enzimas celulolíticas. Os resultados das atividades enzimáticas do extrato produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* obtidos por Zanelato (2011) também podem ser observados na Tabela 2.2, os quais se mostram muito promissores.

Tabela 2.2. Produção de enzimas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* por FES.

Enzimas	Atividade (U/gss)*	
	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>
CMCase	54,3	800
B-glicosidase	3,5	NR**
Xilanase	639,8	900
FPU	9,6	8,3
Referência	Pinto (2010)	Zanelato (2011)

*U/gss = Unidades de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco

** NR = Não reportado

2.5 Biorreatores de leito fixo para fermentação no estado sólido

O biorreator, fermentador, reator biológico ou reator químico é o local onde ocorre o processo fermentativo, no qual substrato e microrganismo são colocados em contato para que a fermentação ocorra, de modo que se obtenha o bioproduto de interesse ao final do processo. A função do equipamento é, portanto, simular as

condições do habitat natural de um microrganismo para que nele se realize a produção do composto desejado (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003).

Os biorreatores de fermentação no estado sólido podem ser classificados de acordo com os regimes de agitação e aeração, podendo ser de leito empacotado, de bandeja, de tambor rotativo, de leito fluidizado, entre outros, conforme mostrado na Figura 2.7 (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

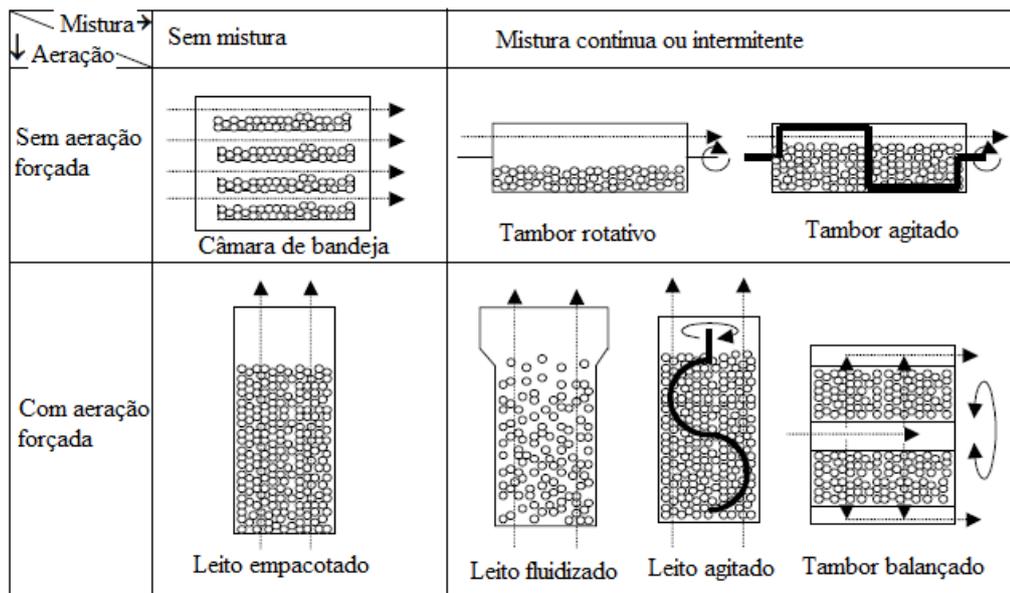


Figura 2.7. Classificação de biorreatores de FES (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

O tipo de biorreator de interesse deste trabalho foi o de leito empacotado, o qual é operado com aeração forçada e normalmente é composto por três seções: uma seção de entrada (para condicionamento das propriedades do ar); uma seção térmica (onde ocorre a fermentação propriamente dita, devendo ser encamisada para manutenção da temperatura ótima do processo) e uma seção de saída (onde ocorre a exaustão, evitando contaminação do biorreator pelo ambiente e do ambiente pelo ar que sai do reator).

Em termos de construção e manutenção, os fermentadores de leito fixo são mais baratos que os de leito móvel. Seu projeto é relativamente simples, de fácil manuseio e baixo requisito operacional, configurando-se como um tubo interno, no qual é empacotado o substrato inoculado, circundado por uma camisa, pela qual circula água na temperatura ideal para a reação. Sua característica de leito estático

o torna ideal para microrganismos sensíveis às tensões de cisalhamento, como é o caso de alguns fungos filamentosos, que podem ter suas hifas rompidas com a movimentação do leite, o que prejudicaria o desenvolvimento do microrganismo.

No entanto, as principais desvantagens deste reator são a segregação de umidade e a heterogeneidade térmica, que afetam a taxa e a seletividade das reações, com distribuição de produtos não homogênea no fermentador (ASHLEY; MITCHELL; HOWES, 1999; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006; UMSZAGUEZ, 2009; ZANELATO, 2011).

2.6 Pré-tratamento do material lignocelulósico

A natureza da matéria presente no bagaço de cana-de-açúcar evidencia a importância da etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico, pois os componentes estruturais contidos na parede celular dos lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) são fortemente associados, formando um complexo estável e recalcitrante. A parede celular da cana-de-açúcar é composta por uma malha de celulose contendo regiões amorfas e cristalinas e hemicelulose ligadas covalentemente à lignina, o que dificulta a ação de enzimas que poderiam hidrolisar esses compostos em açúcares fermentescíveis. A estrutura cristalina da celulose também representa um obstáculo extra à hidrólise enzimática. Somente com a remoção da lignina e a ruptura da celulose cristalina as enzimas teriam acesso aos polímeros de açúcar (PINTO, 2010).

Este processo tem como objetivo aumentar o tamanho dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose, bem como reduzir a estabilidade das fibras, sendo utilizado com o intuito de reduzir a interação entre celulose, hemicelulose e lignina, solubilizando a hemicelulose e/ou a lignina, e tornando o substrato mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG; NAGWANI; HOLTZAPPLE, 1998; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Assim, o pré-tratamento visa fundamentalmente o aumento da acessibilidade das enzimas à celulose.

De maneira geral, o pré-tratamento deve promover os seguintes requisitos: aumentar a formação de açúcares ou facilitar a subsequente hidrólise enzimática; evitar a degradação ou perda de carboidratos; evitar a formação de subprodutos

inibitórios para as etapas de hidrólise e fermentação; ser viável do ponto de vista econômico (SUN; CHENG, 2002).

Nesse sentido, diferentes alternativas tecnológicas têm sido estudadas para serem empregadas como pré-tratamentos e esses métodos são divididos em quatro categorias básicas: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Os pré-tratamentos físicos aumentam a área superficial das partículas da biomassa lignocelulósica por redução do tamanho de partícula, como é o caso da moagem. Os pré-tratamentos físico-químicos consistem de reações químicas realizadas a altas temperaturas e pressões, como é o caso da explosão a vapor, já os métodos químicos degradam a hemicelulose ou removem a lignina e então a rede lignocelulósica é desestruturada, como é o caso do cozimento com ácido ou base forte e dos processos oxidativos avançados. Por fim, os pré-tratamentos biológicos são métodos que empregam microrganismos para deslignificação do material, para os quais pode ocorrer perda considerável de carboidratos devido ao longo tempo requerido (CANILHA et al., 2012). A combinação de métodos distintos é comum na conversão de diferentes materiais lignocelulósicos em diferentes produtos (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

2.6.1 Processos oxidativos avançados

Os processos oxidativos avançados (POAs) surgiram inicialmente para tratar efluentes ricos em compostos biológicos recalcitrantes, como pesticidas, compostos tóxicos, inibidores microbiológicos e outros, os quais não podiam ser tratados por métodos biológicos convencionais de tratamento. Os POAs são caracterizados pela formação de radicais hidroxila em meio líquido em quantidade suficiente para oxidar compostos orgânicos. São processos simples, os quais podem ser homogêneos ou heterogêneos e que utilizam na maioria dos casos a combinação de reagentes comuns, como: H_2O_2 , TiO_2 , ZnO , Fe^{2+} , Fe^{3+} , O_3 , O_2 e em algumas vezes técnicas de ultrassom, feixe de elétrons e radiação UV (MEDEIROS, 2008).

Os POAs apresentam características bastante interessantes como pré-tratamento de biomassa, pois a produção de grandes quantidades de oxidantes fortes, principalmente radicais hidroxila, em conjunto com os oxidantes reagentes do processo permite mineralizar e desestruturar compostos altamente recalcitrantes,

como a lignina que faz parte do sistema de proteção mecânica e estrutural da parede celular da biomassa em geral (TRAVAINI, 2011).

A ozonólise ou oxidação por ozônio é um tipo de processo oxidativo avançado, que pode ser utilizado no pré-tratamento químico da biomassa lignocelulósica e sua ação se deve à exposição do material ao ozônio, um poderoso agente oxidante. A degradação promovida pela utilização do ozônio está principalmente relacionada com a lignina, com ligeiro ataque a hemicelulose. A lignina é, portanto, o material mais provável de ser oxidado pela ação do ozônio devido principalmente a estrutura aromática dos seus precursores e a grande quantidade de ligações duplas entre carbono, uma vez que o ozônio é altamente reativo com compostos que possuem ligações duplas conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons (CUBERO et al., 2009). A reação do ozônio com as ligações duplas da lignina pode ser observada na Figura 2.8. As ligações duplas da lignina podem pertencer tanto ao anel aromático quanto à cadeia alifática da lignina e sua clivagem normalmente gera grupos carboxílicos, quebrando a cadeia polimérica da lignina em fragmentos menores, mais oxigenados e mais solúveis (NASCIMENTO et al., 1998).

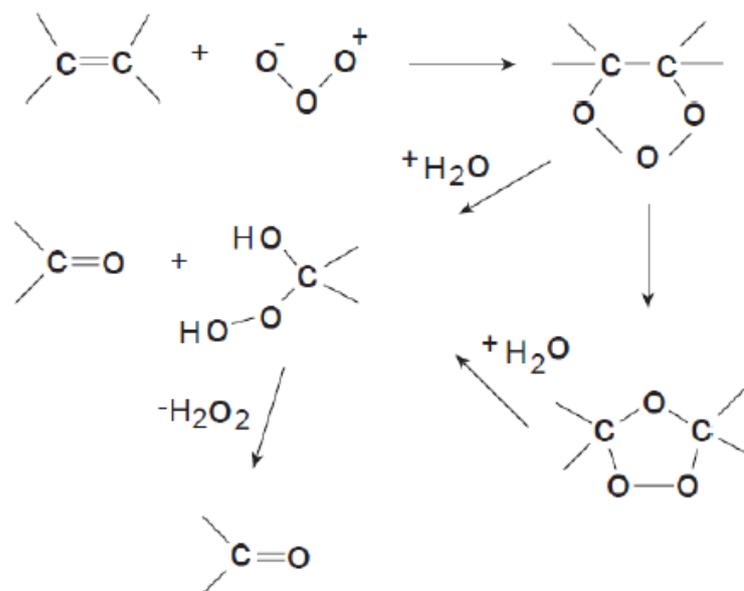


Figura 2.8. Clivagem das ligações duplas da lignina pelo ozônio (NASCIMENTO et al., 1998).

Algumas particularidades dos processos oxidativos envolvendo ozônio podem ser destacadas como: alta seletividade, fácil geração e ausência ou baixíssima concentração da formação de compostos tóxicos entre lignina e o oxidante. Além disso, o processo geralmente é conduzido à temperatura ambiente e não leva à formação de compostos inibidores de fermentação microbiana, como furfural e hidroximetilfurfural. Entretanto, pelas reações de degradação, o processo de ozonólise pode gerar ácidos orgânicos, como ácido carboxílico e fórmico (VIDAL; MOLINIER, 1988). Quando a ozonólise é associada ao tratamento de ultrassom as reações que ocorrem devido à irradiação podem romper as paredes celulares da fibra, facilitando a penetração de solventes no material celulósico e aumentando a transferência de massa (LIU et al., 2007).

Com base nas características da ozonólise muitos trabalhos têm sido desenvolvidos e apontam resultados bastante promissores no uso de ozônio na degradação de compostos recalcitrantes, corantes têxteis, compostos altamente tóxicos, no aumento da biodegradabilidade de efluentes industriais e no branqueamento de polpa celulósica, onde o objetivo é muito similar ao dos pré-tratamentos, ou seja, a remoção ou solubilização da lignina (TRAVAINI, 2011).

Purí (1983), por meio da ozonólise de diversos materiais lignocelulósicos, entre eles bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, obteve aumento na hidrólise enzimática que passaram de 1 a 30 % para 80 a 90 %. García-Cubero e colaboradores (2009) obtiveram aumentos de 29 % e 16 % para 88,6 % e 57 % na hidrólise enzimática pós ozonólise, para farelo de trigo e centeio, respectivamente.

2.6.2 Pré-tratamento hidrotérmico

O tratamento hidrotérmico, também denominado auto-hidrólise, fracionamento aquoso ou fracionamento a vapor, é um dos métodos mais comuns de pré-tratamento da biomassa. Esta metodologia pode ser descrita como um processo termoquímico, no qual o material lignocelulósico é exposto ao vapor de água (CANILHA et al., 2012).

Atualmente, há um grande interesse científico no uso da água, submetida a elevadas temperaturas e pressão, no pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos. Geralmente, são empregadas temperaturas entre 160 e 240 °C e pressão entre 0,7 e 4,8 MPa por 1 a 20 minutos (CANILHA et al., 2012; YUAN et al., 2011). Neste

método, a biomassa é tratada com vapor saturado a alta pressão e temperatura e, em seguida, a pressão é rapidamente reduzida, o que faz com que o material sofra uma descompressão.

O processo causa a degradação da hemicelulose e a transformação da lignina devido às altas temperaturas (KUMAR et al., 2009). O ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica atua como catalisador da reação de hidrólise da biomassa promovendo a despolimerização da hemicelulose (OLIVEIRA, F., 2010). Em temperaturas na faixa entre 180 e 200 °C e em curtos períodos de reação, diferentes quantidades de lignina podem ser extraídas com água e pode ocorrer redução do grau de polimerização da celulose (GÓMEZ, 1985; ALLEN et al., 2001; SILVA, 2009). O efeito desse tratamento sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, sua susceptibilidade à hidrólise ácida e/ou enzimática (ÖHGREN et al., 2007).

Esse método tem sido amplamente utilizado em escala piloto, por exemplo, no National Renewable Energy Laboratory – NREL em Golden Co (EUA), na Sekab em Ornskoldsvik (Suécia), na logen em Ottawa (Canadá) e no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE em Campinas (Brasil), sendo considerado promissor para conversão do material lignocelulósico a etanol, com possibilidade de comercialização (GALBE e ZACCHI, 2010; SANTOS, 2013). Na literatura existem vários trabalhos utilizando esse pré-tratamento em diferentes biomassas: palha de trigo (KABEL et al., 2007), palha de milho (ÖHGREN et al., 2007), bagaço de cana (LASER et al., 2002) e madeira (SÖDERSTRÖM; GALBE; ZACCHI, 2004).

As razões que justificam o interesse científico nesse pré-tratamento estão relacionadas com o fato de que o processo não faz uso de reagentes químicos e não exige reatores altamente resistentes a corrosão, o que é interessante do ponto de vista ambiental e econômico. Ademais, o processo hidrolisa grande parte da fração hemicelulósica e provoca alterações físico-químicas na celulose e lignina, favorecendo a maior eficiência na sacarificação enzimática (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999). No entanto, uma das limitações do pré-tratamento hidrotérmico é a geração de produtos inibitórios da hidrólise enzimática, tais como furfural e hidroximetilfurfural. Devido à formação desses produtos, a biomassa pré-tratada precisa ser lavada com água para remoção dos inibidores juntamente com a

hemicelulose solúvel (AFONSO, 2012), o que resulta em diminuição do rendimento da sacarificação global através da remoção de açúcares solúveis (KUMAR et al., 2009).

2.7 Sacarificação enzimática

O aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar só é possível se houver a sacarificação (ou hidrólise) do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis utilizados pela levedura. Esse processo pode ser realizado por via química ou enzimática. Entretanto, essas últimas apresentam vantagens em relação ao uso dos ácidos, pois a hidrólise enzimática é conduzida sob condições brandas, atingindo aproximadamente 100 % de degradação da celulose, enquanto a hidrólise ácida requer altas temperaturas e baixo pH, resultando em condições corrosivas, além de não alcançar um rendimento tão elevado (OGIER et al., 1999). Ademais, a conversão enzimática é específica pelo substrato, evitando a geração de compostos secundários que poderiam inibir a etapa de fermentação (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Por outro lado, a hidrólise enzimática também tem sua limitação quando comparada à hidrólise ácida. O uso de enzimas requer um tempo maior (dias) para que ocorra a hidrólise (TENGBORG; GALBE; ZACCHI, 2001), enquanto apenas alguns minutos são necessários para a ação do ácido (TAHERZADEH et al., 1997). Além deste fator, é necessário levar em consideração o preço das enzimas, usualmente mais caras que os ácidos empregados na hidrólise.

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática incluem o tipo de substrato, a atividade celulolítica e as condições de reação (temperatura, pH, entre outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise enzimática, as pesquisas focam na otimização do processo hidrolítico e no aumento da atividade celulolítica (CANTWELL et al., 1988).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é limitada por diversos fatores, como a cristalinidade da celulose, grau de polimerização, umidade, área superficial disponível e o conteúdo de lignina (LAUREANO-PEREZ et al., 2005). Outros autores como Grous; Converse; Grethlein (1986) e Thompson; Chen; Grethlein (1992) concluíram que o tamanho dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas é o principal fator limitante da hidrólise enzimática da

biomassa lignocelulósica. A retirada da fração de hemicelulose aumenta o tamanho médio dos poros do substrato, aumentando a probabilidade de hidrólise da celulose (PALONEN et al., 2004). A lignina e a secagem do material lignocelulósico pré-tratado também limitam a taxa e extensão da sacarificação enzimática: a lignina por atuar como um escudo, prevenindo que partes susceptíveis do substrato possam ser hidrolisadas, e a secagem por provocar um colapso na estrutura dos poros (GROUS; CONVERSE; GRETHLEIN, 1986; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

2.7.1 Interação sinérgica e os coquetéis enzimáticos

A produção de enzimas celulolíticas e sua aplicação na sacarificação de materiais lignocelulósicos para produção de etanol celulósico são tecnologias em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas e estratégias podem ser aplicadas visando aumento de produtividade e redução dos custos. Portanto, existem dois principais gargalos no processo de obtenção biotecnológica de etanol celulósico: os métodos de pré-tratamento impostos à biomassa e os altos custos de produção de celulases, os quais poderiam ser reduzidos por meio da utilização de preparados enzimáticos com elevadas atividades específicas (SINGHANIA et al., 2010). Para aperfeiçoar a utilização das enzimas celulolíticas nos processos de sacarificação da biomassa diversas alternativas têm sido estudadas e dentre as possibilidades, algumas são apontadas com elevado potencial de sucesso (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

O conceito de engenharia de produto pode ser aplicado em processos de produção de celulases, visando a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico, em particular endoglucanase e β -glicosidase. O formulado ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases (WEN; LIAO; CHEN, 2005); pela produção em separado das celulases e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas (KÁDÁR; SZENGYEL; RÉCZEY, 2004; XIAO et al., 2004; IMAI; IKARI; SUZUKI, 2004); ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (SRIVASTAVA; VERMA; SRIVASTAVA, 1999).

As enzimas celulolíticas são produzidas por diferentes microrganismos, que em sua maioria apresenta grandes restrições que dificultam ou geram custos adicionais ao processo de produção de celulases. A biologia molecular é uma ferramenta que pode ser utilizada como alternativa para superar as restrições e dificuldades na produção enzimática, possibilitando a expressão somente das enzimas desejáveis, reduzindo ou anulando a produção de proteínas interferentes; aumentando a velocidade de crescimento, minimizando o tempo de produção; aprimorando a produtividade enzimática e as propriedades cinéticas e físico-químicas da enzima; e facilitando as etapas de *downstream*, sobretudo quando há secreção da proteína para o meio de cultivo (FERREIRA, 2010).

