UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DE β-GLUCOSIDASES DE *Aspergillus niger*

DIOGO SIMAS BERNARDES DIAS

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DE β-GLUCOSIDASES DE *Aspergillus niger*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS (MSc.)

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD.* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, 2011

D541p Dias, Diogo Simas Bernardes.

Produção, caracterização parcial e aplicação de β-glucosidases de *Aspergillus niger*/ Diogo Simas Bernardes Dias. 2011.
xix, 98 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Nei Pereira Jr.

1. Celulases. 2. *β*-glucosidases. 3. *Aspergillus niger*. 4. Materiais lignocelulósicos. 5. Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada. – Dissertação. I. Nei Pereira Jr (Orient.). II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 662.88

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DE β-GLUCOSIDASES DE *Aspergillus niger*

DIOGO SIMAS BERNARDES DIAS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS (MSc.).

Aprovada por:

_____

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*.
(Orientador Presidente)

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, DSc.

_____

Rosalie Reed Rodrigues Coelho, DSc.

_____

Roberto Nobuyuki Maeda, DSc.

Rio de Janeiro, 2011

"Na Natureza nada se
cria, nada se perde,
tudo se transforma."
Antoine Lavoisier

Dedico aos meus pais, Giovanni Pessoa Dias e Sandra Maria Simas Bernardes Dias, e ao meu irmão Vinícius Simas Bernardes Dias que foram, são e serão fundamentais em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar saúde para conseguir atingir esse sonho.

A toda a minha família, em especial meu pai Giovanni Pessoa Dias, à minha mãe Sandra Maria Simas Bernardes Dias, ao meu irmão Vinícius Simas Bernardes Dias e minha avó Ernestina Simas Bernardes que não pôde ver em vida o final desse ciclo.

Ao professor Nei pela orientação acadêmica, e a liberdade de atuação na dissertação.

Ao Roberto Maeda pela ajuda no desenvolvimento de toda parte experimental, assim como sua contribuição na parte escrita de materiais e métodos.

À Danielle pelas inúmeras revisões, e principalmente pela amizade e o carinho.

À Carolina pela revisão no capítulo de resultados e discussão.

Ao Élcio pela amizade.

À Equipe LADEBIO, em especial a Agatha, Beatriz, Bruna, Fábio, Jorge, Luiz, Felipe, Gabriela, Gabriel, Rafaela, Lis, Mayara, Thaís, Thainá, Mariana melo, Mariana Faber, Lorena, Liliana, Patrycia, Paulo, Sabrina, Vanessa e Verônica.

Às Amigas Flávia, Mariana, Gisele e Andressa pelos momentos de apoio e descontração.

À Jamille por estar sempre por perto para abraçar, dar conselhos e broncas.

Ao Ulrich pela amizade e por ajudar em toda a parte escrita com extrema paciência e boa vontade, assim como nas dicas, conversas e conselhos, e por fim na diversão.

Ao André pela amizade e pelas orações.

Aos amigos Aike e Cadu pelas conversas e conselhos.

Aos amigos Flávia, Teresa, Leonardo, Gustavo, Milton, Adilza, Virgínia e Renata.

Aos amigos de Petrópolis, em especial Rafael, Matheus, Maicon, Marco, Guto, Leandro e Bernardo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a finalização desta etapa.

À CAPES, ao CNPq e a Petrobrás pelo suporte no desenvolvimento da pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de Figuras xii
Lista de Tabelas xvi
Lista de abreviaturas xvii
Resumo xviii
Abstract xix
1. Introdução 1
2. Objetivos 5
2.1 Objetivo geral 5
2.2 Objetivos específicos 5
3. Revisão Bibliográfica 6
3.1. Matérias-primas para a produção de bioetanol 6
3.1. 1. Sacaríneas 6
3.1.2. Amiláceas 7
3.1. 3. Lignocelulósicas 8
3.1.3.1. Celulose 9
3.1.3.2. Hemiceluloses 10
3.1.3.3. Lignina 10
3.2. Fungos filamentosos 11
3.2.1. *Aspergillus niger* 12
3.3. Estratégias para a produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos 13
3.3.1. Hidrólise e fermentação separadas (SHF) 14
3.3.2. Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) 15
3.3.3. Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF) 17
3.3.4. Bioprocesso consolidado (CBP) 17
3.4. Pré-tratamentos 18
3.5. Hidrólise enzimática de celulose 21
3.5.1. Mecanismo de hidrólise das celulases 22
3.5.2. Fatores limitantes da hidrólise enzimática 26
3.6. Considerações sobre o aproveitamento de materiais lignocelulósicos 27
4. Materiais e Métodos 30
4. 1. Microrganismo 30

4.1.1. Ativação e manutenção dos esporos 30
4.1.2. Obtenção da suspensão de esporos 30
4.2. Pré-tratamento do bagaço 31
4.2.1. Pré-tratamento ácido 31
4.2.2. Pré-tratamento alcalino 32
4.3. Ensaios prévios para a produção de β-glucosidases em fermentação submersa. 32
4.3.1. Avaliação do potencial das linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de β-glucosidases. 32
4.3.2. Avaliação do potencial da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e da celulose microcristalina como indutor na produção de β-glucosidases 33
4.4. Planejamentos experimentais para a maximização da produção de β-glucosidases de *A. niger* 1004 34
4.5. Produção de β-glucosidases em biorreator instrumentado 35
4.6. Obtenção do extrato bruto 38
4.7. Concentração do extrato bruto enzimático em *Hollow Fiber*® 38
4.7.1. Concentração em *Hollow Fiber*® 38
4.8. Caracterização do concentrado enzimático 39
4.8.1. Avaliação da estabilidade do concentrado enzimático 39
4.8.2. Avaliação da influência do pH e da temperatura sobre o concentrado enzimático 39
4.8.3. Avaliação eletroforética 40
4.9. Avaliação do poder hidrolítico do preparado enzimático concentrado 41
4.9.1. Atividades dos complexos enzimáticos a 37℃ e 50℃ 43
4.9.2. Quantificação de glicose e celobiose 43
4.10. Procedimentos analíticos 43
4.10.1. Quantificação das atividades enzimáticas e teor protéico 43
4.10.1.1. Atividade β-glucosidásica 43
4.10.1.2. Atividade CMCásica 44
4.10.1.3. Atividade FPásica 45
4.10.1.4. Teor protéico 45
5. Resultados e Discussão 46
5.1. Avaliação preliminar de produção de β-glucosidases 46

5.1.1. Avaliação do potencial de linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de β-glucosidases 46
5.1.2. Avaliação do potencial de utilização da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e da celulose microcristalina como indutor da produção de β-glucosidases por *Aspergillus niger* ATCC 1004 48
5.1.3. Considerações dos potenciais das linhagens de *Aspergillus niger* e da utilização da celulignina parcialmente deslignificada e celulose microcristalina como indutor para a produção de β-glucosidases 48
5.2. Produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004 por fermentação submersa em frascos agitados utilizando planejamentos experimentais 49
5.2.1. Planejamento *Plackett & Burman* de 16 variáveis 50
5.2.2. Planejamento Delineamento Composto Central Rotacional de 3 variáveis 54
5.2.3. Planejamento experimental fatorial 2^3 57
5.2.4. Considerações gerais dos planejamentos experimentais 59
5.3. Ensaios em biorreator 60
5.4. Concentração do extrato bruto enzimático em *Hollow Fiber*® 63
5.5. Caracterização do concentrado enzimático 64
5.5.1. Avaliação da estabilidade do concentrado enzimático 65
5.5.2. Avaliação da influência do pH e da temperatura sobre o extrato enzimático concentrado 67
5.5.3. Avaliação eletroforética do preparado celulásico 70
5.6. Avaliação do desempenho do preparado celulásico produzido, na hidrólise de celulignina de bagaço decana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina 73
5.6.1. Atividades dos complexos enzimáticos a 37℃ e 50℃ 73
5.6.2. Ensaios de hidrólise enzimática 74
5.6.3. Considerações gerais sobre hidrólise enzimática de substratos celulósicos 78
6. Conclusões 83
6.1. Sugestões 84
Referências Bibliográficas 85

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura molecular de celulose.	9
Figura 3.2	Estrutura molecular da hemicelulose.	10
Figura 3.3	Estrutura Geral da Lignina (Marx, 2000).	11
Figura 3.4	Micrografia da estrutura do órgão de frutificação da espécie *Aspergillus niger* (Fonte: adaptado de Tortora, 2005).	13
Figura 3.5	Diagrama de blocos do processo de hidrólise e fermentação separadas (SHF).	15
Figura 3.6	Diagrama de blocos do processo sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).	16
Figura 3.7	Diagrama de blocos do processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF).	17
Figura 3.8	Diagrama de blocos do processo bioprocesso consolidado (CBP).	18
Figura 3.9	Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos (Fonte: adaptado de MOSIER *et al*., 2004)	19
Figura 3.10	Amorfogênese da celulose microcristalina e ação das enzimas que fazem parte do complexo celulásico. (ARANTES e SADDLER, 2010).	23
Figura 3.11	Mecanismo de ação das exoglucanases em água (Fonte: adaptado de ARANTES e SADDLER, 2010).	25
Figura 4.1	Aspecto macroscópico das linhagens: (A) *Aspergillus niger* ATCC 1004 e (B) *Aspergillus niger* ATCC 16404 cultivadas em meio Batata Dextrose Agar.	30
Figura 4.2	Aspectos do bagaço de cana-de-açúcar após diferentes pré-tratamentos: (A) bagaço de cana-de-açúcar cominuído, (B) Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento ácido (celulignina ácida de bagaço de cana), (C) celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada, obtida após tratamento alcalino seguido de ajuste de pH e (D) celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada cominuída.	32
Figura 4.3	Reator contendo meio de fermentação para a produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004.	36
Figura 4.4	Representação do painel de controle do biorreator com as variáveis: pH, Temperatura, Oxigênio dissolvido, agitação e bombas para controle de pH.	37
Figura 4.5	Painel de controle das variáveis de agitação, vazão de ar, oxigênio dissolvido (30%), temperatura	37

(28℃), pH, bomba de ácido (HCl 2 M) e base (NaOH 2 M) para corrigir pH do meio de produção de β-glucosidases.

Figura 4.6 Equipamento *Hollow Fiber*® utilizado para a concentração do extrato bruto enzimático. 39

Figura 4.7 Sistema de eletroforese vertical. 41

Figura 4.8 Experimento da hidrólise nas condições de 200 rpm à 37℃, por 33 horas. 42

Figura 5.1 Perfil cinético de produção de β-glucosidase com composição de meio descrito na seção 4.2, em pH 5,5, 28℃, 200 rpm, durante o período de 196 horas. 47

Figura 5.2 Diagrama de Pareto do planejamento *Plackett Burman* de 16 variáveis. 52

Figura 5.3 Perfil cinético de produção de β-glucosidase na melhor condição experimental (ensaio 14 do PB16, 28℃, 200 rpm) 53

Figura 5.4 Diagrama de Pareto do planejamento Delineamento Composto Central Rotacional 56

Figura 5.5 Perfil cinético de produção de β-glucosidase na melhor condição apontada pelo DCCR (ensaio 3, 28℃, 200 rpm). 56

Figura 5.6 Diagrama de Pareto do planejamento experimental fatorial 2^3. 58

Figura 5.7 Perfil cinético de produção de β-glucosidase da melhor condição do planejamento experimental fatorial 2^3 (ensaio 7, 28℃ à 200 rpm). 58

Figura 5.8 Perfil cinético da produção de β-glucosidases e CMCases de *A. niger* ATCC 1004 em processos conduzidos em pH 3,0, 4,0 e 5,0 (28℃ e 30% de oxigênio dissolvido, em volume de meio de 3L), com composição de meio da melhor condição do planejamento experimental. 61

Figura 5.9 Atividade específica de β-glucosidases x tempo em processos conduzidos em pH 3,0, 4,0 e 5,0 (28℃ e 30% de oxigênio dissolvido, em volume de meio de 3L), com composição de meio da melhor condição do planejamento experimental. 62

Figura 5.10 Estabilidade do preparado enzimático LADEBIO-AN a 37℃ e 50℃. 65

Figura 5.11 Estabilidade do preparado enzimático LADEBIO-AN a 37℃ por 16 dias. 66

Figura 5.12 Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional relacionado à atuação combinada do pH e da temperatura. 68

Figura 5.13	Gráfico de superfície e resposta da influência do pH e da Temperatura.	69
Figura 5.14	Zimograma de β-glucosidase corado com Esculim.	71
Figura 5.15	Gel SDS-PAGE proteínas desnaturadas com resultados obtidos software “Gel-Pro Analyzer 4.0”	72
Figura 5.16	Hidrólise da **celulignina de bagaço de cana** parcialmente deslignificada (CPD), a 37℃, 200 rpm, na concentração de 100g CPD/L (68% celulose), com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático LADEBIO-AN nas proporções de β-glucosidase; FPase de 0,8:1,0 (controle); 1,4:1,0 e 2,0:1,0.	75
Figura 5.17	Hidrólise de **celulose microcristalina** (Avicel), atemperatura de 37℃, 200 rpm, na concentração de 68g Avicel/L, com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático LADEBIO-AN nas proporções de β-glucosidase; FPase de 0,8:1,0 (controle); 1,4:1,0 e 2,0:1,0.	75
Figura 5.18	Hidrólise da **celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada**, a temperatura de 37℃, 200 rpm, na concentração de 100g/L (68% celulose), com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático β-comercial elevando a razão de β-glucosidase:FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.	76
Figura 5.19	Hidrólise da **celulose microcristalina**, a temperatura de 37℃, 200 rpm, na concentração de 68g/L, com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático β-comercial elevando a razão de β-glucosidase:FPase de 0,8: 1,0 para 1,4: 1,0 e 2,0: 1,0.	77
Figura 5.20	Rendimento de hidrólise da **celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada** na concentração de 100g/L (68% de celulose), a temperatura de 37℃, 200 rpm, com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose e adição dos preparados enzimáticos LADEBIO-AN e β-comercial, elevando as proporções de β-glucosidase:FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.	79
Figura 5.21	Rendimento de hidrólise da **celulose**	80

microcristalina na concentração de 68 g/L, a temperatura de 37℃, 200 rpm, com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose e adição dos preparados enzimáticos LADEBIO-AN e do e β-comercial, elevando a proporção β-glucosidase: FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Composição dos materiais lignocelulósicos	9
Tabela 3.2	Classificação taxonômica de *Aspergillus niger*	13
Tabela 4.1	Composição do meio para produção de β-glucosidases de *A. niger*.	33
Tabela 4.2	Condições do planejamento *Plackett & Burman* 16 para a produção de β-glucosidases.	34
Tabela 4.3	Condições do planejamento DCCR para a produção de β-glucosidases.	35
Tabela 4.4	Condições do planejamento fatorial 2^3 para a produção de β-glucosidases.	35
Tabela 4.5	Condições do planejamento DCCR da influência do pH e de temperatura sobre a atividade do concentrado enzimático.	40
Tabela 4.6	Composição do gel de corrida para SDS-PAGE e Zimograma.	40
Tabela 4.7	Hidrólise enzimática.	42
Tabela 4.8	Composição do reagente de DNS.	44
Tabela 5.1	Produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004 nas condições de composição de meio descrito na seção 4.2, em pH 5,5, 28℃, 200 rpm, durante o período de 168 horas.	48
Tabela 5.2	Planejamento *Plackett & Burman* de 16 variáveis	51
Tabela 5.3	Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional.	55
Tabela 5.4	Planejamento experimental fatorial 2^3.	57
Tabela 5.5	Condições de maior produção de atividade β-glucosidásica.	59
Tabela 5.6	Condições de produção de atividade β-glucosidásica em biorreator instrumentado.	60
Tabela 5.7	Produção de atividades da literatura.	63
Tabela 5.8	Etapas de concentração das β-glucosidases.	64
Tabela 5.9	Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional.	68
Tabela 5.10	Massas Moleculares de β-glucosidases.	72
Tabela 5.11	Atividade dos complexos enzimáticos nas temperaturas de 37 e 50℃.	73
Tabela 5.12	Concentração de celobiose nos experimentos de hidrólise.	78
Tabela 5.13	Rendimento de hidrólise apresentado na Literatura	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CBH	Celobioidrolases
CBHI	Celobioidrolases do tipo I
CBHII	Celobioidrolases do tipo II
CBP	Consolidated Bioprocessing
CPD	Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMC	Direct Microbial Conversation
EG	Endoglucanases
FPU	Filter Paper Unit
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	High-performance liquid chromatography
OD	Oxigênio Dissolvido
PB	*Plackett & Burman*
SHF	Separate Enzymatic Hydrolysis and Fermentation
SSCF	Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
UNCTAD	United Nations Conference on Trade And Development

RESUMO

DIAS, Diogo Simas Bernardes. Produção, caracterização parcial e aplicação de β-glucosidases de *Aspergillus niger*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011. Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD*.

O alto custo das enzimas apresenta-se como um gargalo tecnológico para a produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos, denominado de bioetanol de segunda geração, sendo necessário o desenvolvimento de estudos para a produção de celulases. Estas enzimas, também produzidas por fungos filamentosos, consistem de um complexo enzimático constituído por três grupos principais envolvidos nos processos de hidrólise: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidases. Visando à redução dos custos, tecnologias mais eficientes para a sacarificação podem ser desenvolvidas, através do emprego de "coquetéis enzimáticos" que apresentem alto sinergismo entre os principais grupos enzimáticos constituintes. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, caracterização parcial e aplicação de β-glucosidases de *Aspergillus niger*. Foi desenvolvido um preparado enzimático, denominado de LADEBIO-AN, que teve seu desempenho avaliado de forma consorciada com preparados comerciais. Inicialmente, foi realizada uma seleção de linhagens produtoras tendo sido apontada *Aspergillus niger* ATCC 1004 como a de maior potencial para a produção de β-glucosidases em celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada (CPD). O uso de técnicas de planejamento experimental sequencial conduziu a um aumento na produção enzimática de 1.480 para 4.750 U/L, com a redução de seis componentes do meio de produção. O meio otimizado apresentou a seguinte composição: Tween-80 (7 mL/L), extrato de levedura (10 g/L), CPD (7,5 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (4 g/L) e KH_2PO_4 (3 g/L). Na seqüência, o processo foi avaliado em escala de biorreator instrumentado, apresentando o melhor resultado, operado em pH 4,0, 30% de oxigênio dissolvido e volume útil de 3L. A maior produção de atividade β-glucosidásica foi de 4.880U/L, com a redução de 36 horas de processo. O meio fermentado sem células foi concentrado em membranas de fibra oca, apresentando um valor de atividade de 49.330 U/L. O preparado enzimático concentrado mostrou-se estável a 4℃ (temperatura de estocagem) e 37℃ (temperatura utilizada no processo de sacarificação e fermentação simultâneas). Por outro lado, os maiores valores de atividade enzimática foram alcançados em faixas de temperatura entre 47 e 52,7℃ e de pH entre 3,6 e 5,2. As massas moleculares das β-glucosidases produzidas foram estimadas em 167,9 e 119,0 KDa, através de zimograma e SDS-PAGE. Finalmente, foi verificado que os melhores rendimentos de hidrólise enzimática foram de, aproximadamente, 50% para a CPD e 30% para a celulose microcristalina, ambos com a adição do preparado LADEBIO-AN, valores superiores aos atingido pelos preparados comerciais. O preparado enzimático desenvolvido no presente trabalho de pesquisa apresenta grande potencial para a tecnologia de produção de bioetanol de segunda geração.

Palavras chaves: 1. Celulases. 2. *β*-glucosidases. 3. *Aspergillus niger*. 4. Materiais lignocelulósicos. 5. Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada.

ABSTRACT

DIAS, Diogo Simas Bernardes. Production, partial characterization and application of β-glucosidases from *Aspergillus niger*. Thesis (Master of Technology in Chemical and Biochemical Processes) - School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 2011. Advisor: Nei Pereira Jr., *PhD.*

The high cost of enzymes is presented as a technological bottleneck for the production of bioethanol from lignocellulosic materials, called second-generation bioethanol, being necessary the development of studies for the production of cellulase. Such enzymes also produced by filamentous fungi, consist of an enzyme complex , in which three main groups are involved in the process of hydrolysis: endoglucanases, exoglucanases and β-glucosidases. Aiming at cost reduction, more efficient technologies for the saccharification can be developed through the use of "enzyme cocktails" that have high synergy between the main enzymatic constituents. This study aimed to develop a bioprocess for the production, partial characterization and application of β-glucosidases from *Aspergillus niger*. We have developed an enzyme preparation, called LADEBIO-AN, which had its performance evaluated on combination with commercial preparations. Initially, a selection of producing strains was performed, being considered *Aspergillus niger* ATCC 1004 as the greatest potential for the production of β-glucosidase in cellulignin of sugarcane bagasse partially delignified (CPD). The use of sequential experimental design techniques resulted in an increase in enzyme production of 1,480 to 4,750 U/L, with a reduction of six components in the medium of production. The optimized medium showed the following composition: Tween-80 (7 mL/L), yeast extract (10 g/L), CPD (7.5 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (4 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L). Next, the process was evaluated on a scale of instrumented bioreactor, operated at pH 4.0, 30% of dissolved oxygen and working volume of 3L. The best production of β-glucosidase activity was 4.880 U/L, with a reduction of 36 hours to process. The free-cell fermented medium was concentrated in hollow fiber membranes, displaying an activity value of 49,330 U/L. The concentrated enzyme preparation was stable at 4℃ (storage temperature) and 37℃ (temperature used in the process of simultaneous saccharification and fermentation). On the other hand, higher values of enzyme activity were achieved at temperature ranging between 47 and 52.7℃ and pH between 3.6 and 5.2. The molecular masses of β-glucosidases produced was estimated in 167.9 and 119.0 kDa by applying zymogram and SDS-PAGE technique. Finally, it was found that the best yields of enzymatic hydrolysis were approximately 50% for CPD and 30% microcrystalline cellulose, both with the addition of the preparation LADEBIO-AN, which performance was superior when compared with the use of commercial preparations. The enzymatic preparation LADEBIO-AN shows great potential for the technology of second generation bioethanol production.

Key words: 1. Cellulases. 2. β-glucosidases. 3. *Aspergillus niger*. 4. Lignocellulosic materials. 5. Cellulignin of sugarcane bagasse partially delignified.

1. INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da população ao longo das últimas décadas resultou em uma elevada demanda de energia, suplementada em sua maioria por fontes não renováveis, especialmente o petróleo. Uma vez que o suprimento de energia pertence à base operacional da sociedade, nos mais diversos aspectos, aliado ao fato de constituir um fator determinante no posicionamento econômico, político e social das nações, o petróleo assume importante papel. Porém, a combustão do petróleo e seus derivados têm grande importância com relação à inserção de altas concentrações de poluentes no ambiente (PEREIRA Jr. *et al*., 2008; BON *et al*., 2008).

Atualmente, as diversas formas de utilização dos combustíveis fósseis, por exemplo, no setor de transporte, representam cerca de 60% do consumo total dos combustíveis, assumindo uma injeção de poluentes em elevado custo, sendo não renováveis, de forma que contribuem fortemente às rápidas mudanças climáticas, influenciando no equilíbrio dos ecossistemas, no clima global e nas reservas de petróleo (BALAT, 2011).

De acordo com uma recente pesquisa do painel intergovernamental sobre mudanças climáticas, o aquecimento do sistema climático mundial é unívoco, se devendo provavelmente ao aumento da concentração dos gases do efeito estufa. Os gases oriundos das atividades humanas, os quais contribuem em proporções maiores para o aquecimento global ou acentuam tal problema são: metano (CH_4), óxido nitroso (NO_2), hidrofluorcarbonetos (HFCs), perfluorcarbonetos (PFCs), hexafluoretos de enxofre (SF6) e dióxido de carbono (CO_2) (BRETHAUER e WYMAN, 2010; PEREIRA Jr. *et al*., 2008).

Os gases produzidos por fontes antropogênicas podem permanecer durante décadas na atmosfera, ou seja, as emissões produzidas hoje resultarão impactos no sistema climático por um longo período. Dentre estes se destacam o aumento da temperatura global, o aumento dos níveis dos oceanos, o derretimento das calotas polares, impactos adversos na agricultura e perda da biodiversidade, entre outros. Para isto é necessário uma conscientização da sociedade, com a devida abordagem do problema, requerendo mudanças no consumo e nos hábitos comportamentais (PEREIRA Jr. *et al*., 2008).

A tentativa pela redução do aquecimento global encorajou o surgimento de pesquisas objetivando desenvolver métodos para conter as emissões, bem como o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de biocombustíveis de novas gerações, focados nas vantagens tecnológicas para a redução do consumo de energia e no aumento da eficiência de conversão ou utilização (BALAT *et al.*, 2008).

Neste cenário, surgiu o termo Biorrefinaria, o qual se refere ao uso de matérias-primas renováveis e seus resíduos, de maneira mais integral e diversificada, para a produção, por rota química ou biotecnológica, de combustíveis, produtos químicos e energia, com a mínima geração de resíduos e emissões. Este conceito é análogo ao aplicado na refinaria de petróleo, na qual diversos tipos de combustíveis e petroderivados são produzidos ao mesmo tempo em que um segmento industrial trabalha como polo de matérias-primas para o outro (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

O bioetanol é produzido pela fermentação de açúcares por leveduras, como a espécie *Saccharomyces cerevisae,* em diversas fontes de biomassa. O produto é reconhecido como o único combustível transportável com poder econômico, ambiental e atributos estratégicos. O bioetanol é o produto mais importante em termos de volume e valores de mercado, tendo como principais matérias-primas, carboidratos, caldo de cana e melaço, assim como outros substratos baseados no amido, milho e trigo, considerado uma *commodity* de primeira geração (BRETHAUER e WYMAN, 2010).

Entretanto, a partir somente da produção de bioetanol de primeira geração, se cria um cenário no qual a demanda por matéria-prima compete com o setor de alimentos, isto é, quando da utilização de terras destinadas ao cultivar são utilizadas na plantação de vegetais destinados a tornarem-se matéria-prima da produção do biocombustível. Além disso, outro problema relacionado à utilização de terras diz respeito ao desflorestamento. Neste contexto, uma alternativa surgiu nas ultimas décadas, desenvolvida por pesquisas baseadas em materiais lignocelulósicos, candidatos em potencial como futura matéria-prima, na produção do bioetanol de segunda geração, assim chamado em razão da natureza dessa matéria-prima (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Como o desenvolvimento está ligado ao termo sustentabilidade, a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, estimada em 10^{10} milhões de

toneladas em todo o mundo, se torna uma interessante alternativa, pois não compete com as plantações direcionadas à alimentação, além do baixo custo quando comparadas à matéria-prima convencional. Apesar da conversão biológica de diferentes fontes lignocelulósicas, tais como resíduos agrícolas e florestais ou culturas lignocelulósicas voltadas à produção de bioetanol, possam oferecer inúmeros benefícios, o desenvolvimento desta tecnologia esbarra em fatores econômicos que vem pontualmente sendo contornados (ALVIRA *et al.*, 2010).

Os materiais lignocelulósicos não contêm prontamente os monossacarídeos disponíveis para bioconversão, uma vez que são compostos por polissacarídeos, tais como, celulose e hemicelulose. Tais substratos devem ser hidrolisados por ácidos ou enzimas em açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática é o caminho mais promissor, porém a baixa acessibilidade da celulose nativa é o problema chave para o processo de obtenção de etanol. A celulose na planta está associada à lignina e hemicelulose. Tais estruturas juntamente à própria cristalinidade da celulose dificultam o acesso de agentes hidrolíticos para a mesma. O pré-tratamento é requerido para retirar a lignina e a hemicelulose, aumentando a porosidade do material e a susceptibilidade à celulose. A hemicelulose deve ser preservada, evitando a formação de inibidores. A utilização de reagentes químicos economicamente viáveis, bem como procedimentos e equipamentos simples constituem pontos importantes do processo de obtenção de etanol de 2ª geração (CARDONA *et al.*, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é conduzida por enzimas celulolíticas específicas, as quais geralmente produzem açúcares redutores, incluindo a glicose. Os custos são baixos quando comparados a tratamentos ácidos e alcalinos, devido às condições de condução do processo, normalmente moderadas e a ausência de corrosão. Bactérias e fungos são utilizados na produção de enzimas celulolíticas, porém, devido à baixa produção dessas enzimas pelas bactérias, os estudos têm direcionado a síntese de enzimas por fungos, por exemplo, *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penincilium* (SUN e CHENG, 2002; BALAT, 2011).

Geralmente, as celulases consistem em uma mistura de enzimas, as quais três grupos principais estão envolvidos no processo de hidrólise: endoglucanases, atacando as regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose, exoglucanases ou

celobioidrolases, degradando as moléculas e transformando em celobiose, pelos terminais redutores e não redutores, e β-glucosidases, hidrolisando celobiose em glicose. O alto custo das enzimas, cerca de 40-49% dos custos da produção de etanol de 2ª geração, produz um gargalo tecnológico, sendo necessário o desenvolvimento de estudos para a produção de celulases por diferentes fungos com uma produção na própria planta, propondo um desenvolvimento sustentável, visando o aproveitamento total do material lignocelulolítico (SUN e CHENG. 2002; ROCHA, 2010; SUKUMARAN *et al*. 2010).