Sabe-se que o substrato é atacado pelas enzimas do complexo celulolítico de modo sinérgico, resultando num aumento da eficiência pela ação conjunta dos componentes de um sistema quando comparado a atuação isolada dos mesmos. Assim, o sinérgismo observado nas enzimas celulolíticas provoca um aumento significativo na velocidade de formação de produtos solúveis em comparação à velocidade de atuação isolada das celulases (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Essa interação sinérgica pode ocorrer entre uma endoglucanase de determinada espécie de microrganismos e uma celobiohidrolase de outra espécie. As celobiohidrolases possuem a capacidade de atuar de modo acelerado na extremidade gerada pela ação das endoglucanases na cadeia do polissacarídeo, evidenciando que as enzimas encontram-se distribuídas ao longo da fibra de celulose. Além disso, é possível que ocorra sinérgismo entre os diversos subtipos de celobiohidrolases, pois existem enzimas que atuam nas extremidades redutoras (celobiohidrolases do tipo I – CBHI) e enzimas que atuam nas extremidades não-redutoras (celobiohidrolases do tipo II – CBHII) das fibras de celulose (LYND et al., 2002). O grau de sinérgismo varia de acordo com o tipo de celulose empregada como substrato, uma vez que na presença de celulose cristalina o sinérgismo do tipo endo-exo é elevado, diminuindo na celulose amorfa e tornando-se muito baixo ou ausente em derivados solúveis da celulose como, por exemplo, a carboximetilcelulose (CMC) (BHAT; BHAT, 1997).

Atualmente existem no mercado diversos consórcios enzimáticos comerciais, os quais são constituídos pelos três grupos de celulases: Endoglucanases, Celobiohidrolases e β -glicosidases. No entanto, esses preparados enzimáticos

possuem baixa atividade β -glucosídica, o que faz necessária a suplementação desta enzima para efetiva atuação na hidrólise enzimática da biomassa.

As enzimas comerciais são uma mistura de enzimas obtidas de diferentes microrganismos com a finalidade de formar um coquetel enzimático com altas concentrações das principais frações enzimáticas que compõem as celulases (AFONSO, 2012). Essas enzimas são produzidas por empresas internacionais e os principais preparados enzimáticos disponíveis no mercado utilizam, em sua maioria, fungos filamentosos como fonte para o *pool* enzimático (FERREIRA, 2010). Entre os microrganismos mais empregados pelas empresas produtoras destacam-se os preparados enzimáticos constituídos por celulases secretadas por *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma viride*, os quais podem ser empregados isoladamente ou pela consorciação de enzimas de outro microrganismo para suplementação das celulases.

A *Novozymes* e a *Genencor Danisco* são indústrias renomadas na produção comercial de enzimas, as quais se destacam pela produção de celulases para conversão de biomassa. Novas tecnologias têm sido adotadas por essas empresas com o objetivo de reduzir o custo de produção dos preparados celulásicos (SINGHANIA et al., 2010). A empresa *Genencor Danisco* lançou recentemente um complexo enzimático denominado *Accelerase*[®] 1500 destinado especificamente para indústrias de processamento da biomassa lignocelulósica. Esse complexo é produzido com uma linhagem geneticamente modificada de *Trichoderma reesei* e contém níveis mais elevados de atividade β -glucosidásica, de modo a assegurar quase a conversão completa de celobiose à glicose (FERREIRA, 2010; DUPONT, 2013).

Apesar da interação sinérgica já mencionada, a impressionante eficiência de degradação da biomassa demonstrada por vários microrganismos na natureza não podem ser atribuídas isoladamente a este mecanismo endo-exo hidrolítico. Extrair e processar uma única cadeia de celulose a partir de seu ambiente compacto e recalcitrante demanda energia, considerando a alta cristalinidade da celulose e sua forte associação a outros polissacarídeos da parede celular. Sistemas de liberação de oxidantes de baixo peso molecular tais como o radical livre hidroxila, que ataca aleatoriamente o substrato por reações químicas do tipo Fenton, tem sido supostos a atuar em conjunto com celulases na degradação da lignocelulose. Estes incluem: celobiose desidrogenase, quinona cíclica redox e reação Fenton

glicopeptídica (MARTINEZ et al., 2009; BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008). Maiores detalhes a respeito das enzimas auxiliares foram apresentados na seção 2.3.2 desta *Revisão da Literatura*.

Além das enzimas que atuam diretamente sobre as ligações covalentes em polissacarídeos da parede celular de plantas, enzimas que atuam indiretamente, também podem ser importantes na degradação da lignocelulose. Há três categorias de tais enzimas. O primeiro grupo é composto pelas proteínas não-enzimáticas, que contribuem para afrouxamento da parede, tais como expansina e seus homólogos fúngicos e bacterianos. Um segundo grupo é constituído por enzimas que podem ser indiretamente críticas, sendo as que degradam os componentes não-glicosídicos de parede, tais como a lignina e proteínas, facilitando deste modo o acesso das glicosil-hidrolases. Um terceiro grupo potencialmente importante de enzimas auxiliares pode ser aquele que degrada moléculas pequenas, liberadas pelos pré-tratamentos, que inibem as enzimas degradativas centrais ou os passos posteriores de fermentação (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010).

Uma maior eficiência dos coquetéis enzimáticos aplicados na hidrólise dos materiais lignocelulósicos provavelmente pode ser obtida por misturas não somente focadas nas enzimas principais da degradação da celulose (endoglucanase, celobiohidrolase, β -glicosidase, endoxilanase e β -glicosidase), mas sim em inúmeras outras denominadas acessórias que atuam sobre as ligações menos abundantes encontradas na parede celular vegetal. Entre as enzimas acessórias de maior importância podem ser citadas: arabinases, glucanases, liases, pectinases e vários tipos de esterases (BERLIN et al., 2007). Assim, os coquetéis enzimáticos a partir da mistura de extratos de fungos distintos são alternativas futuras para elevar a eficiência do processo de sacarificação enzimática, permitindo a ação sinérgica de diferentes enzimas sobre a biomassa (SØRENSEN et al., 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores e no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE/ UNESP).

3.1 Microrganismos e substratos

Foram empregados os fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b (termofílico) e *Trichoderma reesei* QM9414 (mesofílico). O primeiro foi isolado pela Prof^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini (IQ/UNESP) a partir de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar da Usina Guarani, de Olímpia-SP, e fora utilizado por Zanelato et al. (2012), que obteve resultados promissores de produção de celulase em escalas de frascos e de reator de leito fixo de bancada. Já o fungo mesofílico é bastante comum na literatura de FES, sobretudo para produção de celulases, sendo considerado um microrganismo padrão para produção dessas enzimas.

Os microrganismos pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, e estavam estocados em tubos de ensaio com meio de cultura inclinado, submerso em óleo mineral, em câmara fria a 5 °C, ou em glicerol a -80 °C. As soluções estoque dos fungos foram mantidas em tubos criogênicos em glicerol a 20 % a -20 °C. Para utilização, as culturas foram repicadas em tubos e posteriormente inoculadas em erlenmeyers com meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD) mantida em câmara BOD a 45 °C durante 48 horas para a cultura de *Myceliophthora thermophila* e 28 °C por 168 horas para a de *Trichoderma reesei* no meio de Agar Batata Dextrose (BDA).

Para inoculação do substrato, 100 mL de solução nutriente foram adicionados aos frascos, que foram agitados em mesa orbital, após o que a superfície do meio foi raspada com alça de platina para suspensão dos esporos do meio de cultura, obtendo-se a suspensão de esporos. Uma alíquota de 1 mL foi retirada da

suspensão para contagem de esporos em câmara de Neubauer, sendo a concentração final da suspensão ajustada para 10^5 esporos/mL.

Como substratos, foram empregados bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. O farelo foi comprado no comércio local e foi utilizado nos ensaios tal como adquirido. O bagaço foi doado pela Usina Vale, de Onda Verde-SP, tendo sido lavado com água corrente para remoção de terra e de açúcares residuais do processo de moagem da cana-de-açúcar, sendo esses dosados na água de lavagem pelo reagente DNS (MILLER, 1959) até não ser possível sua detecção, após o que foi seco em estufa a 65 °C até peso constante. Para fins de padronização do tamanho das fibras, o bagaço foi peneirado em peneiras de 4 e 3 mm, separando-se para uso nos experimentos apenas o bagaço retido na peneira de 3 mm, separando-se as fibras maiores e o excesso de pó fino. Bagaço de cana e farelo de trigo foram acondicionados em sacos de polietileno de parede espessa em câmara de refrigeração até utilização.

Para os ensaios, o substrato foi previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 20 minutos), bem como a solução nutriente, que consiste em uma solução salina contendo: 0,35 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 % (m/v) de KH_2PO_4 , 0,05 % (m/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % (m/v) de CaCl_2 e 0,1 % (v/v) de Tween 20 em pH 5,0 (ZANELATO, 2011). Posteriormente, o substrato foi inoculado com a suspensão de esporos e umidificado com solução nutriente até atingir a umidade adequada para a fermentação por cada fungo, após o que foi homogeneizado e empacotado no leito do reator de leito fixo.

3.2 Fermentação em reator de leito empacotado

A fermentação em reator de leito empacotado foi realizada no mesmo sistema empregado por Casciatori; Casciatori e Thoméo (2013). Neste sistema, o ar foi fornecido por compressor e filtrado para retirada de impurezas grosseiras, passando por medidor de vazão, após o que foi umidificado em coluna recheada com esferas de vidro e cheia de água, imersa em banho termostático. Antes do fermentador, o ar ainda passou por filtro de algodão para remoção de impurezas. A vazão do ar foi 240 L/h para suprimento de oxigênio às células (CASCIATORI; CASCIATORI; THOMÉO, 2013). Para melhorar o controle térmico do biorreator e minimizar as

possibilidades de contaminação microbiológica, foi construída uma sala fechada com condicionamento de ar, destinada exclusivamente à operação do biorreator.

O fermentador foi construído em módulos encamisados em aço inox, com 7,62 cm de diâmetro interno e 10 cm de comprimento cada, de modo que seu comprimento totalizou 1 m por meio da adição consecutiva de 10 módulos. A seção útil de fermentação foi compreendida entre 10 e 90 cm de comprimento. Uma foto do biorreator com 1 metro de comprimento é mostrada na Figura 3.1.



Figura 3.1. Configuração do biorreator de leito fixo com 10 módulos de 10 cm de altura cada, totalizando 1 m de comprimento.

Para o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, os cultivos no biorreator foram feitos em meio composto por bagaço de cana e farelo de trigo (BC:FT) 7:3 (m/m). A umidade inicial do substrato foi 75 % (em base úmida, b.u.), as temperaturas do ar e da camisa foram 45 °C, e a duração da fermentação foi de 96 horas (ZANELATO, 2011).

Para o fungo mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414, os cultivos no biorreator foram feitos em meio composto por bagaço de cana e farelo de trigo (BC:FT) 9:1 (m/m) com conteúdo de umidade inicial de 70 % (b.u.), as temperaturas do ar e da

camisa foram de 28 °C, e a duração da fermentação foi de 168 horas (CASCIATORI, 2012; PINTO, 2010).

Para realização de cada fermentação, o substrato foi pesado e esterilizado em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 20 minutos) em sacos plásticos de polipropileno com capacidade de 2 litros. A quantidade de substrato por módulo foi calculada de acordo com os dados de densidade *bulk* dos materiais (CASCIATORI et al., 2015). Nestes mesmos sacos plásticos, o substrato foi inoculado, umidificado e homogeneizado manualmente, após o que foi empacotado no biorreator, módulo a módulo, já no local de montagem e operação do equipamento. Quanto à técnica de empacotamento, devido à diferença no formato e granulometria do farelo de trigo e do bagaço de cana, que devem permanecer misturados o mais homogeneamente possível, uma porção de material úmido e bem misturado foi tomada do saco plástico e depositada no interior do módulo, após o que a acomodação foi feita com auxílio de um cilindro, que pressiona as amostras e acomoda-as ao formato do biorreator sem provocar segregação das partículas menores.

Ao final do processo, amostras de meio fermentado foram retiradas longitudinalmente do fermentador para extração das enzimas. Para extração, foi tomado todo o recheio de cada módulo, adicionando-se 20 mL de água destilada por grama de substrato sólido seco em câmara de agitação orbital, por 30 minutos a 100 rpm. O extrato foi filtrado e centrifugado (10000 rpm, 15 min, 5 °C), após o que o sobrenadante foi empregado como solução enzimática bruta no teste de atividade.

3.3 Determinação da atividade enzimática

Foram determinadas as atividades endoglucanase (CMCase), papel de filtro ou FPU (atividade conjunta das três celulasas), betaglicosidase e xilanase (hemicelulase) dos extratos enzimáticos brutos.

As atividades enzimáticas de CMCase e xilanase foram determinadas seguindo-se Ghose (1987) e Ghose e Bisaria (1987), respectivamente, com modificações, reagindo-se 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato, quais sejam, respectivamente, carboximetilcelulose (CMC, Sigma-Aldrich®) e xilana (Sigma-Aldrich®). A reação se deu em banho termostático a 60 °C para os extratos produzidos pelo fungo termofílico e a 45 °C para os produzidos pelo mesofílico, por 10 minutos, sendo interrompida por adição de 1,0 mL do reagente

DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico). A quantificação de açúcares redutores liberados da reação de análise da atividade foi feita segundo Miller (1959). A solução foi mantida em banho de água em ebulição por 10 minutos, após o que foi imediatamente transferida para banho de gelo. Foram adicionados 8,0 mL de água destilada, após o que foi feita leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Nos tubos controles, o extrato enzimático foi adicionado após paralisação da reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação por mL de enzima.

A atividade de betaglicosidase foi quantificada como descrito por Pinto (2010) a partir da reação de 50 μL de extrato enzimático bruto, 250 μL de 4-nitrofenol-beta-D-glicopiranosídeo 4 mmol L^{-1} (PNPG, Sigma-Aldrich®) e 250 μL de solução tamponante acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} e pH 5,0 por 10 minutos em banho termostático a 60 °C para os extratos do fungo termofílico e 45 °C para os do mesofílico. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de Na_2CO_3 2 mol L^{-1} , e o nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Foi definida uma unidade enzimática como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol.

A atividade papel de filtro ou FPU foi quantificada seguindo-se a metodologia empregada por Pinto (2010), sendo determinada, conforme Miller (1959), a concentração de açúcares redutores liberados da reação tendo como substrato papel de filtro Whatman n°1 cortado em tiras 1 x 6 cm (50 mg), imerso em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 5,0 e 0,1 mL de extrato enzimático bruto. A reação se deu em banho termostático com agitação a 60 °C para extratos do fungo termofílico e 45 °C para os do mesofílico, por 60 minutos, sendo interrompida por 1,0 mL de DNS. O restante do procedimento foi similar ao exposto para a determinação de atividades CMCase e xilanase.

Em se tratando de fermentação em estado sólido, com base no volume de água utilizado para extração das enzimas, os resultados das atividades enzimáticas foram convertidos para serem expressos em unidades por grama de substrato sólido (U/gss) segundo a Equação 3.1.

$$\frac{U}{\text{gss}} = \frac{(\text{Abs} + a)}{bT} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{V} \cdot D \cdot F \quad (3.1)$$

onde Abs é a absorvância lida em nm; a é o coeficiente linear da curva padrão; b é o coeficiente de extinção em $\mu\text{mol/mL}$; t é o tempo de reação em minutos; V é o volume da alíquota de enzima em mL; D é a diluição do extrato enzimático e F é a razão entre o volume de água utilizado na extração e a massa de substrato sólido.

3.4 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Como matéria prima para a hidrólise enzimática, o bagaço de cana coletado na Usina Vale de Onda Verde-SP, já lavado e seco conforme descrito anteriormente para utilização como substrato na FES, foi nesta etapa triturado e separado em peneira granulométrica de 0,84 mm para padronização do tamanho da fibra. Foi aproveitada a porção que conseguiu atravessar a malha da peneira. Esse material foi empregado como substrato na etapa de sacarificação do bagaço *in natura* e no pré-tratamento com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino do material lignocelulósico para posterior hidrólise.

No tratamento empregando ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino ($\text{O}_3 + \text{US} + \text{NaOH}$), o gás ozônio foi obtido usando o gerador Radast 10C Ozoxi-Ozônio e para a irradiação de ultrassom foi empregada sonda ultrassônica operante a 22 kHz e temperatura ambiente. Para o pré-tratamento foram pesados 20 g de bagaço e umedecidos com 10 mL de solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, os quais foram empacotados em coluna de vidro e colocados sob fluxo constante de ozônio durante 1 hora, em seguida o bagaço foi desempacotado e homogeneizado. Após a homogeneização, esse bagaço foi colocado em erlenmeyer, tratado com 400 mL de solução alcalina (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e submetido ao efeito de ultrassom por 5 minutos. Transcorrido o tempo de ultrassom, o bagaço foi mantido em repouso por 2 horas. O material pré-tratado foi lavado com água destilada, seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até obter peso constante e armazenado protegido de luz e umidade para posterior utilização na etapa de hidrólise enzimática (PERRONE, 2012).

O fluxo de ozônio foi determinado de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), passando-se o gás ozônio gerado por dois *Traps* (*Trap A* e *Trap B*) ligados em série por aproximadamente 10 minutos, cada *Trap* foi preenchido com 200 mL de solução 2 % de Iodeto de Potássio. Após aproximadamente 10 minutos, alíquotas da solução do *Trap A* e *B*

foram retiradas e titulados com Tiosulfato de Sódio (0,01 N). A fórmula para a determinação do fluxo de ozônio é apresentada na Equação 3.2.

$$\frac{\text{mg}}{\text{min}} = \frac{(A + B) \cdot N \cdot 24}{t} \quad (3.2)$$

onde A é o *Trap A*; B é *Trap B*, N é a normalidade do Na₂S₂O₃ e t é tempo da ozonização em minutos. O valor obtido e empregado foi de 1,9 ± 0,2 g de O₃ / min (PERRONE, 2012).

O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento hidrotérmico foi doado pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE, localizado em Campinas – SP. As condições de processo empregadas no pré-tratamento foram 190 °C por 15 minutos.

3.5 Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas foram realizadas em erlenmeyer, contendo 0,2 g de bagaço de cana *in natura* e pré-tratado. Foram adicionados diferentes volumes de extrato enzimático bruto em cada erlenmeyer, de modo a completar o volume final para 10 mL com tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 5,0. Os erlenmeyers foram colocados em agitador orbital a 150 rpm. Os ensaios foram conduzidos nas temperaturas ótimas de atividade enzimática do extrato produzido pelos fungos, já determinadas por Machado (2012), quais sejam 65 °C para *M. thermophila* e 45 °C para *T. reesei*.

O planejamento experimental adotado para avaliação da eficiência de sacarificação foi um planejamento central composto rotacional com análise por superfície de resposta, com 5 repetições do ponto central. Os fatores adotados foram dois, quais sejam volume de extrato enzimático aplicado e tempo de hidrólise, totalizando 13 ensaios para cada extrato enzimático e para cada estado do bagaço de cana (*in natura* e pré-tratado), sendo 9 tratamentos e 4 testes no ponto central. Na escolha dos fatores adotados considerou-se que, no âmbito da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, as celulasas são insumos que impactam significativamente o processo, representando um elevado custo operacional. O tempo é outro parâmetro importante, estando relacionado com a velocidade da

reação, pois quanto mais rápida a reação, maior a produtividade do processo e menor o tempo gasto para a obtenção dos açúcares fermentescíveis.

O planejamento experimental é apresentado na Tabela 3.1, tendo sido elaborado com auxílio do software Minitab® 15.1. Os fungos empregados neste trabalho e os dois pré-tratamentos do bagaço de cana foram tratados como blocos do planejamento experimental. A variável de resposta dos ensaios foi a quantidade de açúcares redutores liberados na sacarificação, obtida pelo reagente DNS (MILLER, 1959).