Castro (2006) estudou o potencial de oito microrganismos, incluindo duas linhagens de *Aspergillus niger* no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), que se apresentavam com potencial para produção de β-glucosidase. Dando continuidade à pesquisa, Rocha (2010) estudou a produção de celulases por *Trichoderma harzianum*, obtendo respostas, as quais resultaram em valores ótimos na produção de endoglucanases e baixa produção de β-glucosidases. Visando à redução dos custos do bioetanol, tecnologias para sacarificação mais eficientes podem ser incluídas, como os denominados “coquetéis enzimáticos”. Daí vem à luz a possibilidade de estudar os microrganismos comumente utilizados para a suplementação de β-glucosidases, pertencentes ao gênero *Aspergillus* (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo geral, o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de β-glucosidases, com posterior caracterização, e aplicação das mesmas. Como forma de apresentação, a dissertação está estruturada em capítulos. Após a introdução ao tema, no capítulo 2 são definidos os objetivos do trabalho. No capítulo 3, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre materiais lignocelulósicos e microrganismos envolvidos na produção enzimática, assim como estratégias e mecanismos envolvidos nos processos de hidrólise para a produção de bioetanol, a partir de materiais lignocelulósicos, sendo discutidas ao final do capítulo, umas considerações sobre o aproveitamento dos materiais deste campo. Os materiais e métodos estão descritos no capítulo 4 e no capítulo 5, os resultados deste estudo estão discutidos. O capítulo 6 aborda as conclusões e sugestões, seguido da sessão das referências bibliográficas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver um bioprocesso voltado para a produção de β-glucosidases por uma linhagem de *Aspergillus niger* em fermentação submersa e aplicar o extrato enzimático na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

2.2. Específicos

• Avaliar o potencial de duas linhagens de fungos filamentosos, para a produção de β-glucosidases: *Aspergillus niger* ATCC 1004 e *Aspergillus niger* ATCC 16404;

• Avaliar o potencial de utilização da celulose microcristalina e da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada como indutor da produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004;

• Produzir β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004 por fermentação submersa em frascos agitados;

• Determinar o perfil cinético de produção das celulases em biorreator instrumentado;

• Avaliar a estabilidade do concentrado celulásico;

•Avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade do concentrado enzimático;

•Avaliar o padrão eletroforético do concentrado celulásico;

•Avaliar o desempenho do concentrado celulásico produzido, na hidrólise celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina, comparando com um preparado enzimático comercial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Matérias-primas para produção de bioetanol

Os biocombustíveis têm sua origem a partir de diversos tipos de matérias-primas, tais como óleos de plantas, açúcar de beterraba, cereais, resíduos orgânicos e o processamento de biomassas. Estes materiais contêm apreciáveis quantidades de carboidratos, ou mesmo diferentes formas (monossacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos) que podem ser fermentados diretamente ou após procedimentos de hidrólise. A conversão de carboidratos com 5 ou 6 átomos de carbono em bioetanol é mais simples comparada a materiais amiláceos e biomassa lignocelulósica, na medida em que estes materiais não podem ser diretamente utilizados por leveduras (BALAT *et al.*, 2008).

Nos últimos 15 anos, um aumento significativo tem sido constatado em direção a utilização mais eficiente de materiais de resíduos renováveis agroindustriais. No Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar representa o principal resíduo de composição lignocelulósica para a produção de bioetanol de segunda geração. A disponibilidade das matérias-primas renováveis pode variar consideravelmente de estação para estação, dependendo também da localização geográfica. As mudanças dos custos também podem variar em grande escala afetando os custos do bioetanol (SOCCOL *et al.,* 2010).

As matérias-primas utilizadas para a produção de bioetanol podem ser classificadas em três grupos: (i) Sacaríneas, os mais utilizados são a cana-de-açúcar, o açúcar de beterraba e o sorgo; (ii) Amiláceas, provenientes do trigo, milho e cevada; (iii) Lignocelulósicas, representadas pela madeira e por resíduos agrícolas e agro-industriais (BALAT *et al.*, 2008).

3.1.1. Sacaríneas

A sacarose, utilizada para a produção de bioetanol de primeira geração, é essencialmente originada da cana-de-açúcar e da beterraba, representando dois terços e um terço da produção mundial, respectivamente. Como estes vegetais são cultivados em regiões geograficamente distintas, a cana-de-açúcar é comum em

países tropicais e subtropicais, enquanto a beterraba em países temperados (UNCTAD, 2006).

Nos países europeus, o melaço da beterraba é a matéria-prima mais utilizada. Como vantagens para a sua produção de beterraba destacam-se o baixo ciclo de colheita, altos rendimentos, alta tolerância das vastas faixas de variações climáticas, assim como a baixa necessidade de água e fertilizantes. O sorgo sacarino é uma das culturas mais resistentes à seca, podendo permanecer latente durante longos períodos. Das muitas espécies vegetais investigadas, o sorghum sacharium se encontra como um dos mais promissores para produção de bioetanol, principalmente em países desenvolvidos (BALAT *et al.*, 2008).

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil é viável economicamente, em função de sua posição privilegiada como principal produtor mundial, representando aproximadamente 35% da produção global. Além disso, o país incorporou o etanol em sua matriz energética e determinou a adição de bioetanol à gasolina em proporção variando de 20 a 25%. E ainda, o país abandonou o protecionismo ao açúcar, favorecendo a produção de etanol (PEREIRA Jr., 2008; VEIGA FILHO, 2010).

3.1.2. Amiláceas

O amido é um biopolímero que pode ser definido como uma cadeia de polissacarídeos de glicose. Para a produção de bioetanol a partir do mesmo faz-se necessária, inicialmente, a hidrólise de sua cadeia para a obtenção do xarope de glicose, que posteriormente é convertido em etanol por leveduras. As longas cadeias de glicose são convertidas a açúcares fermentáveis através de hidrólise enzimática ou ácida. A atuação das amilases é realizada a temperaturas relativamente altas, próximas a 80℃, em um processo conhecido industrialmente como liquefação. Os principais fatores que afetam a hidrólise incluem o substrato, a atividade enzimática e as condições de reação, incluindo, temperatura, pH, dentre outros parâmetros (NEVES, 2006; CARDONA e SANCHES, 2007).

O amido é o substrato mais utilizado na América do Norte e Europa para a produção de etanol, sendo o milho e o trigo as principais matérias-primas. Os Estados Unidos, principalmente, possuem uma larga produção baseada no milho,

apresentando valores acima de 49 bilhões de litros por ano. Adicionalmente, são esperados em 2022, valores em torno de 136 bilhões. Os custos desta produção são representados principalmente de acordo com a proximidade da plantação à planta (CARDONA e SANCHES, 2007; BALAT *et al.*, 2008; BABCOCK, 2011).

Neste contexto, a indústria de bioetanol a partir de amido tem sido comercialmente viável, devido às melhorias do setor nos últimos 30 anos, além da eficiência das enzimas, redução do tempo e custos de processos, bem como o aumento nos rendimentos do processo. Um dos principais elementos que contribuem para os altos custos do processo é o fato da levedura *Saccharomyces cerevisae* não utilizar diretamente os materiais amiláceos, necessitando da adição de altas concentrações enzimáticas (glucoamilases e α-amilases), além de altas temperaturas empregadas no tratamento destes materiais, variando de 140 a 180℃ (SHIGECHI *et al*., 2004).

3.1.3. Lignocelulósicas

A biomassa lignocelulósica apresenta-se muito atrativa para a produção de etanol, por ser o material biológico mais abundante sobre a terra, além de ter a capacidade de produção de 442 bilhões de litros ao ano (produção mundial) deste combustível. A mesma pode ser classificada em resíduos de florestas, resíduos sólidos urbanos, resíduos de papel e resíduos de agriculturas. Desta forma, os materiais lignocelulósicos se apresentam vantajosos por serem abundantes, renováveis, e, sobretudo, possuírem baixo custo de produção, altos índices de rendimentos, boa adequação ao solo, bem como baixos impactos ambientais. Entretanto, é necessária a realização de pré-tratamentos ácidos, alcalinos e/ou enzimáticos, conduzindo a um aumento dos custos do processo (BALAT *et al.,* 2008; BALAT, 2011).

A composição química dos materiais lignocelulósicos é um dos principais fatores que afetam o processo de conversão. Outros fatores envolvidos são a sua estrutura, variação genética e suas interações. A Tabela 3.1 apresenta a composição dos materiais lignocelulósicos, constituídos de três polímeros básicos: celulose $[(C_6H_{10}O_5)_x]$, hemiceluloses $[(C_5H_8O)_m]$ e lignina $\{[C_9H_{10}O_3.(OCH_3)_{0,9-1,7}]_n\}$ (LEE, 2007; BALAT *et al.*, 2008; SOCCOL *et al.,* 2010).

Tabela 3.1. Composição dos materiais lignocelulósicos.

	Componentes (%)		
Material lignocelulósico	**Celulose**	**Hemicelulose**	**Lignina**
Bagaço de cana-de-açúcar	36	28	20
Palha de cana-de-açúcar	36	21	16
Palha de arroz	33	26	7
Palha de trigo	39	36	10
Papel	43	13	6

Fonte: OLSON e HAHN (1996); AWAFO (1997)

3.1.3.1. Celulose

A celulose consiste no principal componente do vegetal, apresentando-se como o polímero orgânico mais abundante da biosfera, em cerca de $7{,}0 \times 10^{11}$ toneladas. Este carboidrato é um homopolissacarídeo linear, formados por unidades de glicose anidra, ligadas por cadeias de β-1,4-glicosídeos e ao final das cadeias de glucanas com um carbono anomérico (SANDGREN, 2005).

A cadeia de celulose (Figura 3.1), imediatamente após a sua síntese, interage com microfibras de celulose através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. As mesmas tornam-na mais resistente à hidrólise do que as ligações α-1,4 dos polímeros de glucana do amido (NIEDUSZYNSKI e PRESTON, 1970).

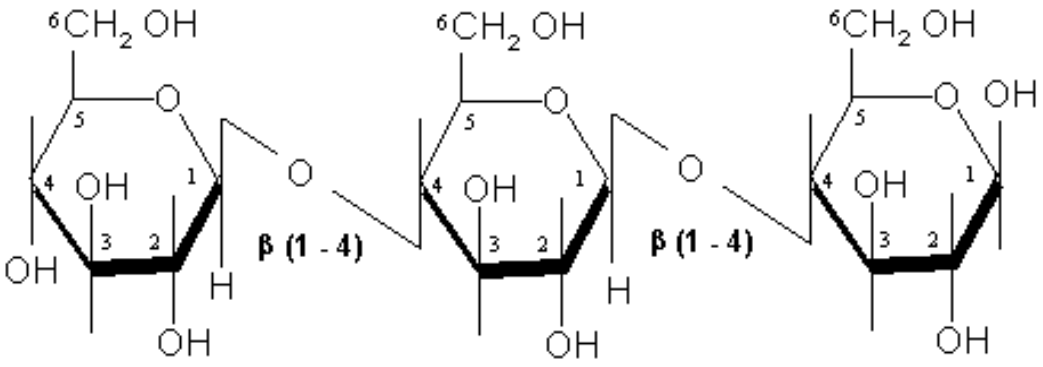

Figura 3.1- Estrutura molecular de celulose.

3.1.3.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e podem ser definidas como uma mistura heterogênea de diferentes polissacarídeos de baixa massa molecular, variando de acordo com a espécie do vegetal (PEREIRA Jr., 2008).

Contrariamente à celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos naturais de baixo grau de ramificação e, consequentemente, não apresentam regiões cristalinas. Sua grande variação contribui para uma alta complexidade da estrutura e diferentes conformações. As xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas são as principais constituintes deste carboidrato (COLLINS *et al.,* 2005; PEREIRA Jr., 2008). Na figura 3.2 é apresentado um exemplo da hemicelulose.

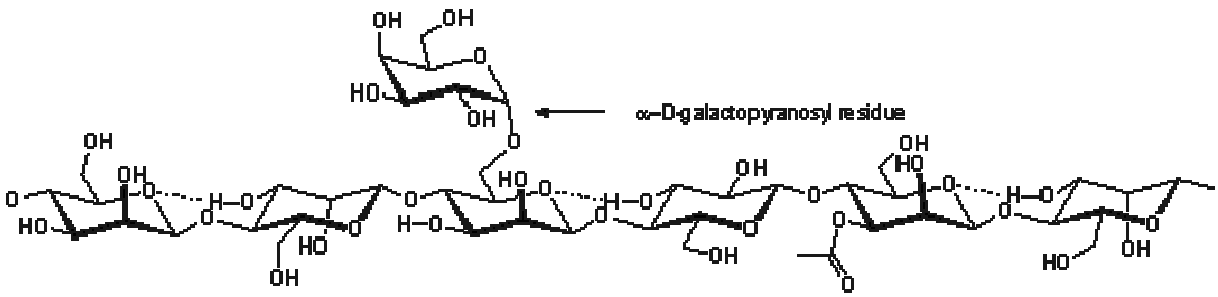

Figura 3.2. Estrutura molecular da hemicelulose.

3.1.3.3. Lignina

A lignina é composta, em sua maioria, por unidades de fenilpropano nas formas tridimensionais e amorfas, as quais não conferem acoplamento nas formas regulares ou repetitivas. A mesma é sintetizada a partir dos alcoóis p-culmarílico, coniferílico e sinapilico, gerando unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas. Sua estrutura varia de acordo com a espécie da planta, promovendo resistência mecânica, além de neutralizar ataques enzimáticos (MAEDA, 2010).

A lignina é altamente ramificada em polímeros aromáticos na parede celular de certas biomassas e sua estrutura se encontra juntamente com as fibras de celulose (Figura 3.3). Estas estruturas, somadas às hemiceluloses, constituem o

complexo lignocelulósico, apresenta-se como barreira para alguns sistemas microbiológicos e agentes químicos (YAMAN, 2004).

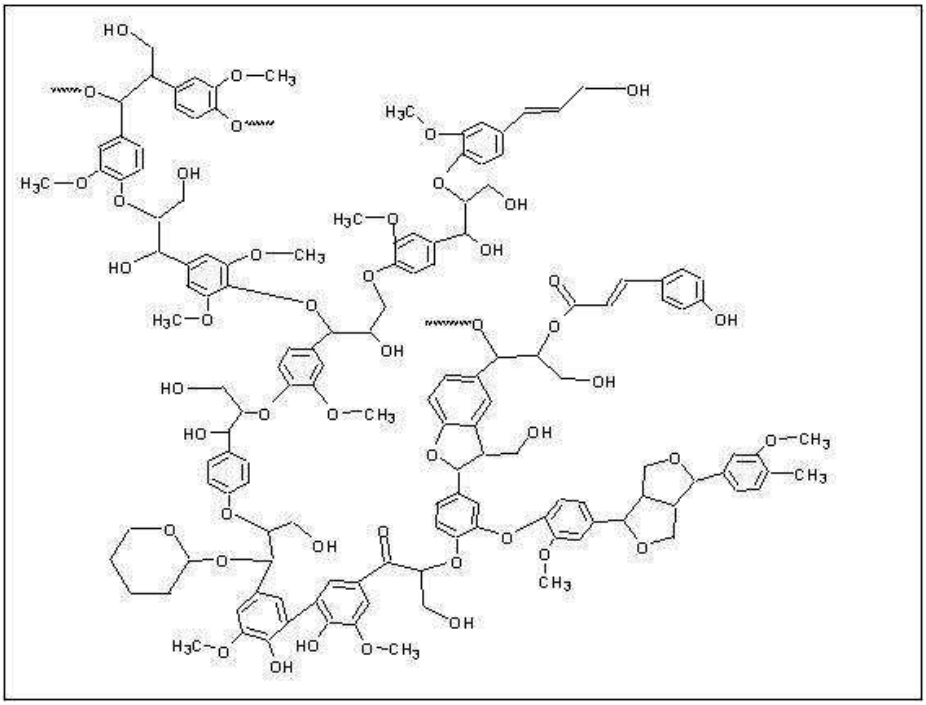

Figura 3.3. Estrutura Geral da Lignina (Marx, 2000).

3.2. Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são um dos mais importantes sistemas de expressão eucarióticas atualmente disponíveis para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. Todavia, a exploração do imenso potencial desses microrganismos como produtores de uma vasta faixa de enzimas extracelulares de aplicação industrial, somente se tornou possível após avanços nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética dos mesmos. Com o advento das técnicas de biologia molecular foram superadas muitas das limitações dos melhoramentos genéticos tradicionais, como a indução aleatória de mutações e a seleção de fenótipos desejados, o que ampliou ainda mais as possibilidades de emprego dos fungos filamentosos como doadores de genes ou hospedeiros dos mesmos (BON *et al.,* 2008).

Em suma, os fungos filamentosos se destacam pela capacidade de degradação de biopolímeros através da produção enzimática. Na literatura se destacam algumas espécies com potencial para utilização industrial: *Humicola*

insolens, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium acremonium*, *Mucor miehie*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus orizae* e *Aspergillus niger*. Com relação à produção de celulases, a espécie *Aspergillus niger* apresenta alta eficiência na produção de β-glucosidases (TAHERZADEH e KARAMI, 2007; PEREIRA Jr., 2008; BON *et al.,* 2008).

3.2.1. *Aspergillus niger*

Em geral, a espécie *Aspergillus niger* é ubíqua estando presente no ar, na água e na superfície de tecidos vegetais e animais. Tais espécies participa da decomposição da madeira, papel e derivados de fontes naturais, sendo mais abundante em regiões de clima tropical e subtropical (ROSA, CAMPOS e BARONI, 2002).

Quando cultivada em meios artificiais, apresentam crescimento acelerado, inicialmente branco ou amarela, e posteriormente marrom ou negro. A colônia é composta por micélio aéreo, com conidióforos eretos, distribuídos densamente sobre a superfície do meio, além de grande produção de conídios. As espécies pertencentes ao grupo produzem o aspergilo ou cabeça aspergilar. Tal estrutura consiste em uma haste não septada e estípede, terminando em uma vesícula, sobre a qual nascem às células conidiogênicas, denominadas por fiálides. Estas que por sua vez são responsáveis por sintetizar os conídios, bem como as métulas (SAMSON *et al.,* 1995; SANTOS, 2007).

A cabeça aspergilar simples é formada por uma vesícula, parcial ou totalmente coberta por uma série de células alongadas, fiálides, que dão origem aos conídeos. Os mesmos, estruturas resistentes ao dessecamento, podem se apresentar de diferentes formas: curtos, compactos e colunares ou radiados (SAMSON *et al.,* 1995; SANTOS, 2007).

Na figura 3.4 observa-se uma cabeça bisseriada, caracterizada por possuir uma camada de células (métulas) anteriormente à camada de fiálides. O *Aspergillus niger,* além de possuir a cabeça aspergilar e a haste, contém a célula pé conectada à estípede (SANTOS 2007). A tabela 3.2 apresenta a classificação taxonômica desta espécie.

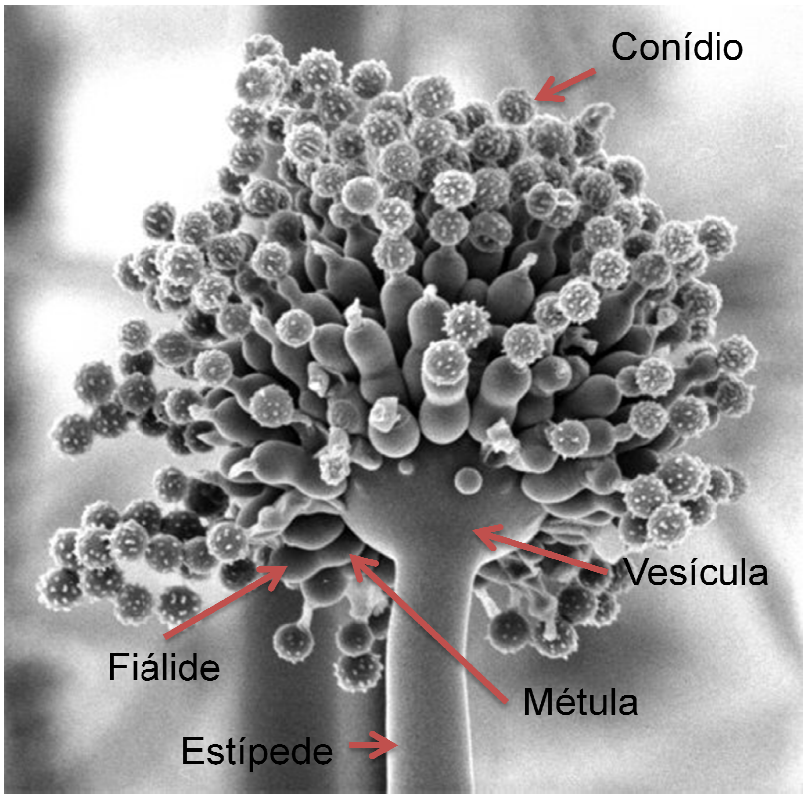

Figura 3.4. Micrografia da estrutura do órgão de frutificação de *Aspergillus niger* (Fonte: adaptado de Tortora, 2005).

Tabela 3.2. Classificação taxonômica de *Aspergillus niger*.

Classificação taxonômica	
Reino	Fungi
Subreino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Classe	Eurotiomycetes
Subclasse	Eurotiomycetidae
Ordem	Eurotiales
Família	Trichocomacea
Gênero	*Aspergillus*

Fonte: NCBI (2011)

3.3. Estratégias para a produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos

A transformação de materiais lignocelulósicos para a produção de bioetanol vem sendo estudada dentro de diversas estratégias de processos. Devido à

presença de diferentes açúcares nestes compostos faz-se necessário o uso de diferentes pré-tratamentos, assim como o uso de enzimas simultaneamente ou separadamente à ação dos microrganismos fermentativos. Neste contexto, surgem quatro estratégias, cada uma em diferentes estágios de desenvolvimento (PEREIRA Jr., 2008).

3.3.1. Hidrólise e fermentação separadas (SHF)

Após o pré-tratamento ácido do material lignocelulósico ocorre a separação entre os sólidos, chamados de celulignina, e o líquido, rico em pentoses, que podem ser diretamente fermentadas a bioetanol e posterior destilação. A celulignina em seguida sofre um pré-tratamento alcalino que gera uma parte líquida com alta concentração de lignina e outra parte sólida, rica em celulose. A parte sólida poderá ser utilizada para a produção de celulases, empregando-se microrganismos específicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Através da atuação de enzimas do complexo celulásico, os sólidos também poderão ser convertidos a hexoses e fermentados separadamente, obtendo-se o bioetanol, seguido da etapa de destilação (Figura 3.5). Contudo, esta estratégia tornou-se ultrapassada devido à baixa eficiência da hidrólise enzimática da celulose (PEREIRA Jr *et al.*,2008).

No processo de SHF, o pré-tratado lignocelulósico é hidrolisado à glicose e fermentado separadamente. No caso da atuação das celulases, a temperatura ideal geralmente ocorre entre 45℃ e 50℃, contudo, a pro dução de etanol ocorre na faixa de 30℃ a 37℃. Entretanto, a inibição da atividade celulásica pelos açúcares se torna o grande inconveniente deste processo, que promove, inicialmente, a liberação de concentrações elevadas de glicose e celobiose (OLSSON *et al.*, 2006; TAHERZADEH e KARIMI, 2007; PEREIRA Jr *et al.*, 2008).

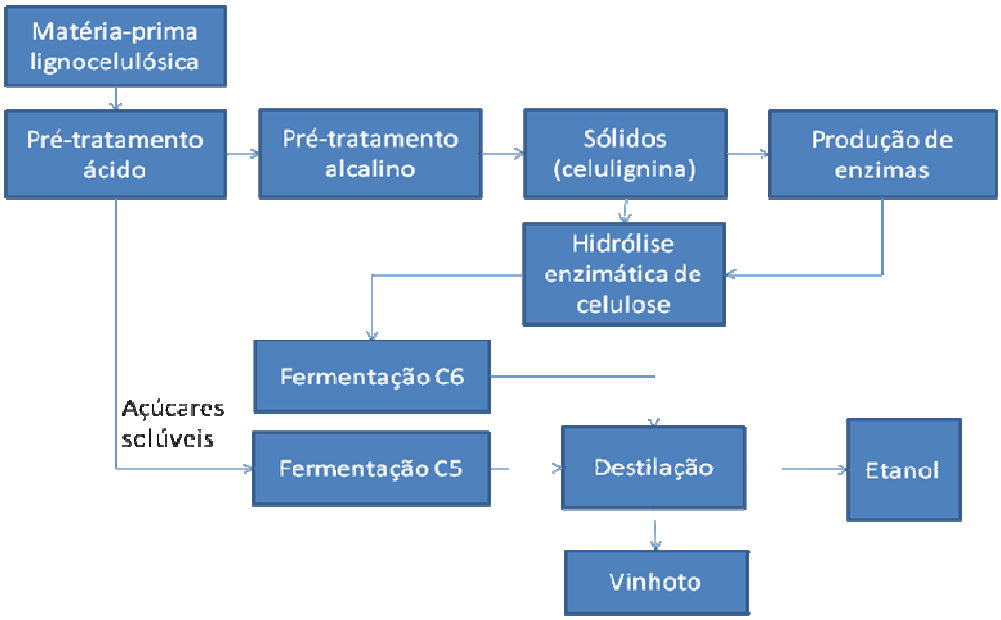

Figura 3.5. Diagrama de blocos do processo de hidrólise e fermentação separadas (SHF).

Como exemplo, em 6 g/L de celobiose ocorre redução de cerca de 60% de atividade celulásica, assim como em 3 g/L de glicose, as β-glucosidases sofrem redução de 75% em sua atividade. Adicionalmente, há riscos de contaminações, devido ao prolongamento do tempo de processo, relacionado à separação das etapas de hidrólise e fermentação, podendo ocorrer em até 4 dias (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

3.3.2. Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

A principal diferença entre os processos de SHF e SSF é a redução de uma etapa, ou seja, a hidrólise enzimática e a fermentação ocorrem simultaneamente, no mesmo biorreator, como observado na figura 3.6. Este processo é um dos mais bem sucedidos para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos pré-tratados.

A glicose produzida pela hidrólise enzimática é imediatamente consumida pelos microrganismos. Desta forma, os efeitos de inibição pela glicose e celobiose são minimizados devido às baixas concentrações destes açúcares no meio. Outras vantagens observadas são a produção de altos rendimentos de etanol durante o

processo, além da utilização de baixas concentrações de enzimas (MCMILLAN *et al.*, 1999; SUN e CHENG, 2002).

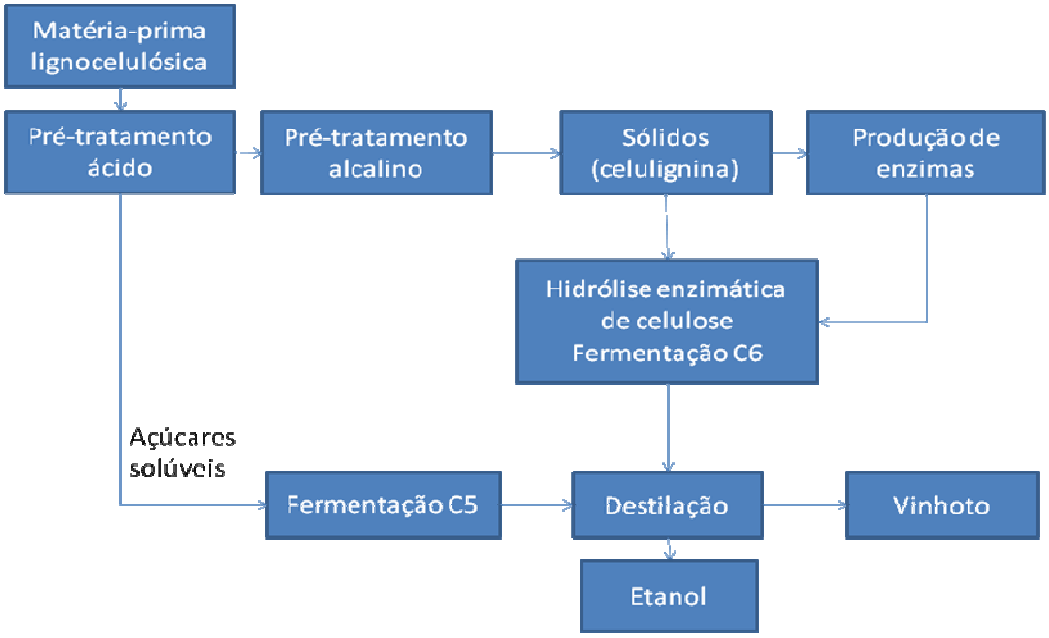

Figura 3.6. Diagrama de blocos do processo sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

Comparativamente ao processo SHF, no processo SSF o risco de contaminação é reduzido, devido à presença de etanol no meio, bem como a redução do tempo de processo e do número de reatores. Entretanto, é necessário aperfeiçoar as condições de processo, relacionando tempo, temperatura e pH empregados na pré-hidrólise enzimática e na fermentação. Desta forma, o inconveniente desta tecnologia é representado pela temperatura de atuação das celulases, variando entre 45℃ e 50℃, que é relati vamente alta em comparação à de fermentação, entre 30℃ e 35℃, o que to rna a hidrólise a etapa limitante do processo de SSF. Além disso, a inibição das celulases pode ser causada pela produção de etanol em cerca de 30 g/L, reduzindo a atividade em 25% (PHILIPPIDIS e SMITH, 1995; WYMAN, 1996; WU e LEE, 1997; TAHERZADEH e KARIMI, 2007; BALAT, 2011).

3.3.3. Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF)

No processo de SSCF, as fermentações das hexoses oriundas da fração celulósica e das pentoses, provindas da fração hemicelulósica, ocorrem simultaneamente, assim como observado na figura 3.7 (TEIXEIRA *et al*., 2000).

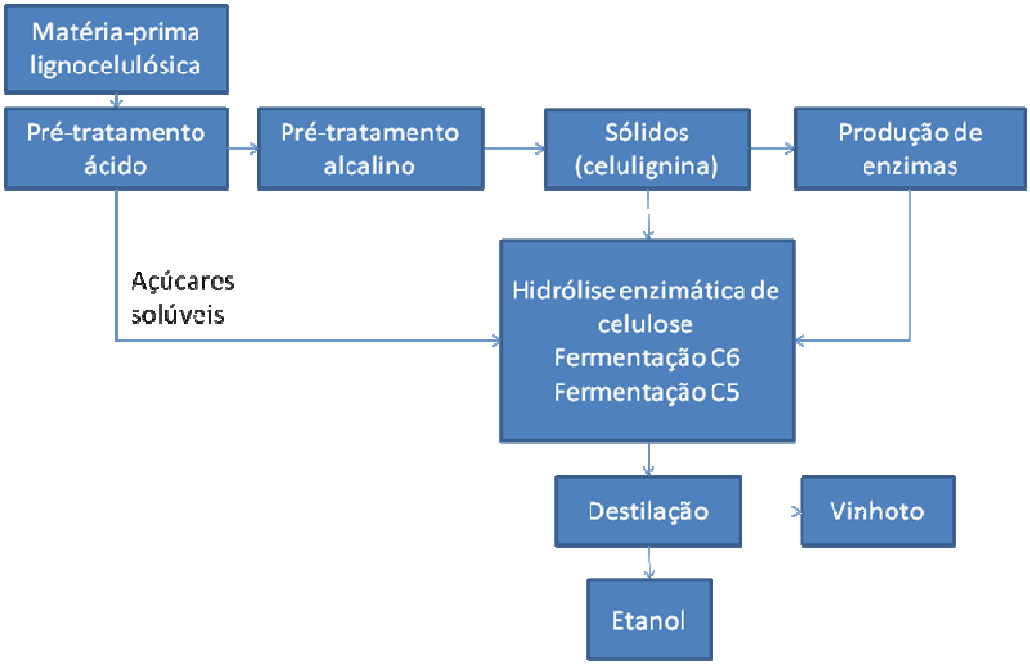

Figura 3.7. Diagrama de blocos do processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF).

O processo de SSCF tem como objetivo conseguir fermentar as hexoses e pentoses por um único microrganismo, com auxílio da biologia molecular obtendo como grande vantagem a utilização de apenas um reator (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

3.3.4. Bioprocesso consolidado (CBP)

Em todas as estratégias citadas anteriormente, a síntese de enzimas é considerada separadamente ao processo de produção de etanol. No Bioprocesso Consolidado, apresentado na figura 3.8, a produção de etanol de 2ª geração seria obtida em um único reator, através do mesmo microrganismo, incluindo a etapa de produção enzimática. Esta técnica, também conhecida como conversão direta de microrganismo (DMC), é baseada na utilização de mono ou co-culturas, na qual há fermentação de celulose e hemicelulose a etanol. Desta forma, o CBP combina a

produção de celulases, a hidrólise da celulose e a fermentação de hexoses e pentoses em um único passo. Esta tecnologia é considerada a mais eficiente, apresentando-se como a ideal na produção de álcool a partir de materiais lignocelulósicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

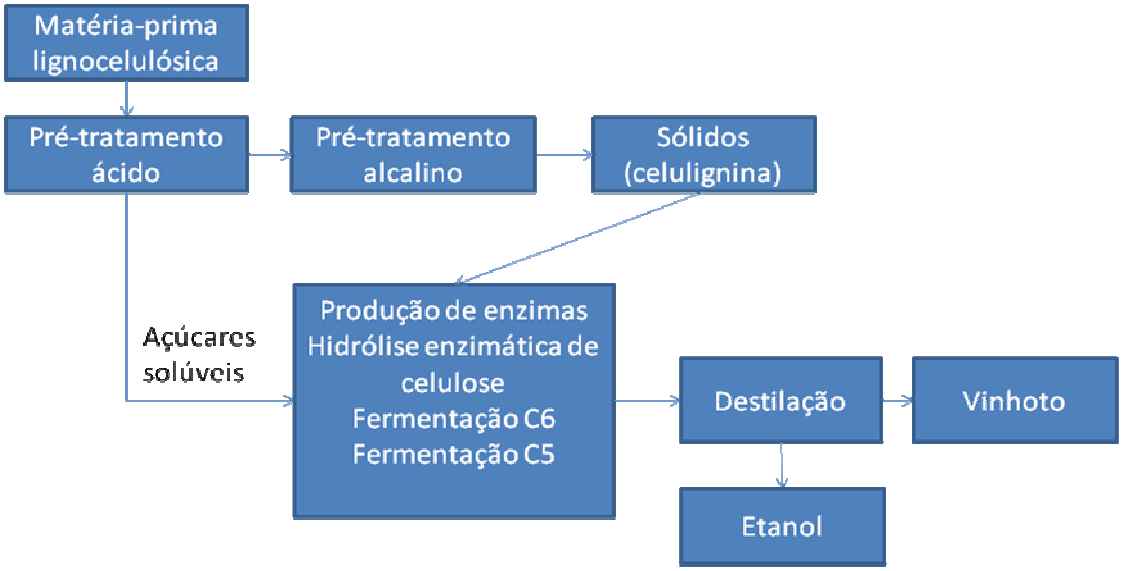

Figura 3.8. Diagrama de blocos do processo bioprocesso consolidado (CBP).

O processo é atrativo no que se diz respeito ao número de biorreatores, devido à simplificação das operações e a redução dos custos. As desvantagens são os baixos rendimentos de produção causados pela formação de co-produtos, a baixa tolerância dos microrganismos ao bioetanol e o crescimento limitado no xarope hidrolisado (BALAT, 2011).

Entretanto, através do uso de tecnologias biomoleculares, existe a possibilidade de expressar genes de produtores de celulases e xilanases, com altas atividades em apenas um microrganismo. Desta forma, o mesmo seria capaz de associar enzimas destes complexos, bem como fermentar pentoses e hexoses, produzindo etanol de maneira eficiente (PEREIRA Jr. et al., 2008).

3.4. Pré-tratamentos

A técnica consiste em superar obstáculos, ou seja, remoção da lignina, tornando a celulose mais acessível às enzimas, assim como a separação da hemicelulose, direcionando-a para a fermentação por microrganismos consumidores de pentoses (YE SUN, 2002).

Os pré-tratamentos são passos necessários para alterarem as características dos materiais lignocelulósicos, promovendo a redução do índice de cristalinidade da celulose, aumentando a porosidade do material, facilitando a acessibilidade da celulose ao ataque enzimático, bem como a relação custo/eficiência para produção de açúcares e consequentemente do bioetanol (Figura 3.9) (MCMILLAN, 1994; HAN *et al.*, 2009; BALAT, 2011).

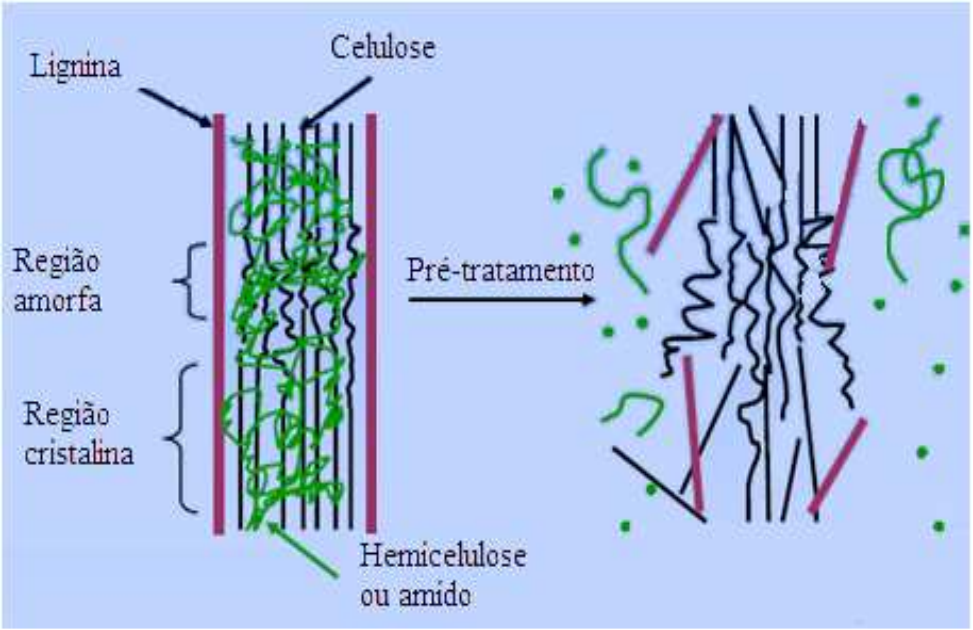

Figura 3.9. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos
(Fonte: adaptado de MOSIER *et al*., 2004)

Os principais pré-tratamentos são divididos em quatro tipos: físico, cominuição do material através de fragmentação ou moagem; físico-químico, explosão a vapor, com catalisador ou não; químico, hidrólise ácida em condições brandas; e biológico, microrganismos ou enzimáticos, de acordo com os agentes que atuam na alteração estrutural (PEREIRA JR. et al., 2008).

Segundo Yang e Wyman (2008), no pré-tratamento físico, o material pode ser cominuído, permitindo altos rendimentos na digestibilidade do pré-tratado sólido, tais como 90% da celulose e hemicelulose em menos de 3 dias, através da participação das enzimas conduzidas no processo contendo 10 FPU/g de celulases. Os rendimentos devem ser altos, próximos de 100%, de celulose e hemicelulose, sem degradação dos açúcares (KLINKE *et al*., 2002; OLIVA *et al*., 2003; ALVIRA *et al.*, 2010).

Baudel *et al.* (2006) enfatizam que o pré-tratamento deve ser muito eficiente em termos de rendimento e funcionalidade, com redução de insumos químicos e de energia, para que possa ocorrer uma menor geração de compostos inibidores às enzimas no processo de sacarificação, e aos microrganismos no processo de fermentação.

Uma alternativa para extração e hidrólise parcial da hemicelulose é a tecnologia de compressão e rápida descompressão chamada de explosão a vapor. Essa operação trabalha através da impregnação do material lignocelulósico em água, em sistemas com alta pressão e elevada temperatura. Essas mudanças provocam explosão violenta e o resultado é a ruptura das cadeias estruturais dos materiais lignocelulósicos, a parte sólida é composta da celulignina e a parte líquida rica em pentoses (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

O pré-tratamento ácido promove a hidrólise da fração de hemicelulose, o pré-tratamento alcalino promove a remoção de parte da fração de lignina, para a posterior ação das enzimas, expondo as fibras de celulose e tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático. Atualmente, o material lignocelulósico é cominuído e tratado inicialmente com ácido sulfúrico diluído, visando à separação da fração hemicelulósica; posteriormente pré-tratado com hidróxido de sódio diluído, para a remoção da lignina; e em seguida, a celulose é convertida à glicose através do pré-tratamento enzimático (HAHN-HAGERDAL *et al*., 2006).

No pré-tratamento com ácido diluído permite-se uma elevada reatividade da fibra apresentando cerca de 90% de digestibilidade da celulose ao ataque enzimático; porém, além deste processo demandar configurações de equipamentos complexas, requer elevado consumo de água e energia. Combinações como concentração de ácido, temperatura e tempo de reação podem gerar altas concentrações de açúcares, principalmente a xilose (BAUDEL, 2006).

A literatura relata a formação de alguns subprodutos que podem interferir posteriormente, no processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico, oriundo do pré-tratamento ácido. Martin *et al. (*2007) relatam a produção dos seguintes inibidores da fermentação: ácido acético, formado pela hidrólise do grupo acetil presente na fração hemicelulósica; ácidos fórmico e levulínico; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da lignina; e furaldeídos como

furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente. Após esta etapa é necessária a neutralização do pH.

Os pré-tratamentos alcalinos apresentam-se menos vantajosos economicamente, utilizando-se principalmente o hidróxido de sódio. A atuação nos materiais lignocelulósicos causa inchaço, pelo aumento da área de superfície interna, a diminuição na cristalinidade, separação da ligação entre carboidratos e a estrutura da lignina (SUN e CHENG, 2002; HAN *et al.,* 2009; BALAT, 2011).

O pré-tratamento biológico consiste no uso do "*pool*" enzimático, principalmente na hidrólise da hemicelulose e na deslignificação. Neste caso a hidrólise enzimática da hemicelulose, sendo específica para xilanases, onde a ação é conduzida através do sinergismo de β-xilosidase, endo 1,4-β-xilanase, acetil-xilanaesterase, α-glucoronidase e L-arabinofurosidase, ainda há problemas relatados aos custos destas enzimas, no qual existe o impedimento para a implementação em escala industrial (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Neste contexto, Taherzadeh e Karimi (2007) afirmaram que os pré-requisitos para as etapas de pré-tratamento são baseadas na produção de fibras de celulose reativas para o ataque enzimático, evitando-se o desperdício/destruição das hemiceluloses e celuloses; redução da formação de inibidores para a hidrólise enzimática e fermentação; minimizando a demanda de energia, além da redução do uso de reagentes químicos.

3.5. Hidrólise enzimática de celulose

O complexo celulolítico apresenta um papel fundamental na natureza, devido à degradação da celulose presente nos vegetais, estabilizando a ligação básica do ciclo do carbono. Para enfrentar o desafio de utilizar a celulose para a conversão à glicose, os microrganismos celulolíticos produzem uma mistura complexa de enzimas, as quais coletivamente podem apresentar especificidade para o glicosídeo de ligações β-1,4, e, consequentemente promovem a completa solubilização e hidrólise da mesma.

As celulases estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas industriais, atuando em conjunto na hidrólise das fibras vegetais, gerando celo-

oligossacarídeos, celobiose e glicose. Os pré-tratamentos enzimáticos apresentam grandes vantagens, principalmente por não degradarem o produto, atingindo 100% de conversão. Adicionalmente, a hidrólise enzimática é conduzida em condições brandas de pH e temperatura, não apresentam problemas de corrosão, possuindo rendimentos em torno de 75% a 85%, e, sobretudo, tem-se projetado melhoras do mesmo para 95% (ZHANG e LYND, 2004).

A utilização de enzimas para conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis é considerada uma alternativa ambientalmente correta. No entanto, este processo é bastante lento, pois a hidrólise da celulose é dificultada pelas altas concentrações de lignina e de hemicelulose; fazendo-se necessário o uso de pré-tratamentos ácidos e alcalinos (TAHERZADEH e KARIMI, 2007; BALAT, 2011).

3.5.1. Mecanismo de hidrólise das celulases

Para que a hidrólise enzimática da celulose seja realizada faz-se necessária a adsorção da enzima à superfície do substrato, através da formação do complexo enzima-celulose. Em seguida, há a conversão da celulose a açúcares fermentáveis e a posterior liberação das celulases ao meio reacional. No caso de substratos insolúveis, a difusão deve acontecer envolvendo o substrato sólido e a adsorção nos sítios disponíveis do substrato, seguida da formação do complexo celulase-substrato e da hidrólise das ligações dos glicosídeos da celulose. Por fim, ocorre a difusão dos produtos de hidrólise para o meio reacional, bem como a dessorção do complexo celulásico do substrato hidrolisado (HELLE, 1993; AWAFO, 1997; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Portanto, sugere-se que as celulases necessitam ser adsorvidas sobre a superfície da celulose (insolúvel), anteriormente à ocorrência da hidrólise, bem como o substrato antes inacessível, torne-se estruturalmente acessível às celulases. Desta forma, ocorre a desordenação molecular das regiões embaladas e ordenadas, localizadas nas redes de fibras celulósicas, e em seguida, à exposição das cadeias celulósicas, presas entre as microfibras (ARANTES E SADDLER, 2010).

Neste contexto, a amorfogênese, estado inicial da hidrólise enzimática da celulose, ou o possível mecanismo pelo qual a dispersão, inchaço ou delaminação

do substrato celulósico, resulta na redução do grau de agregação da fibra e/ ou cristalinidade, assim como a criação da acessibilidade à superfície, pelo aumento da superfície interna. Consequentemente, se nota o aumento da reatividade das fibras do substrato celulósico pelo aumento direto da quantidade de celulose acessível para as enzimas (Figura 3.10-A). Uma vez que a rede celulósica está acessível para as enzimas, a ação de sinergética das endo e exoglucanases que promovem a fragmentação das moléculas acessíveis a oligossacarídeos solúveis, moléculas de celuloses com grau de polimerização menor que seis unidades (Figura 3.10-B), que são hidrolisadas para celobiose (Figura 3.10-C), e a seguir hidrolisadas à glicose (Figura 3.10-D) (ARANTES e SADDLER, 2010).

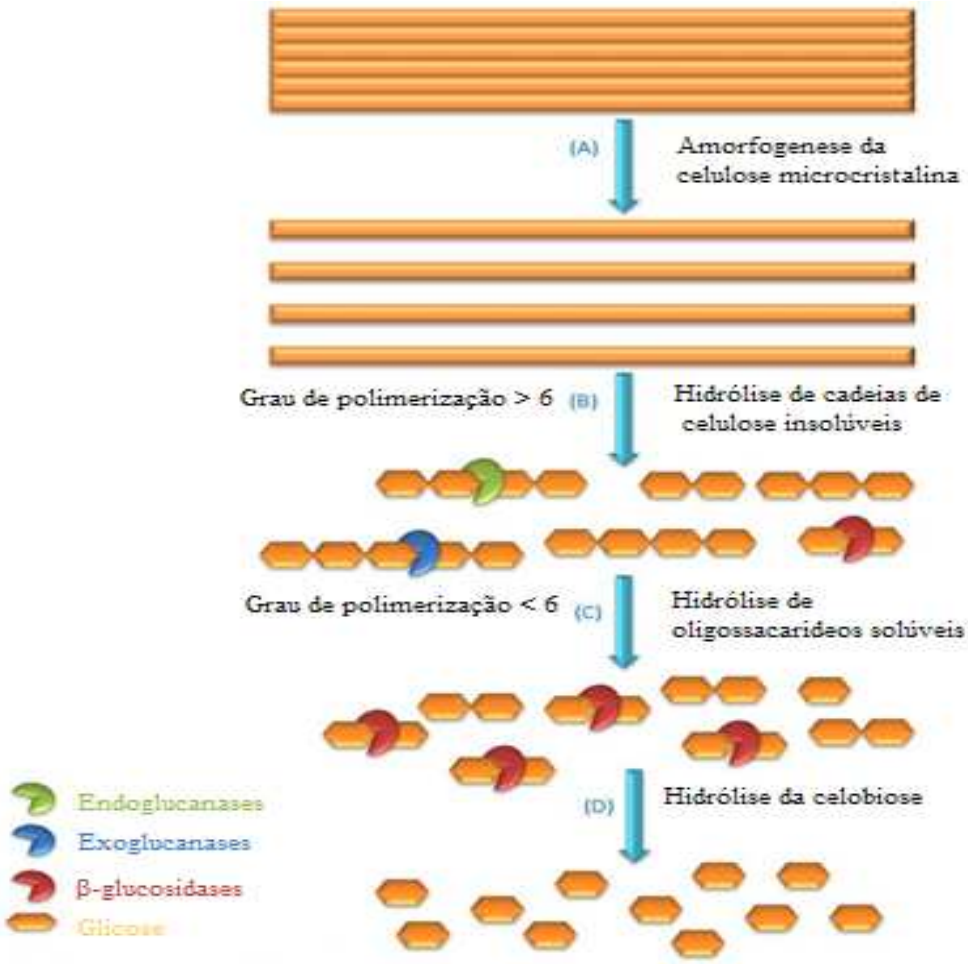

Figura 3.10. Amorfogênese da celulose microcristalina e ação das enzimas que fazem parte do complexo celulásico (ARANTES e SADDLER, 2010).

As características do substrato sólido durante a hidrólise da celulose variam, principalmente, de acordo com as mudanças nos números finais de carbonos na cadeia de celulose, resultado da atuação das endoglucanases, da utilização pelas exoglucanases, bem como das mudanças na acessibilidade da celulose; fato este que ocorre devido ao consumo do substrato e da fragmentação da celulose (LYND *et al*., 2002; ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006).

As celulases apresentam um melhor rendimento quando atuam simultaneamente. A conversão microbiológica das biomassas celulósicas em produtos úteis é um processo complexo envolvendo combinadas ações das três enzimas nomeadas endoglucanases (1,4-D glucanoidrolases ou EG, ou EC 3.2.14), exoglucanases (celobioidrolases, CBH, 1,4-β-D-glucanacelobioidrolase, ou EC 3.2.1.91.) e β-glucosidases (celobiases ou EC 3.2.1.21) (PEREIRA Jr., 2008).

Adicionalmente as β-glucosidases podem ser divididas em três subgrupos baseados na especificidade pelo substrato: (i) celobiases, que hidrolisam apenas oligossacarídeos, (ii) *broad-especificity-β*-glucosidases que apresentam atividade tanto em dissacarídeos quanto em oligossacarídeos; e aril-β-glucosidases, caracterizadas pela afinidade exclusivamente aos aril-β-glucosídeos. Assim como as celobioidrolases, as β-glucosidases também sofrem inibição pelo produto (AWAFO, 1997; RIOU *et al.*, 1998).

O sinergismo pode-se configurar de cinco formas: Exo-BG, Endo-Endo, Endo-BG Endo-Exo e Exo-Exo. No caso do sinergismo Exo-BG, a celobiose liberada pela ação da exoglucanase consiste como substrato para as β-glucosidases. Já na Endo-Endo, existem enzimas que são adsorvidas fortemente pelo substrato e outras fracamente; quando há mistura destas enzimas a conversão da celulose em açúcares redutores melhora. No entanto, as endoglucanases que se ligam fracamente ao substrato têm sua atividade reduzida quando atingem o nível de conversão de 30 a 40%. No terceiro tipo de sinergismo, Endo-BG, dois importantes mecanismos podem estar envolvidos: O primeiro diz respeito à ocorrência de hidrólise das celodextrinas de cadeias longas liberadas pelas endoglucanases sob ação de algumas β-glucosidases; o segundo mecanismo está relacionado à produção de celobiose, que mais tarde é clivada pelas β-glucosidases. No quarto caso, as endoglucanases atuam na região amorfa da fibra e fornecem terminais

redutores e não redutores para atuação das CBHI e CBHII, respectivamente. Já no sinergismo Exo-Exo, as CBHI e CBHII atuam de forma simultânea na hidrólise dos terminais redutores e não redutores, liberados pela ação das endoglucanases. Somado aos principais grupos de celulases, há também enzimas auxiliares que atuam na hemicelulose, tais como as glucoronidase, acetillesterase, xilanase, β-xilosidase, galactomanase e glucomanase (RABINOVICH *et al*., 1986; SUN e CHENG, 2002; ZHANG e LYND, 2004; PEREIRA Jr., 2008; KLYOSOV 2010).

As CBHI também podem ser adsorvidas através de defeitos nas fibras de celuloses, distúrbios na estrutura cristalina conhecida como microfissuras, seguido por sua penetração nos espaços interfibrilares. Consequentemente, a entrada da CBHI induzirá a ação do mecanismo de dispersão da celulose cristalina. Portanto, sugere-se que a presença desta enzima dentro de tal espaço aumenta a pressão mecânica nas cavidades da parede inchando a estrutura de celulose, acomodando mais moléculas de água entre as microfibras. A água se coloca entre as microfissuras e segue penetrando os espaços capilares, rompendo as ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose e as dissociando. As enzimas ainda impedem que cadeias solvatadas e livres se realinhem (Figura 3.11). (ARANTES e SADDLER, 2010).

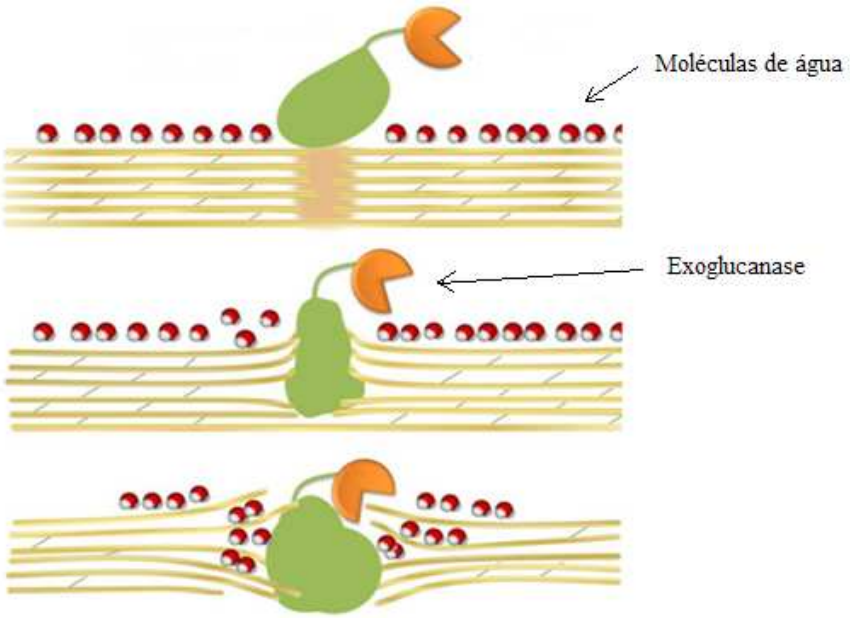

Figura 3.11. Mecanismo de ação das exoglucanases em água (Fonte: adaptado de ARANTES e SADDLER, 2010).

3.5.2. Fatores limitantes da hidrólise enzimática

Um dos principais objetivos do pré-tratamento é aumentar a área de superfície, tornando o substrato mais acessível ao complexo enzimático. Esse fato ocorre devido à presença da lignina e das hemiceluloses, que dificultam o acesso do complexo celulásico e, consequentemente, diminuem a eficiência de hidrólise (ALVIRA *et al*., 2010).

Adicionalmente, a redução do tamanho de partícula aumenta a área específica da superfície no que tange à acessibilidade das enzimas. As alterações nos materiais lignocelulósicos para aumentar a acessibilidade à celulose são altamente dependentes dos pré-tratamentos escolhidos e influenciam a hidrólise enzimática assim como posteriores etapas. Concomitantemente, destacam-se a combinação do substrato, a dosagem e a eficiência das enzimas utilizadas na hidrólise, a fração líquido/sólido, dentre outros. Em geral, a limitação da hidrólise enzimática está diretamente ligada ao melhoramento dos pré-tratamentos (KUMAR *et al*., 2009; ALVIRA *et al*., 2010).

As enzimas do complexo celulásico são capazes de digerir a celulose cristalina, porém na literatura demonstra-se que nos materiais pré-tratados mecanicamente a cristalinidade foi reduzida, associadamente a redução do tamanho de partícula e aumento da área de superfície. Isto colabora com o fato dos pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos aumentarem a eficiência de hidrólise, porém em alguns casos, podem aumentar a cristalinidade das celuloses em razão da redução das áreas amorfas (ALVIRA *et al.*, 2010).

A cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização são considerados como fatores importantes na determinação da taxa de hidrólise de alguns substratos celulósicos. Entretanto, dados de diversos estudos mostraram que estes parâmetros não podem ser abordados separadamente, no que se refere a materiais recalcitrantes, derivados dos substratos lignocelulósicos. O grau de polimerização depende da natureza lignocelulósica do substrato. Na hidrólise enzimática, as endoglucanases clivam os sítios internos da cadeia celulósica e são responsáveis pela diminuição do grau de polimerização (MANSFIELD *et al*., 1999; CARDONA *et al.,* 2010).

O tamanho do poro do substrato em relação ao tamanho das enzimas pode ser o principal fator limitante da hidrólise de materiais lignocelulósicos, pois as celulases podem ficar retidas nos poros se a área interna for mais larga que a área externa, como ocorre em diversos materiais lignocelulósicos. Portanto, o aumento dos poros pode incrementar significativamente a hidrólise (ZHANG e LYND, 2004; CHANDRA *et al*., 2007).

Avaliando simultaneamente a temperatura e o tempo, inicialmente é possível verificar que as melhores eficiências de hidrólises são obtidas em altas temperaturas. Entretanto, as mesmas podem permitir a degradação de certos açúcares a compostos como furfurais de pentoses e hidroximetil furfurais de hexoses. Neste contexto, podem reduzir a eficiência do pré-tratamento, aumentando a toxicidade do hidrolisado. Por outro lado, sob menores temperaturas, a exposição da celulose para a enzima pode ser muito longa. Desta forma longos tempos implicam em altos custos, tornando o processo muito oneroso e por conseqüência, inviável (PEREIRA Jr., 2008).

3.6. Considerações sobre o aproveitamento de materiais lignocelulósicos

A população mundial cresce aceleradamente, e com isso, necessita-se de um fornecimento eficaz de energia. Atualmente, grande parte da energia é obtida a partir de combustíveis fósseis, seguida da produção de etanol de 1ª geração. Entretanto, o petróleo polui em larga escala, implicando em uma série de complicações ao meio ambiente, e se o etanol acompanhar o crescimento populacional apenas na dependência da produção de 1ª geração, surgiria uma competição entre os alimentos e a produção de energia.

Desta forma, Sun e Cheng (2002) constataram ser necessário o aumento da produção de etanol, embora este fato possa ocasionar em maiores buscas por terras, bem como a valorização do produto, ocasionando uma disputa entre alimentos e energia. Em contrapartida era observado um extenso desperdício dos materiais lignocelulósicos, resíduos agrícolas e florestais, dentre outras biomassas. Consequentemente, os países vêm desenvolvendo tecnologias visando à produção de bioetanol a partir destes materiais, o que promoveria a redução dos custos, além

da aquisição de processos mais eficientes na produção de enzimas celulolíticas (KAMM *et al*., 2006).

Mabee e Saddler (2010) destacaram a viabilidade da produção de bioetanol a partir de resíduos agro-industriais e florestais. Neste caso, a escolha da plataforma de conversão deve ser baseada na facilidade técnica, nos processos econômicos, nas taxas de incentivos e na demanda do mercado. A bioconversão de matérias-primas celulósicas permitiria o incremento na produção de bioetanol, contribuindo ao suprimento da demanda de biocombustíveis, e, diminuindo assim, a dependência do petróleo.

Alvira *et al*. (2010) constataram que para diminuir os custos desta conversão é necessário reduzir as perdas de açúcares, aumentar a concentração dos sólidos e diminuir os custos de equipamentos. Somado a isto, desenvolvimentos estão sendo mais relatados quanto a eficiência *in situ* da produção de celulases em bagaço de cana. Neste contexto, microrganismos recombinantes têm sido empregados, assim como enzimas específicas. Além disso, a biologia molecular pode ser usada como ferramenta para esclarecer as diversas reações catalíticas sobre a atuação dos pré-tratamentos químicos e térmicos na parede celular dos vegetais (CARDONA *et al*.; ALVIRA *et. al*, 2010).

Fang *et al.* (2010) afirmaram que as tecnologias da produção de bioetanol de 2ª geração têm promovido progresso significante nas últimas décadas. No entanto, alguns problemas relacionados ao desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamentos das biomassas, seleção de linhagens com hiperprodução de celulases, emprego de leveduras industriais engenheiradas, cofermentação efetiva de xilose e glicose e construção de sistemas de produção integrados, precisam ser solucionados.