Tabela 3.1. Planejamento experimental central composto dos ensaios de hidrólise enzimática.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
	Volume de extrato enzimático (mL)	Tempo de hidrólise (horas)	Volume de extrato enzimático (mL)	Tempo de hidrólise (horas)
1	-1	-1	3	2
2	1	-1	7	2
3	-1	1	3	6
4	1	1	7	6
5	-1,41	0	2,2	4
6	1,41	0	7,8	4
7	0	-1,41	5	1,2
8	0	1,41	5	6,8
9	0	0	5	4
10	0	0	5	4
11	0	0	5	4
12	0	0	5	4
13	0	0	5	4

Tendo em vista que os pré-tratamentos empregando-se processos oxidativos avançados, tais como os baseados em ozônio, são métodos alternativos e ainda em estudo, buscou-se para efeito de comparação a aplicação dos extratos enzimáticos no bagaço de cana com pré-tratamento hidrotérmico, o qual é um método de tratamento da biomassa bastante empregado na literatura. O planejamento experimental descrito na Tabela 3.1 também foi empregado para esse material.

Com base nos resultados dos ensaios empregando-se os extratos individuais, foram realizadas hidrólises do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com ozônio e

irradiação de ultrassom em meio alcalino aplicando-se uma mistura dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila*, constituindo um coquetel enzimático. O procedimento foi realizado em erlenmeyers de 125 mL, pesando-se 0,5 g de bagaço e adicionando-se 17,5 mL da mistura dos extratos enzimáticos em diferentes composições. As hidrólises foram realizadas em triplicata em quatro condições térmicas. O volume adicionado foi determinado em função dos testes anteriormente descritos, completando-se o volume final para 25 mL com tampão acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ pH 5,0 (PINTO, 2010).

O software Minitab[®] 15.1 também foi empregado para o delineamento e análises estatísticas da aplicação dos coquetéis enzimáticos, nas quais a variável resposta dos ensaios foi a quantidade de açúcares redutores liberados na sacarificação, obtida pelo reagente DNS (MILLER, 1959). O planejamento experimental adotado foi um delineamento fatorial completo, tendo como fatores a composição do coquetel enzimático, cujos níveis foram de 1:1, 1:3 e 3:1 do extrato produzido por *T. reesei* e *M. thermophila*, respectivamente, e temperatura de hidrólise, cujos níveis foram de 45, 55, 65 °C e com alternância de temperatura entre 45 e 65 °C, variando-se a cada uma hora, com duração total de 6 horas. Foram feitas análises de variância e comparação de médias através de testes de Tukey, visando avaliar o efeito das variáveis independentes sobre a variável resposta e encontrar as melhores condições de sacarificação do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino

3.6 Determinação quantitativa de açúcares redutores

Os açúcares redutores do hidrolisado foram determinados pelo método de Miller (1959). A reação foi conduzida adicionando-se, em tubos de ensaio, 1,0 mL da amostra filtrada, juntamente com 1,0 mL do reagente DNS e levados para o banho de ebulição por 10 minutos. Durante a ebulição, o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), ao reagir com açúcares redutores presentes no meio, altera sua coloração inicialmente amarela para tons castanhos. A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de açúcares no meio, e a reação de coloração é interrompida quando as amostras são transferidas para o banho de gelo. Foram adicionados 8,0 mL de água destilada, após o que foi feita leitura da

absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva de calibração utilizando-se glicose como padrão foi traçada e os resultados foram expressos em mg de açúcares redutores / g de bagaço de cana.

O cálculo de conversão de celulose em glicose foi feito a partir da equação 3.3 descrita de acordo com Afonso (2012).

$$X = C_{\text{glicose}} \cdot \frac{v}{m_{\text{hidrolisável}}} \cdot \frac{1}{f} \cdot FE \cdot 100 \quad (3.3)$$

onde X (%) é a porcentagem de glicose convertida; C_{glicose} (g/L) é a concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática, determinada pelo método de dosagem de açúcar redutor (MILLER, 1959); v (L) é o volume total da solução adicionada à hidrólise, a qual no presente trabalho foi igual a 10 mL; $m_{\text{hidrolisável}}$ (g) é a massa de material hidrolisável utilizada descontando-se o teor de umidade presente no bagaço de cana (massa de água), determinado por peso seco; f ($\text{g}_{\text{celulose}}/\text{g}_{\text{hidrolisável}}$) é a fração de celulose no material hidrolisável utilizado, o qual foi tomado como sendo igual a 48,9 % do bagaço pré-tratado com $\text{O}_3 + \text{US} + \text{NaOH}$ (PERRONE, 2012) e 40 % do bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico, valor teórico da fração de celulose presente no bagaço de cana (AGUILAR et al., 2002) e FE é o fator estequiométrico da relação de celulose a glicose, que é igual a 0,9 (AFONSO, 2012).

3.7 Quantificação, por HPAEC-PAD, dos teores de açúcares liberados pela ação enzimática

A quantificação dos teores de açúcares foi realizada por HPAEC-PAD (Thermo Scientific (Dionex) ICS-5000) com coluna de troca aniônica CarboPac[®] PA - 1 a 25 °C e compartimento a 30 °C, com diluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ e degaseificada com N_2 , o fluxo utilizado foi de 1 mL/min com os solventes, A (200 mmol L⁻¹ de NaOH), B (água ultra pura) e C (500 mmol L⁻¹ de NaOH), utilizou-se eluição isocrática de 0 a 12 minutos com 6 % de A, 94 % de B, e 0 % de C, de 12 minutos a 16 minutos foi utilizado 100 % de C para a limpeza da coluna, e por fim dos 16 minutos aos 30 minutos 6 % de A, 94 % de B, e 0 % de C para o condicionamento da coluna (PERRONE, 2012). A curva de calibração foi construída utilizando padrões de glicose, xilose e celobiose (Sigma-Aldrich[®]).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Produção de enzimas celulolíticas em reator de leito empacotado

4.1.1 Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b

Na Figura 4.1 apresenta-se o substrato colonizado pelo fungo *Myceliophthora thermophila* ao final do ensaio fermentativo, verificando-se o mesmo aspecto branco e cotonoso do seu desenvolvimento em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD), o que demonstra o bom desenvolvimento do fungo no processo realizado. Nas Figuras 4.2a a 4.2d são apresentados os resultados das atividades CMC_{Case}, xilanase, FPU e β -glicosidase, respectivamente, em função do comprimento do biorreator. As atividades estão expressas em unidade de atividade enzimática (U) por grama de substrato sólido seco (gss).



Figura 4.1. Substrato colonizado por *Myceliophthora thermophila* no biorreator

Nas Figuras 4.2a e 4.2b é possível notar que as atividades CMC_{Case} e xilanase foram baixas somente no módulo do topo do fermentador (80 a 90 cm), apresentando resultados iguais a 281,8 e 1321,9 U/gss, respectivamente. As maiores atividades CMC_{Case} (1134,5 U/gss) e xilanase (2885,1 U/gss) foram obtidas no módulo 2 (10 a 20 cm), próximo a base do reator. No entanto, entre 10 e 80 cm de comprimento, as atividades enzimáticas mantiveram-se elevadas e praticamente constantes, com resultados concordantes com os obtidos por Zanelato (2011) em seus ensaios no biorreator com comprimento total 50 cm.

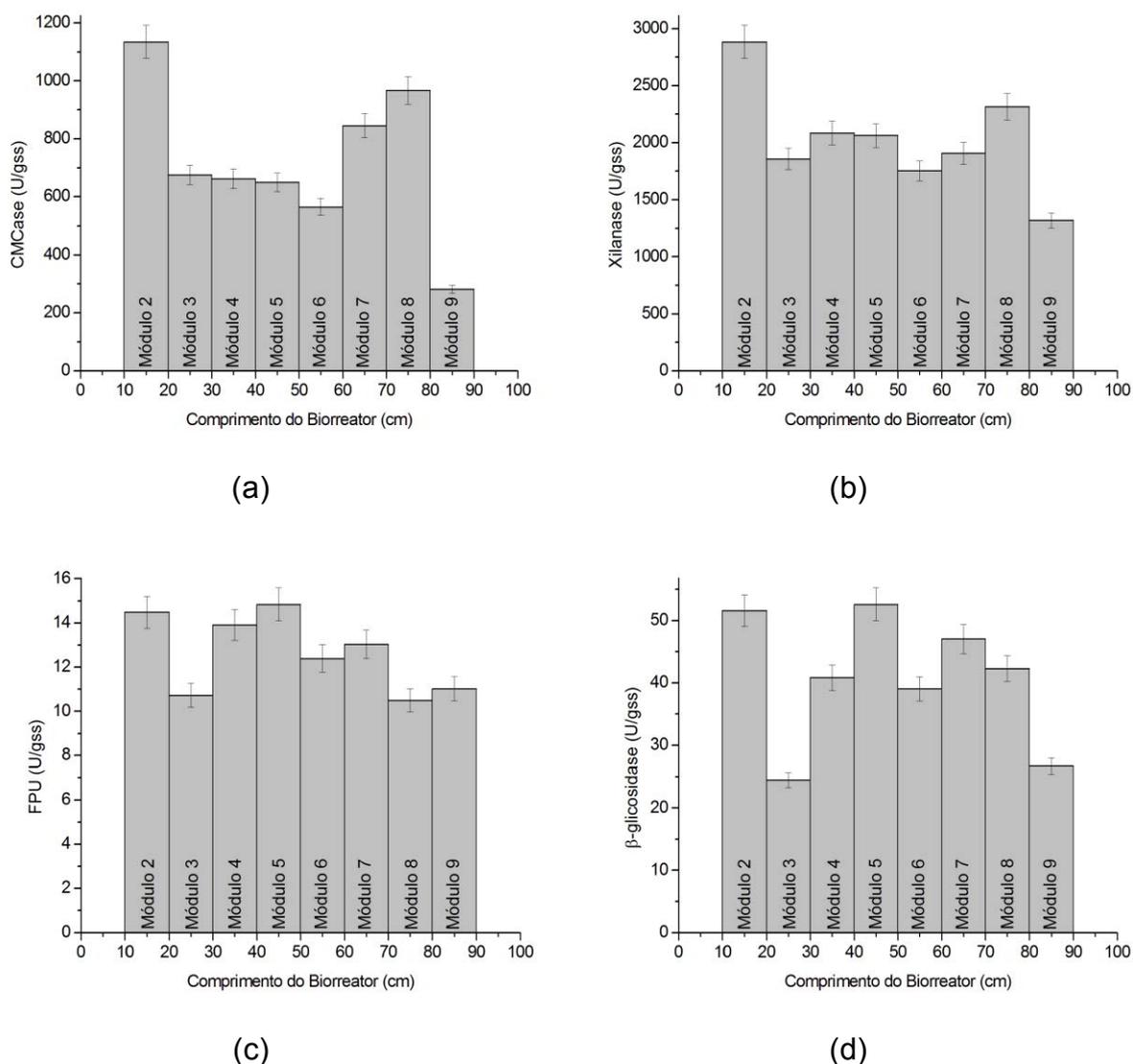


Figura 4.2. Atividades celulolíticas em função do comprimento do biorreator (1 m de comprimento total, fungo *Myceliophthora thermophila*, 240 L/h): (a) CMCCase; (b) xilanase; (c) FPU; (d) β -glicosidase.

As atividades FPU e β -glicosidase mostraram tendência semelhante em função do comprimento do reator, apresentando pico de atividade no módulo 5 (entre 40 e 50 cm), com resultados iguais a 14,8 e 52,6 U/gss, respectivamente. As mínimas atividades FPU (10,5 U/gss) e β -glicosidase (24,5 U/gss) foram obtidas, respectivamente, nos módulos 8 e 3 do fermentador (Figura 4.2c e 4.2d). Uma vez que a atividade FPU é um indicativo da atividade conjunta das três celulases contidas no extrato bruto (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase), é coerente que as atividades FPU e β -glicosidase dos extratos obtidos de diferentes frações

longitudinais do biorreator sejam similares, tendo em vista que a β -glicosidase é geralmente a enzima limitante na hidrólise da celulose, pois é responsável por fazer o rompimento final dos dímeros em moléculas de glicose, importante por evitar que os dímeros se acumulem, o que inibiria a cadeia de degradação da celulose como um todo (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

No Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP tem-se utilizado duas linhagens do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*, quais sejam as linhagens I-1D3 (empregada no presente trabalho) e M.7.7, ambas isoladas no próprio Instituto, para obtenção de celulases por FES em reator de bancada em leito fixo e em escala de frascos. Na Tabela 4.1, observa-se que os resultados obtidos no presente estudo são muito promissores quando comparados aos de outros trabalhos da literatura que empregaram fungos do mesmo gênero visando a produção de enzimas celulolíticas em diferentes substratos, reiterando que a linhagem isolada no Instituto tem potencial para aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 4.1. Produção de enzimas fibrolíticas por linhagens do fungo *Myceliophthora*.

Microrganismo	Substrato*	CMCase (U/gss)	xilanase (U/gss)	FPU (U/gss)	Tipo de reator	Referência
<i>Myceliophthora sp.</i> (V2A2)	PA	31,3	590,2	0,6		
<i>Myceliophthora fergusii</i> (T41)	PA	36,7	884,7	2,3	Frascos	Soni et al., (2008)
<i>Myceliophthora sp.</i> (MYC)	PA	35,0	900,2	2,4		
<i>Myceliophthora sp.</i> (IMI 389099)	BC	6,62	620,1	0,7	Frascos	Badhan et al., (2007)
<i>Myceliophthora sp.</i> (IMI 389099)	FT	26,6	128,9	0,7		
<i>Myceliophthora sp.</i> M.7.7	BC+FT	53,7	1044,6	2,0	Sacos de polipropileno	Moretti (2010)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3	BC+FT	800,0	900,0	8,3	Leito empacotado	Zanelato (2011)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b (preparado enzimático)	BC+FT	849,9	2253,6	12,1	Leito empacotado	Presente Estudo

* PA: Palha de arroz; BC: Bagaço de cana; FT: Farelo de trigo (Modificado de ZANELATO, 2011).

Nota-se que a produção de CMCase, xilanase e FPU no presente estudo foi muito superior às produções obtidas em outros estudos (Tabela 4.1), evidenciando o

bom potencial tecnológico do fungo em questão na produção destas enzimas por FES para aplicação na sacarificação do bagaço de cana. Assim, a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* no biorreator, nas condições operacionais adotadas no presente trabalho, pode ser considerada satisfatória, dado que o perfil de atividade enzimática foi relativamente homogêneo, com alguma heterogeneidade sendo justificada por limitações intrínsecas do processo, já reportadas por Zanelato et al. (2012) e Casciatori; Casciatori e Thoméo. (2013).

4.1.2 Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma reesei* QM9414

Na Figura 4.3, apresenta-se o substrato colonizado pelo fungo *Trichoderma reesei* ao final do ensaio fermentativo, verificando-se o mesmo aspecto esverdeado e granuloso do seu desenvolvimento em meio Agar Batata Dextrose, o que demonstra o bom desenvolvimento do fungo no processo de produção de celulases. Nas Figuras 4.4a a 4.4d são apresentados o perfil das atividades CMCase, xilanase, FPU e β -glicosidase do extrato enzimático produzido em função do comprimento do biorreator. As atividades estão expressas em unidade de atividade enzimática (U) por grama de substrato sólido seco (gss).



Figura 4.3. Substrato colonizado por *Trichoderma reesei* no biorreator.

A Figura 4.4 permite observar que a mínima atividade CMCase do extrato enzimático produzido pelo fungo mesofílico *Trichoderma reesei* foi obtida no módulo 9 do biorreator (6,0 U/gss), enquanto a máxima atividade foi obtida no módulo 4 (39,0 U/gss), ou seja, entre 30 e 40 cm de comprimento. Para a atividade xilanase a

mínima atividade observada corresponde ao módulo 6 (42,4 U/gss) e a máxima atividade ao módulo 2 (135,1 U/gss). A mínima atividade FPU do extrato produzido no biorreator foi obtida no módulo 7 (1,6 U/gss) e a máxima no módulo 4 (6,0 U/gss). Por fim, nota-se que a mínima atividade β -glicosidase (1,9 U/gss) foi obtida no módulo 5, bem como que a máxima atividade sobre beta foi obtida no módulo 2 (16,9 U/gss).

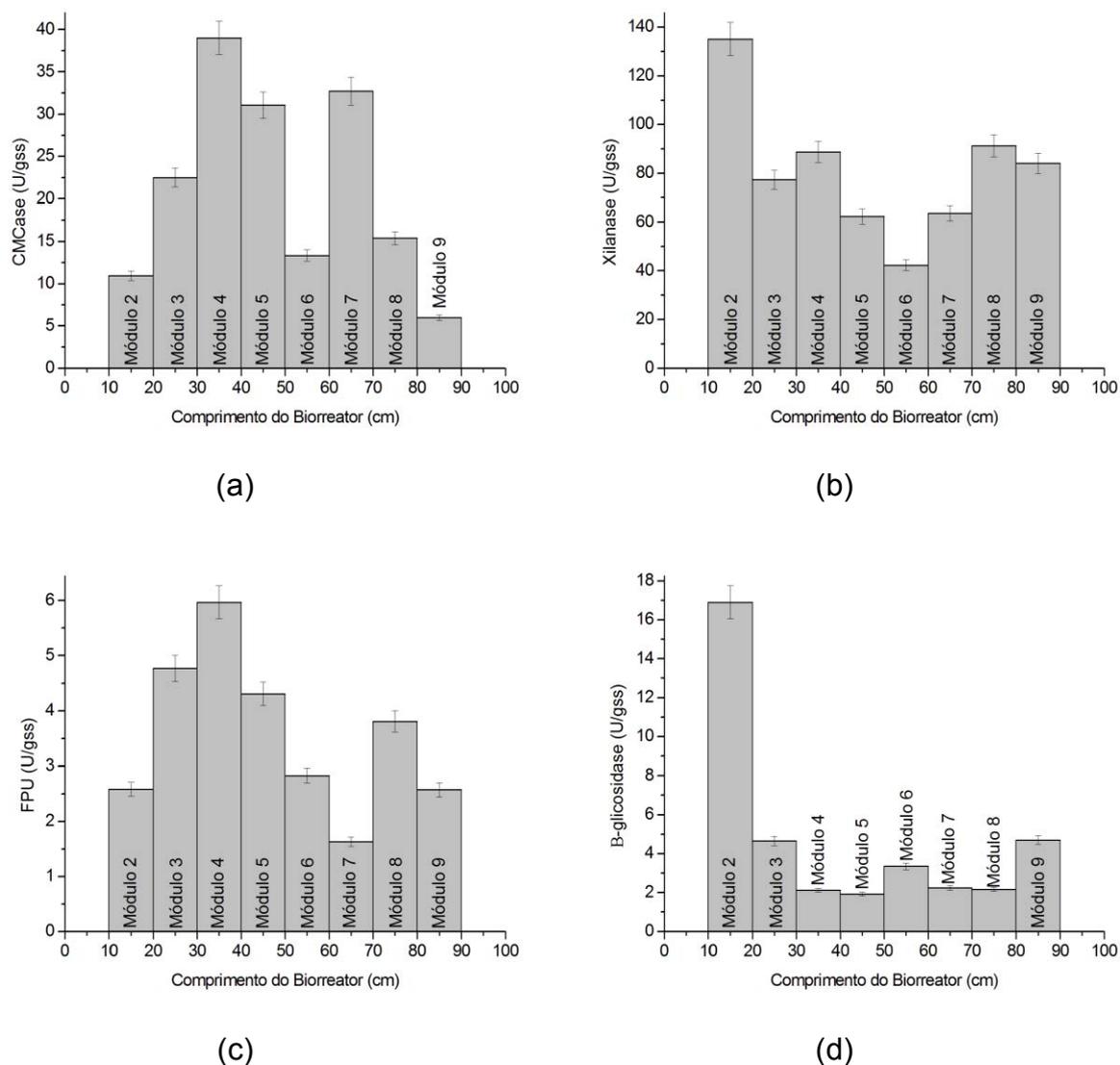


Figura 4.4. Atividades celulolíticas em função do comprimento do biorreator (1 m de comprimento total, fungo *Trichoderma reesei*, 240 L/h): (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPU; (d) β -glicosidase.