Em geral, os países que têm a produção baseada na cana-de-açúcar apresentam uma oferta menor que a necessidade. Assim, os materiais lignocelulósicos consistem em recursos que podem ser utilizados para esta produção. Apesar da tecnologia de primeira geração ser madura e eficiente, a obtenção de bioetanol de segunda geração é complexa e desafiadora, além de não se apresentar devidamente estabelecida. Apesar destas biomassas residuais serem

subprodutos de processos agro-industriais, possuírem alta disponibilidade e baixo custo, o seu processamento eleva o custo total da produção devido ao alto custo das enzimas e dos pré-tratamentos (SUKUMARAM *et al.*, 2010).

O Brasil tem utilizado 44% de recursos renováveis em sua matriz energética, apesar da área ocupada para a produção de cana-de-açúcar ser próxima a 0,9% da área cultivável. Além disso, o governo brasileiro tem projetos de atingir 50% de área cultivável, e juntamente à utilização dos materiais lignocelulósicos, o país poderá triplicar a sua produção de biocombustíveis. O governo encontra o apoio de institutos de pesquisas e universidades, os quais focam suas pesquisas na seleção e identificação de microrganismos celulolíticos e xilanolíticos para otimização de linhagens através do emprego de técnicas biomoleculares. Outros estudos nas áreas de desenvolvimento de celulases com alta especificidade também estão sendo realizados, bem como estudos teóricos sobre os mecanismos de ação e produção dos complexos enzimáticos; caracterização química, bioquímica e proteômicas de enzimas extracelular de fungos; avaliação da eficiência da mesma em diferentes pré-tratados da biomassa derivada da cana-de-açúcar; cargas enzimáticas/biomassas; dentre outros (SOCCOL *et al*., 2010).

Estudos preliminares têm indicado que o uso de biocombústíveis oriundos de materiais lignocelulósicos pode reduzir cerca de 60% das emissões dos gases de efeito estufa, comparados com os combustíveis de origem fóssil (SINGH *et al.,* 2010). Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas energéticas, substituindo-se a dependência do petróleo. A tecnologia do uso de destes materiais é cada vez mais recorrente e desenvolvida. O Brasil aponta como um dos pioneiros, não somente em função da grande área territorial destinada ao cultivo, mas também pelo domínio na produção de bioetanol de 1ª geração, podendo tornar-se líder mundial na implementação desta tecnologia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de Deuteromicetos: *Aspergillus niger* ATCC 1004 e *Aspergillus niger* ATCC 16404. Macroscopicamente, as colônias desenvolvidas em meio Batata dextrose Agar (Criterion, Houston, USA) (BDA), apresentavam-se densas e com coloração típica, preta, como apresentado na figura 4.1.

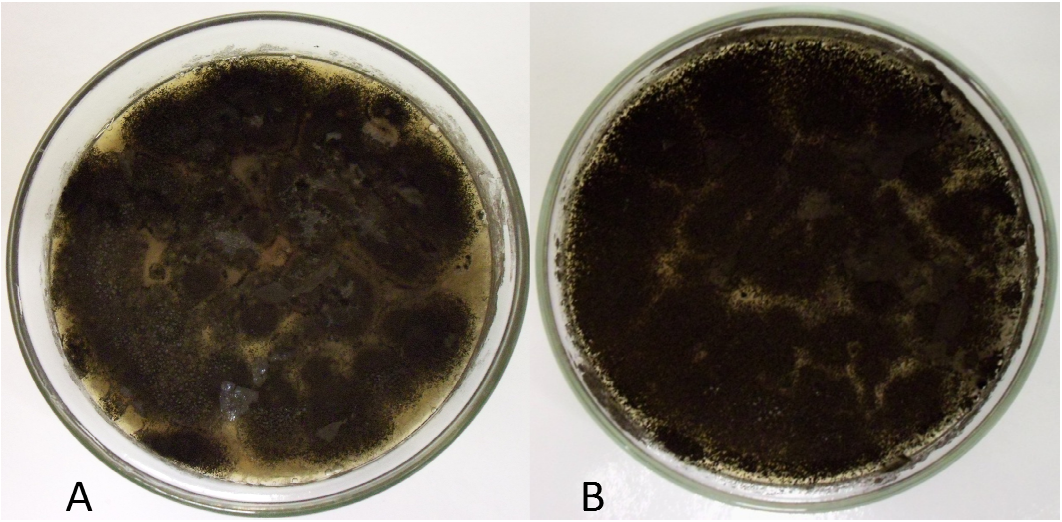

Figura 4.1. Aspecto macroscópico das linhagens: (A) *Aspergillus niger* ATCC 1004 e (B) *Aspergillus niger* ATCC 16404 cultivadas em meio Batata Dextrose Agar.

4.1.1. Ativação e manutenção dos esporos

As linhagens fúngicas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BDA, incubadas por um período de 7 a 12 dias em estufa (Quimis, Q317B) à 30℃. Após a incubação, os esporos foram retirados de forma asséptica e transferidos para microtubos Eppendorf contendo solução 20% de glicerol em água destilada. Os esporos foram mantidos nesta solução, sob refrigeração à 4℃.

4.1.2. Obtenção da suspensão de esporos

A preparação dos esporos foi realizada inoculando uma alçada do conteúdo armazenado nos microtubos Eppendorf em tubos de ensaio contendo meio BDA

inclinado, com posterior incubação à 30℃ por 7 a 1 2 dias. Após esse período foram adicionados 10 mL de água destilada estéril ao tubo de ensaio, seguido de tratamento no sonicador por 1 minuto (Thornton, T50) e agitação em vortex (Genie, K550 G) por mais 1 minuto. Da suspensão final, uma alíquota foi transferida para a câmara de Neubauer (Loptiklabor) para quantificação de esporos em microscópio óptico (Nikon Alphaphot, Eclipse).

4.2. Pré-tratamento do bagaço

Os principais processos de deslignificação são avaliados para melhorar ou facilitar a acessibilidade das enzimas à matriz celulósica. Os pré-tratamentos favorecem significativamente a acessibilidade dos microrganismos ao substrato, assim como a hidrólise enzimática. Com o intuito de facilitar a atuação das enzimas, o bagaço foi pré-tratado utilizando-se tratamentos ácido e alcalino. Tais tratamentos, combinados à termopressurização, desorganizam a estrutura da parede celular, promovendo um incremento da adsorção das enzimas no substrato, em função do aumento da área superficial e remoção parcial de barreiras físicas (VÁSQUEZ *et al.*,2007).

4.2.1. Pré-tratamento ácido

A metodologia empregada nesta etapa do pré-tratamento foi conduzida segundo Fogel (2004) e Betancur (2005), objetivando a remoção da fração hemicelulósica e com isto, aumentar a acessibilidade à celulose pelos fungos. O bagaço de cana-de-açúcar foi previamente lavado e seco. Nesta forma cominuídos em moinho, em seguida 250 g do material foi levado a bandeja e borrifado um volume total de 750 mL de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 1% (v/v). O material acidificado foi autoclavado por 40 minutos, a 121℃ (Fabbe-Primar). Após esta etapa o material foi submetido à prensagem hidráulica, em seguida passou por sucessivas lavagens com água destilada e, posteriormente, secado a 65℃ (Nova Ética) com circulação forçada de ar, por 24 horas. Neste estágio o material foi denominado de celulignina ácida de bagaço de cana.

4.2.2. Pré-tratamento alcalino

A celulignina ácida de bagaço de cana foi submetida ao tratamento alcalino na proporção de 200 g para cada 4 L de solução de NaOH 0,5 M. O material foi transferido para frascos Erlenmeyer de capacidade de 6 L, sendo submetido ao tratamento térmico por 30 minutos, à 121℃. Após es te período, a fração sólida foi separada da fração líquida, rica em lignina. O material foi deixado em repouso em água destilada e o pH foi ajustado de acordo com cada experimento (3,00; 3,32; 3,66; 4,00; 5,00; 5,50; 6,00; 6,68 e 7,00). Ressalta-se que o material foi conduzido a estufa em seguida ao moinho para desfazer os grânulos, ao final sua composição foi de: Celulose (68%), hemicelulose (12%), lignina (9%), cinzas (5%) e umidade (4%) (MAEDA, 2010). O material foi denominado de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada. A Figura 4.2 apresenta o aspecto do bagaço ao longo do pré-tratamento.

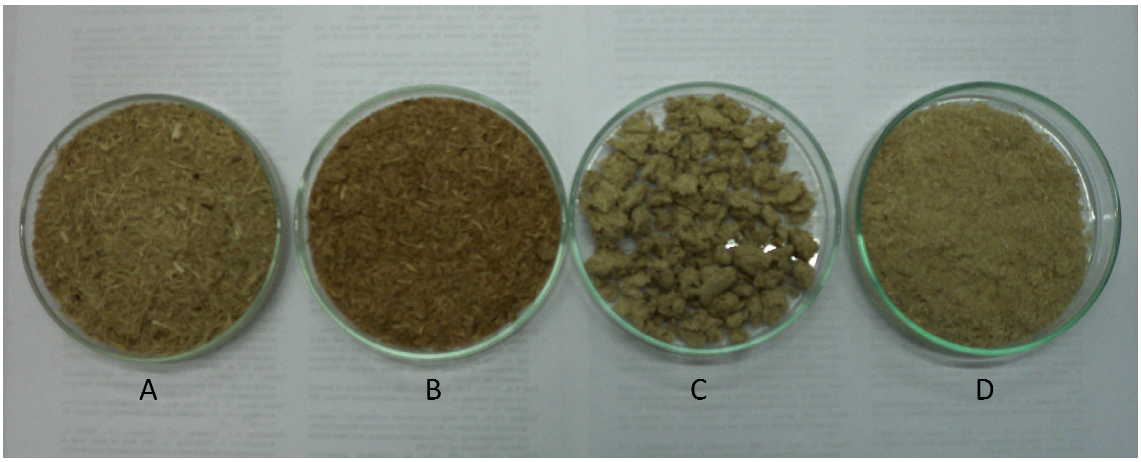

Figura 4.2. Aspectos do bagaço de cana-de-açúcar após diferentes pré-tratamentos: (A) bagaço de cana-de-açúcar cominuído, (B) Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento ácido (celulignina ácida de bagaço de cana), (C) celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada, obtida após tratamento alcalino seguido de ajuste de pH e (D) celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada cominuída.

4.3. Ensaios prévios para a produção de β-glucosidases em fermentação submersa.

4.3.1. Avaliação do potencial das linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de β-glucosidases.

Os ensaios para a obtenção da cinética de produção de β-glucosidases de *A. niger* ATCC 1004 e ATCC 16404 foram conduzidos utilizando o meio descrito por Castro (2006), com modificações (Tabela 4.1). As alterações foram a retirada de peptona, a adição de Tween-80 e aumento da concentração de extrato de levedura.

Tabela 4.1. Composição do meio para produção de β-glucosidases de *A. niger*.

Componentes	Concentração
CPD	7,5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	5,6 g/L
KH_2PO_4	4,0 g/L
$CaCl_2.2H_2O$	0,8 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,6 g/L
Extrato de Levedura	2,3 g/L
$FeSO_4.7H_2O$	0,01 g/L
$MnSO_4.4H_2O$	0,0032 g/L
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0028 g/L
$CoCl_2.6H_2O$	0,04 g/L
Tween-80	2 mL/L

CPD - Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada

Aos frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 mL contendo 100 mL em meio foram adicionados aproximadamente 10^7 esporos, e incubados à 28℃, sob agitação de 200 rpm (New Brunswick Scientific, Shaker), por 196 h. Durante o período de incubação, alíquotas de 2 mL eram coletadas em intervalos de 24 h e posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm, durante 15 minutos (Sorvall® Fresco), para obtenção do extrato enzimático e posterior quantificação da atividade β-glucosidásica.

4.3.2. Avaliação do potencial da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e da celulose microcristalina como indutor na produção de β-glucosidases

Para o estudo de indução de produção de β-glucosidases pela fonte carbono, conduziram-se ensaios conforme o descrito na tabela 4.1., com exceção da fonte de

carbono a qual avaliou a celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina, no tempo de 168 horas.

4.4. Planejamentos experimentais para a maximização da produção de β-glucosidases de *A. niger* 1004

A busca pela otimização de produção de β-glucosidases foi realizada em frascos agitados utilizando ferramentas de planejamentos experimentais sequenciais, utilizando como variável de resposta a atividade β-glucosidásica, ao final de 168 horas, os resultados foram analisados pelo *software Statistica 7,0*®. Primeiramente, foi realizado um planejamento *Plackett & Burman* 16 (PB16), aplicando-se as condições apresentadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Condições do planejamento *Plackett* & *Burman* 16 para a produção de β-glucosidases.

Variáveis	**Mínimo (-1)**	**Pontos centrais (0)**	**Máximo (+1)**
$pH_{inicial}$	4,0	5,5	7,0
CPD (g/L)	7,5	8,5	9,5
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	4,0	5,6	7,2
KH_2PO_4 (g/L)	3,0	4,0	5,0
$CaCl_2.2H_2O$ (g/L)	0	0,8	1,6
$MgSO_4.7H_2O$ (g/L)	0	0,6	1,2
Extrato de Levedura (g/L)	1,0	2,3	3,6
$FeSO_4.7H_2O$ (g/L)	0	0,01	0,02
$MnSO_4.4H_2O$ (g/L)	0	0,0032	0,0064
$ZnSO_4.7H_2O$ (g/L)	0	0,0028	0,0056
$CoCl_2.6H_2O$ (g/L)	0	0,04	0,08
Tween-80 (mL/L)	1	2	3

CPD- Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada

A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foi conduzido um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), cujas condições estão apresentadas na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Condições do planejamento DCCR para a produção de β-glucosidases.

Variáveis	Axial mínimo (-1,68)	Mínimo (-1)	Pontos centrais (0)	Máximo (+1)	Axial máximo (+1,68)
$pH_{inicial}$	3,32	4,00	5,00	6,00	6,68
Extrato de Levedura (g/L)	0,98	2,00	3,50	5,00	6,02
Tween-80 (mL/L)	4,32	5,00	6,00	7,00	7,68

Ressalta-se que além das variáveis apresentadas na Tabela 4.3, o meio continha em sua composição, celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada (7,5 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (4 g/L) e KH_2PO_4 (3 g/L). A terceira e última etapa do planejamento experimental, utilizou planejamento fatorial 2^3, cujas condições estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Condições do planejamento fatorial 2^3 para a produção de β-glucosidases.

Variáveis	Mínimo (-1)	Pontos centrais (0)	Máximo (+1)
$pH_{inicial}$	3,32	3,66	4,00
Extrato de Levedura (g/L)	5,00	7,50	10,0
Tween-80 (mL/L)	5,00	6,00	7,00

Cabe ressaltar que o meio empregado também continha celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada, $(NH_4)_2SO_4$ e KH_2PO_4 nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente.

4.5. Produção de β-glucosidases em biorreator instrumentado

A partir do melhor resultado do planejamento experimental, isto é, com o estabelecimento das condições de meio, ensaios de produção de β-glucosidases. foram conduzidos em biorreator instrumentado. Foi utilizado um biorreator New BioFlo® 310 (New Brunswick Scientific, benchtop fermentor) com capacidade de 5 L, contendo 3 L meio reacional (Figura 4.3). Todo o sistema, compreendendo o

biorreator preenchido com o meio reacional e pH ajustado adequadamente foi previamente esterilizado. O pré-inóculo foi desenvolvido com a linhagem de *A. niger* ATCC 1004 nas mesmas condições, com volume equivalente a 10% do volume de meio.

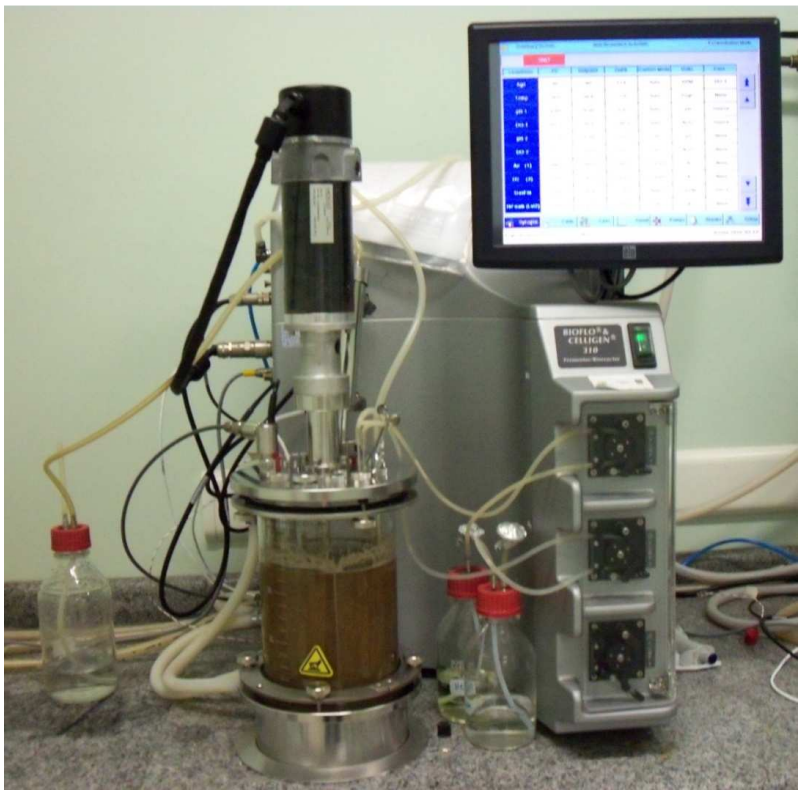

Figura 4.3. Reator contendo meio de fermentação para a produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004.

A figura 4.4 ilustra o painel de controle do equipamento, sendo apresentadas as condições do processo: temperatura controlada em 28℃, concentração de oxigênio dissolvido (OD). O sistema foi configurado em controle cascata, de forma a variar agitação e fluxo de ar, mantendo constante a concentração de OD em 30%. Foram realizados 3 reatores fixando o valor de pH (3,0, 4,0 e 5,0) ,e os mesmos foram controlados com adição de HCl 2M. As tarjas verdes (temperatura, entrada de ar, agitação, pH e OD) indicam que tais variáveis são controladas pelo sistema, as tarjas azuis (bomba de pH) indicam a ativação quando necessária e as tarjas vermelhas indicam as opções desativadas. A produção das celulases foi monitorada com amostragens de alíquotas de aproximadamente 10 mL, em seguida centrifugadas, em intervalos de 6 horas até 12 horas e a partir deste momento em intervalos de 12 horas até o fim do processo.

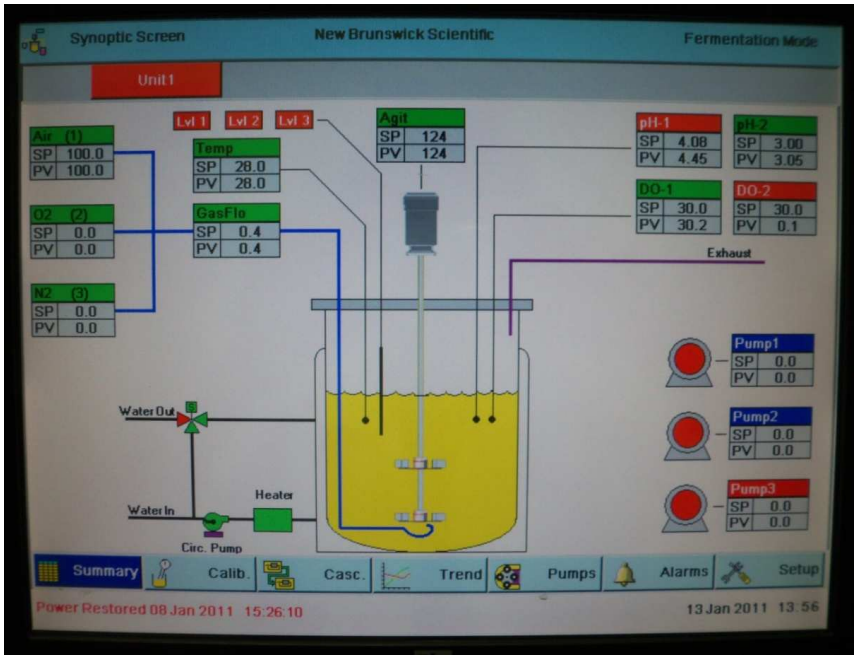

Figura 4.4. Representação do painel de controle do biorreator com as variáveis: pH, Temperatura, Oxigênio dissolvido, agitação e bombas para controle de pH.

Os perfis cinéticos dos três reatores foram semelhantes, na Figura 4.5 está apresentado o comportamento do bioprocesso.

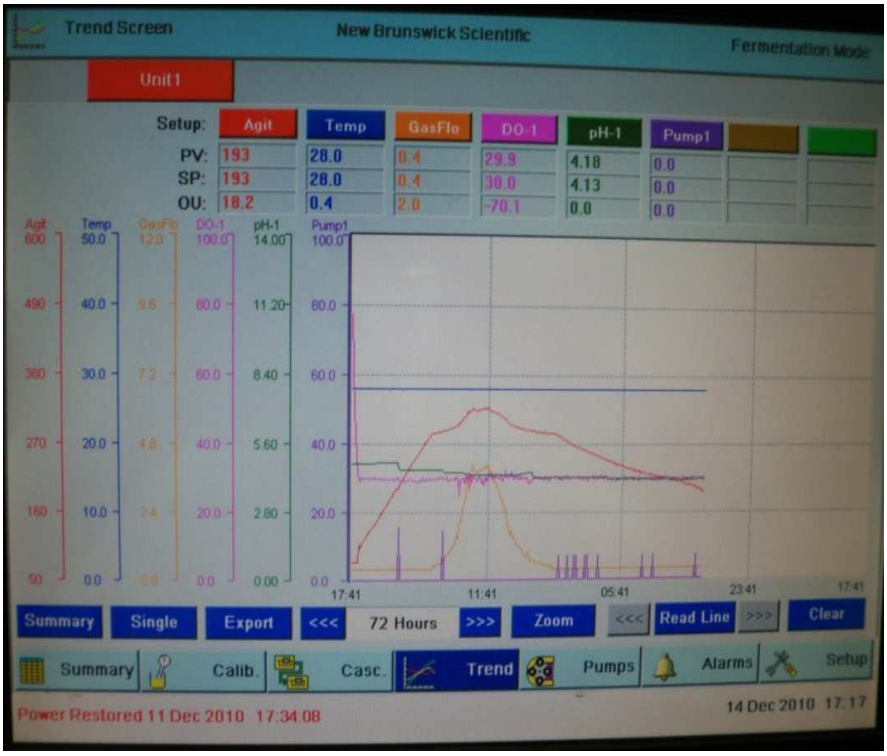

Figura 4.5. Painel de controle das variáveis de agitação, vazão de ar, oxigênio dissolvido (30%), temperatura (28℃), pH, bomba de ácido (HCl 2 M) e base (NaOH 2 M) para corrigir pH do meio de produção de β-glucosidases.

A agitação foi limitada até 350 rpm, pois acima deste valor pode ocorrer o cisalhamento das células e morte do microrganismo, assim como perda de atividade das enzimas. Num primeiro período, a agitação aumenta de forma contínua e, em seguida, ocorreu um aumento da injeção de ar, para manter a relação de oxigênio dissolvido em 30%. Nesta etapa, o microrganismo estava na fase de produção propriamente dita, em seguida se mantém estável durante determinado tempo, até que depois se diminui à necessidade de ar e agitação, indicando o fim do bioprocesso. Em relação ao pH, o sistema se manteve estável, sendo controlado ao longo do tempo com injeções de HCl 2M. Conforme detectado nos frascos cônicos, o microrganismo aumentou o pH do meio. A temperatura se manteve constante com valor de 28℃.

4.6. Obtenção do extrato bruto

O meio fermentado produzido no reator foi transferido para frascos Erlenmeyer de 2L, em seguida foi filtrado em lã de vidro sob filtração a vácuo com o intuito da retirada das células e do resíduo de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada presentes no meio, para desta forma se obter o extrato bruto enzimático.

4.7. Concentração do extrato bruto enzimático em *Hollow Fiber*®

4.7.1. Concentração em *Hollow Fiber*®

O extrato bruto celulásico foi concentrado utilizando um sistema de filtração tangencial em membranas em fibras ocas de polissulfona *Hollow Fiber*® (Quix stand GE Healthcare, São Paulo, Brasil) apresentada na Figura 4.6. A primeira etapa do processo consistiu na microfiltração em membranas de porosidade de 0,2 µm, para remoção de células remanescentes e material particulado. Para concentração, foi utilizada coluna de membrana com corte (*cut-off*) de 10 kDa.

Durante o processo de concentração foram retiradas amostras do extrato bruto, do concentrado e do permeado da ultrafiltração, para a quantificação das atividades celulásicas. O preparado enzimático concentrado de *A. niger* ATCC 1004 foi denominado de LADEBIO-AN. Este foi utilizado nos ensaios de caracterização e na composição de um formulado para hidrólise enzimática da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e da celulose microcristalina.

Figura 4.6. Equipamento *Hollow Fiber*® utilizado para a concentração do extrato bruto enzimático.

4.8. Caracterização do concentrado enzimático

4.8.1. Avaliação da estabilidade do concentrado enzimático

O extrato concentrado foi incubado em estufas (Estufa C. B. Retilínea, Mod 0.02/2) a 37° e 50℃ simultaneamente. As temperatur as empregadas foram as mesmas utilizadas em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Amostragens para quantificação da atividade β-glucosidásica foram realizadas em intervalos inicialmente de 3 horas, posteriormente aumentados para 24 horas. A estabilidade do concentrado a 4℃ também foi conduz ida em períodos de 30 dias, durante 60 dias.

4.8.2. Avaliação da influência do pH e da temperatura sobre o concentrado enzimático

Para o estudo de efeito do pH e de temperatura foram estabelecidos dois pontos, máximo e mínimo de cada fator os quais foram avaliados utilizando

planejamento experimental DCCR (Tabela 4.5). Para avaliação do pH utilizou-se soluções seguindo metodologia Golmori (1955).

Tabela 4.5. Condições do planejamento DCCR da influência do pH e de temperatura sobre a atividade do concentrado enzimático.

Variáveis	Axial mínimo (-1,41)	Mínimo (-1)	Pontos centrais (0)	Máximo (+1)	Axial máximo (+1,41)
pH	3,6	4,0	5,0	6,0	6,4
Temperatura (℃)	34,3	37	43,5	50	52,7

4.8.3. Avaliação eletroforética

Seguindo manual da eletroforese de isoenzimas e proteínas (ALFENAS, 1998) foi conduzida a corrida em gel separador de poliacrilamida 15% e gel empilhador 4%, cuja composição está apresentada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Composição do gel de corrida para SDS-PAGE e Zimograma.

Componentes (mL)	Gel separador 15%	Gel empilhador 4%
Tris-HCl, pH 8,9	1,5	-
Tris-HCl, pH 6,8	-	1,5
solução de componentes acrílicos	7,5	2,0
Solução de persulfato de amônia	0,05	0,05
TEMED	0,05	0,1
SDS 10%	0,1	0,1
Água mili-Q	5,9	11,35

A eletroforese foi realizada em cuba vertical (Bio-Rad, FB300), com aplicação de diferença de potencial de 100-120 V e corrente de 20 mA/gel, à temperatura de 25℃ (Figura 4.7). A caracterização das celulases e proteínas foi realizada comparando-se ao padrão *Full-range Rainbow* (225 kDA-azul, 150 kDa-vermelho, 102 kDa-verde, 76 kDa-amarelo, 38 kDa-azul, 31 kDa -Laranja, 24 kDa-verde, 17 kDa-azul, 12 kDa-vermelho).

Após a eletroforese, o gel SDS-PAGE foi imerso em solução corante de *coomassie blue* durante período de aproximadamente 3 horas e, em seguida, foi descorada com solução 10% ácido acético.

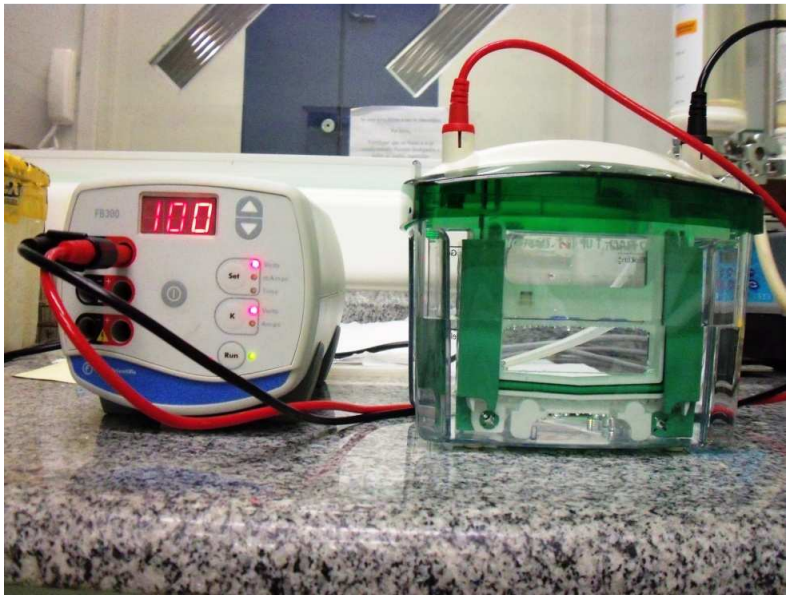

Figura 4.7. Sistema de eletroforese vertical.

Para revelação de β-glucosidases, após a eletroforese, o gel foi imerso em solução Triton x-100 0,1%, agitado durante 20 minutos, lavado com tampão citrato de sódio de pH 5,0 50 mM e agitado durante 20 minutos. O procedimento foi repetido duas vezes a fim de garantir a remoção do SDS. A revelação foi realizada com solução de esculim (6,7-dihydroxycoumarin 6-glucoside) 0,1% após 30 minutos de incubação sob agitação a 50℃. A solução de clor eto férrico 0,03% foi adicionada à temperatura ambiente. O ensaio é baseado no fato das β-glucosidases agirem separando a glicose da esculetina, a qual reage com o cloreto férrico, formando um precipitado escuro, revelando desta forma, especificamente, a banda de β-glucosidase. O gel SDS-PAGE foi analisado no *software* “Gel-Pro Analyzer” (Media Cybernetics) (KWON *et al.*, 1994).

4.9. Avaliação do poder hidrolítico do preparado enzimático concentrado

A hidrólise enzimática foi realizada utilizando carga enzimática de 25 FPU/g de celulose, em uma concentração de sólidos de 100 g/L de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada (68% de celulose) ou 68 g/L de celulose

microcristalina (Avicel). Diferentes preparações enzimáticas foram obtidas utilizando o preparado comercial Multifect, β-comercial (NS50010) e o preparado LADEBIO-AN de forma a variar a proporção β-glucosidase:FPase. Os experimentos foram conduzidos como apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Hidrólise enzimática.

Extrato enzimático	Proporção β-glucosidase:FPase	Fonte carbono
Multifect	0,8: 1,0	CPD Avicel
Multifect + LADEBIO-AN	1,4: 1,0	CPD Avicel
Multifect + βcomercial	1,4: 1,0	CPD Avicel
Multifect + LADEBIO-AN	2,0: 1,0	CPD Avicel
Multifect + βcomercial	2,0: 1,0	CPD Avicel

CPD-Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada

Os experimentos foram realizados em duplicata, em frascos Erlenmeyers de 500 mL sob agitação de 200 rpm à 37℃, por 33 horas (Figura 4.8). As variáveis analisadas foram glicose, celobiose e rendimento de hidrólise.

Figura 4.8. Experimento da hidrólise nas condições de 200 rpm à 37℃, por 33 horas.

4.9.1. Atividades dos formulados enzimáticos a 37℃ e 50℃

Foram dosadas as atividades Fpásicas, CMCásicas e β-glucosidásicas conforme descritos nas seções 4.10.1.1, 4.10.1.2 e 4.10.1.3 avaliando-se os comportamentos de incubação nas temperaturas de 37°C e 50℃.

4.9.2. Quantificação de glicose e celobiose

A glicose e a celobiose produzidas durante a hidrólise enzimática foram quantificadas por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (Waters detector, 2414) dotada de coluna HPX87P. A fase móvel utilizada foi água miliQ, com um fluxo de 0,6 mL/min, utilizando padrões de glicose (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e celobiose (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

4.10. Procedimentos analíticos

4.10.1. Quantificação das atividades enzimáticas e teor protéico

Nos extratos enzimáticos obtidos foram determinadas as atividades β-glucosidásicas, CMCásicas e FPásicas pelo método descrito por Ghose (1987) modificado e o teor proteico pelo método Bradford (BioRad). Para as diluições necessárias durante a quantificação foi utilizada uma solução tampão citrato de sódio pH 5,0.

4.10.1.1. Atividade β-glucosidásica

Para obtenção da solução substrato de celobiose, 0,5 g de celobiose foi pesado e diluído em 25 mL de solução tampão citrato de sódio pH 5,0 resultando uma solução de 2% de celobiose, mantida sob refrigeração de 4℃.

A determinação da atividade β-glucosidásica, foi realizada em microtubos Eppendorff com capacidade de 2,0 mL, em banho de gelo, onde ocorria a transferência de 50 µL de solução de celobiose 2% e 50 µL de extrato enzimático diluído. Em seguida, os sistemas ficavam incubados à 50℃, por 15 minutos, seguido de banho fervente durante 10 minutos, com o intuito de promover a inativação das enzimas. Posteriormente era adicionado 1 mL de reativo enzimático glicose-oxidase para cada microtubo, e novamente levado para incubação à 37℃ por mais 15 minutos. No branco foram utilizados 100 µL de solução tampão e, no padrão, 10 µL

de glicose. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e adicionados ao sistema um volume de 910 µL de água destilada, com exceção do padrão (1 mL). A leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda de 505 nm (Spectrumlab, 22pc). A atividade de β-glucosidase foi expressa em unidades internacionais (UI), onde a unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto (GHOSE, 1987).

4.10.1.2. Atividade CMCásica

Para obtenção da solução substrato de CMC pesou-se 0,5 g Carboximetilcelulose (CMC) adicionando-se 25 mL de solução tampão citrato pH 5,0. O sistema foi aquecido em banho Maria com o propósito de facilitar a dissolução do substrato, resultando ao final, uma solução 2% de CMC, estocada sob refrigeração a 4℃. A determinação foi feita pelo método do Dinitrossalicílico. O reagente DNS foi preparado de acordo com Miller (1959) e sua composição está apresentada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Composição do reagente de DNS.

Componentes	Quantidade
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	10,6g
NaOH	19,8g
Sal de Rochele	306,0g
Metabissulfito de sódio	8,3g
Fenol	7,6mL
Água destilada	1416mL

Para a determinação da atividade CMCásica foram usados microtubos Eppendorf com capacidade de 2 mL. Os microtubos foram colocados em banho de gelo e em seguida a eles fora transferidos 50 µL de solução 2% de CMC e 50 µL de extrato enzimático diluído, quando necessário. Os sistemas foram então incubados a 50℃ por 15 minutos e posteriormente levados ao banho fervente por 10 minutos, com intuito de promover a interrupção da reação enzimática. Após esta etapa, foram adicionados 300 µL de reagente DNS e novamente levados a banho fervente por mais 5 minutos. Em seguida foram adicionados 1500 µL de água destilada e

conduziu-se a leitura da absorvância a 540 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o branco preparado com 100 µL de tampão.

A atividade de CMCásica foi expressa em unidades internacionais (UI), onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto (GHOSE, 1987).

4.10.1.3. Atividade FPásica

Para a determinação da atividade FPásica foram utilizados tubos de ensaios com capacidade de 25 mL, inseridos em banho de gelo, aos tubos foram adicionados 1000 µL de tampão citrato de sódio pH 5,0, uma tira de papel Whatman n° 1 com dimensões de 1x6 cm e 500 µL de extrato enzimático. O sistema foi incubado a 50℃ por 1 hora. Após o período de incub ação, o sistema foi tratado com banho fervente por 10 minutos, com o propósito de inativar as enzimas. Em seguida, foram adicionados 3 mL de DNS ao sistema, sendo submetido novamente em banho fervente por mais 5 minutos. A próxima etapa consistiu em adicionar 20 mL de água destilada, seguida da homogeneização dos sistemas e leitura da absorvância a 540nm. O ensaio foi conduzido em triplicata. Para o branco reacional, utilizou-se o mesmo sistema sem a tira de papel e 500 µL de solução tampão substituindo o extrato enzimático.

A atividade de FPásica foi expressa em unidades internacionais (UI), onde uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessário para liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto (GHOSE, 1987).

4.10.1.4. Teor protéico

A quantificação do teor protéico total foi realizada utilizando kit BIORAD baseado no método de Bradford (1976). Em microtubos Eppendorf com capacidade de 2 mL, foram adicionados 800 µL da amostra previamente diluída e 200 µL de reativo de Bradford (Kit BioRad). O sistema foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Água destilada mais o reativo de Bradford foi utilizada para o branco. A leitura da absorvância foi realizada a 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo estão apresentados os resultados obtidos nesta dissertação, bem como sua discussão, levando-se em conta os fenômenos observados e dados anteriormente reportados na literatura. Serão discutidos o potencial de microrganismos para a produção das β-glucosidases, da fonte de carbono como indutor para a produção, a otimização do meio de produção utilizando técnicas de planejamento de experimentos, seguindo a produção em biorreatores. Serão discutidas também, as questões relacionadas à concentração do extrato enzimático, sua avaliação de estabilidade e desempenho em diferentes temperaturas e valores de pH, bem como da eletroforese, culminando com a hidrólise da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e de celulose microcristalina.

5.1. Avaliação preliminar de produção de β-glucosidases

Inicialmente, foi avaliado o desempenho de duas linhagens de *Aspergillus niger* (ATCC 1004 e ATCC 16404) com vistas a selecionar a melhor para a continuidade dos estudos de produção de β-glucosidases. Na sequência, duas fontes de carbono (celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina) foram investigadas com o propósito de se eleger a mais adequada ao processo em desenvolvimento.

5.1.1. Avaliação do potencial de linhagens de *Aspergillus niger* para a produção de β-glucosidases

Castro (2006) havia sinalizado que linhagens de *A. niger* produziam proporcionalmente mais atividade β-glucosidásica do que outras espécies de fungos filamentosos pertencentes à coleção de culturas do LADEBIO/UFRJ. Desta forma, se fez necessário avaliar o comportamento das linhagens de *A. niger* através de um estudo cinético. Observou-se através dos perfis apresentados na figura 5.1 de ambas as linhagens, uma fase de baixa produção no período de 72 horas, após inoculação com esporos, diferenciando-se a partir de então, sendo o melhor desempenho aquele apresentado pela linhagem de *A. niger* ATCC 1004.

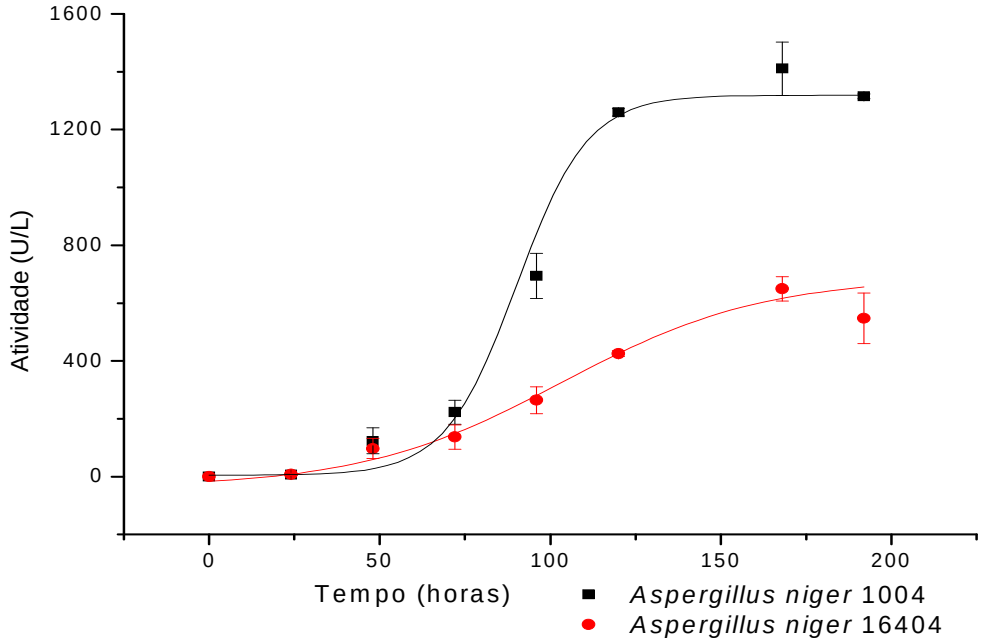

Figura 5.1. Perfil cinético de produção de β-glucosidases com composição de meio descrito na seção 4.2, em pH 5,5, 28℃, 200 rpm, du rante o período de 196 horas.

A linhagem de *A. niger* ATCC 1004 apresentou produção máxima de 1480 U/L, no sétimo dia de experimento, representando um aumento percentual de aproximadamente 55%, comparado ao valor obtido com a linhagem ATCC 16404 (658 U/L). Ressalta-se que esta última linhagem, ainda se encontrava em fase de produção no tempo de 168 horas. Os resultados foram diferentes dos obtidos por Castro (2006), cerca de 900 U/L com 192 horas, utilizando *Aspergillus niger* ATCC 16404, maior do que o observado nos experimentos, o que pode estar relacionado às modificações propostas do meio, bem como do tempo de estocagem da linhagem no banco de culturas. Ressalta-se ainda que Castro (2006) não verificou a produção da enzima em frascos cônicos.

Kang *et al.* (2004) reportaram a produção de β-glucosidase produzida por uma mutante de *Aspergillus niger* KK2, apresentando cinética de produção similar a observada neste estudo, sendo em 144 horas a produção máxima (107 U/g de substrato).

5.1.2. Avaliação do potencial de utilização da celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e da celulose microcristalina como indutor da produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004

A produção de β-glucosidases foi verificada nas condições de composição de meio baseado na seção 4.2 em pH 5,5, 28℃ à 200 rpm, durante o período de 168 horas. Os experimentos se diferenciavam somente em relação à fonte de carbono, ou seja, em um experimento foi usado a celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e no outro celulose microcristalina, ambos substratos em concentração de 7,5 g/L (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004 nas condições de composição de meio descrito na seção 4.2, em pH 5,5, 28℃, 200 rpm, durante o período de 168 horas.

Fonte de carbono	Atividade (U/L)
Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada (CPD)	1.228 ± 117
Celulose micro cristalina (Avicel)	880 ± 22

A produtividade volumétrica do experimento foi de 8,53 U.L/h quando utilizado celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e 6,11 U/L.h quando celulose microcristalina foi investigada. Calculando a relação entre produtividade volumétrica de CPD pela Avicel, obtem-se uma relação de 1,39. Hanif, Yasmeen e Rajoka (2004) estudaram a indução da síntese de celulases em *Aspergillus niger* NIAB 280 e observaram uma maior produtividade volumétrica para a linhagem quando era induzido por bagaço de cana-de-açúcar em detrimento à celulose microcristalina. Os autores obtiveram 21,0 e 15,5 U/L.h, respectivamente. A relação entre os valores de produtividades volumétricas foi de 1,4, resultado bastante similar ao obtido no presente estudo, indicando a melhor indução da fonte de carbono proveniente do resíduo da cana-de-açúcar. A celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada por ter apresentado melhor resposta foi definida como fonte de carbono do processo em desenvolvimento.

5.1.3. Considerações dos potenciais das linhagens de *Aspergillus niger* e da utilização da celulignina parcialmente deslignificada e celulose microcristalina como indutor para a produção de β-glucosidases

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram elaboradas modificações no meio de produção, tendo sido mantidas a temperatura (28℃) e a agitação (200

rpm), baseados nos seguintes critérios: (i) retirada da peptona por impactar negativamente a economicidade do processo, adicionando-se, assim, uma concentração maior de extrato de levedura com intuito de compensar a retirada da peptona. Outra modificação foi à incorporação de Tween-80, por facilitar à liberação das enzimas ligadas a parede celular, tendo em vista ter sido reportado seu importante papel em trabalhos da literatura (WEN, LIAO e CHEN, 2005; KOVÁCS *et al*.,2008; SOHAIL *et al.*,2009; SONI, NAZIR e CHADHA, 2010); (ii) A temperatura de produção de celulases para *A. niger* foi observada na literatura em diversas faixas, dentre as mais citadas se encontraram as temperaturas de 25℃ (RASHID E SIDDIQUI, 1997), 28℃ (KANG, *et al*., 2004), 28-30℃ (CHEN, XIA e XUE, 2006) e 30℃ (AHAMED E VERNETTE, 2008). No presente trabalho, em experimentos preliminares ficou evidenciada a inativação do microrganismo e consequentemente a não produção de enzimas em temperaturas acima de 35℃ (dados não apresentados). Desta forma, fixou-se a temperatura em 28℃; e (iii) a agitação foi mantida em 200 rpm baseada nos estudos de Rocha (2010).

5.2. Produção de β-glucosidases de *Aspergillus niger* ATCC 1004 por fermentação submersa em frascos agitados utilizando planejamentos experimentais

A competitividade e o alto custo, a cada dia, tornam mais difícil pensar em desenvolvimento de processos e produtos sem agregar uma metodologia científica de trabalho. Assim, com a crescente busca de otimizações, minimizando custos e tempos, maximizando rendimentos, produtividade e qualidade de produtos, entre outros objetivos, têm sido buscada a técnica de planejamento de experimentos. Para se atingir os objetivos se fazem necessária uma integração entre o processo, estatística e bom senso, tanto na montagem dos experimentos, quanto na análise estatística dos resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Todo planejamento experimental começa com uma série de experimentos, com o objetivo de se definirem as variáveis e os níveis importantes. As variáveis podem ser qualitativas como o tipo de microrganismo, no exemplo da dissertação, *Aspergillus niger* ATCC 1004 e *Aspergillus niger* ATCC *16404*, e quantitativas, como por exemplo, concentração de reagentes, pH, temperatura, suprimento de oxigênio, agitação mecânica etc. Em resumo, os objetivos e os critérios devem estar bem claros, de modo a dar sustentação à escolha, a variação e os níveis escolhidos para

as variáveis selecionadas, as variáveis de respostas e o planejamento experimental. Na última etapa, deve-se considerar o tamanho da amostra, o número de réplicas, a seleção de uma ordem de realização dos experimentos, assim como a eleição dos métodos de análises (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

O planejamento dos experimentos deve ser realizado para determinar ou quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas e é indispensável para que se possam obter resultados confiáveis, assim como análises estatísticas consistentes. O planejamento experimental gera vantagens como a redução do número de experimentos, tanto pela realização de experimentos de uma única corrida como com repetições. A análise de fatores simultaneamente permite o cálculo e avaliação do erro experimental, além de depender mais da competência na área de atuação que do conhecimento estatístico (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

5.2.1. Planejamento *Plackett & Burman* de 16 variáveis

O planejamento *Plackett & Burman* (PB), também conhecido como planejamento não geométrico, pois não pode ser representado por cubos, consiste em usar números múltiplos de quatro, para o número de corridas. Este é utilizado quando o número de variáveis independentes a serem usadas é elevado, indicando a seleção prévia das mesmas de maneira muito valiosa. Além do mais, quando comparado a outros métodos, a redução do número de experimentos é notável. Outra regra que deve ser obedecida relaciona-se ao número de experimentos que deve ter o PB, com pelo menos quatro unidades acima do número de variáveis independentes (CALADO e MONTGOMERY, 2003, RODRIGUES e IEMMA, 2005)

A tabela 5.2 apresenta os resultados do planejamento PB16, cujos valores variaram de 5 U/L (experimento 1) a 2289 U/L (experimento 14). A partir dos resultados obtidos no PB foi gerado o diagrama de Pareto (Figura 5.2), no qual se observou que as variáveis que apresentaram maior significância estatística sobre a produção de β-glucosidase foram: o Tween-80, seguido do extrato de levedura, direcionando para maiores valores, em contraposição ao pH que resultou em maiores valores de atividade β-glucosidásica com valores de pH menores. Este fato deve-se, provalvelmente, ao Tween-80 por facilitar a liberação das enzimas aderidas à parede celular. O extrato de levedura apresentou efeito positivo pelo fato de ser uma excelente fonte de nitrogênio, nutriente que tem um papel extremamente relevante na produção de enzimas. Com relação ao pH, é sabidamente conhecido que, os fungos filamentosos, em sua maioria, são ligeiros acidófilos.

Tabela 5.2. Planejamento *Plackett* & *Burman* de 16 variáveis

Ensaio	pH inicial	CPD	$(NH_4)_2SO_4$	KH_2PO_4	$CaCl_2.2H_2O$	$MgSO_4.7H_2O$	EL	$FeSO_4.7H_2O$	$MnSO_4.4H_2O$	$ZnSO_4.7H_2O$	$CoCl_2.6H_2O$	Tween-80	Atividade (U/L)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	5
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1.096
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	796
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1.315
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1.239
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	349
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.098
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.773
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	636
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1.122
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	771
12	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1.531
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1.448
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	**2.289**
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	**2.207**
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	726
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.215
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.198
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	973

CPD - Celulignina de bagaço de cana Parcialmente Deslignificada; EL- Extrato de levedura

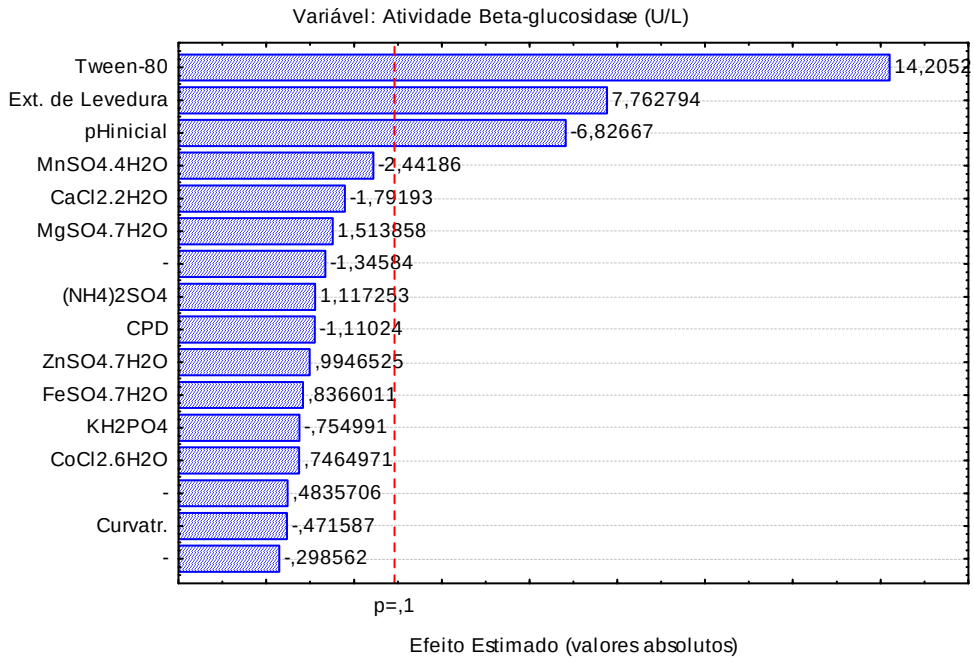

Figura 5.2. Diagrama de Pareto do planejamento *Plackett Burman* de 16 variáveis.

Com o propósito de validar o planejamento experimental, a condição que resultou no maior valor de atividade β-glucosidásica (experimento 14) foi escolhida para a realização de um estudo cinético em frasco agitado. O resultado deste estudo está exibido na figura 5.3, na qual se observa que a produção máxima apresentou valor médio de 2.346 U/L, bem próximo ao resultado encontrado na melhor condição do PB16 (2.289 U/L), corroborando o planejamento experimental realizado.

Arnesen *et al*. (1998) verificaram que a adição de Tween-80 no meio de crescimento de *Thermomyces lanuginous* aumentava não somente a biomassa, mas também estimulava a produção de α-amilases. O mesmo é um surfatante, que torna as membranas dos fungos mais permeáveis e facilita a liberação das enzimas no meio aquoso (WEN, LIAO e CHEN, 2005; AHAMED e VERMETTE, 2008).

Adicionalmente, a adição de surfatantes tem sido reportada como positiva para o aumento da hidrólise enzimática de diferentes substratos em diferentes concentrações. Os mecanismos têm se transformado em alvo de estudos, nos quais três principais características são atribuídas a estas substâncias anfifílicas: (i) mudar a estrutura do substrato, tornando a celulose mais disponível ao ataque enzimático; (ii) aumentar a estabilidade da enzima, isto é, reduzem a desnaturação térmica; (iii)

afetar a interação, ou seja, as enzimas adsorvidas são prevenidas de inativação (ALKASRAWI *et al.*, 2003).

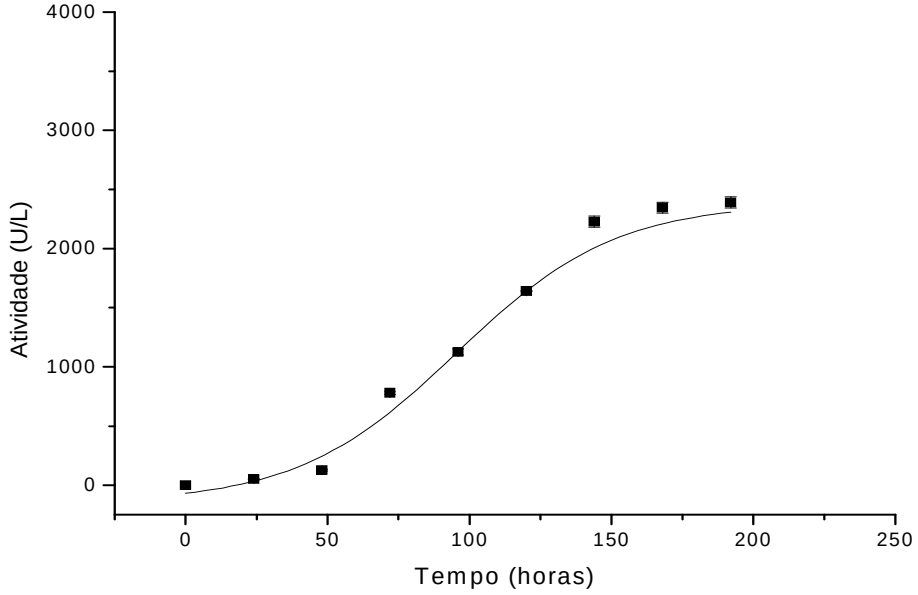

Figura 5.3. Perfil cinético de produção de β-glucosidase na melhor condição experimental (ensaio 14 do PB16, 28℃, 200 rpm)

Os pré-tratamentos com surfatantes apresentam-se como novo potencial para aumento de rendimentos em glicose e xilose e subsequente aumento de hidrólise enzimática comparado a tratamentos sem adição dos mesmos. Melhor remoção da lignina por surfatantes pode reduzir as ligações não produtivas da enzima com a lignina. O tratamento com Tween-80 devido à melhor remoção de lignina deve aumentar a acessibilidade à celulose (QING, YANG e WYMAN, 2010). Como o substrato utilizado ainda continha uma porcentagem de lignina pode ter ocorrido sua ligação ao restante de lignina, o que consequentemente facilitou o ataque a celulose. Fang *et al.* (2010) sugerem que os surfatantes podem absorver a lignina o que aumentaria o poder de hidrólise do complexo enzimático celulósico.

A adição de extrato de levedura pode induzir a produção de enzimas e facilitar o desenvolvimento dos microrganismos, sendo uma excelente fonte de nitrogênio e de vitaminas do complexo B (B_1, B_2, B_6) e representa um insumo de baixo custo para o bioprocesso, isto, pois o mesmo pode ser utilizado a partir de resíduos de indústrias, por exemplo, cervejeiras. Além de ser rico em minerais, em macro e micro-elementos, como o magnésio, zinco, selênio, entre outros, ainda apresenta

elevado teor em proteína (30% a 70%), sob forma mais facilmente assimilável (YAMADA *et al.*, 2003; AHAMED e VERMETTE, 2008).

O efeito do pH inicial sobre o meio de cultura para produção de celulases, atualmente vem sendo investigado. Gao et al. (2008) observaram que o pH 2-3 foi a melhor condição. Por outro lado, Romero et al. (1999), Xia e Cen (1999) e Jecu (2000) obtiveram melhores resultados em uma faixa ampla de pH de 3 a 6, sugerindo assim, a possibilidade de degradação de materiais celulolíticos e produção de celulases em pH mais baixos.

Ainda de acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 5.2), alguns componentes do meio de produção ($CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$ e $CoCl_2.6H_2O$) puderam ser excluídos, uma vez que não foram variáveis significativas no processo e seus valores inferiores (-1) iniciavam-se em zero. Tais elementos servem como cofatores e, provavelmente, já se encontravam em concentrações requeridas no extrato de levedura. As outras variáveis não significativas foram fixadas em seu menor valor, pois as faixas avaliadas não se iniciavam em zero. Em seguida, partiu-se para o segundo planejamento, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 3 variáveis.

5.2.2. Planejamento Delineamento Composto Central Rotacional de 3 variáveis

O planejamento DCCR permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim a análise de uma variável, sujeita a todas as combinações das demais. Esses planejamentos são extremamente úteis para medir efeitos ou influências de uma ou mais variáveis de um processo. O usual é realizar um planejamento com dois níveis, no máximo três. O uso de mais níveis aumenta muito o número de experimentos, o que se quer evitar quando se propõe o uso desta técnica para se planejar o experimento (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

A tabela 5.3 apresenta a matriz do planejamento juntamente às respostas, cuja variação foi observada de 915 U/L (experimento 11) a 3.111 U/L (experimento 3). Nesta série experimental, além da estrutura do DCCR, houve a adição de 4 pontos centrais.

Tabela 5.3. Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional.

N° do experimento	Tween-80	Ext. de Levedura	pH $_{inicial}$	Atividade (U/L)
1	-1	-1	-1	1.872
2	-1	-1	1	1.694
3	-1	1	-1	**3.111**
4	-1	1	1	2.398
5	1	-1	-1	1.869
6	1	-1	1	1.633
7	1	1	-1	3.069
8	1	1	1	2.071
9	-1,682	0	0	1.885
10	1,682	0	0	2.252
11	0	-1,682	0	915
12	0	1,682	0	**3.041**
13	0	0	-1,682	2.050
14	0	0	1,682	1.683
15	0	0	0	1.825
16	0	0	0	1.876
17	0	0	0	1.849
18	0	0	0	1.751

Com os dados do planejamento experimental, o Diagrama de Pareto pôde ser construído (Figura 5.4), onde é observada a influência positiva do extrato de levedura, ou seja, um aumento na concentração de extrato de levedura conduz a uma maior produção de β-glucosidase, e um efeito negativo do pH indicando quanto menor o pH, maior a produção enzimática, o que havia sido evidenciado no planejamento experimental anterior.

Por outro lado, o Tween-80 apresentou influência marginal, porém para o próximo experimento sua concentração não foi fixada, tendo sido o seu valor influenciado de forma positiva. Isto nos levou a manter as condições de máximo (+1) e minímo (-1).

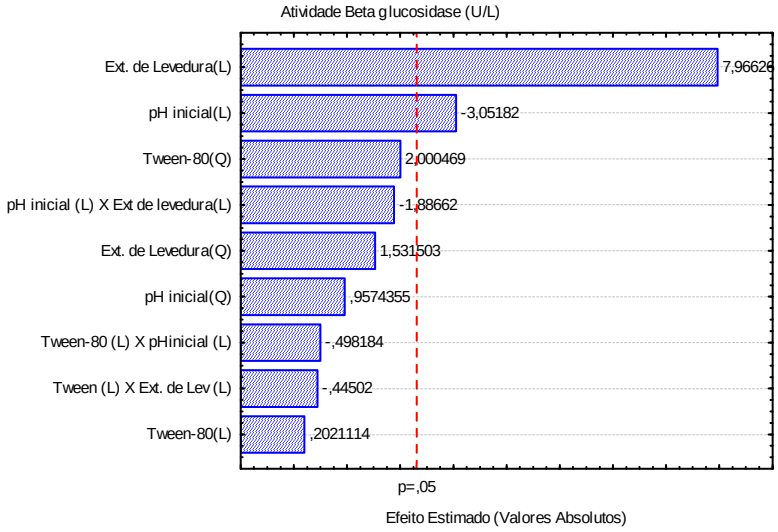

Figura 5.4. Diagrama de Pareto do planejamento Delineamento Composto Central Rotacional.