Nota-se que as máximas atividades CMCase e FPU foram obtidas entre 40 e 50 cm do biorreator (Figura 4.4a e 4.4c) e entre 10 e 20 cm para xilanase e β -

glicosidase (Figura 4.4b e 4.4d), permitindo inferir que os melhores resultados de atividade enzimática correspondem aos módulos mais próximos a base do reator.

Fungos do gênero *Trichoderma* são potenciais produtores de enzimas celulolíticas no processo da FES (FLORENCIO, 2011). A espécie *Trichoderma reesei* é a melhor caracterizada e a mais empregada industrialmente para a produção de celulases e hemicelulases (BÉGUIN; AUBERT, 1994; KING et al., 2009; ROCHA, 2010). Atualmente, as pesquisas com fungos do gênero *Trichoderma* são focadas particularmente no aumento da eficiência na produção do extrato celulolítico, com a finalidade de reduzir os custos da cadeia de produção do etanol celulósico, empregando resíduos agroindustriais (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

A Tabela 4.2 compara dados de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, pelo processo de FES, por fungos do gênero *Trichoderma*.

Tabela 4.2. Produção de enzimas fibrolíticas por linhagens do fungo *Trichoderma*.

Microrganismo	Substrato*	CMCase (U/gss)	xilanase (U/gss)	FPU (U/gss)	Tipo de reator	Referência
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	BC	5,7	NR*	4,0	Frascos	Basso; Gallo; Basso (2010)
<i>Trichoderma sp.</i> 32942	FT+CA	13,9	NR	7,7	Frascos	Zhao; Zhou; Zheng (2010)
<i>Trichoderma reesei</i> LM-UC4	BC	18,8	NR	5,3	Frascos	Gutierrez-Correa e Tengerdy (1998)
<i>Trichoderma reesei</i> LM-UC4E1	BC BC+ FS	22,6	1968,0	NR		
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Avicel	55,7	NR	5,9	Placas de Petri	King et al., (2009)
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	FT	NR	165,5	NR	Frascos	Deshpande et al., (2008)
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	BC+FT	54,3	639,8	9,6	Sacos de polipropileno	Pinto (2010)
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414 (preparado enzimático)	BC+FT	28,6	117,2	4,5	Leito empacotado	Presente Estudo

* NR: Não reportado; CA: Casca de arroz; FA: Farelo de arroz; BC: Bagaço de cana; FS: Farelo de soja; FT: Farelo de trigo (Modificado de FLORENCIO, 2011).

As atividades enzimáticas obtidas para o extrato produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* QM9414 por fermentação em estado sólido no reator de leito

empacotado são comparáveis a literatura, tendo em vista que os resultados do presente estudo foram semelhantes aos reportados na Tabela 4.2.

4.1.3 Comparação da produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e *Trichoderma reesei* QM9414

Na Figura 4.5 é apresentada uma comparação das atividades enzimáticas (CMCase, xilanase, FPU e β -glicosidase) obtidas pelos extratos celulolíticos produzidos pelos fungos *Myceliophthora thermophila* e *Trichoderma reesei*.

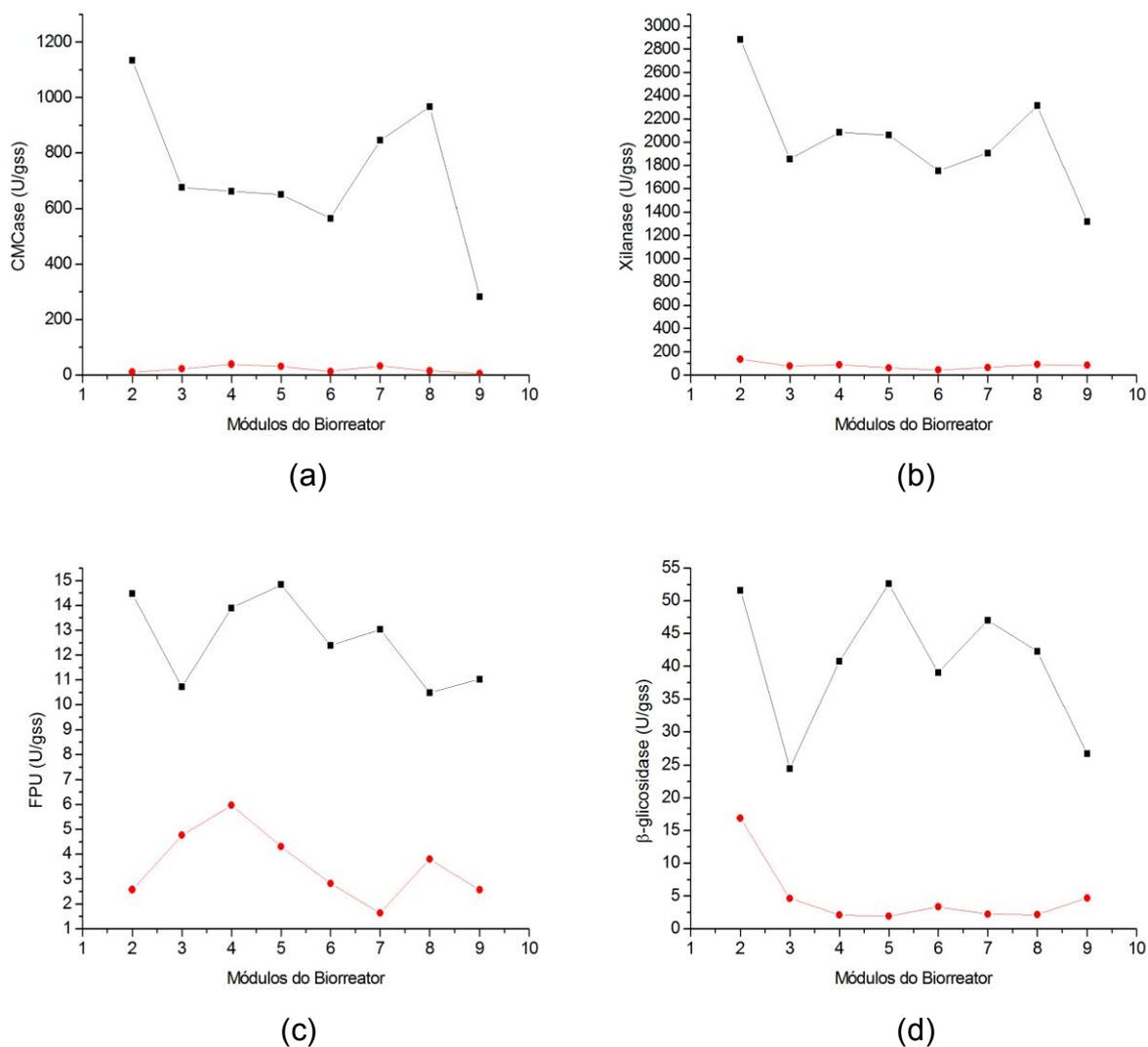


Figura 4.5. Comparação das enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo termofílico *M. thermophila* (—■—) e pelo fungo mesofílico *T. reesei* (—●—): (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPU; (d) β -glicosidase.

Observa-se que as atividades obtidas para o extrato do fungo mesofílico foram muito inferiores às obtidas pelo fungo termofílico com a mesma taxa de aeração, o que é justificável, tendo em vista que, normalmente, os fungos termofílicos secretam naturalmente enzimas mais ativas para substratos complexos (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000). As atividades CMC_{case}, xilanase, FPU e β -glicosidase do extrato produzido pelo fungo mesofílico *T. reesei* representa, em média, 3, 4, 27 e 12 %, respectivamente, das atividades obtidas para o extrato produzido pelo fungo termofílico *M. thermophila*.

O emprego de fungos com preferências térmicas distintas prestou-se a comparar o efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas e a adaptação dos microrganismos ao processo de fermentação sólida, bem como a eficiência de aplicação do extrato enzimático na sacarificação do bagaço de cana, uma vez que fungos diferentes respondem de forma distinta aos estímulos do meio.

Pinto (2010) avaliou a produção de enzimas celulolíticas pelos fungos termofílicos *Thermoascus aurantiacus* e *Thermomyces lagunosus* e pelos mesofílicos *Trichoderma reesei* e *Penicillium viridicatum* em substrato composto por bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 1:1 e 80 % de umidade. Em seus ensaios de atividade enzimática o autor também observou que os microrganismos termofílicos apresentaram, em sua maioria, melhores resultados de atividade celulásica e xilanásica quando comparado com os fungos mesofílicos.

4.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado

Para aplicação dos extratos na sacarificação do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado foi feito um preparado enzimático para cada fungo, proveniente da mistura de 50 mL do extrato produzido em cada módulo do biorreator de leito empacotado, com o intuito de homogeneizar as atividades enzimáticas obtidas em função do comprimento do reator. Ensaios de determinação da atividade enzimática foram novamente realizados e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Atividades dos preparados enzimáticos provenientes da mistura dos extratos obtidos dos diferentes módulos do biorreator.

Atividade Enzimática (U/gss)	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
CMCase	849,9 ± 60,4	28,6 ± 0,6
Xilanase	2253,6 ± 2,4	117,2 ± 0,6
FPU	12,1 ± 1,5	4,5 ± 0,03
B-glicosidase	41,1 ± 0,7	2,7 ± 0,03

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4.3, é possível afirmar que os preparados enzimáticos de ambos os fungos apresentaram altas atividades celulolíticas, de forma que podem ser considerados de bom potencial para aplicação na sacarificação do bagaço de cana.

4.2.1 Hidrólise empregando o extrato enzimático produzido por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b

Os teores de açúcares redutores totais liberados da hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados, expressos em mg de açúcares redutores por grama de bagaço de cana, e a porcentagem de conversão de celulose a glicose, obtida pela Equação 3.3, são apresentados na Tabela 4.4.

Na Tabela 4.4 observa-se que, para os três tipos de bagaço utilizados, os maiores teores de ART foram obtidos empregando-se um tempo mais longo, o que pode estar associado ao fato de que, em um tempo mais curto, provavelmente as enzimas ainda não tinham atacado completamente o substrato. Desta forma, o tempo está correlacionado à cinética de catálise, pois quanto maior o tempo de hidrólise, maior a probabilidade de ocorrerem encontros produtivos entre a enzima e o substrato, sendo limitado pelo tempo reacional em que a hidrólise enzimática é cessada. Contudo, deve-se atentar para o fato de que altos tempos de reação podem provocar a inativação do complexo enzimático, devido ao longo tempo de exposição às altas temperaturas de hidrólise.

Tabela 4.4. Teores de açúcares redutores e glicose (obtida por conversão) dos hidrolisados enzimáticos. Os bagaços de cana *in natura* e pré-tratados foram hidrolisados com o extrato produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila*.

Ensaio	Volume (mL)	Tempo (horas)	Bagaço <i>in natura</i>		Bagaço pré-tratado com O ₃ + US + NaOH		Bagaço com pré-tratamento hidrotérmico	
			ART (mg/g)	Glicose (%)	ART (mg/g)	Glicose (%)	ART (mg/g)	Glicose (%)
			1	3	2	22,4	5,4	75,3
2	7	2	40,4	9,7	99,7	19,4	34,3	8,2
3	3	6	28,5	6,8	126,9	24,8	36,4	8,7
4	7	6	56,5	13,5	174,6	34,0	44,9	10,7
5	2,2	4	22,2	5,3	98,2	19,2	30,0	7,2
6	7,8	4	43,8	10,5	162,6	31,7	44,8	10,7
7	5	1,2	30,2	7,2	89,0	17,4	24,2	5,8
8	5	6,8	34,4	8,3	146,9	28,7	51,7	12,4
9	5	4	34,0	8,2	133,3	26,0	45,9	10,9
10	5	4	36,7	8,8	152,8	29,8	45,9	11,0
11	5	4	36,0	8,6	124,1	24,2	41,1	9,8
12	5	4	47,5	11,4	130,5	25,5	43,7	10,4
13	5	4	42,3	10,1	131,3	25,6	43,2	10,3

A Tabela 4.4 também permite observar que para a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH obteve-se uma maior liberação de ART do que para o bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico. Para esse bagaço obteve-se uma quantificação máxima de ART igual a 174,6 mg de açúcar redutor / g de bagaço tratado empregando-se 7 mL de extrato enzimático e 6 horas de hidrólise (ensaio 4), enquanto para o bagaço de cana *in natura* a maior quantificação foi igual a 56,5 mg de ART / g de bagaço utilizando-se as mesmas condições de volume e tempo de hidrólise.

Para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico, bastante comum na literatura, os melhores resultados foram obtidos empregando-se 5 mL de extrato enzimático e 6,8 horas de hidrólise, resultando em uma liberação máxima de ART igual a 51,7 mg de ART / g de bagaço tratado. Foi feita uma análise de variância entre os teores de ART liberados na hidrólise do bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico, utilizando-se somente os pontos centrais, e a análise

estatística de comparação das médias mostrou que não há diferença significativa entre os resultados de hidrólise dos dois tipos de bagaço ($p > 0,05$).

A Figura 4.6 apresenta a superfície de resposta dos resultados obtidos com o *Myceliophthora thermophila*. A taxa de hidrólise foi avaliada pela quantificação de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise e do volume de extrato enzimático aplicado para os três tipos de bagaço. Nota-se que empregando um maior volume de extrato enzimático obteve-se uma maior quantidade de ART para o bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$, pois com volumes menores possivelmente as enzimas ficaram saturadas e não sobraram sítios ativos para a hidrólise. Sendo assim, para a faixa de volumes testados nesses substratos, quanto maior o volume de extrato enzimático utilizado na hidrólise, maior a eficiência da sacarificação enzimática. No entanto, testes com volumes maiores podem ser realizados até se encontrar o ponto a partir do qual a liberação de açúcares redutores torne-se constante.

Os dados da Figura 4.6a permitem observar que não ocorreu a saturação das enzimas pelo substrato, uma vez que, pela projeção da superfície de resposta, ainda deveria ocorrer crescente liberação de ART em função do tempo de hidrólise e do volume de extrato enzimático aplicado na sacarificação do bagaço de cana *in natura*.

Similarmente ao bagaço não tratado, o aumento do volume de extrato e do tempo de hidrólise aumentaram a liberação de açúcares redutores para o bagaço pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino conforme é possível observar na Figura 4.6b. Em geral, para os ensaios com o bagaço pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$, a quantidade de ART liberados na sacarificação e, conseqüentemente, os valores de conversão de celulose a glicose foi cerca de 3 vezes a observada para o bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico. Desta forma, a ozonólise associada à irradiação de ultrassom e tratamento alcalino pode ser considerada um pré-tratamento eficiente para facilitar a hidrólise enzimática do bagaço de cana, permitindo maior conversão de celulose em glicose.

Por outro lado, na Figura 4.6c observa-se que o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico não manteve a mesma relação dos demais substratos, pois com volumes maiores ocorreu uma redução na quantidade de açúcares redutores liberados, estando os teores mais associados ao tempo de hidrólise do que ao volume de extrato enzimático aplicado.

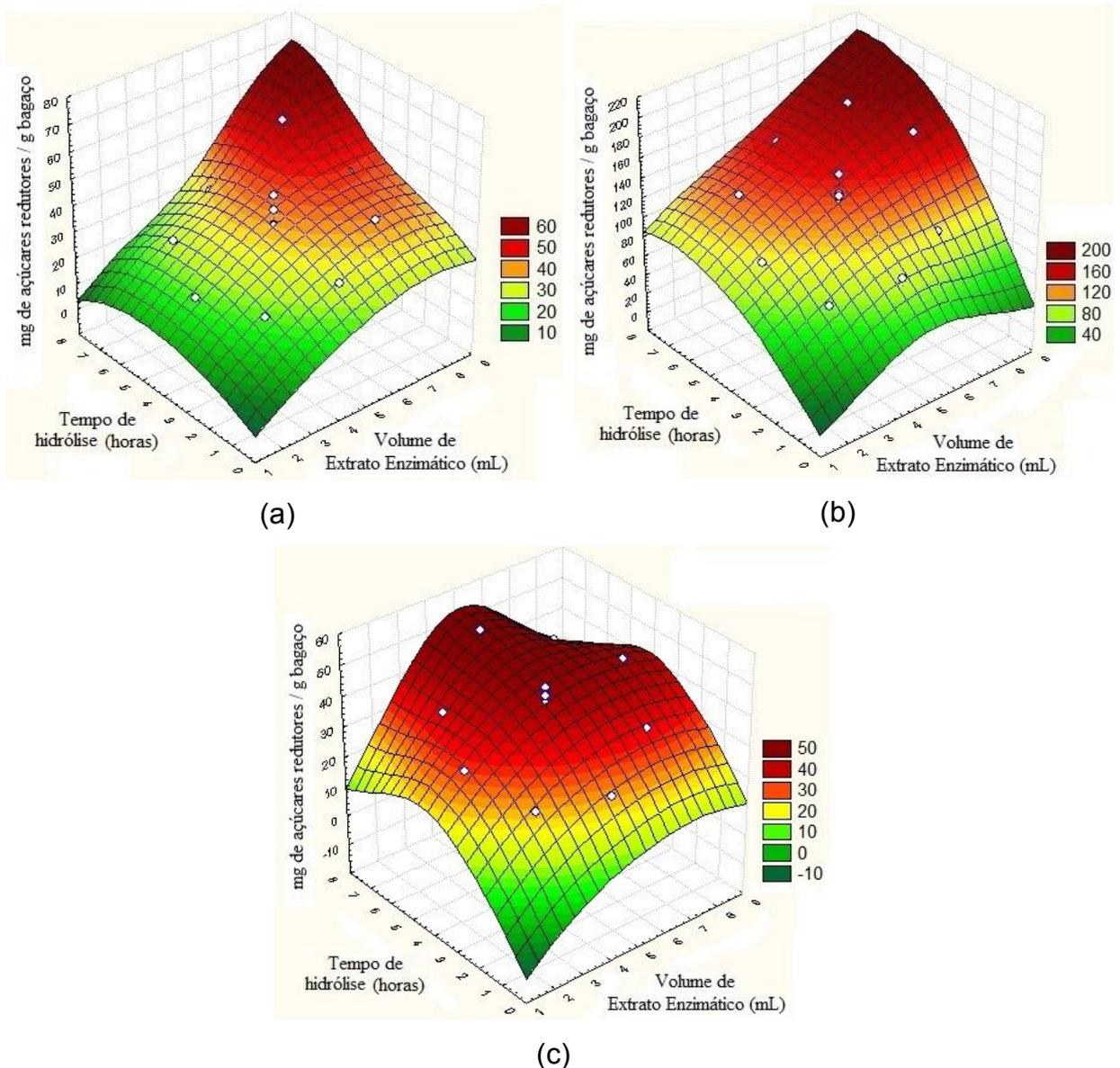


Figura 4.6. Superfície de resposta dos resultados obtidos com o *Myceliophthora thermophila*. Hidrólise expressa em ART em função do tempo de hidrólise e volume de extrato enzimático empregado: (a) para o bagaç *in natura*; (b) para o bagaç pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$; (c) para o bagaç com pré-tratamento hidrotérmico.