Conforme mostrado anteriormente, o experimento número 3 apresentou melhor resultado, sendo conduzido um estudo cinético em frasco agitado, com intuito de se validar a sua resposta (Figura 5.5). A cinética novamente apresentou valor máximo de atividade enzimática (3.033 U/L) bem próximo ao obtido no experimento 3 (3.111 U/L), em 144 horas. A cinética do experimento apresentou-se similar a anterior, com uma fase inicial de baixa produção de 50 horas, seguida da fase de produção propriamente dita entre 50 e 144 horas, após a qual a produção foi constante.

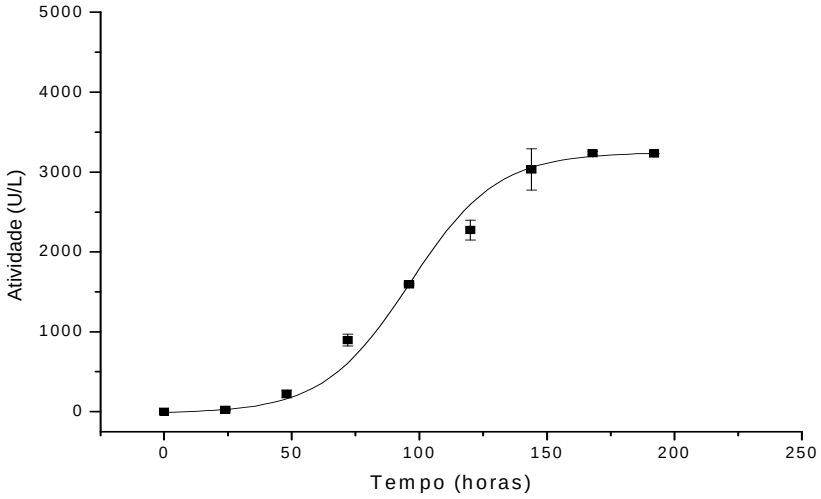

Figura 5.5. Perfil cinético de produção de β-glucosidases na melhor condição apontada pelo DCCR (ensaio 3, 28℃, 200 rpm).

5.2.3. Planejamento experimental fatorial 2^3

O planejamento experimental fatorial 2^3 tem basicamente a mesma composição que um DCCR, com exceção da ausência dos pontos axiais, consequência esta que acarreta em reduzir o nível de confiança, de 95 para 90%, contendo três experimentos no ponto central. O experimento foi desenvolvido para ampliar a faixa de produção, com o intuito de explorar principalmente o extrato de levedura, uma vez que o Tween-80 se encontrou na marginalidade e o pH medido foi o inicial, que se alterava com o decorrer dos experimentos. A matriz experimental e as respostas obtidas estão apresentadas na tabela 5.4. O experimento resultou em valores de atividade enzimática variando de 1.740U/L (experimento 2) a 4.749U/L (experimento 7).

Tabela 5.4. Planejamento experimental fatorial 2^3.

N° do experimento	$pH_{inicial}$	Ext. de Levedura	Tween-80	Atividade (U/L)
1	-1	-1	-1	2.002
2	1	-1	-1	1.740
3	-1	1	-1	4.114
4	1	1	-1	3.856
5	-1	-1	1	3.424
6	1	-1	1	3.112
7	-1	1	1	**4.749**
8	1	1	1	4.673
9	0	0	0	3.421
10	0	0	0	3.451
11	0	0	0	3.353

Novamente, o Diagrama de Pareto foi construído (Figura 5.6), indicando o extrato de levedura como principal variável que influência a produção de β-glucosidases, seguido pelo Tween-80, ambos no sentido de aumento de concentração. O pH apresentou influência, apesar de apresentar uma faixa pouco extensa (3,3 a 4,0), no sentido de quanto mais ácido, maior a produção.

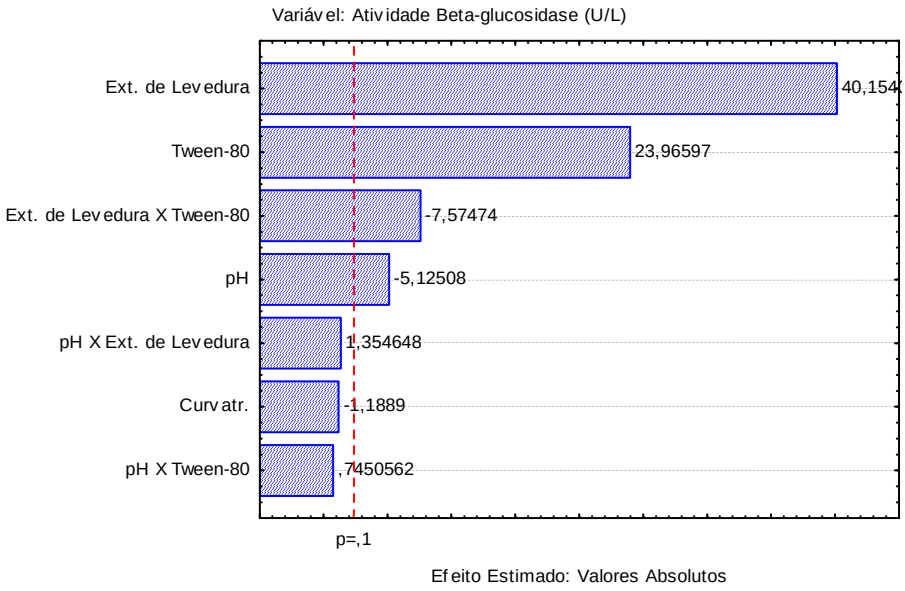

Figura 5.6. Diagrama de Pareto do planejamento experimental fatorial 2^3.

O maior resultado encontrado foi no experimento 7, com menor valor de pH e maiores concentrações de extrato de levedura e Tween-80. Nestas condições foi conduzido um estudo cinético de produção de β-glucosidases (Figura 5.7), com intuito de se validar o planejamento experimental.

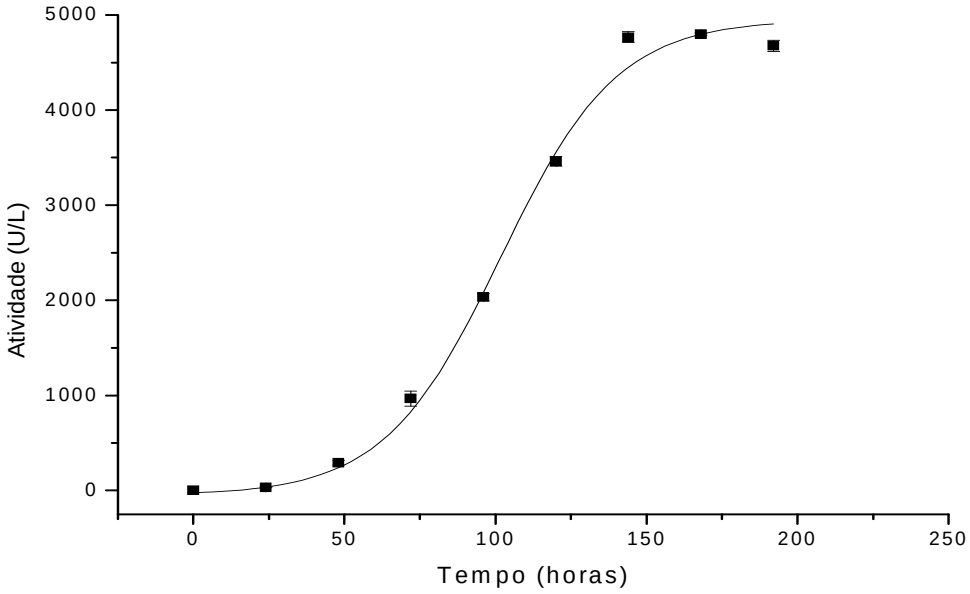

Figura 5.7. Perfil cinético de produção de β-glucosidases da melhor condição do planejamento experimental fatorial 2^3 (ensaio 7, 28℃ à 200 rpm).

A atividade enzimática máxima novamente apresentou valor bem próximo ao obtido no experimento 7 (4.749U/L), sendo em média 4.765 U/L, validando com sucesso o planejamento experimental. O comportamento cinético apresentou-se similar ao anterior, com uma fase de baixa produção de 0 a 50 horas, seguida de uma fase de aumento de produção entre 50 e 144 horas, com a fase estacionária no restante do processo. Estas condições foram empregadas para os ensaios em biorreator instrumentado, que serão apresentados na seção 5.3.

5.2.4. Considerações gerais dos planejamentos experimentais

A utilização da estratégia de planejamentos experimentais sequenciais se apresentou como importante ferramenta para o aumento da produção de β-glucosidases, uma vez que a produção inicial dos experimentos foi de 1.482 U/L, em um meio com 11 componentes. Ao final do primeiro planejamento, já foi possível obter um valor de atividade enzimática de 2.289 U/L o que confere um aumento de 54,5%, tendo sido excluídos 6 reagentes, o que contribui para a economicidade do processo. No segundo planejamento, obteve-se como melhor resultado o valor de 3.111 U/L, cerca de 36% maior que o máximo obtido no primeiro planejamento experimental. Por fim, do segundo para o terceiro planejamento experimental logrou-se um aumento de 53% em atividade β-glucosidásica. Ao final dos planejamentos a maior produção de atividade β-glucosidásica (4749 U/L) se encontrava nas condições descritas na tabela 5.5.

Tabela 5.5. Condições de maior produção de atividade β-glucosidásica.

Variável	**Unidade**
$pH_{inicial}$	3,32
Tween-80	7mL/L
Extrato de levedura	10g/L
Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada	7,5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	4 g/L
KH_2PO_4	3 g/L
Temperatura	28℃
Velocidade de agitação	200rpm

5.3. Ensaios em biorreator

Os resultados anteriores mostraram que a fase de produção de β-glucosidase iniciava-se após 50-72 horas de cultivo, o que seguramente era decorrente da inoculação com esporos. Desta forma, com intuito de se reduzir etapa não produtiva ou de baixa produção, foi desenvolvido um pré-inóculo, que após 72 horas de cultivo era inoculado no biorreator em concentração de 10% (v/v). O biorreator foi operado com um volume de trabalho de 3 L de meio de produção e sua composição está apresentada na tabela 5.6.

Tabela 5.6. Condições de produção de β-glucosidases em biorreator instrumentado.

Variável	Unidade
pH	3,0, 4,0 ou 5,0
Tween-80	7mL/L
Extrato de levedura	10g/L
CPD	7,5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	4 g/L
KH_2PO_4	3 g/L
Temperatura	28℃
Oxigênio Dissolvido	30% de saturação

CPD - Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada

Como foram observadas diferentes respostas quando variou-se o pH nos planejamentos experimentais sequenciais, esta variável foi novamente avaliada, nos ensaios em biorreator, tendo em vista que neste sistema o pH é mais facilmente controlado. A produção de β-glucosidases foi avaliada em valores de pH 3,0, 4,0 e 5,0 (Figura 5.8).

No biorreator onde o pH foi fixado em 3,0 os valores de produção foram baixos, apresentando atividade β-glucosidásica máxima de 1.713 U/L. Os valores máximos de atividade CMCásica foram em torno de 124 U/L; a atividade FPásica também foi quantificada, porém não foi detectada. Provavelmente, a baixa produção se deu em função do baixo pH, que não favoreceu o desenvolvimento do microrganismo. Ferreira *et al*. (2005) avaliaram os valores de pH 2 e 3,2,

evidenciando que, quanto mais ácido o pH, menor era a atividade catalítica de lipases. Castro (2006) reportou que valores próximos a pH 3,0 resultaram em baixa produção de β-glucosidases de A*spergillus niger* ATCC 16404.

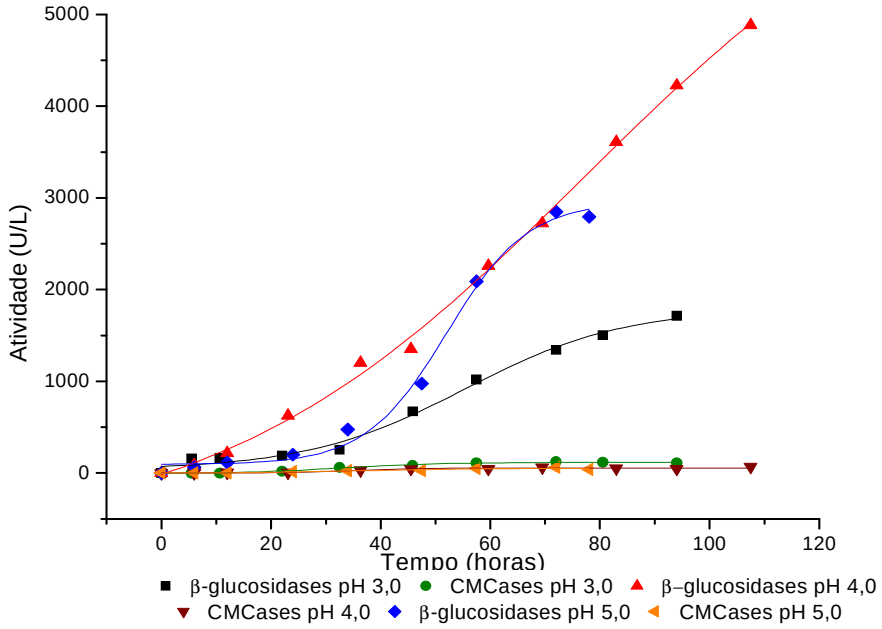

Figura 5.8. Perfil cinético da produção de β-glucosidases e CMCases de *A. niger* ATCC 1004 em processos conduzidos em pH 3,0, 4,0 e 5,0 (28℃ e 30% de oxigênio dissolvido, em volume de meio de 3L), com composição de meio da melhor condição do planejamento experimental.

O bioprocesso operado em pH 4,0 apresentou o melhor resultado, sendo o único a conseguir, de fato, a eliminação da etapa não produtiva, obtendo uma linearidade na produção e atingindo valor máximo de atividade enzimática de 4.882 U/L de β-glucosidase, ligeiramente acima dos valores obtidos nos frascos agitados (4.749 U/L). Este ensaio, apresentou valores baixos de CMCases, em torno 68 U/L, novamente não apresentando produção de atividade FPásica ao longo do processo cuja duração foi de 107,5 horas. Resultados similares foram encontrados por Sohail *et al*. (2009), cuja maior produção de β-glucosidases de *Aspergillus* MS82 se deu em pH 4,0 (1,2 U/L.h).

O biorreator conduzido em pH 5,0 apresentou resultados máximos de produção de β-glucosidases de 2.850 U/L e de 60 U/L para a produção de atividade CMCásica, não sendo detetada atividade FPásica. A fase de baixa produção,

mesmo com o pré-inóculo não foi contornada, pois até 36 horas, o bioprocesso ainda não tinha atingido a fase de produção propriamente dita. O tempo total de produção foi de 78 horas, no qual se encontrava estável, próximo de um ligeiro declínio.

Os biorreatores apresentaram variações de atividades específicas, as quais aumentaram com o passar do tempo. Desta forma, ao final dos experimentos, o *pool* enzimático resultou em valores próximos a 16 U/mg de proteína (Figura 5.9). Entretanto, nos três casos obtiveram-se diferentes atividades enzimáticas e concentrações de proteína. Seguindo a ordem decrescente destas variáveis de resposta, os melhores resultados foram obtidos nos experimentos realizados em pH 4,0 (4.882 U/L e 309 mg/L), 5,0 (2.850 U/L e 171 mg/L) e 3,0 (1.713 U/L e 135 mg/L).

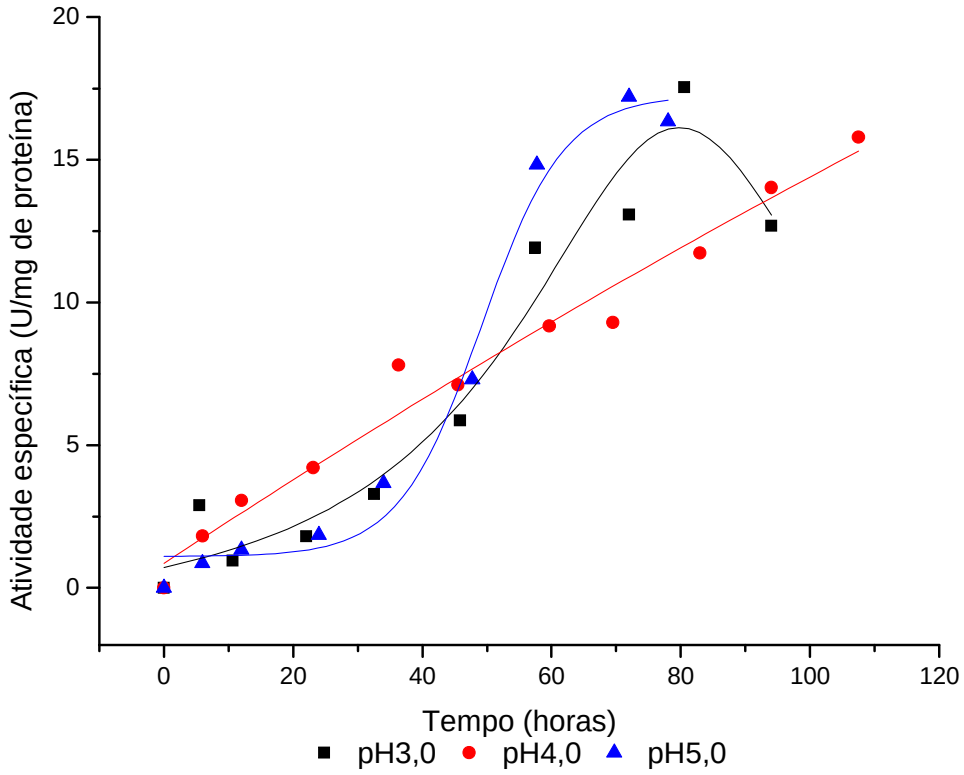

Figura 5.9. Atividade específica de β-glucosidases x tempo em processos conduzidos em pH 3,0, 4,0 e 5,0 (28℃ e 30% de oxi gênio dissolvido, em volume de meio de 3L), com composição de meio da melhor condição do planejamento experimental.

Em termos de produção de atividade β-glucosidásica, o biorreator conduzido em pH 4,0 apresentou os melhores resultados e a este comparam-se os valores de outros autores (Tabela 5.7), apresentando potencial biotecnológico.

Tabela 5.7. Produção de atividades da literatura.

Microrganismos	FC	Atividade β-glucosidásica	Referência
A. niger ATCC 6275	TP	26,8 U/g	Prasertsan *et al*. (1997)
T. reesei LM-UC4 e *A. phoenicis* QM 329	BC	17,0 U/g	Gutierrez-Correa *et al.* (1997)
T. reesei QM9414 e *A. niger terreus* SUK-1	BC	40,0 U/g	Massadeh *et al.* (2001)
A. niger KK2	PA	100,0 U/g	Kang *et al.* (2004)
T. reesei Rut C30 e *A. phoenicis* QM 329	E	640,0 U/L	Wen *et al*. (2005)
A. niger ATCC 16404	BC	1.836 U/L	Castro (2006)
A. niger MTCC7956	FT	2.840 U/L	Sukumaran *et al.* (2009)
A. niger MS82	DF	250 U/L	Sohail *et al.* (2009)
T. reesei Rut e *A. niger*	PM	1.400 U/L	Fang *et al*. (2010)
A. awamori	FT	45600U/L[1]	Gottschalk *et al.* (2010)
A. niger 1004	CPD	4.882U/L	Este Estudo (2011)

[1]Resultado após etapa de concentração; FC- Fonte celulósica; TP- Torta de Palmeira; BC- Bagaço de Cana; PA- Palha de Arroz; E- Esterco; FT- Farelo de Trigo; DF: Diversas fontes; PM- Palha de Milho; CPD- Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada.

Os valores obtidos neste trabalho foram superiores quando comparados aos encontrados por outros autores na produção de β-glucosidases, porém alguns dos trabalhos citados acima não tiveram como principal objetivo a produção de β-glucosidases e sim o complexo celulásico. Adicionalmente, alguns valores são meramente ilustrativos, pois se encontram em unidades diferentes e não podem ocorrer comparações.

5.4. Concentração do extrato bruto enzimático em *Hollow Fiber*®

Na tabela 5.8 são apresentados os valores de atividades relacionados às fases nas quais o material se classifica como extrato bruto, permeado e concentrado, assim como o seu fator de concentração para o material resultante do

experimento (preparado LADEBIO-AN), oriundo do meio fermentado sem células do experimento em biorreator que apresentou melhor resultado (realizado em pH 4,0).

Tabela 5.8. Etapas de concentração das β-glucosidases.

	Fator de concentração/L em função das β-glucosidases de meio de produção	**FPase (U/L)**	**CMCase (U/L)**	**β-glucosidase (U/L)**
Extrato bruto	-	Nd	60	4.297
Permeado	-	Nd	Nd	Nd
Concentrado	3,8	4	501	49.331

Nd- Não detectado

Ao final do processo de produção enzimática, 4.882 U/L de atividade β-glucosidásica foram obtidos. Após a separação do micélio e dos sólidos residuais por filtração em lã de vidro, verificaram-se perdas de aproximadamente 12%. Este material foi encaminhado ao sistema de membranas, tendo sido obtido um fator de concentração por litro de 3,8, correspondendo a um preparado enzimático com atividade β-glucosidásica de 49.331U/L. Apesar de se ter logrado sucesso na concentração do extrato enzimático bruto, as perdas foram relevantes, pois no estudo de Maeda (2010), integrante da equipe LADEBIO, usando o mesmo equipamento, o valor para o fator de concentração enzimática por litro foi de 7,6. Parte das perdas pode ser justificada, pois membranas com diâmetro de corte de 10 KDa permitem a passagem de moléculas de até 30 KDa, assim como enzimas auxiliares (MAEDA, 2010). Outra possibilidade deve-se ao fato de ter ocorrido o entupimento dos poros da coluna, resultante de uma filtração em lã de vidro não adequada, conduzindo a retenção de parte das enzimas no primeiro resíduo.

5.5. Caracterização do concentrado enzimático

Nesta seção, estão apresentados os resultados da caracterização parcial do preparado enzimático LADEBIO-AN. Primeiramente foi avaliada a estabilidade, nas temperaturas de 37℃ e 50℃ (usualmente utilizadas nos processos de SSF e SHF, respectivamente), bem como a temperatura de estocagem (4℃). Em seguida, os resultados relacionados ao efeito do pH combinado a temperatura também estão apresentados e discutidos à luz de um planejamento experimental . Por fim, um perfil eletroforético de β-glucosidases de *A. niger* foi também exibido e discutido.

5.5.1. Avaliação da estabilidade do concentrado enzimático

A Figura 5.10 apresenta a estabilidade do preparado LADEBIO-AN nas temperaturas de 37 e 50℃. Enquanto na temperatura de 37℃, a atividade se manteve praticamente estável perdendo apenas 5 pontos percentuais de sua atividade inicial, durante o período de 3 horas, foi notória a perda da estabilidade do preparado concentrado a 50℃, apresentando um tempo de meia-vida de aproximadamente 2 horas.

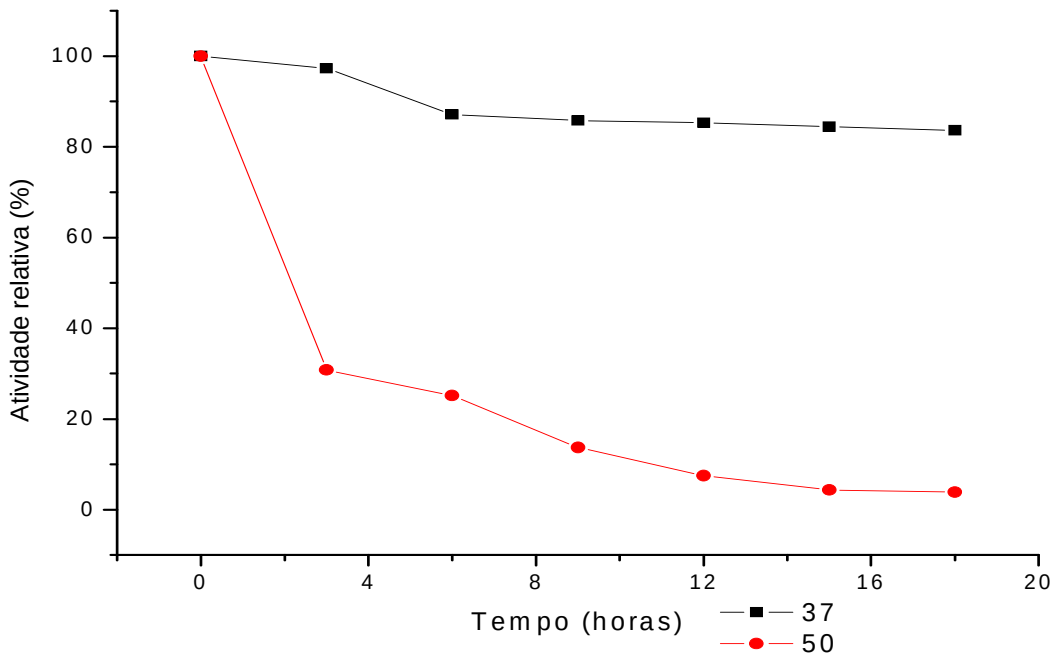

Figura 5.10. Estabilidade do preparado enzimático LADEBIO-AN a 37℃ e 50℃.

Como em 50℃ foram obtidos valores baixos de atividade relativa, não foi dada continuidade às medições com o decurso do tempo, porém tentou-se contornar a baixa estabilidade utilizando glicerol em uma concentração de 0,75% (v/v). No entanto, novamente em menos de 3 horas já havia passado o tempo de meia-vida do extrato enzimático. Em um novo experimento, adicionou-se glicerol 0,75% (v/v) e polietilenoglicol (2 g/L). Similarmente, o preparado enzimático concentrado continuou a perder sua estabilidade, atingindo o seu tempo de meia-vida em menos de 3 horas.

Para o experimento de estabilidade na temperatura de 37℃ continuaram-se as quantificações até 384 horas (Figura 5.11). Inicialmente, ocorreu uma leve perda de atividade no extrato enzimático, mas a partir de 50 horas a estabilidade enzimática permaneceu em aproximadamente 80% do valor inicial.

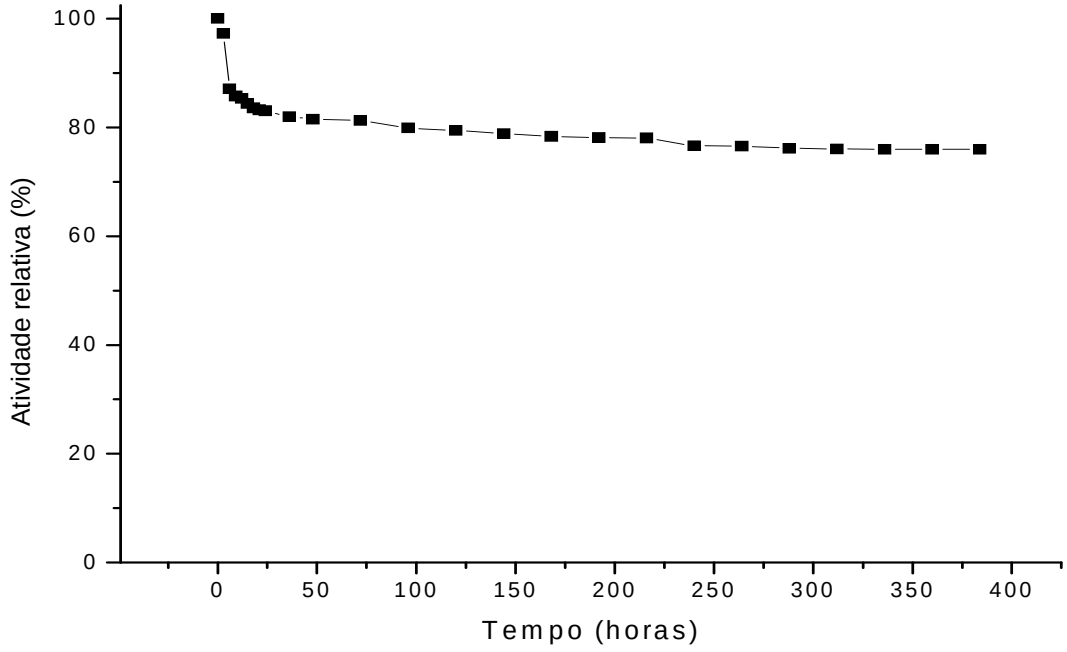

Figura 5.11. Estabilidade do preparado enzimático LADEBIO-AN a 37℃ por 16 dias.

O efeito da estocagem a 4℃ apresentou como medida de atividade relativa nos trinta primeiros dias, um valor de 99,5%, demonstrando uma destacável estabilidade. Confirmando este resultado, aos 60 dias o valor de atividade β-glucosidásica foi de 99,2%.

A incubação de extratos enzimáticos de mesofílicos, principalmente em temperaturas acima de 50℃, sob períodos de tempo e xtensos, provoca perda de atividade enzimática (LEHNINGER, 2006). Na literatura, são reportados diversos trabalhos sobre a produção de β-glucosidases de *Aspergillus* e a avaliação de sua estabilidade. Rashid e Siddiqui (1997) realizaram testes de estabilidade enzimática, incubando os sistemas em diferentes temperaturas, 50, 55, 60, 64 e 67℃, durante 200 minutos. Foi constatado que com o passar do tempo, quanto maior a temperatura, maior a taxa de inativação/desnaturação enzimática. Farinas *et al.*

(2010) avaliaram a atividade das β-glucosidase em temperaturas de 37 e 50℃, por 100 horas, observando ao final do experimento uma atividade próxima a 50% a 50℃ e de menos de 90% em 37℃ em relação à atividade re sidual. Elyas *et al*. (2010) testaram a estabilidade apenas por 6 horas, em temperaturas de 30, 40, 50 e 60℃, e ao final as atividades residuais se encontravam nas faixas de 81-91, 81-92, 81-89 e 15-20%, respectivamente.

Se ao meio reacional forem implementados incrementos na temperatura, que imprimem maior quantidade de energia cinética a moléculas participantes nas reações (enzimas e substratos), ocorrerá um maior número de colisões num menor período de tempo. Entretanto, uma enzima absorvendo energia demais pode resultar no rompimento de sua estrutura terciária, acarretando em sua desnaturação. De forma geral, espera-se que o aumento da temperatura aumente a atividade até um ponto ótimo, a partir do qual ocorre à desnaturação (CASTRO, 2006).

5.5.2. Avaliação da influência do pH e da temperatura sobre o extrato enzimático concentrado

Com o intuito de se melhorar o rendimento de hidrólise, o pH e a temperatura se tornam variáveis de fundamental importância. Em certos casos podemos usar uma menor carga enzimática em temperaturas ou valores de pH que permitem um melhor desempenho catalítico, ou seja, encontrar o ponto ótimo de hidrólise é uma condição *sine qua non* na otimização de qualquer processo químico ou bioquímico . Novamente, a ferramenta de planejamento experimental (DCCR de duas variáveis, Tabela 5.9) foi utilizada, avaliando-se a influência do pH e a temperatura sobre o extrato enzimático concentrado. Neste planejamento foram obtidas atividades variando de 11.100 U/L a 64.400 U/L, apresentando considerável variação.

A partir dos resultados do planejamento experimental pôde ser construído o Diagrama de Pareto (Figura 5.12) e o gráfico de superfície de resposta (Figura 5.13). O primeiro avalia a influência das variáveis, indicando como a mais importante, a temperatura (L), que apresentou efeito positivo, ou seja, maior temperatura, maior atividade. Por outro lado, o pH apresentou efeito negativo, ou seja, quanto menor o seu valor, maior atividade β-glucosidásica, indicando que a enzima alvo de nossos estudos atua melhor em valores de pH ácidos. Os maiores resultados foram

encontrados nos experimentos números 2 e 8, apresentando a dependência da atividade principalmente pelas elevadas temperaturas.

Tabela 5.9. Planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional.

N°do experimento	pH	Temperatura	Atividade (U/L)
1	-1	-1	23.743
2	-1	1	**51.516**
3	1	-1	11.615
4	1	1	22.835
5	-1,41	0	24.849
6	1,41	0	11.101
7	0	-1,41	21.531
8	0	1,41	**64.395**
9	0	0	40.849
10	0	0	39.388
11	0	0	40.573

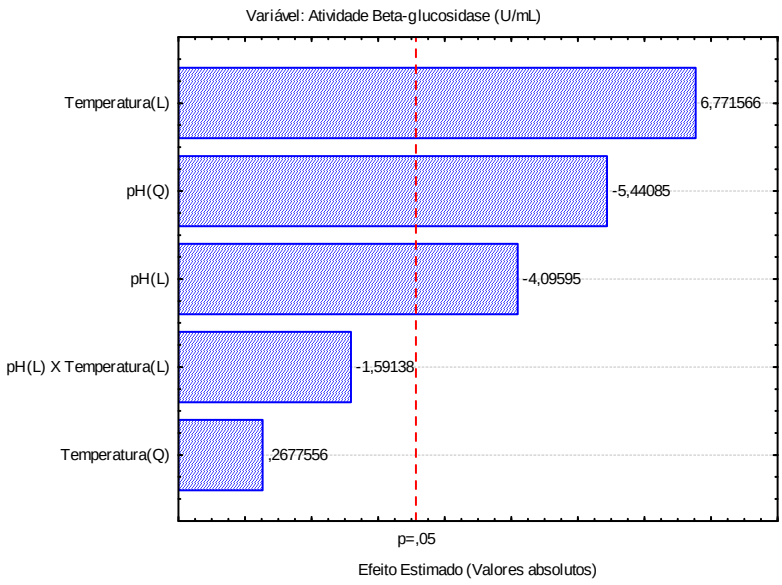

Figura 5.12. Diagrama de Pareto do Delineamento Composto Central Rotacional relacionado à atuação combinada do pH e da temperatura.

Na figura 5.13 observa-se a atuação combinada do pH e da temperatura sobre a atividade β-glucosidásica, e assim pode ser visualizado que os melhores valores foram encontrados na faixa de pH entre 3,6 e 5,2, e temperaturas variando

entre 47 e 52,7℃. O gráfico de superfície de respo sta corrobora o que foi exibido no diagrama de Pareto; ambos indicaram maiores temperaturas e menores valores de pH.

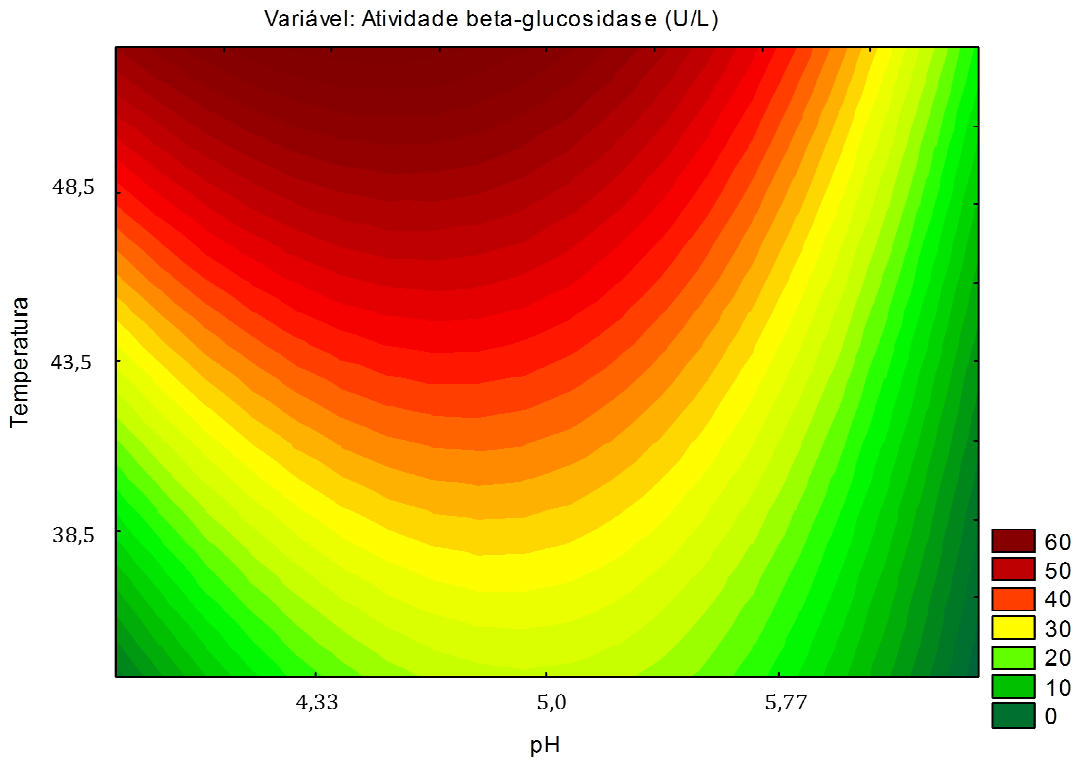

Figura 5.13. Gráfico de superfície e resposta da influência de pH e Temperatura.

Quando o pH e temperatura são avaliados sobre complexos celulásicos devem ser considerados a estabilidade e a atividade (SINGH *et al*., 2009). O melhor resultado em relação a atividade foi detectado experimentalmente em pH 5,0 e temperatura de 52,7℃. Porém, a atividade do preparado enzimático a 50℃ provocou perda de sua estabilidade e, desta forma, este preparado enzimático mostra um potencial maior para aplicações em temperaturas relacionadas a processos SSF (37℃), e valores de pH mais próximos da faixa de 4,0 a 5,0, o que também, se adequa ao processo SSF.

Singh *et al.* (2009) avaliaram o complexo celulásico produzido por *Aspergillus heteromorphus*, tendo sido analisados o efeito da concentração enzimática, a concentração do substrato, da temperatura e do pH (variáveis independentes) e como variável de resposta ou dependente, a atividade FPásica. A partir do trabalho, verificou-se as principais interações entre pH e temperatura. Entretanto, na análise

separadamente de cada variável, foi notória a maior importância da carga enzimática, seguida da concentração do substrato e por fim o pH e a temperatura. Ao final do experimento, observou-se a maior atividade em pH 4,8 e temperatura de 60℃.

Elyas *et al.* (2010) observaram que o ótimo de atividade foi encontrado em pH ácido, em uma faixa de 3,0 a 4,0 e as temperaturas de maior atividade em 60℃, após este valor as enzimas perdiam atividade. Farinas *et al.* (2010) investigaram faixas de pH (2,4 a 6,6) e temperatura (23 a 87℃), tendo sido o pH a variável mais importante. Os valores encontrados como ótimos de atividades foram em temperaturas variando de 35 a 60℃ e pH entre 4 e 5 ,5, sendo o melhor resultado observado no ponto central (pH 4,5 e temperatura 55℃). Watanabe *et al.* (1992) encontraram os melhores valores de atividade β-glucosidásica em temperatura de 55℃ e pH 4,5.

5.5.3. Avaliação eletroforética do preparado celulásico

A eletroforese em gel mais usada é a de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), para a determinação da massa molecular e pureza das moléculas. O dodecilsulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico que se liga fortemente às proteínas ocorrendo desta forma a sua desnaturação e fornecendo uma carga negativa constante por unidade de massa. Os complexos de SDS-proteínas irão se mover para o anodo durante o processo. Carregando o gel com proteínas-padrão, com massa molecular conhecida, as massas moleculares das amostras protéicas podem ser determinadas (COELHO, 2008).

Simultaneamente, foram realizadas as corridas nos géis, zimograma (Figura 5.14) em condições nativas e SDS-PAGE (Figura 5.15) em condições desnaturantes. Ambos com corrida de um padrão, duas corridas do extrato bruto e duas corridas com extrato concentrado. Foi possível identificar uma forma de β-glucosidase no extrato bruto e no concentrado. Neste último, além de uma forte banda, foi revelada também outra banda com massa molecular menor.

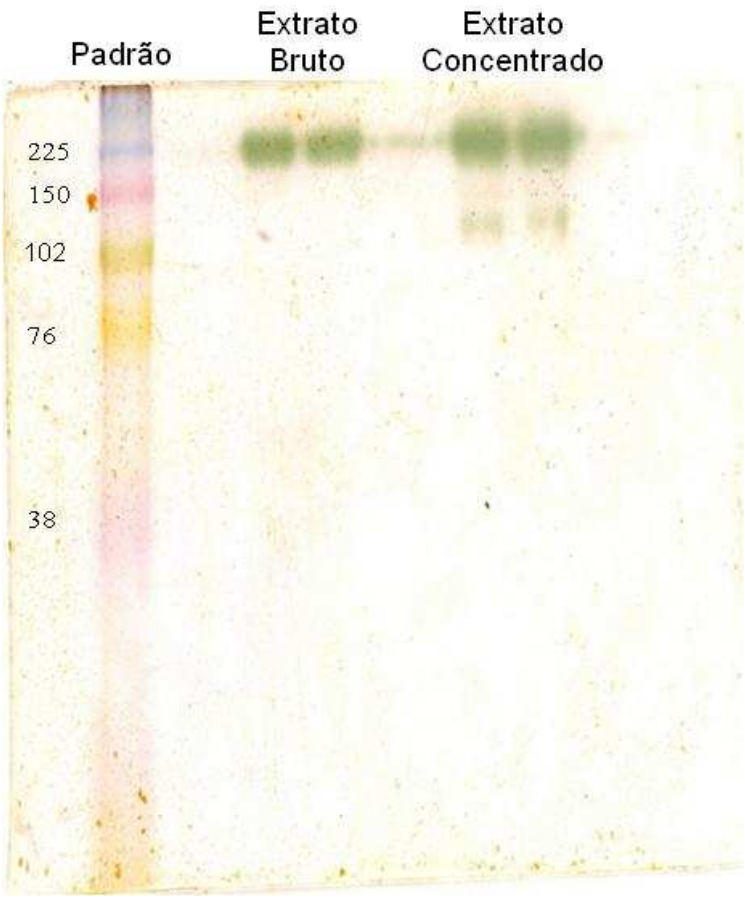

Figura 5.14. Zimograma de β-glucosidases corado com Esculim em condições nativas.

A precisão do tamanho da enzima só pode acontecer em condições desnaturantes (FERREIRA, 2010). Apenas o concentrado apresentou resolução nessa condição (Figura 5.15). No gel de SDS-PAGE, após analisado no *software* "Gel-*Pro Analyzer* 4.0", puderam ser identificadas bandas com as seguintes massas moleculares 167,9, 119,0, 95,0, 77,5, 72,5 e 67,6 KDa.

Como a primeira e a segunda banda encontradas no gel relacionada ao zimograma é a banda equivalente a primeira e segunda posição no SDS-PAGE, então as massas moleculares das enzimas β-glucosidases são provavelmente de 167,9 KDa (primeira banda) e 119,0 KDa (segunda banda), porém não se exclui a possibilidade desta última possuir massas moleculares de 94,5, 77,5, 72,0 ou 67,1KDa. Para a identificação e caracterização das massas moleculares seriam necessárias purificações das enzimas, desta forma com essa metodologia pode-se identificar o número de bandas e encontrar massas moleculares próximas das reais.

As massas moleculares das β-glucosidases do preparado LADEBIO-AN estão de acordo com a extensa faixa obtida por outros pesquisadores (Tabela 5.10).

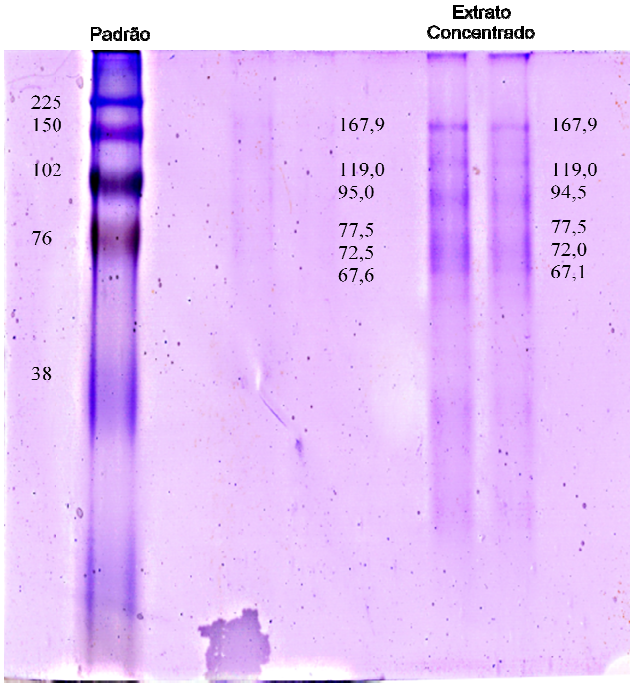

Figura 5.15. Gel SDS-PAGE proteínas desnaturadas com resultados obtidos software "Gel-Pro Analyzer 4.0" em condições desnaturantes

Tabela 5.10. Massas Moleculares de β-glucosidases.

Fonte	MM (KDa)	Referência
Talaromyces emersonii	135	Coughlan e McHale (1988)
Humicola insolens	250	Hayashida et al. (1988)
Aspergillus nidulans	50 e 125	Kwon et al. (1994)
Aspergillus niger CCRC31494	105	Yan e Lin (1997)
Aspergillus niger	330	Rashid e Siddiqui (1997)
Aspergillus oryzae	43	Riou et al. (1998)
Aspergillus niger MAS	48	Coutinho e Henrissat (1999)
Trichoderma harzianum	75	Yun et al. (2001)
Valvariela valvacea	380 e 97	Li et al. (2005)
Trichoderma harzianum	75 e 85	Rocha (2009)
Penicillium funiculosum	77,3	Maeda (2010)
Aspergillus-AS *58*	30, 33, 44 e 85	Elyas (2010)
Penicillium pinophilum	120	Joo et al. (2010)
Aspergillus niger 1004	167,9 e 119,0	Este estudo (2011)

MM: Massa Molecular

5.6. Avaliação do desempenho do preparado celulásico produzido, na hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina

Para avaliar o poder hidrolítico das β-glucosidases sobre a celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina, assim como investigar o possível sinergismo entre os preparados e compará-los, utilizou-se o preparado comercial Multifect e a este em diferentes experimentos foram adicionados os preparados enzimáticos do concentrado de *A. niger* e de outro preparado comercial com alta concentração em β-glucosidases.

5.6.1. Atividades dos complexos enzimáticos a 37℃ e 50℃

Como a metodologia de quantificação de atividade β-glucosidásica é realizada a 50℃, foi conduzido um estudo comparativo com a mesma metodologia, porém a 37℃ (Tabela 5.11). Os valores de atividade enzimática obtidos nas temperaturas mais baixas foram menores, como esperado, pois a atuação dos formulados enzimáticos geralmente apresentam melhores atividades em temperaturas a 50℃, uma vez que essas temperaturas são próximas ao ponto ótimo de suas atividades. Um exemplo pode ser o extrato Multifect apresentando valor 1,4 vezes maior de atividade quando comparado a sua atuação em temperatura de 37℃.

Tabela 5.11. Atividade dos complexos enzimáticos nas temperaturas de 37 e 50℃.

Extrato enzimático	T (℃)	FPásica (U/L)	CMCásica (U/L)	β-glucosidásica (U/L)	β-glucosidásica/ CMCásica
Multifect	37	153.115	2.411.030	67.820	-
	50	214.124	4.206.410	170.475	-
β-comercial	37	ND	14.595	313.450	21:1
	50	ND	19.849	1.057.778	47:1
LADEBIO-AN	37	ND	421	19.981	53:1
	50	ND	365	48.937	134:1

T- Temperatura; ND - Não Determinado

As atividades de β-glucosidases foram adicionadas de acordo com as relações estipuladas na metodologia IUPAC (na temperatura de 50℃), porém a hidrólise foi realizada a 37℃. Desta forma, com uma relação entre a atividade a 50℃ e atividade a 37℃, ao preparado β-comercial, o declínio da atividade β-

glucosidásica foi de 3,37 vezes e para o extrato LADEBIO-AN foi de 2,45. Outro fato relevante deve-se mesmo que pese o preparado LADEBIO-AN estar mais diluído, a razão entre as atividades β-glucosidásica e CMCásica é, aproximadamente, 2 vezes maior quando comparada com a do preparado β-comercial, independente da temperatura. Os dois resultados apontam para um melhor desempenho do preparado LADEBIO-AN.

5.6.2. Ensaios de hidrólise enzimática

De acordo com a seção 4.9, os experimentos foram separados em quatro grupos (Figuras 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19), apresentando o comportamento na hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e celulose microcristalina, em função do aumento da proporção de β-glucosidase:FPase (com a adição dos extratos LADEBIO-AN e β-comercial) de 0,8:1,0 (apenas comercial Multifect) para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

O primeiro experimento (Figura 5.16) relaciona-se à aplicação do extrato enzimático Multifect (0,8:1,0) isoladamente e a sua comparação com as misturas dos complexos celulásicos Multifect + LADEBIO-AN, nas proporções de β-glucosidase:FPase de 1,4:1,0 e 2,0:1,0. A produção de glicose aumentou de forma significativa quando foi elevada a quantidade de β-glucosidase, sendo encontrados valores de 20,4 (Multifect), 29,3 e 36,7 g/L de glicose, respectivamente. O extrato enzimático LADEBIO-AN potencializou a produção de glicose, resultante do aumento da razão β-glucosidase: FPase, fato este que deve ser entendido pelo sinergismo entre os extratos enzimáticos ensaiados.

A Figura 5.17 apresenta a produção de glicose a partir do mesmo extrato utilizado anteriormente, porém quantificando sua atuação sobre a celulose microcristalina (Avicel). Os resultados apresentaram concentração de glicose de 16,6 g/L, quando se empregou a proporção de β-glucosidase:FPase de 0,8:1,0,. Com o aumento da carga de β-glucosidase para 1,4:1,0 e 2,0:1,0, de produção de glicose foi aumentada passando a 24,2 e 22,7 g/L, correspondendo a aumentos de 1,46 e 1,37 vezes, respectivamente. Fica evidenciado que a proporção 1,4:1,0 de β-glucosidase:FPase é aquela que deverá ser empregada, por razões não só de

natureza técnica (maior sinergismo) como também a relacionada à economicidade (menor carga de β-glucosidases)

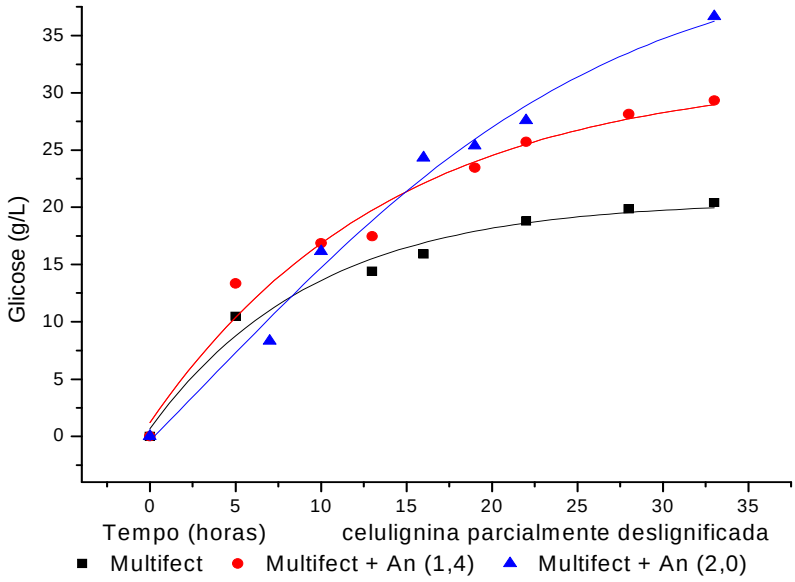

Figura 5.16. Hidrólise da **celulignina de bagaço de cana** parcialmente deslignificada (CPD), a 37℃, 200 rpm, na concentra ção de 100g CPD/L (68% celulose), com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático LADEBIO-AN nas proporções de β-glucosidase; FPase de 0,8:1,0 (controle); 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

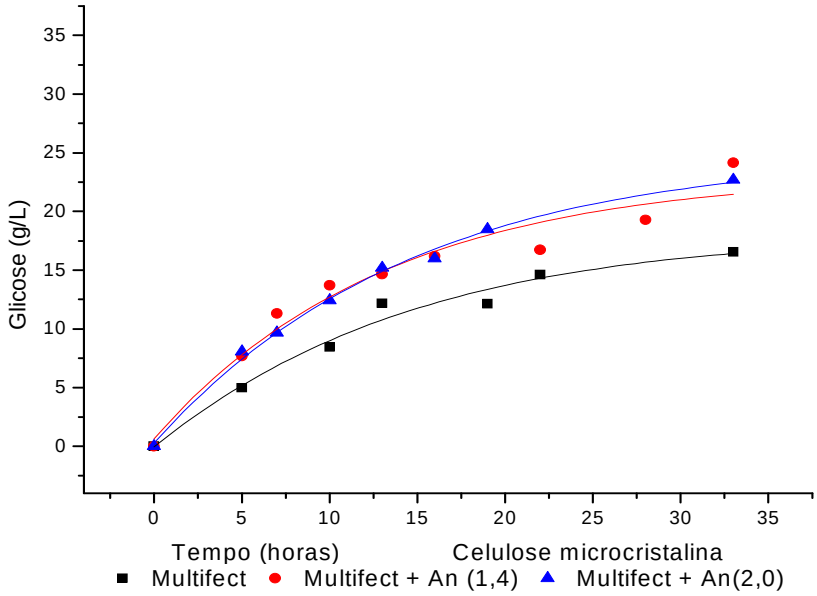

Figura 5.17. Hidrólise de **celulose microcristalina** (Avicel), a temperatura de 37℃, 200 rpm, na concentração de 68g Avicel/L, com carga enzimática de 25 FPU/g de

celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático LADEBIO-AN nas proporções de β-glucosidase; FPase de 0,8:1,0 (controle); 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

A hidrólise da celulignina parcialmente deslignificada a partir do preparado Multifect e da adição do preparado β-comercial (Figura 5.18) apresentou uma tendência similar independente da razão β-glucosidase:FPase utilizada, resultando em valores de concentração de glicose de 20,4, 18,8 e 20,0 g/L, quando se aumentou a proporção enzimática em estudo de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0: 1,0, respectivamente. O preparado β-comercial não apresentou o esperado sinergismo com o preparado Multifect sobre a celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada.

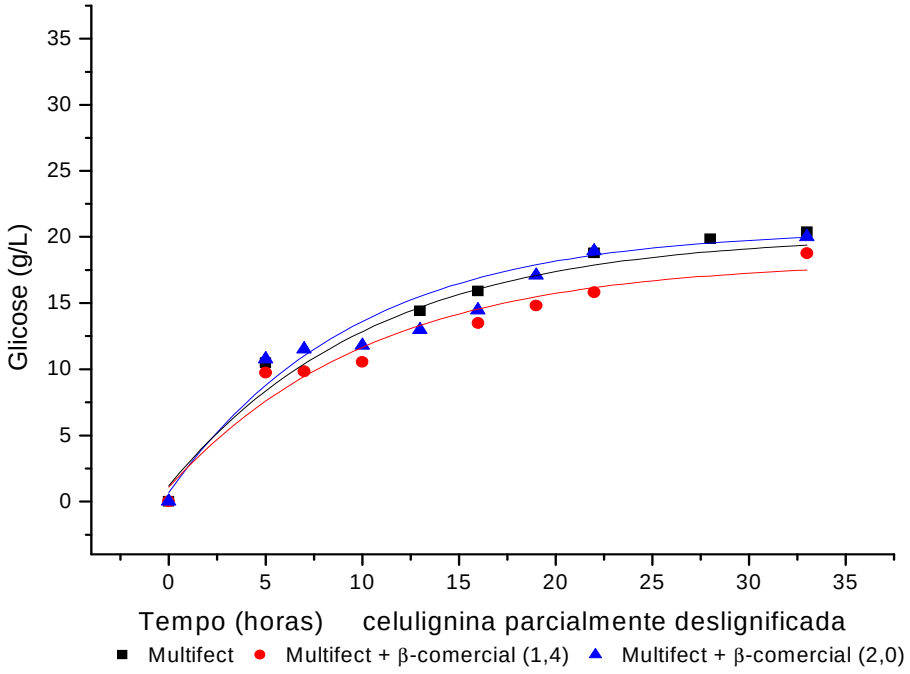

Figura 5.18. Hidrólise da **celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada**, a temperatura de 37℃, 200 rpm, na concentração de 100g/L (68% celulose), com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático β-comercial elevando a razão de β-glucosidase:FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

A Figura 5.19 apresenta os resultados da hidrólise enzimática de celulose microcristalina, empregando os extratos comerciais (Multifect e β-comercial), na qual se verificam pequenos incrementos na concentração de glicose quando se aumentou a razão de β-glucosidase:FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0. Os

resultados de concentração de glicose, em 22 horas de hidrólise enzimática, foram de 14,63, 15,99 e 17,29 g/L, respectivamente, correspondendo a aumentos de 1,09 e 1,18 vezes quando comparados ao experimento que continha apenas adição do extrato enzimático da Multifect.

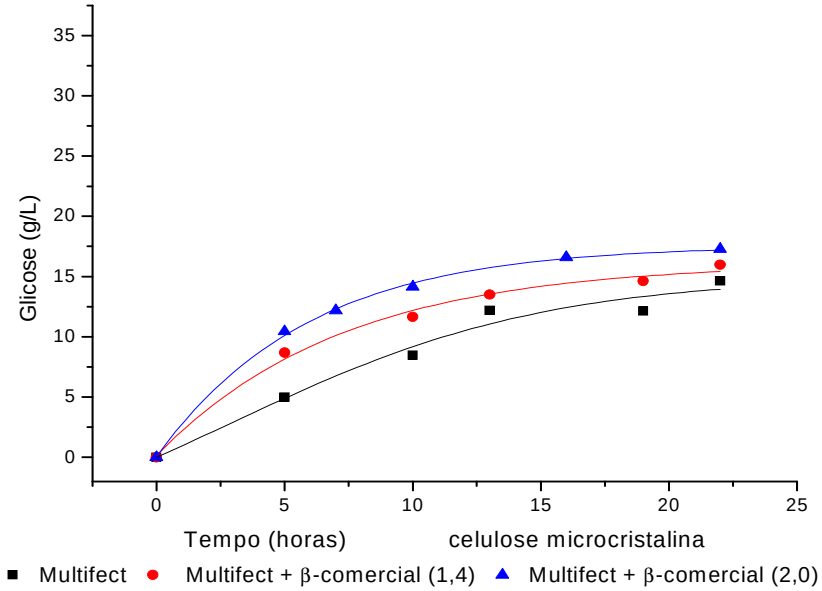

Figura 5.19. Hidrólise da **celulose microcristalina**, a temperatura de 37℃, 200 rpm, na concentração de 68g/L, com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose (pelo extrato Multifect), com a adição do preparado enzimático β-comercial elevando a razão de β-glucosidase:FPase de 0,8: 1,0 para 1,4: 1,0 e 2,0: 1,0.

Em uma comparação entre os extratos contendo proporção de 1,4:1,0 atuando sobre a celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada, o extrato enzimático LADEBIO-AN apresentou um sinergismo maior com o extrato Multifect demonstrando um desempenho bastante superior ao sinergismo do extrato enzimático β-comercial, fato esse também constatado na proporção 2,0:1,0. Para a celulose microcristalina o desempenho do extrato enzimático LADEBIO-AN com o extrato Multifect foi similar nas proporções de β-glucosidase:FPase de 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

A concentração de celobiose na hidrólise (Tabela 5.12) foi também determinada para todos os experimentos, sendo que em apenas três deles a presença deste dissacarídeo foi identificada. Dois destes três experimentos correspondem a sistemas contendo apenas o preparado comercial Multifect e o

terceiro àquele cuja relação β-glucosidase:FPase foi de 1,4:1,0, no qual foi empregado o extrato β-comercial.

Tabela 5.12. Concentração de celobiose nos experimentos de hidrólise.