De acordo com as análises estatísticas realizadas com auxílio do software de análise estatística Minitab[®] 15.1, observou-se que, para aplicação do extrato produzido pelo fungo *M. thermophila* na sacarificação enzimática do bagaç de cana *in natura*, a quantidade de ART liberados sofre efeito significativo apenas da variável volume (valor $p = 0,002$), sendo significativamente crescente com o aumento do

volume, enquanto o fator tempo de hidrólise não tem efeito significativo (valor $p > 0,05$). Em termos da quantidade de açúcares redutores liberados, a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$ sofre efeito significativo de ambas as variáveis: volume de extrato enzimático ($p = 0,001$) e tempo de hidrólise ($p \approx 0,000$), sendo neste caso significativamente crescente com o aumento tanto do volume e quanto do tempo. Na sacarificação do bagaço com pré-tratamento hidrotérmico observou-se efeito significativo de ambas variáveis ($p = 0,005$), bem como efeito de interação quadrático do fator volume ($p = 0,010$) e do fator tempo de hidrólise ($p = 0,014$).

Os fungos termofílicos apresentam a vantagem de produzir enzimas mais termoestáveis, uma característica bastante interessante do ponto de vista industrial da produção do etanol de segunda geração, sobretudo quando pré-tratamentos que envolvem o uso de calor são empregados na etapa anterior à hidrólise enzimática (DA SILVA et al., 2005). Como as enzimas produzidas por fungos termofílicos atuam bem em temperaturas mais elevadas, é possível gastar uma quantidade de energia menor para resfriamento do material entre as operações de deslignificação a quente e de sacarificação, aumentando a viabilidade do processo. Assim, as enzimas termoestáveis possibilitam a condução da reação de hidrólise a temperaturas superiores a $50\text{ }^\circ\text{C}$, o que lhes confere facilidades como maiores velocidades de hidrólise; menor viscosidade do meio, a qual facilita operações de homogeneização; operação em maiores concentrações de produtos e substratos, além de diminuição do risco de contaminação por fungos mesofílicos (MORETTI, 2010; AFONSO, 2012).

De acordo com a equação bioquímica, representada pela Equação 4.1, que expressa a reação de conversão de glicose em etanol:



tem-se que o máximo teórico de produção de etanol a partir de hexoses é de 510 mg por grama de glicose fermentada (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Com base na densidade do etanol, o volume máximo produzido é igual a 0,65 mL de etanol por grama de glicose fermentada. Desta forma, o máximo de etanol que teoricamente seria possível se obter a partir da destilação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$, para o qual se obtiveram aproximadamente 174,6 mg de açúcar redutor por grama de bagaço, considerando-

se que os açúcares redutores sejam apenas glicose, é igual a 0,1135 mL de etanol por grama de bagaço, equivalente a aproximadamente 113,5 L de etanol por tonelada de bagaço tratado. Para os bagaços de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico, para os quais se obtiveram 56,5 e 51,7 mg de açúcar redutor por grama de bagaço, respectivamente, o máximo de etanol obtido seria, aproximadamente, 36,7 L por tonelada de bagaço *in natura* e 33,6 L por tonelada de bagaço com pré-tratamento hidrotérmico.

4.2.2 Hidrólise empregando o extrato enzimático produzido por *Trichoderma reesei* QM9414.

Os teores de açúcares redutores totais liberados da hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados, expressos em mg de açúcares redutores por grama de bagaço de cana, e a porcentagem de conversão de celulose a glicose, obtida pela Equação 3.3, são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Teores de açúcares redutores e glicose (obtida por conversão) dos hidrolisados enzimáticos. Os bagaços de cana *in natura* e pré-tratados foram hidrolisados com o extrato produzido pelo fungo *Trichoderma reesei*.

Ensaio	Volume (mL)	Tempo (horas)	Bagaço <i>in natura</i>		Bagaço pré-tratado com O ₃ + US + NaOH		Bagaço com pré-tratamento hidrotérmico	
			ART (mg/g)	Glicose (%)	ART (mg/g)	Glicose (%)	ART (mg/g)	Glicose (%)
			1	3	2	20,8	5,0	34,4
2	7	2	35,8	8,6	63,4	12,4	32,7	7,8
3	3	6	19,7	4,6	54,2	10,6	25,8	6,2
4	7	6	45,1	10,8	108,5	21,2	46,0	11,0
5	2,2	4	12,4	3,0	39,0	7,6	16,8	4,0
6	7,8	4	39,7	9,5	101,6	19,8	40,6	9,7
7	5	1,2	23,3	5,6	39,1	7,6	15,8	3,8
8	5	6,8	31,7	7,6	96,6	18,9	38,2	9,1
9	5	4	25,5	6,1	71,5	13,9	31,0	7,4
10	5	4	24,4	5,9	66,7	13,0	33,0	7,9
11	5	4	27,6	6,6	72,1	14,0	31,6	7,5
12	5	4	26,7	6,4	78,1	15,2	36,9	8,8
13	5	4	26,8	6,4	74,7	14,6	31,9	7,6

De modo similar ao observado pela aplicação do extrato enzimático produzido pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*, os resultados apresentados na Tabela 4.5 permitem notar que, o aumento do volume de extrato enzimático aplicado e do tempo de hidrólise resultou em maior quantificação dos açúcares redutores liberados na sacarificação dos três tipos de bagaços de cana empregando-se o extrato produzido pelo fungo mesofílico *Trichoderma reesei*.

De acordo com a Tabela 4.5, para a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH, utilizando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo *T. reesei*, obteve-se maior liberação de ART e, conseqüentemente, maior conversão de celulose a glicose do que para o bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico. Para a hidrólise do bagaço pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino obteve-se uma quantificação máxima de ART igual a 108,5 mg de açúcar redutor / g de bagaço tratado empregando-se 7 mL de extrato enzimático e 6 horas de hidrólise (ensaio 4), enquanto para o bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico a maior quantificação foi igual a 45,1 e 46,0 mg de ART / g de bagaço, respectivamente, utilizando-se as mesmas condições de volume e tempo de hidrólise. Em média, para os ensaios com o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH a quantidade de ART foi aproximadamente 2,5 vezes a quantidade de ART liberados para o bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico.

A Figura 4.7 apresenta a superfície de resposta dos resultados obtidos com o *Trichoderma reesei*. A taxa de hidrólise foi avaliada pela quantificação de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise e do volume de extrato enzimático aplicado para os três tipos de bagaço.

Na figura 4.7 observa-se que não ocorreu a saturação das enzimas pelo substrato e nem a desnaturação térmica do extrato celulolítico, uma vez que, pela projeção da superfície de resposta, ainda deveria ocorrer um aumento na liberação de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise e do volume de extrato enzimático aplicado na sacarificação do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados.

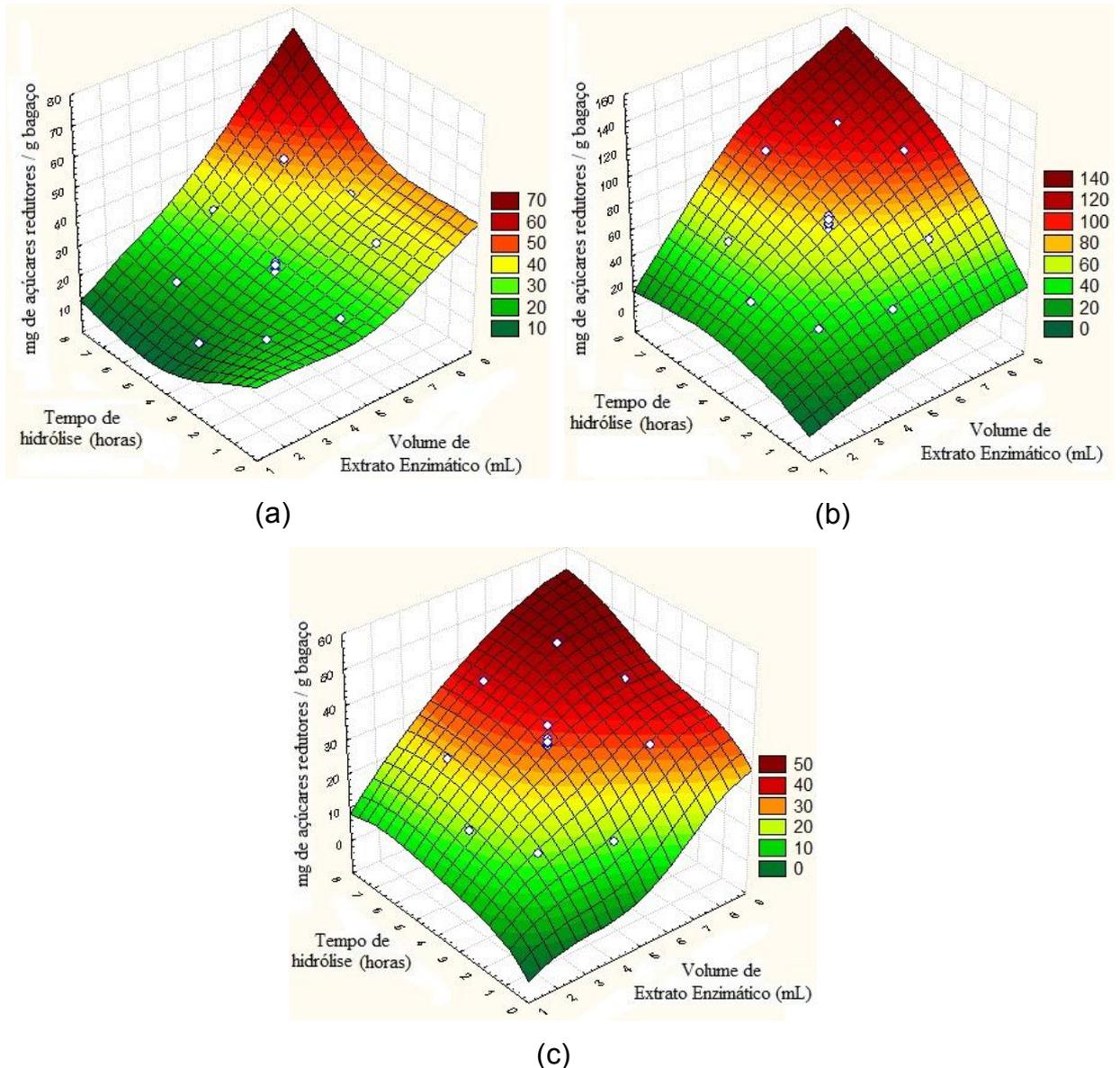


Figura 4.7. Superfície de resposta dos resultados obtidos com o *Trichoderma reesei*. Hidrólise expressa em ART em função do tempo de hidrólise e volume de extrato enzimático empregado: (a) para o bagaço *in natura*; (b) para o bagaço pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$; (c) para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico.

Os estimadores estatísticos dos dados da hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura*, aplicando-se o extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *Trichoderma reesei*, indicaram diferença significativa na quantidade de ART liberados com as variações do volume de enzima ($p \approx 0,000$) e do tempo de hidrólise ($p = 0,016$), sendo significativamente crescente com o aumento tanto do volume de extrato enzimático aplicado quanto do tempo de hidrólise. Neste caso, os dados também apontaram efeito de interação entre as variáveis volume de extrato

enzimático e tempo de hidrólise ($p = 0,044$). As análises estatísticas da quantidade de açúcares redutores liberados na sacarificação enzimática empregando-se bagaço de cana pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$ também mostraram efeito significativo dos fatores volume e tempo ($p \approx 0,000$), bem como efeito de interação entre as variáveis ($p = 0,025$). Os resultados das análises estatísticas da quantidade de ART liberados na hidrólise do bagaço de cana com pré-tratamento hidrotérmico indicaram diferença significativa de ambas variáveis: volume de extrato enzimático ($p = 0,031$) e tempo de hidrólise ($p = 0,026$), bem como efeito de interação quadrático do fator tempo de hidrólise ($p = 0,040$).

Pinto (2010) realizou sacarificação do bagaço de cana empregando-se diferentes volumes de extrato enzimático produzidos por fungos filamentosos em cultivo sólido, variando-se o volume de extrato aplicado e o tempo de hidrólise e também observou que a maior liberação de ART ocorreu com o maior volume de extrato enzimático associado ao maior tempo de hidrólise para três dos quatro fungos empregados em seu trabalho. O autor reporta ainda que não ocorreu a saturação das enzimas pelo substrato, uma vez que a projeção de suas curvas indicam que ocorreria um aumento progressivo na liberação de açúcares redutores, concordando com o presente trabalho.

O fungo *Trichoderma reesei* é reconhecido por sua notável capacidade sacarificante devido à produção de exoglucanases, quantificadas pela atividade papel de filtro (PINTO, 2010). Este microrganismo produz duas exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHI e CBHII), cinco endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV e EGV) e duas β -glicosidades (BGLI e BGLII). As duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e as duas endoglucanases (EGI e EGII) são produzidas em proporção aproximada de 6:2:1:1, ou seja, as endoglucanases quantificadas pela atividade CMC_{Case}, representam apenas 20 % do total de celulasas produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*. Contudo, exoglucanases e endoglucanases somam juntas 90 % do coquetel enzimático de celulasas, enquanto as β -glicosidades secretadas por este fungo correspondem a menos de 1 % do extrato celulolítico produzido (MARGEOT et al., 2009; LYND et al., 2002).

A deficiência na expressão da enzima β -glicosidase pelo fungo *Trichoderma reesei* ou sua inibição pela glicose durante a hidrólise resulta no acúmulo de celobiose, o que inibe a ação das celobiohidrolases e endoglucanases, diminuindo a taxa de hidrólise (KOVÁCS; SZAKACS; ZACCHI, 2009). Portanto, para a efetiva

aplicação na sacarificação enzimática do bagaço de cana a suplementação do extrato enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* com β -glicosidase se faz necessária, com o objetivo de aumentar a eficiência de conversão de celulose a glicose. Todavia, o fungo mesofílico *Trichoderma reesei* está entre os microrganismos com maiores potenciais para a produção de celulasas, além de ser o mais detalhadamente estudado (FLORENCIO, 2011).

De acordo com a Equação 4.1, empregando-se o extrato produzido por *T. reesei*, o máximo de etanol que teoricamente seria possível se obter a partir da destilação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$, para o qual se obtiveram aproximadamente 108,5 mg de ART / g de bagaço, é igual a 70,5 L de etanol por tonelada de bagaço tratado. Para o bagaço de cana *in natura* e para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico, para os quais se obtiveram 45,1 e 46,0 mg de ART / g de bagaço, respectivamente, o máximo de etanol obtido seria, aproximadamente, 29,3 e 29,9 litros por tonelada de bagaço.

4.3 Análise comparativa da hidrólise enzimática

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de muitos fatores que envolvem desde as características do substrato até a natureza do sistema enzimático utilizado. Os fatores relacionados às enzimas incluem a inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de produto final (glicose e celobiose), adsorção irreversível das enzimas sobre o substrato e desnaturação enzimática por exposição excessiva à temperatura e agitação do processo. Já os fatores relacionados ao substrato correspondem à porosidade e cristalinidade das fibras de celulose, teor de lignina e hemicelulose (SANTOS, 2013). Como foram utilizados extratos enzimáticos produzidos por fungos com comportamentos térmicos distintos e ainda substratos para hidrólise com e sem pré-tratamento, na presente seção é feita uma análise comparativa dessas duas variáveis na eficiência de sacarificação.

4.3.1 Extratos produzidos por fungos termofílico e mesofílico

Os dados de hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura*, pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$ e com pré-tratamento hidrotérmico, empregando-se as soluções enzimáticas brutas do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b

e do mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414 estão apresentados na Figura 4.8, que tem por objetivo facilitar a visualização dos resultados.

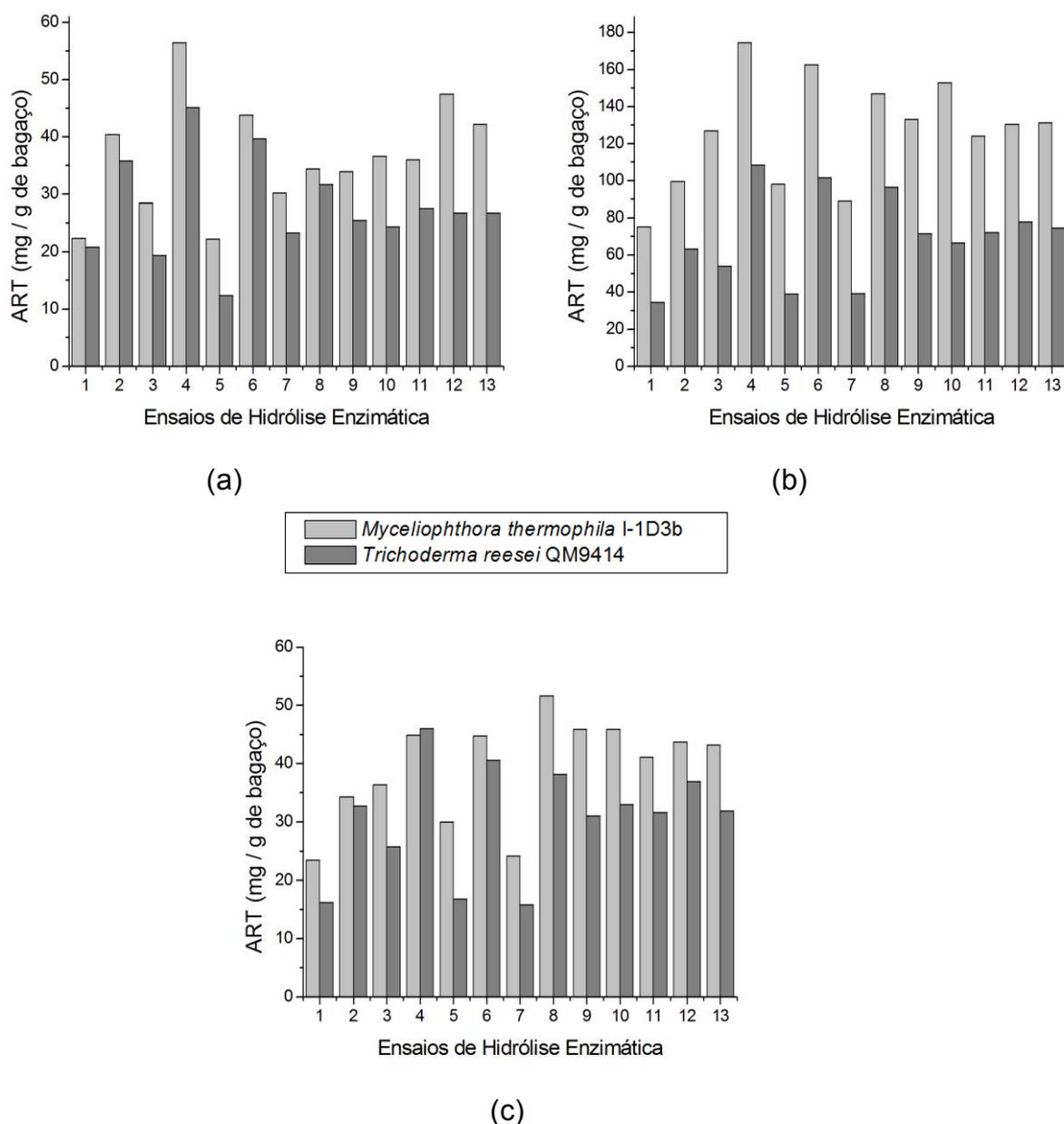


Figura 4.8. Teores de açúcares redutores liberados por ação dos extratos brutos produzidos pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414 na sacarificação do bagaço de cana: (a) *in natura*; (b) pré-tratado com O₃ + US + NaOH; (c) com pré-tratamento hidrotérmico.

Os teores de açúcares liberados na sacarificação dos três tipos de bagaço por ação das enzimas de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b foram maiores do que os de *Trichoderma reesei* QM9414. Sobretudo, essa diferença foi mais expressiva para

o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH, no qual ambos os fungos resultaram em maior liberação de ART e a quantidade de açúcar liberado pelo fungo termofílico foi, aproximadamente, o dobro da quantidade de ART liberados pelo fungo mesofílico.