Extratos enzimáticos	Fonte de celuloses	Faixa de concentração de celobiose (g/L)
Multifect	CPD	1,27-2,54
Multifect	Avicel	0,39-1,02
Multifect+β-comercial (1,4)	CPD	0,29-0,67
Multifect+β-comercial (1,4)	Avicel	Nd
Multifect+LADEBIO-AN (1,4)	CPD	Nd
Multifect+LADEBIO-AN (1,4)	Avicel	Nd
Multifect+β-comercial (2,0)	CPD	Nd
Multifect+β-comercial (2,0)	Avicel	Nd
Multifect+LADEBIO-AN (2,0)	CPD	Nd
Multifect+LADEBIO-AN (2,0)	Avicel	Nd

Nd - Não detectado; CPD - Celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada; Avicel - Celulose microcristalina

Os resultados revelaram a necessidade da adição de preparados enriquecidos com β-glucosidases ao preparado comercial Multifect, para a conversão total da celobiose.

5.6.3. Considerações gerais sobre hidrólise enzimática de substratos celulósicos

Os rendimentos de hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada (Figura 5.20) foram maiores, quando se empregou o preparado LADEBIO-AN. Devido ao sinergismo existente entre o preparado comercial Multifect com o preparado LADEBIO-AN, nas razões de β-glucosidase:FPase de 1,4:1,0 e 2,0:1,0, foram obtidos valores de rendimento de hidrólise de 39 e 49%, respectivamente, bem superiores ao atingido (27%) com o preparado Multifect. Em relação ao preparado β-comercial não foi verificado o esperado sinergismo, obtendo-se valores de rendimento de hidrólise similares ao alcançado com o preparado comercial Multifect (0,8:1,0), não havendo, portanto, potencialização de sua atuação.

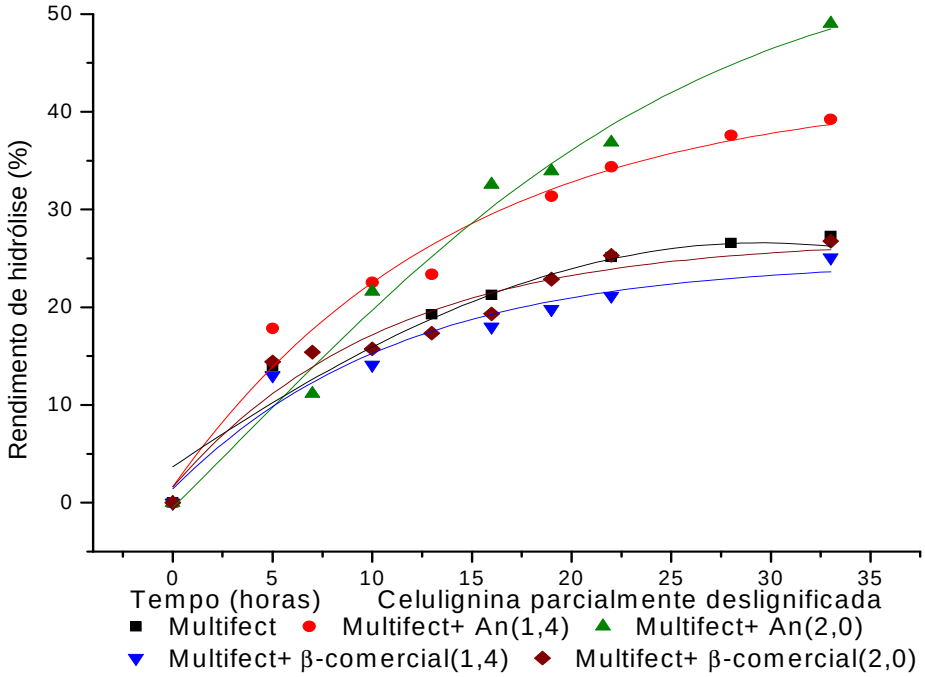

Figura 5.20. Rendimento de hidrólise da **celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada** na concentração de 100g/L (68% de celulose), a temperatura de 37℃, 200 rpm, com carga enzimática de 25 FPU/g de celulose e adição dos preparados enzimáticos LADEBIO-AN e β-comercial, elevando as proporções de β-glucosidase:FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

Os rendimentos de hidrólise de celulose microcristalina (Figura 5.21) foram similares quando se empregava tanto o preparado LADEBIO-AN quanto o β-comercial. Ressalta-se, no entanto, que os maiores resultados foram alcançados com um menor carga de β-glucosidases, proveniente do preparado LADEBIO-AN (razão 1,4:1,0 para o preparado LADEBIO-AN e 2,0:1,0 para o β-comercial), o que ratifica o maior sinergismo do preparado LADEBIO-AN quando comparado ao β-comercial com o preparado Multifect.

Os maiores rendimentos de hidrólise (aproximadamente 50%) atingidos com a celulignina de bagaço de cana quando comparados aos obtidos com celulose microcristalina (aproximadamente 30%) podem estar associados à amorfogênese da celulose de bagaço de cana decorrente do pré-tratamento ácido, como sinalizado por Arantes e Saddler (2010). A redução da cristalinidade da celulose torna este

importante polissacarídeo mais suscetível à hidrólise, como apontado por Pereira Jr. *et al.* (2008).

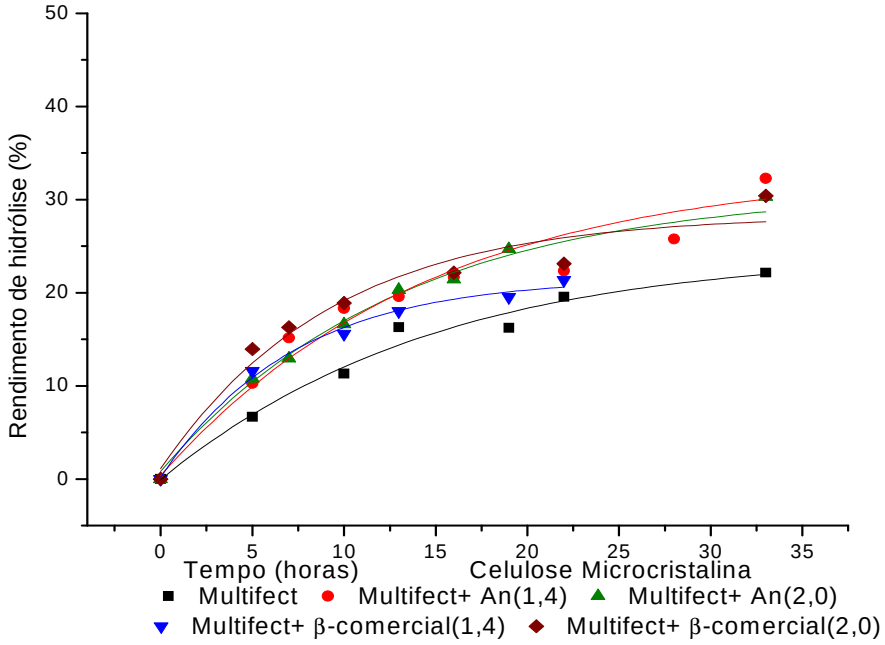

Figura 5.21. Rendimento de hidrólise da **celulose microcristalina** na concentração de 68 g/L, a temperatura de 37℃, 200 rpm, com carg a enzimática de 25 FPU/g de celulose e adição dos preparados enzimáticos LADEBIO-AN e do e β-comercial, elevando a proporção β-glucosidase: FPase de 0,8:1,0 para 1,4:1,0 e 2,0:1,0.

Os resultados obtidos na presente dissertação de mestrado podem ser comparados a outros reportados na literatura (Tabela 5.13). O preparado LADEBIO-AN mostrou excepcional potencial, devido ao fato de apresentar bom desempenho e poder ser empregado no desenvolvimento da tecnologia SSF, em temperaturas próximas de 37℃, diferentemente da grande maioria dos preparados comerciais que apresentam temperaturas ótimas de hidrólise e fermentação de acordo com o processo SHF, em 50℃ e 37℃, respectivamente.

Maeda *et al.* (2011) obtiveram melhores rendimentos de hidrólise (aproximadamente 94% de rendimento) quando empregaram o extrato comercial Multifect (12,5 FPU/g CPD) juntamente com preparados enzimáticos de *Penicillium funiculosum* (12,5 FPU/g CPD). No mesmo trabalho, os autores reportam que o preparado enzimático de *Trichoderma harzianum*, utilizado na mesma razão que de

P. funiculosum, resultou em rendimentos de hidrólise de 97,2%, em 18 horas de reação enzimática sobre a celulignina parcialmente deslignificada. Gottschalk *et al.* (2010) também constataram o sinergismo entre os preparados de *Trichoderma reesei* (61% de rendimento isoladamente) e *Aspergillus awamori* (36% de rendimento isoladamente), obtendo melhores resultados com misturas (rendimento de hidrólise de 81%), durante 72 horas de processo, atuando sobre o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

No estudo de hidrólise enzimática é importante destacar principalmente o tempo total de hidrólise para se obter um bom rendimento; a matéria-prima utilizada que determina a fonte para obtenção dos açúcares para produção de etanol de segunda geração; o transporte da matéria-prima; a temperatura a fim de se saber qual tecnologia a ser empregada (SSF ou SHF) e a carga enzimática, que influenciará o custo do processo. O extrato LADEBIO-AN complementou eficientemente o preparado comercial Multifect, principalmente na hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada, obtendo-se altos rendimentos de hidrólise em tempos relativamente curtos, na temperatura do processo de SSF (37℃).

A partir dos resultados obtidos pode-se verificar que o extrato LADEBIO-AN foi produzido em ótima concentração, podendo ainda ser melhorado. O mesmo foi caracterizado parcialmente, estimada a sua massa molecular, que se encontrou dentro das faixas conhecidas para β-glucosidases. Na sequência, mostrou-se estável para ser empregado no processo de SSF. Sua aplicação na hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada e em celulose microcristalina foi desenvolvida, obtendo-se melhores resultados para a primeira. A partir dos resultados descritos anteriormente, pode ser dado suporte as conclusões do trabalho.

Tabela 5.13. Rendimento de hidrólise apresentado na Literatura

Ext. enzimático/Microrg.	Subst.	Cel. (g/L)	t(h)	C. E. (FPU/g)	T(℃)	R (%)	Referência
Trichoderma reesei Rut C30	SM	20	24	15	45	59	Juhász et al. (2005)
Celuclast	Abeto	20	24	15	45	41	Juhász et al. (2005)
Celuclast + Novozym 188	Abeto	20[1]	72	15	48	82	Yang e Wyman (2006)
Trichoderma reesei + *Aspergillus niger*	SM	100[2]; 200[2]	48	20	50	84,5[2]	Chen et al. (2007)
Celuclast + Novo zym 188	PP	20	24	10	37	46	Martins et al. (2008)
Trichoderma reesei + *Aspergillus niger*	BC	20	48	50 (+5BG/g)	45	17,64	Sukumaram et al. (2009)
Trichoderma reesei + *Aspergillus niger*	BCPTAC	20	48	50 (+5BG/g)	45	15,82	Sukumaram et al. (2009)
T. reesei + *Aspergillus niger*	BCPTAL	20	48	50 (+5BG/g)	45	17,79	Sukumaram et al. (2009)
Trichoderma reesei + *Aspergillus niger*	Avicel	6,6	24	12(+2400BG)	45	71	Aswathy et al. (2010)
Trichoderma reesei + *Aspergillus niger*	Avicel	30	48	20	50	50	Fang et al. (2010)
Celluclast	Avicel	30	48	20	50	33	Fang et al. (2010)
Multifect + LADEBIO-AN	CPD	68	33	25(+50BG)	37	50	Este estudo (2011)

Ext. enzimático/Microrg. - Extrato enzimático/microrganismo; Subst.- Substrato; Cel. (g/L) - celulose (g/L); t(h)-tempo (h); C. E. (FPU/g)-Carga enzimática (FPU/g); T(℃)-Temperatura- R (%)-Rendimento (%); [1](56% de celulose); [2](100 inicial e 200 final batelada alimentada); BG - β-glucosidase ; FPU - Atividade de Papel de Filtro; SM - Sabugo de Milho; PP - Polpa de Papel; BC - Bagaço de Cana; BCPTAC- Bagaço de Cana pré-tratamento ácido; BCPTAL - Bagaço de Cana pré-tratamento Alcalino; ATA - Aguapé com Tratamento Alcalino; CPD – Celulignina de bagaço de cana Parcialmente Deslignificada.

6- CONCLUSÕES

1. O microrganismo *Aspergillus niger* ATCC 1004 apresentou grande potencial produtor de β-glucosidases. Os avanços na etapa de produção desta enzima resultaram em um aumento de 3,21 vezes quando comparado aos ensaios preliminares em frascos agitados, utilizando celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada como fonte de carbono.

2. A utilização da ferramenta de planejamentos experimentais sequenciais levou à produção máxima de β-glucosidases de 4.750 U/L, nas seguintes condições: temperatura, 28℃; agitação, 200rpm; $pH_{inical,}$ 3,32; concentrações de celulignina parcialmente deslignificada, Tween-80, $(NH_4)_2SO_4$ e KH_2PO_4, de 7,5 g/L, 7 mL/L, 4 g/L e 3g/L, respectivamente, em frascos agitados.

3. O perfil cinético da produção de β-glucosidases em biorreator apresentou melhor resultado em pH 4,0, validando os resultados obtidos na etapa dos planejamentos experimentais, havendo uma redução do tempo de processo em 36 horas, o que impactou positivamente a produtividade do processo (de 33,0 U/L.h para 45,2 U/L.h).

4. O concentrado enzimático LADEBIO-AN apresentou valores superiores ao reportados na literatura, mesmo tendo apresentado perdas significativas. O produto enzimático desenvolvido apresentou estabilidade à temperatura de aplicação para tecnologia de SSF, mostrando-se bastante estável a estocagem, com valores de perdas menores que 1%, em um período de 60 dias.

5. A influência do pH na atuação do extrato enzimático concentrado indicou melhores resultados para uma faixa mais ácida (4,0-5,0), e a temperatura apresentou os melhores resultados de atividade enzimática quando sua atuação dava-se na faixa de 50 a 52,7℃.

6. Duas bandas de β-glucosidases foram reveladas na eletroforese em condição nativas, e suas prováveis massas moleculares são de 167,9 e 119 KDa.

7. O rendimento de hidrólise da celulignina parcialmente deslignificada pelo extrato Multifect somado ao extrato LADEBIO-AN na proporção β-glucosidase:FPase de 2,0:1,0 foi de, aproximadamente, 50%. A mistura apresentou alto sinergismo e influenciou positivamente a hidrólise em cerca de 81% a mais em relação ao sistema contendo apenas o extrato comercial Multifect. Além disso, o extrato LADEBIO-AN apresentou melhor desempenho quando comparado ao β-comercial, não somente aplicado à celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada, bem como na celulose microcristalina (Avicel).

6.1. SUGESTÕES

Com intuito de se dar continuidade a esta temática, algumas sugestões são definidas:

Estudos mais detalhados focalizando o real papel de surfatantes, tendo em vista ter sido evidenciado seu efeito positivo na produção enzimática.

Avanços nas técnicas de concentração do extrato bruto enzimático, objetivando potencializar o extrato concentrado, assim como minimizar perdas.

Avaliação do preparado enzimático na hidrólise de materiais lignocelulósicos, aplicando o processo de hidrólise e fermentação simultâneas (SSF).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. New York. v. 42, n. 1, p. 41-46, 2008.

ALAFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins (fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos). Viçosa: Editora UFV, 1998, 574p.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. London. v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BÖJESSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G. The effect of tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*. New York. v. 33, n. 1, p. 71-78, 2003.

ARANTES, V.; SADDLEER. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. London. v. 3, p. 1-11, 2010.

ARNESEN, S.; ERIKSEN, S. H.; OLSEN, J.; JENSEN, B. E. Increased production of α-amilase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of tween 80. *Enzyme and Microbial Technology.* New York. v. 23, n. 3-4, p. 249-252, 1998.

ASWATHY, U. S.; SUKUMARAN, R. K.; DEVI, G. L.; RAJASREE, K.P.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Bio-ethanol from hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource Technology*. London. v. 101, n. 3, p. 925-930, 2010.

AWAFO, V. A. Biosynthesis of cellulases-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. 1997. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos e Química Agrícola) - McGill University, Montreal, 1997.

BABCOCK, B. A. A política do etanol dos EUA. Disponível em: <http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=1071> . Acessado em 03 jul. 2011.

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

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*. Barking. v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSOHP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DO ETANOL, 3; 2006, Campinas.

BETANCUR, G. J. V. Avanços em biotecnologia de hemicelulose para a produção de etanol por *Pichia stipits*. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* New York. v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. London. v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology.* London. v. 101, n. 13 p. 4754-4766, 2010.

CARDONA, C. A.; SANCHES , O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Biosource Technology*. London. v.98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidos a partir de celulignina de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum* spp.). 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova.* São Paulo. v. 33, n. 1, p. 1-12, 2010.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*. New Dehli. v. 47, n. 4, p. 323-328, 2007.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration & Biodegradetion*. Barking. v. 59, n. 2, p. 85-89, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. Planejamento de experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro: Epub, 2008, 280p.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: E-papers, 2003, 288p.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews.* Amsterdam. v. 29, n.1 , p. 3–23, 2005.

COUGHLAN, M. P.; MCHALE, A. Purification of β-D-glucosidase glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. *Methods in Enzymology*. Amsterdam. v. 160, n. 3, p. 437-443, 1988.

COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Carbohydrate enzymes: an integrated database approach. In “Recent Advances in carbohydrate bioengineering”, H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12, 1999.

ELYAS, K. K.; MATHEW, A.; SUKUMARAN, R. K.; ALI, P. P. M.; SAPNA, K.; KUMAR, S. R.; MOL, K. R. R. Production optmization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus*-SA 58. *New Biotechnology*. Amsterdam. v. 27, n. 4, p. 347-351, 2010.

FANG, X.; SHEN, Y.; BAO, X. QU, Y. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresource Technology*. London. v. 101, n. 13, p. 4814-4819, 2010.

FARINAS, C.S.; LOYO, M. M.; BARALDO JR, A.; TARDIOLI, P. W.; BARTUCCI NETO, V.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology*. London. v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

FERRAZ, F. O. Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e a fermentabilidade do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar a xilitol e etanol. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FERREIRA, V. Produção de β-glucosidases em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultêna à fermentação para a produção de etanol de segunda geração. 2010. Tese (Doutorado do programa de Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FOGEL, R. Otimização de hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e utilização do hidrolisado na produção de xilitol por *Candida ghillerondii*. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl Chem*. London. v. 59, n. 2, p. 257-238, 1987.

GOLTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, 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*. New York. v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology*. New York. v. 1, p. 138-146. 1955.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; 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*. Barking. v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GUO, G-L.; HSU, D-S.; CHEN, W-H.; CHEN, W-H.; HWANG, W-S. Characterization of enzymatic for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme and Microbial Technology*. New York. v. 45, n. 2, p. 80-87, 2009.

GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*. Barking. v. 68, n. 2, p. 173-178, 1999.

HAN, L. R.; ZHANG, S. X.; ZHU, C. S.; ZHANG, X. Screening and identification of superior fungus degraded cellulose. *Journal of Northwest A & F University.* Yangling. v. 36, n. 1, p. 169-174, 2008.

HAHN-HÄNGERDAL, 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*. Amsterdam. v. 24, n. 5, p. 549-556, 2006.

HANIF, A.; YASMEEN, A.; RAJOKA, M. I. Induction, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. Barking. v.94, n. 3, p.311-319, 2004.

HAYASHIDA, S.; OHTA, K. M. K. Cellulases from *Humicola insolens* and *Humicola grisea*. *Methods in Enzymology*. Amsterdam. v. 160, p. 323-332, 1988.

HELLE, S. S.; DUFF, J. B. S.; COOPER, D. C. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering.* New York. v. 42, n. 5, p. 611-617, 1993.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. Barking. v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, K.N. REVERA-HERNÁNDES, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*. Barking. v. 100, n. 3, p. 1238-1245, 2009.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products*. Amsterdam. v. 11, n. 1, p. 1-5, 2000.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*. Barking. v.40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.

JOO, A.; JEYA, M.; LEE, K, MOON, H.; KIM, Y.; LEE, J. Production and characterization of β-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry*. Barking. v. 45, n. 6, p. 851-858, 2010.

KAMM, B.; SCHNEIDER, U.; HUTTL, R. F.; GRUNEWALD, H.; GUSOVIUS, H-J.; STOLLBERG, C.; AY, P.; KAMM, M. Lignocellulosic Feedstock Biorefinery – Combination of technologies of agroforestry and a biobased substance and energy economy. Disponível em: < http://www-docs.tu-cottbus.de/pressestelle/public/Forum_der_Forschung/Heft_19/053-062_LignocellulosicFeedstockBiorefinery.pdf>. Acesso em 18 mai 2011.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. *Bioresource Technology*. Barking. v. 91, n. 2, p. 153-156, 2004.

KIM, J. K.; OH, B. R.; SHIN, H.; EOM, C.; KIM, S. W. Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochemistry*. Barking. v.43, n. 11, p. 1308-1312, 2008.

KLINKE, H. B.; AHRING, B. K.; THOMSEN, A. B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresourse Technology.* Barking. v. 82, n. 1, p. 15-26, 2002.

KLYOSOV, A. A. Principles of enzymatic degradation of cellulose. In: Idustrial enzyme engineering. Disponível em: http://aklyosov.home.comcast.net/~aklyosov/. Acessado em: 15 nov 2010. 2010.

KOVÁCS, K.; MEGYYERI, L.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β-glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology*. Amsterdam. v. 43, n. 1, p. 48-55, 2008.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies, *Bioresourse Technology.* Barking. v. 100, n. 6, p. 3948–3962, 2009.

KWON, K-S.; LEE, J.; KANG, H. G.; HAH, Y. C. Detection of ß-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology.* Washington. v. 60, n. 12, p. 4584-4586, 1994.

LEE, D.; OWENS, V. N.; BOE, A.; JERANYAMA, P. Composition of herbaceous biomass feedstock. Brokings: South Dakota State University Publication, 2007, 16p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER: Princípios de bioquímica, 4ª. Ed. São Paulo: Savier, 2007, 1202p.

LEHNINGER, A. L. Lehninger – Princípios de bioquímica, 4ª ed., São Paulo: Sarvier, 2006, 1232p.

LI, X. L.; LJUNGDAHL, L. G.; XIMENES, E. A.; CHEN, H.; FELIX, C. R.; COTTA, M. A.; DIEN, B. S. Properties of a recombinant β-glucosidases from polycentric anaerobic fungus orpinomyces PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Clifton. v. 113-116, p. 233-250, 2005.

LUO, L.; VOET, E. V. D.; HUPPES, G. Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Amsterdam. v. 13, n. 6-7, p. 1613-1619, 2009.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Amsterdam. v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MABEE, W. E.; SADDLER, J.N. Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in Canada. *Bioresource Technology.* Barking. v. 101, n. 13, p. 4806-4813, 2010.

MAEDA, R. N. Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração. 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA Jr., N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*. Barking. v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrates and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress.* London. v. 15, n. 5, p. 804–816, 1999.

MARTIN, C.; MARCET, M.; ALMAZAN, O.; JÖNSSON, L. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to sugarcane bagasse hydrolysate with hight content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology.* Barking. v. 98, n. 12, p. 1767-1773, 2007.

MASSADEH, M. I.; YUSOFF, W. M. W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, London. v. 23, n. 21, p. 1771-1774, 2001.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Ed.). Conversion of hemicellulose hydrolizates to ethanol. Washington: American Chemical Society Symposium, 1994, p. 292-294.

McMILLAN, J. D.; NEWMANN, M. M.; TEMPLETON, D. W.; MOHAGHEGHI, A. Simultaneous saccharification and cofermentation and dilute-acid pretreated yellow polar harwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. *Applied and Biochestry and Biotechnology.* Washington. v. 77-79, n. 1, p. 649-665, 1999.

NEVES, M.A.D. Bioethanol production from wheat milling by-products. 2006. Tese (Doutorado em Ciências da Vida e do Meio Ambiente) – Universidade de Tsukuba, Tsukuba, 2006.

NIEDUSZYNSKI, I. A.; PRESTON, R. D. crystallite size in natural cellulose. *Nature.* London. v. 225, p. 273-274, 1970.

OLSSON, L.; HAHN, H. B.; Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. New York. v.18, n. 5, p. 312-331, 1996.

OLSSON, M. H. M.; MAVRI, J.; WARSHEL, A. Transition state theory can be used in studies of enzyme catalysis: lessons from simulations of tunneling and dynamical effects in lipoxygenase and other systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* London. v. 361, n. 10, p. 1417-1432, 2006.

PALMERI, R.; SPAGMA, G. β-glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*. New York. v. 40, n. 3, p. 382-389, 2007.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context f biorefinery. Series on Biotechnology, 1st. ed., vol. 2, Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, 46p.

PEREIRA Jr., N.; BON, E. P. da S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. Série em Biotecnologia, 1ª. ed., vol. 1, Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, 63p.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied biochemistry and Biotechnology.* Washington. v. 51-52, n. 1, p. 117-124, 1995.

PRASERTSAN, P.; KITTIKUL, A. H.; KUNGHAAE, A.; MANEESRI, J.; OI,S. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Amsterdam. v. 13, n.5, p. 555-559, 1997.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*. New York. v. 101, n. 15, p. 5941, 2010.

RABINOVICH, M. L.; NGUEM VAN VIET; KLYOSOV, A. A. Synergism under concerted action of endoglucanases qith low and high affinity for cellulose. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*. Moscow. v. 22, n. 1, p. 70-79, 1986.

RASHID, M. H.; SIDDIQUI, K. S. Thermodynamic and kinetic study of stability of the native and chemically modified β-glucosidases from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. Barking. v. 33, n. 2, p. 109-115, 1998.

RIOU, C.; SALMON, J-M.; VALLIER, M-J.; GÜNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington. v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.

ROCHA, V. A. L. Produção de celulases por *Trichoderma harzianum* e aplicação do preparado enzimático na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de processos (uma estratégia seqüencial de planejamentos). Campinas: Casa do Pão, 2005, 326p.

ROMERO, M. D.; AGUADO, J.; GONZÁLEZ, L.; LADERO,M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*. Amsterdam. v. 25, n. 3-5, p. 244-250, 1999.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. Micologia veterinária: prática 8 [2002]. 12 f. Notas de aula. Impresso.

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.* New York. v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. 4th. ed. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures baarn delft, 195, 322 p.

SANTOS, S. F. M. Estudo para produção de pectinase por fermentação submersa em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SHIGECHI, H.; FUJITA, Y.; KOH, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and α-amylase. *Biochemical Engineering Journal*. Amsterdam. v. 18, n. 2, p. 149-153, 2004.

SINGH, A.; KUMAR, R.; BISHNOI, K.; BISHNOI, N. R. Optimization of synergistic parameters activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. New York. v. 48, n. 1, p. 28-35, 2009.

SINGH, A.; PANT, D.; KORRES, N. E.; NIZAMI, A. S.; PRASAD, S. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives. *Biosource Technology*. Barking. v. 101, n. 13, p. 5003-5012, 2010.

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*. New York. v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A., TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*. Barking. v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAM, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect temperature and pH. *New Biotechnology*. Amsterdam. v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B. S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus furmigatus* fresenius strain (AMA) capable of effcient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*. Amsterdam. v. 31, n. 2, p. 277-283, 2010.

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

SUKUMARAN, R. K.; SURENDER, V. J.; SINDHU, R.; BINOD, P.; JANU, K. U.; SAJNA, K. V.; RAJASREE, K. P.; PANDEY, A. Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. *Bioresource Technology*. Barking. v.101, n. 13, p. 4826-4833, 2010.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hidrolyses processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*. Guangzhou. v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M. C. M.; FAIRCHILD, T. R.; TAIOLI, F. Decifrando a Terra. São Paulo: Oficina de textos, 2000, 558p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 920p.

UNCTAD - UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT. Challenges and opportunities for developing countries in producing biofuels. Geneva: UNCTAD publication, 2006.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C., SOUZA JR., M. B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Washington. v. 136-140, n. 1-12, p. 141-154, 2007.

VEIGA FILHO, A. A. Novo ciclo do Proálcool: problemas derivados do aumento da produção de etanol. Disponível em: < http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/etanol/index.htm>. Acesso em 20 abr 2010.

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

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SATUCCI, M. C.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. *Revista de Nutrição*. Campinas. v. 1 6, n. 4, p. 423-432, 2003.

YAN, T. R.; LIN, C. L. Purification and characterization of a glucose-tolerant *β*-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC31494. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* Tokyo. v. 61, n. 6, p. 965-970, 1997.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flow through hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. *Bioresource Technology*. Barking. v. 99, n. 13, p. 5756-5762, 2008.

YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering.* New York. v. 94, n. 4, p. 2028-2032, 2001.

YEN SUN, J. C. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Cellulose.* Amsterdam. v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

YUN , S. I.; JEONG, C. S.; CHUNG, D. K.; CHOI, H. S. Purification and some properties of a β-glucosidases from *Trichoderma harzianum* type c-4. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. Barking. v. 65, n.9, p. 2028-2032, 2001.

WATANABE, T.; SATO, T.; YOSHIOKA, S.; KOSHJIMA, T.; KUWAHARA, M. Purification and properties of *Aspergillus niger β*-glucosidase. *European Journal of Biochemistry.* Berlin. v. 209, n. 2, p. 651-659, 1992.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*. Barking. v. 96, n. 4, p. 491-499, 2005.

WYMAN, C. E. Handbook on bioethanol: production and utilization. Washington: Taylor & Francis, 1996, 442p.

WU, Z.; LEE, Y.Y. Inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters.* Amsterdam. v. 19, n. 10, p. 977-979, 1997.

XIA, L. M.; CEN, P. L. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic wastw from the xylose industry. *Process Biochemistry*. Amsterdam. v. 34, n. 9, p.909-912, 1999.

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

ZHANG, Y-H., P. LYND, L. R. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thrmocellum. Applied and Environmental Microbiology.* Washington. v. 70, n. 3, p. 1563-1569, 2004.