Para o bagaço de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico, embora o extrato enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* tenha apresentado atividades enzimáticas muito menores que o produzido pelo *Myceliophthora thermophila*, o desempenho de ambos foi muito similar, evidenciando a qualidade do *pool* de celulasas secretadas pelo mesofílico. Com base nisso, pode-se inferir que as enzimas contidas no extrato do fungo termofílico atuam melhor em substratos menos complexos, uma vez que a eficiência de conversão foi bastante alta para os substratos padrões (CMC, xilana, papel de filtro), intermediária para o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH e mais baixa para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico e *in natura*, que foram os substratos mais complexos.

Com relação ao pré-tratamento hidrotérmico, o extrato produzido pelo fungo *M. thermophila*, que tem elevada atividade xilanásica (2253,6 U/gss), enzima responsável por hidrolisar as hemicelulasas, resultou em uma menor liberação de ART, que inclui xiloses. É provável que, em função da remoção das hemicelulasas ocasionada por este processo de tratamento da biomassa, a eficiência global da sacarificação foi reduzida.

Para efeito de comparação das enzimas celulolíticas produzidas por FES, aplicou-se o complexo enzimático comercial da Prozyn[®], seguindo-se o mesmo planejamento experimental descrito na Tabela 3.1. Para os ensaios, o complexo foi devidamente diluído conforme o manual descritivo da enzima e os tubos foram colocados em banho de hidrólise com agitação a 60 °C. Os resultados obtidos na hidrólise do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados empregando-se o complexo Prozyn[®] são apresentados na Tabela 4.6.

Na Tabela 4.6 nota-se que, de modo similar ao observado para a hidrólise empregando-se os extratos fúngicos produzidos por FES, a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH resultou em maior liberação de ART e, conseqüentemente, maior conversão de celulose a glicose do que os bagaços de cana *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico. Para esse bagaço obteve-se uma quantificação máxima de ART igual a 603,5 mg de açúcar redutor / g de bagaço tratado empregando-se 7 mL de extrato enzimático bruto e 6 horas de hidrólise (ensaio 4), enquanto para o bagaço de cana *in natura* a maior quantificação foi igual

a 119,4 mg de ART / g de bagaço utilizando-se as mesmas condições de volume e tempo de hidrólise. Para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico os melhores resultados foram obtidos empregando-se 7,8 mL de extrato enzimático e 4 horas de hidrólise (ensaio 6), resultando em uma liberação máxima de ART igual a 159,9 mg de ART / g de bagaço tratado.

Tabela 4.6. Teores de açúcares redutores e glicose (obtida por conversão) dos hidrolisados enzimáticos. Os bagaços de cana *in natura* e pré-tratados foram hidrolisados com o complexo enzimático comercial Prozyn®.

Ensaio	Volume (mL)	Tempo (horas)	Bagaço <i>in natura</i>		Bagaço pré-tratado com O ₃ + US + NaOH		Bagaço com pré-tratamento hidrotérmico	
			ART (mg/g)	Glicose (%)	ART (mg/g)	Glicose (%)	ART (mg/g)	Glicose (%)
1	3	2	83,2	19,9	305,0	59,5	66,9	16,0
2	7	2	101,5	24,3	430,8	84,0	93,0	22,2
3	3	6	54,7	13,1	493,9	96,4	87,9	21,0
4	7	6	104,7	25,1	603,5	117,8	157,4	37,6
5	2,2	4	61,4	14,7	288,9	56,4	70,4	16,8
6	7,8	4	119,4	28,6	476,6	93,0	159,9	38,1
7	5	1,2	99,2	23,8	290,8	113,5	74,5	17,8
8	5	6,8	85,4	20,5	425,5	83,0	66,1	15,8
9	5	4	92,2	22,1	528,2	103,0	108,4	25,9
10	5	4	85,2	20,4	488,4	95,3	145,5	34,7
11	5	4	89,3	21,4	464,0	90,6	120,6	28,8
12	5	4	88,9	21,3	383,9	74,9	144,4	34,5
13	5	4	88,7	21,3	437,3	85,3	145,0	34,6

Na hidrólise do bagaço de cana *in natura* empregando-se os extratos produzidos pelos fungos *M. thermophila* e *T. reesei* obteve-se, respectivamente, máximo teor de ART liberado igual a 56,5 e 45,1 mg de ART / g de bagaço. Esses valores correspondem a, aproximadamente, 47 e 38 % da liberação máxima de ART quando da aplicação da enzima comercial (119,4 mg de ART / g de bagaço). Para o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH a aplicação dos extratos produzidos por FES pelos fungos termofílico e mesofílico resultaram em 147,6 e 108,5 mg de ART / g de bagaço, o que equivale a 29 e 18 %, respectivamente, da quantidade de ART liberados pela aplicação da Prozyn® (603,5 mg de ART / g de bagaço). Quando

aplicados no bagaço com pré-tratamento hidrotérmico os extratos produzidos no presente trabalhos culminaram em 51,7 e 46,0 mg de ART / g de bagaço, o que representa, respectivamente, 32 e 29 % dos teores de ART liberados pelo complexo comercial (159,9 mg de ART / g de bagaço).

O uso do complexo enzimático comercial é mais eficiente do que as enzimas produzidas por FES, pois esses complexos possuem uma formulação adequada das enzimas necessárias e são suplementados para aumentar a eficiência da sacarificação do bagaço de cana. No entanto, esses complexos comerciais são caros, representando elevado custo no processo, aparecendo como desvantagem da hidrólise enzimática e obstáculo para a efetiva inclusão do etanol celulósico na matriz energética mundial (FLORENCIO, 2011). Assim, os resultados obtidos aplicando-se as enzimas celulolíticas produzidas por FES em biorreator de leito empacotado podem ser considerados promissores, tendo em vista que foi empregado um tempo de hidrólise relativamente curto e as enzimas produzidas por FES mostraram-se eficientes para aplicação na sacarificação do bagaço de cana.

4.3.2 Efeito do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Os pré-tratamentos da biomassa desorganizam a estrutura do material lignocelulósico e expõem a celulose e a hemicelulose a ação das enzimas, aumentando os rendimentos da hidrólise (MORETTI, 2010). Geralmente a hidrólise sem o pré-tratamento apresenta um rendimento menor que 20 % enquanto que, com o pré-tratamento, o rendimento pode exceder 90 % de conversão de celulose a glicose (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008). Além disso, a facilitação da hidrólise pelos tratamentos permite empregar condições mais brandas de operação, possibilitando redução no volume de extrato enzimático aplicado e no tempo de hidrólise (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Na Figura 4.9 são apresentadas, para facilitar a interpretação dos resultados, as concentrações de açúcares redutores por grama de bagaços *in natura* e pré-tratados obtidas da hidrólise empregando extratos celulolíticos produzidos por *M. thermophila* e *T. reesei*, respectivamente.

A Figura 6.9 permite observar que a ozonólise associada à irradiação de ultrassom em meio alcalino é um pré-tratamento eficiente para aumentar a hidrólise enzimática do bagaço de cana, permitindo maior conversão de celulose a glicose

(Tabelas 4.4 e 4.5). Para ambos os fungos observa-se que, para todos os ensaios de sacarificação, o teor de ART liberado pela hidrólise do bagaço pré-tratado com O_3 + US + NaOH foi muito superior ao teor liberado pela hidrólise do bagaço *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico, sobretudo quando da aplicação do extrato enzimático produzido por *M. thermophila*.

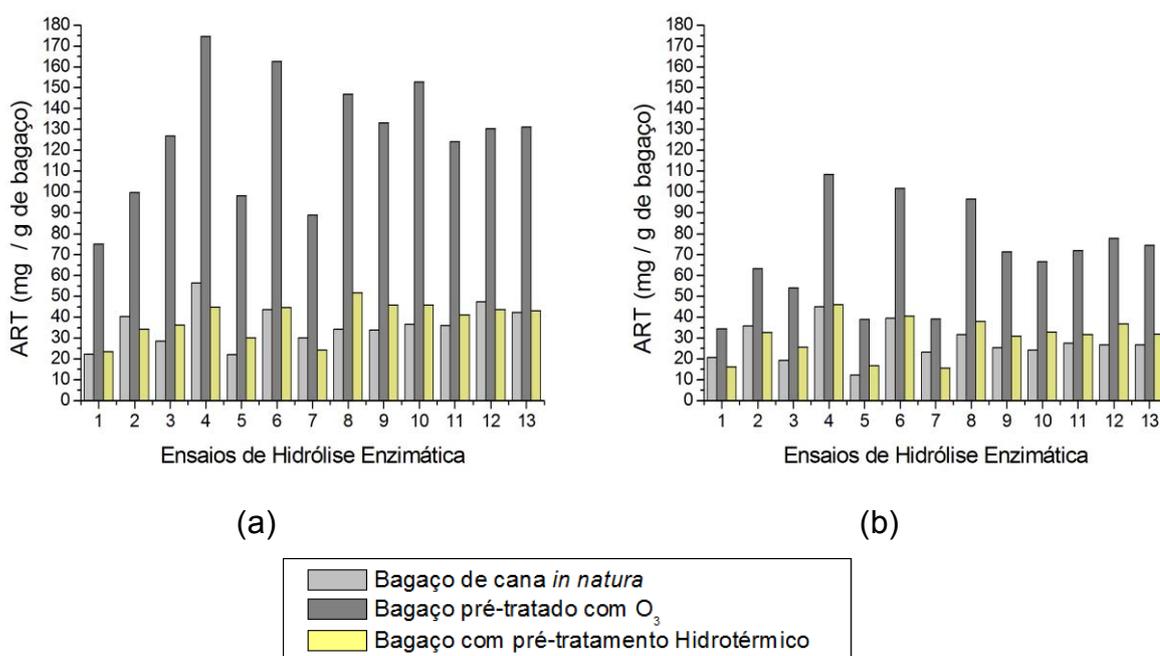


Figura 4.9. Teores de açúcares redutores liberados na sacarificação do bagaço de cana *in natura* e pré-tratados por ação dos extratos brutos produzidos pelo fungo: (a) *Myceliophthora thermophila* I-1D3b; (b) *Trichoderma reesei* QM9414.

A ozonólise promove a remoção da lignina e parte da hemicelulose do substrato, deixando a celulose mais acessível para a ação das enzimas. Possivelmente, com a desestruturação do material lignocelulósico e consequente redução da cristalinidade da celulose, o substrato tenha se aproximado à estrutura da carboximetilcelulose (CMC), tornando-se mais acessível para a ação do extrato celulolítico produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila*, o qual apresentou atividade CMCase muito maior que a do extrato produzido pelo fungo mesofílico (ZANDONA FILHO, 2001). Sendo assim, para o bagaço pré-tratado com O_3 + US + NaOH o efeito do pré-tratamento do bagaço de cana com O_3 + US + NaOH foi percebido mais intensamente nas hidrólises realizadas com o extrato produzido pelo fungo termofílico.

O tratamento hidrotérmico ocasiona a hidrólise de grande parte da fração hemicelulósica presente na biomassa vegetal (GARROTE; DOMÍNGUEZ, PARAJO, 1999). Silva (2009) analisou as frações solubilizadas após diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar e encontrou 88,7 % de hemicelulose removida para a condição de 195 °C por 10 minutos. Assim, a hemicelulose residual forma uma barreira dificultando a ação das celulasas e, conseqüentemente, prejudicando a eficiência global do processo de hidrólise enzimática.

De acordo com Perrone (2012) em seus ensaios de pré-tratamento do bagaço de cana, o fator mais importante durante o pré-tratamento foi a ação conjunta do tratamento com ozônio e a utilização do meio alcalino que promoveram a degradação da lignina e remoção da hemicelulose, deixando a celulose exposta ao ataque das celulasas, tratamento similar ao empregado no presente trabalho. Além disso, a utilização da irradiação de ultrassom, em condições alcalinas, pode romper as paredes celulares facilitando a penetração dos solventes (LIU et al., 2007). O efeito da irradiação somado ao conjunto ozônio/meio alcalino potencializa a desestruturação do material lignocelulósico, aumentando o rendimento da hidrólise enzimática, conforme observado no presente trabalho.

4.4 Determinação dos teores de glicose, xilose e celobiose por HPAEC-PAD

Considerando-se que a fibra do bagaço de cana é formada por aproximadamente 25 % de lignina, 25 % de hemicelulose e 50 % de celulose (PANDEY et al., 2000), os teores de ART quantificados pelo método de Miller (1959) dos pontos centrais do planejamento experimental da aplicação do extrato puro produzido pelo fungo *M. thermophila* no bagaço de cana *in natura* e pré-tratados (ozonólise e hidrotérmico) representam em média 5,2, 17,9 e 5,9 %, respectivamente, do total de açúcar redutor que poderiam ser extraídos do bagaço. Por sua vez, quando aplicado o extrato do fungo *T. reesei* libera-se em média, respectivamente, 3,5, 9,7 e 4,4 % do total de AR presente no material lignocelulósico. Porém, o método do reagente DNS (MILLER, 1959) é uma metodologia inespecífica, visto que a reação por ele empregada envolve qualquer fragmento de celulose ou hemicelulose que tenha capacidade redutora.

Desta maneira, procurou-se determinar com a utilização da cromatografia de troca aniônica, a parcela de ART pertencente a glicose, xilose e celobiose dos pontos centrais do planejamento experimental após a hidrólise enzimática aplicando-se os extratos puros de ambos os fungos. Esses pontos foram escolhidos para análise por *HPAEC-PAD*, pois foram executados com réplicas e representam uma estimativa interna do erro puro e dos pontos axiais, que determinam os termos quadráticos.

Os resultados da quantificação de glicose, xilose e celobiose determinados por cromatografia de troca aniônica (*HPAED-PAD*), conforme item 3.7 da seção *Materiais e Métodos*, expressos em mg de açúcar por grama de bagaço de cana, são apresentados na Figura 4.10.

Na Figura 4.10 observa-se que, em geral, para o ponto central do planejamento experimental, o qual emprega 5 mL de extrato enzimático e 4 horas de hidrólise, os teores de açúcares liberados por ação do extrato produzido por *M. thermophila* foram superiores aos quantificados pela aplicação do extrato produzido pelo fungo mesofílico *T. reesei*, concordando com os resultados obtidos pelo método de Miller (1959).

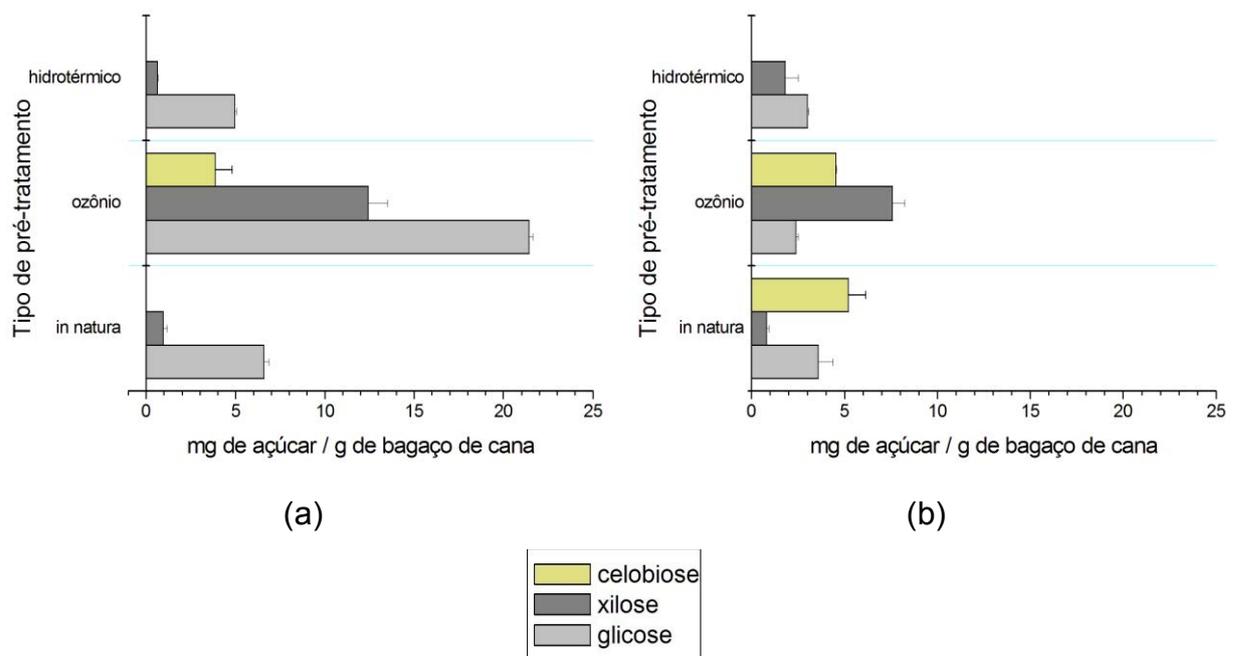


Figura 4.10. Teores de açúcares obtidos por *HPAED-PAD* para os diferentes tipos de tratamento do bagaço de cana por ação dos extratos brutos produzidos pelo fungo: (a) *Myceliophthora thermophila* I-1D3b; (b) *Trichoderma reesei* QM9414

Nas amostras apresentadas na Figura 4.10, que foram submetidas a diferentes tratamentos da biomassa, observa-se que com a utilização do ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino, os teores de açúcares aumentaram em relação à amostra não tratada (bagaço de cana *in natura*). Todavia, o tratamento hidrotérmico não favoreceu a hidrólise enzimática, pois apresentou menor quantificação de açúcares.

Ressalta-se que o extrato do fungo *T. reesei* resultou em maior liberação de xilose. Em média, para os ensaios com o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH a quantidade de xilose foi aproximadamente 9 vezes a quantidade de xilose liberada para o bagaço de cana *in natura* e 4 vezes a quantificada para o bagaço com pré-tratamento hidrotérmico. Além disso, o hidrolisado resultante da aplicação do extrato produzido por *T. reesei* apresentou maiores teores de celobiose.

A celobiose é um dissacarídeo, composto por duas moléculas de glicose, produto da hidrólise incompleta da celulose. Como já relatado, o fungo *T. reesei* é conhecido por sua deficiência na expressão de enzimas β -glicosidases, as quais são responsáveis por converter resíduos de celobiose a glicose. Assim, como o extrato contém uma quantidade insuficiente dessas enzimas, ocorre um acúmulo de celobiose, prejudicando a eficiência global do processo de hidrólise enzimática.

A aplicação do extrato produzido pelo fungo *M. thermophila* resultou na maior quantificação dos três tipos de açúcares analisados quando submetido ao pré-tratamento a base de ozônio. Comparando-se os resultados dessa aplicação com os obtidos para o bagaço *in natura*, observa-se um aumento de aproximadamente 3,2 vezes a quantidade de glicose e 12,8 vezes a de xilose. Ademais, para o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH ocorre liberação de celobiose. Apesar da moderada quantidade de β -glicosidase no extrato enzimático de *M. thermophila* (Figura 4.2d), a mesma foi eficiente na hidrólise, considerando-se a diminuição da quantidade de celobiose, seguida do aumento na quantidade de glicose, enquanto nas hidrólises utilizando-se o extrato de *T. reesei*, houve acúmulo de celobiose.

A quantificação por *HPAEC-PAD* dos açúcares presentes nos hidrolisados dos diferentes tipos de bagaço de cana permitiu uma melhor visualização da extensão da hidrólise enzimática, bem como do efeito dos pré-tratamentos empregados. Os principais açúcares encontrados nas amostras foram a glicose e a xilose, o que é interessante para os processos de sacarificação da biomassa, pois esses podem ser utilizados pelas leveduras na etapa de fermentação e produção do

etanol. Isto demonstra que a extensão da hidrólise atingiu seu principal objetivo, que é a formação dos monossacarídeos passíveis de fermentação. Estes resultados evidenciam que o rendimento da hidrólise enzimática é fortemente influenciado pelo tipo de pré-tratamento da biomassa empregado. Assim, a combinação ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino favorece a acessibilidade das enzimas celulolíticas à celulose proporcionando, portanto, um aumento da digestibilidade enzimática nos processos de conversão da celulose em glicose.

4.5 Sacarificação do bagaço de cana empregando coquetéis enzimáticos produzidos por *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila*

O fungo *Myceliophthora thermophila* é um bom produtor de endoglucanase e endoxilânase, atuando internamente nos substratos, porém produz pequena quantidade de exoglucanase. O fungo *Trichoderma reesei* é reconhecido pela capacidade de produzir diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos, mas apresenta uma deficiência na produção de β -glicosidases (BÉGUIN, 1990). Desta forma, um aumento na eficiência da hidrólise poderia ser obtido buscando o sinergismo entre enzimas dextrinizantes e sacarificantes dos diferentes microrganismos (PINTO, 2010).

Na tentativa de aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, os extratos produzidos pelos fungos *Trichoderma reesei* (T) e *Myceliophthora thermophila* (M) foram misturados em diferentes composições (1:1; 1:3; 3:1), constituindo um coquetel enzimático, para avaliar uma possível complementaridade de suas enzimas. A temperatura é um dos principais fatores externos que influenciam as atividades enzimáticas e, conseqüentemente, o processo de hidrólise enzimática. Assim, o maior desafio na consorciação das enzimas desses fungos reside no fato de um microrganismo ser mesofílico e o outro termofílico, impossibilitando que suas respectivas celulasas atuem na temperatura ótima.

4.5.1 Aplicação dos coquetéis enzimáticos no bagaço de cana *in natura*

Os resultados da liberação de açúcares redutores e do percentual de conversão de celulose a glicose na hidrólise do bagaço de cana *in natura* empregando os coquetéis enzimáticos são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Liberação de açúcares redutores e percentual de conversão na hidrólise do bagaço *in natura* empregando os coquetéis enzimáticos.

Ensaio	ART (mg / g de bagaço)				Glicose (%)			
	45 °C	55 °C	65 °C	Alternada*	45 °C	55 °C	65 °C	Alternada*
T1:M1	28,2	27,0	17,0	50,1	6,8	6,5	4,1	12,0
T1:M3	26,5	26,2	16,6	48,7	6,3	6,3	4,0	11,7
T3:M1	28,6	29,2	15,7	52,4	6,8	7,0	3,7	12,5
T	45,1	17,9	8,1	26,9	10,8	4,3	1,9	6,5
M	21,5	23,4	56,5	45,3	5,2	5,6	13,5	10,8

*Alternada = Hidrólise com alternância da temperatura entre 45 e 65 °C.

Na Figura 4.11 são apresentadas as concentrações de açúcares redutores por grama de bagaço de cana *in natura* obtidas da hidrólise aplicando coquetéis enzimáticos dos extratos celulolíticos produzidos por *T. reesei* e *M. thermophila* em diferentes composições e temperaturas.

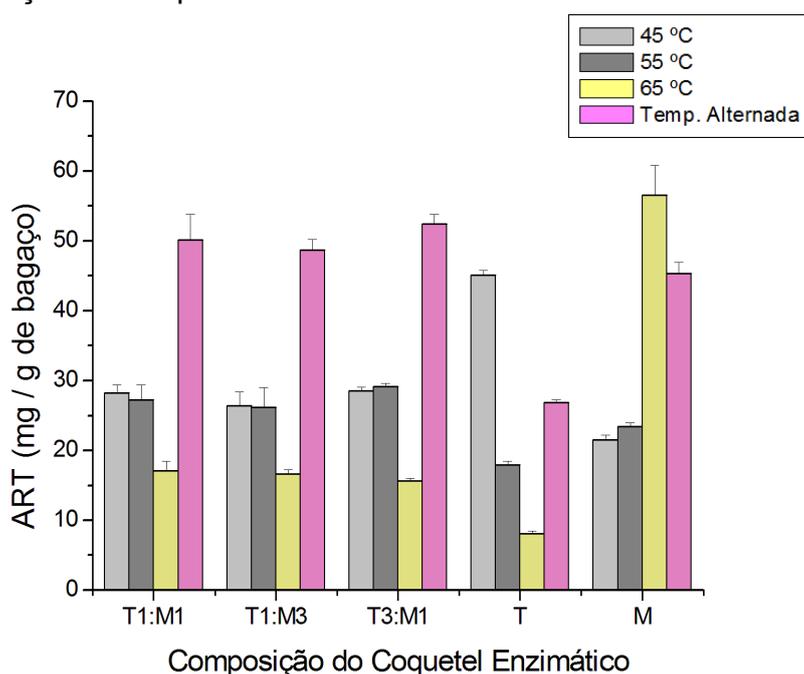


Figura 4.11. Teores de ART liberados na sacarificação do bagaço de cana *in natura* pela ação dos coquetéis enzimáticos.

A Figura 4.12 mostra os resultados das análises estatísticas da hidrólise do bagaço de cana *in natura* em que são apresentados o box-plot dos dados, efeitos

principais de composição e temperatura de hidrólise e efeito de interação entre composição e temperatura.

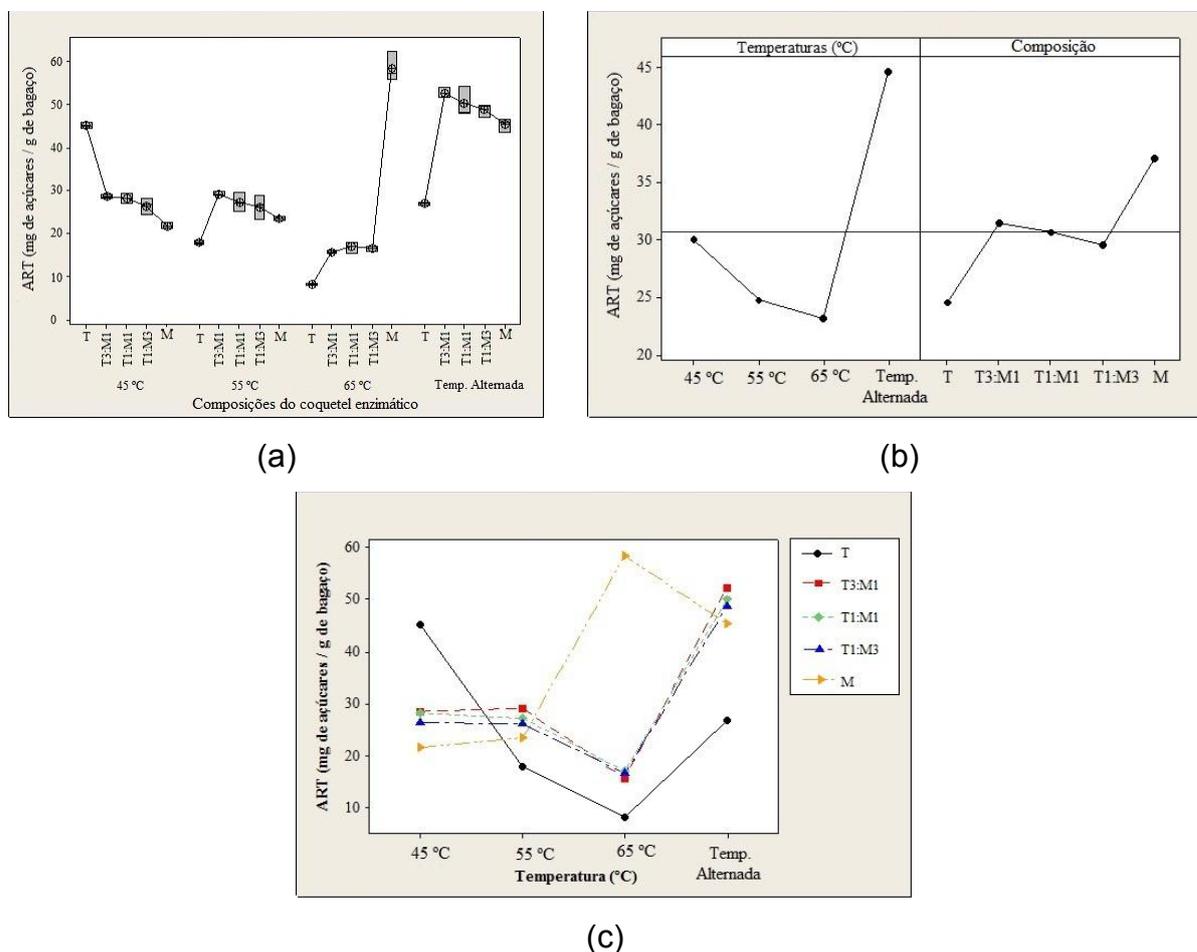


Figura 4.12. Análises estatísticas dos resultados da hidrólise do bagaço de cana *in natura* por ação dos coquetéis enzimáticos: (a) Box-Plot; (b) Efeitos principais de composição e temperatura; (c) Efeito de interação entre composição e temperatura.

Na Figura 4.12 observa-se que a aplicação do extrato puro produzido pelo fungo *M. thermophila* a 65 °C resulta em maiores teores de ART. Para aplicação dos coquetéis enzimáticos ocorreu liberação máxima de ART quando aplicado o coquetel constituído por 75 % do extrato enzimático produzido por *T. reesei* e 25 % do produzido por *M. thermophila* (T3:M1) com alternância de temperatura entre 45 e 65 °C, com nível de significância estatística de 5 %.

No entanto, o emprego das diferentes composições do coquetel enzimático resultou em valores similares de conversão de celulose a glicose (Tabela 4.7).

Quando da aplicação dos extratos puros na temperatura ótima de cada microrganismo obteve-se conversão máxima de 13,5 % para o termofílico e 10,8 % para o mesofílico. Portanto, na condição ideal da reação, ambos os fungos respondem de maneira similar à hidrólise do bagaço de cana *in natura*. Assim, independente da quantidade dos extratos mistos aplicados (diferentes composições empregadas), os resultados da hidrólise desse substrato serão semelhantes.

Para os ensaios realizados em 45 °C, possivelmente, as celulasas do fungo termofílico, ao participarem da hidrólise do substrato, liberam para o meio reacional celobiose, que ocasiona inibição das enzimas do fungo mesofílico. Ademais, as celulasas de *M. thermophila* podem ter sofrido redução de atividade por não trabalhar em sua temperatura ótima. Por outro lado, nas hidrólises realizadas a 65 °C, a aplicação das celulasas puras do fungo *T. reesei* resultou em valores muito baixos de ART, indicando que sofreram desnaturação térmica. Diante disso, observou-se que para aplicação individual das celulasas do fungo *T. reesei* a liberação de ART reduz com a elevação da temperatura, devido à desnaturação térmica. Já para as celulasas do fungo *M. thermophila* os teores de ART aumentam com o aumento da temperatura, pois em baixas temperaturas, as enzimas do fungo termofílico não atuam com sua máxima capacidade, reduzindo a eficiência da hidrólise enzimática (Figura 4.11).

Assim, para aplicação do coquetel constituído por enzimas dos fungos *T. reesei* e *M. thermophila* na sacarificação do bagaço de cana *in natura*, pode-se considerar que a condição térmica ideal é aquela que permite trabalhar com alternância entre as temperaturas ótimas dos microrganismos, possibilitando a ação das celulasas de ambos os fungos e evitando a desnaturação e a inativação enzimática.

4.5.2 Aplicação dos coquetéis enzimáticos no bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH

Na Tabela 4.8 são apresentados os resultados da liberação de açúcares redutores e do percentual de conversão de celulose a glicose da hidrólise do bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH empregando os coquetéis enzimáticos.

Tabela 4.8. Liberação de açúcares redutores e percentual de conversão na hidrólise de bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH empregando os coquetéis enzimáticos.

Ensaio	ART (mg / g de bagaço)				Glicose (%)			
	45 °C	55 °C	65 °C	Alternada*	45 °C	55 °C	65 °C	Alternada*
T1:M1	161,5	176,1	126,9	178,9	31,5	34,4	24,8	42,7
T1:M3	154,6	160,9	142,5	172,7	30,1	31,4	27,8	41,2
T3:M1	168,7	213,1	143,8	182,9	32,9	41,6	28,0	43,6
T	108,5	120,4	49,9	89,4	21,2	23,5	9,7	21,3
M	137,1	146,3	174,6	167,0	26,8	27,4	34,0	39,9

*Alternada = Hidrólise com alternância da temperatura entre 45 e 65 °C.

Na Figura 4.13 são apresentados os teores de ART por grama de bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH obtidos da aplicação dos coquetéis produzidos por *T. reesei* e *M. thermophila* em diferentes composições e temperaturas.

Na Figura 4.14 são apresentados os resultados das análises estatísticas da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH em que são mostrados o box-plot dos dados, efeitos principais de composição e temperatura de hidrólise e efeito de interação entre composição e temperatura.

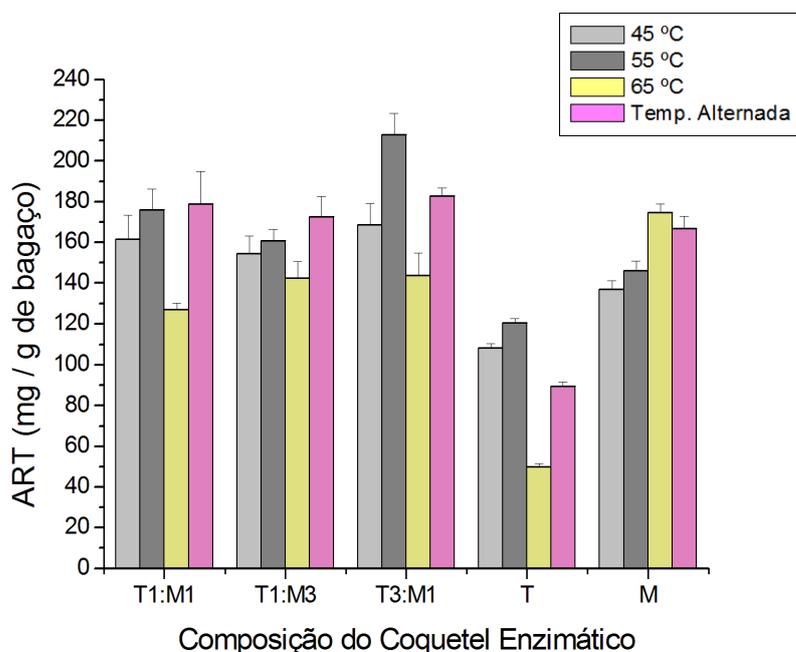


Figura 4.13. Teores de açúcares redutores liberados na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com O₃ + US + NaOH por ação dos coquetéis enzimáticos.

A Figura 4.14 permite observar que os estimadores estatísticos dos dados da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado, aplicando-se os coquetéis enzimáticos dos extratos produzidos pelos fungos *T. reesei* e *M. thermophila*, indicaram diferença significativa na quantidade de açúcares redutores totais liberados com as variações da composição do coquetel enzimático ($p \approx 0,000$) e da temperatura de hidrólise ($p \approx 0,000$), bem como efeito de interação entre as variáveis ($p = 0,000$).

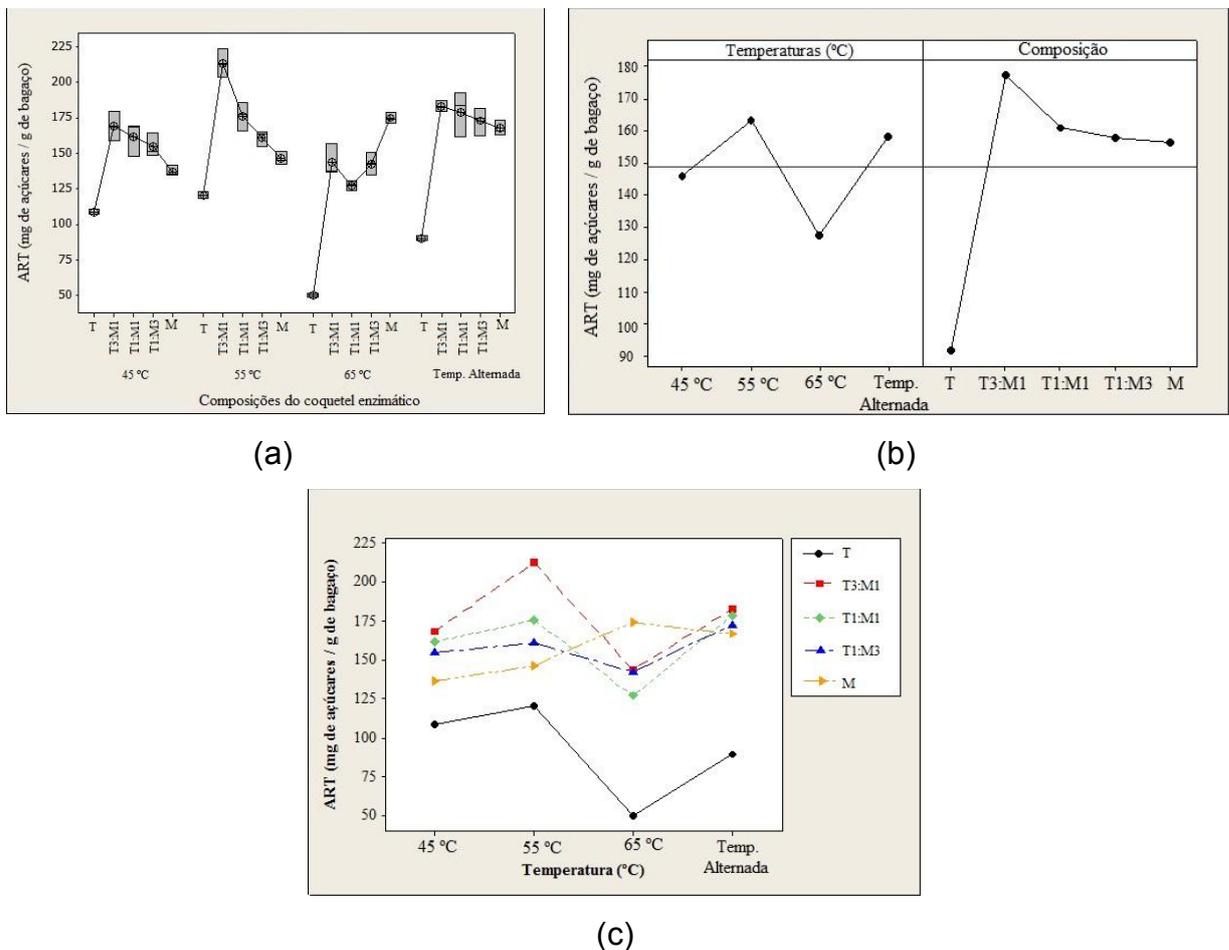


Figura 4.14. Análises estatísticas dos resultados da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com $O_3 + US + NaOH$ por ação dos coquetéis enzimáticos: (a) Box-Plot; (b) Efeitos principais de composição e temperatura; (c) Efeito de interação entre composição e temperatura.

Na Figura 4.14 nota-se que a melhor composição do coquetel enzimático na sacarificação do bagaço pré-tratado é aquela que emprega 75 % do extrato enzimático produzido pelo fungo *T. reesei* e 25 % do produzido pelo fungo *M.*

thermophila (T3:M1) a 55 °C, com nível de significância estatística de 5 %, evidenciando o efeito de sinergia entre as enzimas produzidas pelos fungos *M. thermophila* e *T. reesei*. Contudo, não foi observada diferença significativa entre as hidrólises realizadas a 55 °C e com alternância de temperatura, pois, em ambos os casos, não ocorrem nem desnaturação das enzimas de *T. reesei*, nem inativação das de *M. thermophila*, de modo que as celulases de ambos os fungos, embora com preferências térmicas distintas, atuem de maneira satisfatória.

Todavia, para todas as temperaturas empregadas na hidrólise do bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH, notou-se redução significativa nos teores de ART quando o extrato puro do fungo mesofílico foi aplicado (Figura 4.14). Como já mencionado, o fungo *Trichoderma reesei* apresenta uma deficiência na expressão da enzima β -glicosidase, o que restringe a conversão de celobiose em glicose, proporcionando inibição da atividade das celulases pelo acúmulo do produto da hidrólise. Assim, para a sua efetiva aplicação é necessário que se faça a suplementação com β -glicosidase, a qual pode ser proveniente do extrato enzimático produzido por outro microrganismo, por meio do efeito sinérgico das enzimas (SUKUMARAM et al., 2009; GOTTSCHALK et al., 2010).

Os dados da Tabela 4.8 permitem observar que com o aumento da temperatura de 55 °C para 65 °C ocorre redução da liberação de ART e, conseqüentemente, de conversão de celulose a glicose, para todas as proporções empregadas, destacando-se para a composição T3:M1, devido à desnaturação térmica das enzimas do fungo mesofílico, as quais nessa combinação representam 75 % do volume total das celulases aplicadas. Uma redução menos expressiva foi observada para a composição que emprega maior quantidade de enzimas do fungo termofílico (T1:M3), pois as celulases de *M. thermophila* estão trabalhando em sua temperatura ótima de endoglucanases (65 °C) não sofrendo interferência térmica do processo (MACHADO, 2012).

A temperatura ótima de atividade das endoglucanases foi relatada como sendo igual a 65 °C para *M. thermophila* e 45 °C para *T. reesei*. Porém, há que se considerar que tal conclusão foi baseada em ensaio com 10 minutos de duração e empregando-se carboximetilcelulose como substrato (MACHADO, 2012). Ademais, possivelmente as temperaturas citadas são ótimas para atividade de CMCase dos fungos utilizados, mas não necessariamente serão ótimas para outras atividades do *pool* de celulases. Nos ensaios de hidrólise apresentados no presente trabalho, com

duração de 6 horas, empregando-se os coquetéis enzimáticos, verificou-se um aumento de liberação de ART quando realizada com alternância de temperatura para o bagaço *in natura* e a 55 °C para o bagaço pré-tratado com O₃ + US + NaOH, bem como redução dos teores de ART para os ensaios realizados a 65 °C. Além da desnaturação térmica, concorre para a interferência nas reações de hidrólise a redução da massa de celulose facilmente acessível às enzimas e o acúmulo de inibidores que são os produtos da reação (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Alguns fungos filamentosos, porém não *Trichoderma reesei*, produzem oxirredutases, tais como lacases e lignina peroxidases, que cooperam na despolimerização oxidativa de polissacarídeos da parede celular vegetal e da lignina presente nos materiais lignocelulósicos (KERSTEN; CULLEN, 2007; MARTINEZ et al., 2009). Estas enzimas poderiam aumentar a eficiência das glicosil hidrolases padrões de fungos como *T. reesei*, quer fornecendo uma maneira alternativa para clivar ligações de polissacarídeos ou tornando-os mais acessíveis às enzimas (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010). Assim, pode ser que o fungo *M. thermophila* tenha em seu *pool* de celulases enzimas oxirredutases que auxiliam na sacarificação do bagaço de cana quando combinado ao extrato produzido pelo fungo *T. reesei*, aumentando a eficiência global do processo hidrolítico. Essa hipótese dá margem a futuros estudos para investigar a secreção de enzimas oxidativas, bem como seu mecanismo de ação na degradação da celulose.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

A produção de enzimas celulolíticas pelos fungos termofílico *Myceliophthora thermophila* e mesofílico *Trichoderma reesei* no biorreator, nas condições operacionais adotadas no presente trabalho, foi satisfatória, dado que o perfil de atividade enzimática foi relativamente homogêneo, com alguma heterogeneidade sendo justificada por limitações intrínsecas do processo. As atividades enzimáticas do extrato produzido pelo fungo termofílico foram maiores do que as obtidas para o produzido pelo fungo mesofílico, para a mesma taxa de aeração.

Essas enzimas foram aplicadas na hidrólise do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino e no bagaço com pré-tratamento hidrotérmico. Os resultados com os dois extratos indicaram como ótimos um volume de 7,0 mL e 6 horas de hidrólise para os bagaços *in natura*, pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino e com pré-tratamento hidrotérmico, exceto o extrato de *M. thermophila* que resultou em 5,0 mL e 6,8 horas para o bagaço hidrotérmico. Os melhores resultados de conversão em glicose com os dois extratos foram obtidos com o bagaço pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino, tendo sido de 34,0 % para *M. thermophila* e de 21,2 % para o *T. reesei*, reiterando que este pré-tratamento é eficiente. Embora o extrato enzimático produzido pelo fungo *T. reesei* tenha apresentado atividades enzimáticas inferiores ao produzido por *M. thermophila*, o desempenho de ambos na hidrólise do bagaço *in natura* e com pré-tratamento hidrotérmico foi similar, evidenciando a qualidade do *pool* de celulasas secretadas pelo fungo mesofílico.

Para avaliar uma possível complementaridade dessas enzimas, os extratos foram combinados em diferentes composições e temperaturas. As diferentes combinações resultaram em valores similares de conversão de celulose em glicose para o bagaço *in natura*, com melhores resultados trabalhando-se com alternância entre as temperaturas ótimas dos microrganismos. A melhor composição do coquetel celulolítico na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com ozônio e irradiação de ultrassom em meio alcalino foi obtido pela combinação que empregou 75 % do extrato de *T. reesei* com 25 % de *M. thermophila* a 55 °C, resultando em 41,6 % de conversão, comprovando o efeito de sinergia entre as enzimas.

5.2 Sugestões

Como sugestões para futuros trabalhos na área, propõem-se:

- Estudar as condições operacionais do processo de hidrólise enzimática, avaliando efeito de pH, temperatura, concentração de enzimas e tempo de hidrólise na liberação de açúcares redutores;
- Estudar as enzimas oxidativas e/ou auxiliares envolvidas no mecanismo de degradação da celulose e hemicelulose;
- Avaliar e compreender o sinergismo entre as enzimas hidrolíticas e oxidativas produzidas por diferentes microrganismos na degradação do material lignocelulósico;
- Desenvolver novos coquetéis enzimáticos provenientes da mistura de extratos produzidos por diferentes microrganismos;
- Avaliar a constituição desses coquetéis enzimáticos, buscando-se a composição ideal para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 119f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUES, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 55, n. 4, p. 309-318, 2002.

ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LASER, M.; LYND, R. A. Comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 40, n. 13, p. 2934-2941, 2001.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. Washington, p. 2-42, 1998.

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

ASHLEY, V. M., MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed beds bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 3, n. 2, p. 141-150, 1999.

AWAFO, V. A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics**. 1997. 255f. Tese (Doutorado) - McGill University, Montreal, 1997.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J. SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.

BALAT, M. Mechanisms of thermochemical biomass conversion processes: part 1: reactions of pyrolysis. **Energy Sources**, Nova York, v. 30, n. 7, p. 620-635, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

BALAT, M.; BALAT, M.; KIRTAY, E.; BALAT, H. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 50, n. 12, p. 3147-3157, 2009.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdã, v. 32, n. 3, p. 501-521, 2008.

BANERJEE, G., SCOTT-CRAIG, J. S., WALTON, J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, Nova York, v. 3, n. 1, p. 82-92, 2010.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

BAURHOO, B.; RUIZ-FERIA, C. A.; ZHAO, X. Purified lignin: nutritional and health impacts on farm animals – a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdã, v. 144, n. 3/4, p.175-184, 2008.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 56, n. 3/4, p. 326-338, 2001.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. The biological degradation cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdã, v.13, n. 1, p 25-58, 1994.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, Nova York, v. 15, n. 3/4, p. 583–620, 1997.

BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN M. P (Ed.). **Hemicellulose and hemicellulases**, London: Hazlewood, p. 29-51, 1993.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, Amsterdã, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Carboidratos. In_____: **Química do processamento de alimentos**, 3. ed., São Paulo: Varela, 2003, cap. 1, p. 69.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Bon, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produções, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 2008, p. 241-271.

BRIDGEWATER, A. V. Principles and practice of biomass fast pyrolysis processes for liquids. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdã, v. 51, n. 1/2, p. 3-22, 1999.

BURGERT, I. Exploring the micromechanical design of plant cell walls. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 93, n. 10, p. 1391-1401, 2006.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M. G. A., DA SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Nova York, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CANTWELL, B. A.; SHARP, P. M.; GORMLEY, E.; MCCONNELL, D. J. Molecular cloning of bacillus b-glucanases. In: Aubert, J. P., Beguin, P., Millet, J. (Ed.). **Biochemistry and genetics of cellulose degradation**. Academic Press, San Diego, p. 181-201, 1988.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdã, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Cellulase production in packed bed bioreactor by solid-state fermentation. **European Biomass Conference and Exhibition Proceedings**, Copenhagen, p. 1539-1546, 2013.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of agro-industrial solid by-products applied in solid-state fermentation for cellulase production. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 64, p. 114-123, 2015.

CASCIATORI, P. A. **Produção de enzimas celulolíticas associada à cinética de crescimento dos fungos *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei* em fermentação no estado sólido**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Ambiental) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

CASTILLO, M. R.; CORREIA, M. G.; LINDEN, J. C.; TEGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 16, n. 9, p. 967-972, 1994.

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

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P. K.; SANGWAN, R. S. Cellulase production by six *Trichoderma spp.* fermented on medicinal plant processings. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 605-609, 2009.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84/86, n. 1/9, p. 5-37, 2000.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

CHANLIAUD, E.; BURROWS, K. M.; JERONIMIDIS, G.; GIDLEY, M. J. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. **Planta**, Berlim, v. 215, n. 6, p. 989-996, 2002.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 1-306, 2002. Suplemento.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, Londres, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

CUBERO, M. T. G.; BENITO, G. G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment of enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 4, p. 1608-1613, 2009.

DA SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola sp.* 179-5 e aplicação destas enzimas.** 1992. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

DA SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO, C. M. L. Pectinases, hemicelulases e celulases: substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-250, 1997.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 235-241, 2005.

DEMIRBAS A. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. **Energy Source**, Nova York, v. 3, n. 2, p. 177-185, 2008.

DEMIRBAS, A. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 171-192, 2005a.

DEMIRBAS, A. Influence of gas and detrimental metal emissions from biomass firing and co-firing on environmental impact. **Energy Source**, Nova York, v. 27, n. 15, p. 1419-1428, 2005b.

DESHPANDE, S.K.; BHOTMANGE, M.G.; CHAKRABARTI, T.; SHASTRI, P.N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**, Nova Delhi, v. 15, n. 5, p. 449-456, 2008.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 20, n. 1, p. 11-21, 2004.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1-8, 2012.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado.** 2010. 130f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. **Taxon**, Utrecht, v. 31, n. 3, 1982.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 55, n. 1, p. 1-33, 1996.

DUPONT. Accellerase[®] 1500 – Cellulase enzyme complex for lignocellulosic biomass hydrolysis. Nova York. Disponível em: <http://accelerace.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/accelerace/documents/DUP-00413_ProdSheet_1500_web.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2014.

ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

FELDMAN, D.; BANU, D.; NATANSOHN, A.; WANG, J. Structure–properties relations of thermally cured epoxy-lignin polyblends. **Journal of Applied Polymer Science**, Nova York, v. 42, n. 6, p. 1537-1550, 1991.

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

FERREIRA, V. **Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 132f. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulasas: seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: PeD para produtividade sustentável**. São Paulo: Blucher, p. 697-716, 2010.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLES-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 4, p. 1608-1613, 2009.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, Berlim, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus sp.* by using solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 25, n. 1-2, p. 68-72, 1999.

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

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities – part I: xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 1739-1751, 1987.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTINS, N.; SILVA, R. da. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GÓMEZ, R. J. H. C. **Sacarificação de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

GOTTSCHALK, L. M.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GRABBER, J. H.; RALPHA, J.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 5, p. 455-465, 2004.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdã, v. 144, n. 1/2, p. 1-22, 2008.

GROUS, W. R.; CONVERSE, A. O.; GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 8, n. 5, p. 274-280, 1986.

GUTIERREZ-CORREA, M., TENDERDY, R. P.. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 45-47, 1998.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, Amsterdã, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews – Microbiology**, Londres, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 17, n. 2, p. 79-83, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL. **Brasil vai produzir etanol de segunda geração em 2014**. O Globo, Petrópolis, 2013. Disponível em: <<http://www.inctdobioetanol.com.br>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

JORGENSEN, H.; KUTTER, J. P.; OLSSON, L. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 317, n. 1, p. 85-93, 2003.

KABEL, M. A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 10, p. 2034-2042, 2007.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 20, n. 1, p. 103-110, 2004.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical chemistry: theory, analysis and correlations**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1996.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU, V.; CHRISTAKOPOULOU, P. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 22, n. 5, p. 501-506, 2006.

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 2, p. 77-87, 2007.

KING, B. C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 102, n. 4, p. 1033-1044, 2009.

KIRK, O.; BORCHER, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, Londres, v. 3, n. 1, p. 61-70, 2012.

KOVÁCS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G.; Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 3, p. 1350-1357, 2009.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlim, v. 57, p. 45-125, 1997.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 124, n. 1-3, p. 1081-1099, 2005.

LIU, C.; SUNA, R.; QIN, M.; ZHANG, A.; RENA, J.; XUB, F.; YE, J.; WU, S. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. **Industrial Crops and Products**, Amsterdã, v. 26, n. 2, p. 212-219, 2007.

LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignins: a sustainable alternative to non-renewable materials. **Journal of Polymers and the Environment**, Nova York, v. 10, n. 1-2, p. 39-48, 2002.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, Nova York, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

MACHADO, R. C. **Caracterização da atividade celulolítica dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Myceliophthora sp.* e *Thermoascus aurantiacus* em cultivo no estado sólido.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Ambiental) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

MACHUCA, A. ***Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos de crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos.** 1991. 110f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Nova York, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Oxon, v. 8, n. 3, p. 195-204, 2005.

MARTINEZ, D.; CHALLACOMBE, J.; MORGENSTERN, I.; HIBBETT, D.; SCHMOLL, M.; KUBICEK, C. P.; FERREIRA, P.; RUIZ-DUENAS, F. J.; MARTINEZ, A. T.; KERSTEN, P.; HAMMEL, K. E.; WYMELENBERG, A. V. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 6, p. 1954-1959, 2009.

MEDEIROS, D. R. **Tratamento de efluentes do branqueamento da polpa celulósica por processos oxidativos avançados baseados em ozônio**. 2008. 205f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlim, v. 108, p. 95-120, 2007.

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

MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 16, p. 2166-2172, 2006.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlim, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation**. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 13, n. 2/3, p. 137-147, 2003.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy & Fuels**, Washington, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995.

MORETTI, M. M. de S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; PILÓ-VELOSO, D. Ozonólise das ligninas organossolve e kraft eucalipto. parte II: cinética nos meios ácido e básico. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 578-583, 1998.

NELSON, D. L.; COX, M. Carbohydrates and glycobiology. In: **Lehninger principles of biochemistry**, 4. ed., Nova York:Palgrave Macmillan, cap. 7, p. 249, 2004.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-state substrate sermentation system and their applications in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIE, J. Ethanol production from lignocellulosic biomass. **Oil and Gas Science and Technology/Revue de l'Institut Français du Pétrole**, Rueil-Malmaison, v. 54, p. 67-94, 1999.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicelluloses and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 13, p. 2503-2510. 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRARE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. L. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbio nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulasas**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OZBAY, N.; PUTUN, A. E.; UZUN, B. B.; PUTUN E. Biocrude from biomass: pyrolysis of cotton seed cake. **Renewable Energy**, Oxford, v. 24, n. 3-4, p. 615-625, 2001.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração?. **Circular Técnica 04**, Brasília: Embrapa, 2011.

PALONEN, H.; THOMSEN, A. B.; TENKANEN, M.; SCHMIDT, A. S.; VIIKARI, L. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 117, n. 1, p. 1-17, 2004.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 13, n. 2/3, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, Londres, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse, **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PERRONE, O. M. **Tratamentos físico-químicos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Ambiental) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 2104-2111, 2002.

PINTO, T. O. P. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

POLIZELI, M. L. T.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, H. F.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POUTEAU, C.; DOLE, P.; CATHALA, B.; AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 81, n. 1, p. 9-18, 2003.

PURÍ, V. P. Ozone pretreatment to increase digestibility of lignocelluloses. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 5, n. 11, p. 773-776, 1983.

QUESADA, M.; RUBIO, M.; GOMEZ, D. Ozonation of lignin rich solid fractions from corn stalks. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 19, n. 1/2, p. 115-137, 1999.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 59, n. 4, p. 485-497, 1950.

REIS, A. P. **Purificação, caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas de α -galactosidases de *Aspergillus terreus***. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

RIDDER, E. R.; NOKES, S. E.; KNUTSON, B. L. Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, St. Joseph, v. 42, n. 6, p. 1785-1790, 1999.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 136f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

RYDHOLM, S. A. **Pulping processes**. Wiley: New York, 1965.

SACON, V.; WEISSHEIMER, C. A. Metodologia de lignina simplificada. **Nota Técnica: Riocell**, n. 1481, p. 6, 1996.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, n. 8, p. 2689- 2694, 2005.

SANJUAN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, Berlim, v. 59, n. 6, p. 447-450, 2001.

SANTOS, F. A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 94f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, p. 247-270.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SÖDERSTRÖM, J.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. **Biotechnology Progress**, Nova York, v. 20, n. 3, p. 744-749, 2004.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast. **Bioresources**, Raleigh, v. 3, n. 1, p. 234-246, 2008.

SØRENSEN, H. R., PEDERSEN, S., JØRGENSEN, C. T, MEYER, A. S. Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant "minimal" enzyme cocktail containing beta-xylosidase and novel endo-1, 4-beta-xylanase and alpha-l-arabinofuranosidase activities. **Biotechnololy Progress**, Nova York, v. 23, n. 1, p. 100-107, 2007.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178f. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SRIVASTAVA, K. K.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, R. A recombinant cellulolytic *Escherichia coli*: Cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulase. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 4, p. 293-297, 1999.

SUHAS; CARROTT, P. J. M.; RIBEIRO CARROTT, M. M. L. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 12, p. 2301-2312, 2007.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

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

TAHERZADEH, M. J.; EKLUND, R.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 36, n. 11, p. 4659-4665, 1997.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. In: **Fisiologia Vegetal**, 5. ed., Artmed, 2003.

TEERI, T. T.; BRUMER, H.; DANIEL, G.; GATENHOLM, P. Biomimetic engineering of cellulose-based materials. **Trends in Biotechnology**, Amsterdã, v. 25, n. 7, p. 299-306, 2007.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, Nova York, v. 17, n. 1, p. 110-117, 2001.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H. C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, Essex, v. 39, n. 2, p. 155-163, 1992.

TRAVAINI, R. **Utilização de processos oxidativos avançados baseados em ozônio como pré-tratamento para bagaço de cana-de-açúcar, e hidrólise do bagaço pré-tratado com combinado enzimático dos fungos *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414.** 2011. 62f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

TSUJINO, J., KAWAMOTO, H., SAKA, S. Reactivity of lignin in supercritical methanol studied with various lignin model compounds. **Wood Science and Technology**, Nova York, v. 37, n. 3/4, p. 299-307, 2003.

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

UMSZA-GUEZ, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 em escala de frascos e bioreator de leito fixo.** 2009. 106f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Relatório final da safra 2013/2014. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 14 fev. 2015.

VIDAL, P. F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, Londres, v. 16, n. 1, p. 1-17, 1988.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121, p. 93-104, 2005.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova York, v. 1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 115, n. 1/3, p. 1115-1126, 2004.

YAMAN, S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 651-671, 2004.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, K. O. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 70, p. 1-55, 2010.

YUAN, W.J.; CHANG, B.L.; REN, J.G.; LIU, J.P.; BAI, F.W.; LI, Y.Y. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 112, n. 1, p. 38-44, 2011.

ZANDONA FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas**. 2001. 193f. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo**. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.

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

ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, X.; ZHOU, Y.; ZHENG, G. Microwave pretreatment of substrates for cellulose production by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 5, p. 1557-1571, 2010.