UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Otimização do Cultivo de *Penicillium funiculosum* para a produção de hidrolases visando a sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica

Douglas de França Passos

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD*, Professor Emérito (EQ/UFRJ)

Aline Machado de Castro, *DSc* (CENPES-PETROBRAS)

Março de 2018

Otimização do Cultivo de *Penicillium funiculosum* para a produção de hidrolases visando à sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica

Douglas de França Passos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD*, Professor Emérito (EQ/UFRJ)

Aline Machado de Castro, *DSc* (CENPES-PETROBRAS)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Março de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

P289o

Passos, Douglas de França
Otimização do Cultivo de Penicillium funiculosum para a produção de hidrolases visando a sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica / Douglas de França Passos. -- Rio de Janeiro, 2018.
116 f.

Orientador: Nei Pereira Júnior.
Coorientadora: Aline Machado de Castro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Hidrolases. 2. Penicillium funiculosum. 3. Bagaço de cana-de-açúcar. 4. Hidrólise enzimática. 5. Farelo de Trigo . I. Pereira Júnior, Nei, orient. II. Castro, Aline Machado de, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Otimização do Cultivo de *Penicillium funiculosum* para a produção de hidrolases visando à sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica

Douglas de França Passos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

Aprovado em 20 de Março de 2018, por:

Professor Nei Pereira Jr., *PhD* – EQ/UFRJ (Orientador – Presidente da Banca)

Aline Machado de Castro, *DSc* – CENPES/PETROBRAS (Co-orientadora)

Professor Ivaldo Itabaiana Júnior, *DSc* – EQ/UFRJ

Ayla Sant'Ana da Silva, *DSc* – INT

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Adelson e Claudia, por confiarem em mim e investirem tempo e dinheiro na minha formação, sem vocês eu não teria alcançado nada. A vocês o meu agradecimento e amor. Agradeço também à minha irmã, por estar ao meu lado todo este tempo. Aos meus sobrinhos por me amarem e por me perturbarem mesmo quando eu precisava de silêncio, mesmo assim eu amo vocês.

Agradeço ao querido e amigo professor Nei por toda a orientação dada, por toda inspiração e perseverança. Seus ensinamentos são parte de mim agora, fazem parte do meu “DNA”, não é à toa que costuma chamar seus estudantes de recombinantes seus. Obrigado por confiar em mim.

Agradeço à minha orientadora Aline, que com sua inteligência, doçura e competência me orientou e transpassou a mim um pouco da sua experiência. Muito obrigado.

Agradeço ao professor Fernando Araripe e a professora Janice, da UnB, por terem me recebido em seus laboratórios para o desenvolvimento de parte do meu trabalho. Muito obrigado por serem tão receptivos e prestativos.

Agradeço ao David, por estar ao meu lado nesses anos que desenvolvi meu trabalho, sem a sua companhia a caminhada seria muito mais cansativa e menos prazerosa.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), por todo esse tempo em que estiveram comigo, pelos almoços no grêmio (dividindo o prato, é óbvio) e pelas conversas.

Agradeço aos meus amigos por estarem ao meu lado, me fazendo rir em momentos chatos e por me aturarem sempre. Amigos do 103 e 123, vocês são sensacionais.

Aos professores da Escola de Química pelos ensinamentos e experiências passadas a nós.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade de estudo.

Resumo

PASSOS, Douglas de França. **Otimização do Cultivo de *Penicillium funiculosum* para a produção de hidrolases visando à sua aplicação na desconstrução da biomassa lignocelulósica.** Dissertação (Mestrado em Engenharia em Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD*; Aline Machado de Castro, *DSc.*

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de um bioprocesso que maximize a produção de hidrolases por *Penicillium funiculosum* ATCC 11797, utilizando uma mistura otimizada de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (FT), que é reportado como um excelente provedor de proteínas, aminoácidos e vitaminas. Primeiramente, estudou-se o tempo de pré-inóculo, chegando-se às condições de 72h e proporção volumétrica de 10% em relação ao volume de meio de produção. Realizou-se um planejamento experimental DCCR para otimizar a concentração de CPD e FT, chegando a 15,1 g/L e 5 g/L, respectivamente. Duas configurações de biorreatores foram testadas, uma coluna de bolhas (CB) e um agitado mecanicamente (STR), sendo o último mais eficiente, gerando um coquetel enzimático concentrado que possui as seguintes atividades: FPásica de 13.767 U/L; CMCásica de 282.789 U/L; β-glucosidásica de 31.518 U/L; Avicelásica de 30.896 U/L; Xilanásica de 246.322 U/L e Proteínas Totais de 1.183 mg/L. Foi avaliado ainda o perfil eletroforético dos preparados obtidos, demonstrando, por exemplo, que há, provavelmente, uma única proteína de 134 kDa responsável pela atividade β-glucosidásica presente no concentrado. Realizou-se, também, avaliações do potencial hidrolítico dos concentrados obtidos. Não foram encontradas diferenças cinéticas de liberação de glicose pelos concentrados oriundos da CB e do STR, demonstrando a grande estabilidade do fungo em produzir as hidrolases, mesmo estando em condições reológicas distintas. Foi analisado o efeito da carga de sólidos no desempenho do coquetel durante hidrólise enzimática, chegando-se a 96,4% de eficiência em 72h (Carga de sólidos de 25g/L e carga protéica de 10mg/g). Estudou-se a adoção do regime em batelada alimentada de sólidos na hidrólise, o que gerou um xarope com 98,6 g/L de glicose, em 192h. Ao se reduzir a carga inicial de sólidos da batelada alimentada para 50 g/L, chegou-se na concentração de glicose de 84 g/L, porém na metade do tempo. Por último, averiguou-se a influência da adição de albumina e polietilenoglicol na ação enzimática, sendo este último mais eficiente, liberando 62% a mais de glicose (sinergismo de 1,62) do que sem a adição dos suplementos, demonstrando ser uma alternativa viável para se produzir um xarope rico em glicose.

Palavras-chave: Hidrolases; *Penicillium funiculosum*; Bagaço de cana-de-açúcar; Hidrólise enzimática; Farelo de Trigo.

Abstract

PASSOS, Douglas de França. **Optimization of *Penicillium funiculosum* culture for the production of hydrolases aiming at its application in the deconstruction of lignocellulosic biomass.** Thesis (Master in Chemical and Biochemical Process Engineering) - School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 2018

Advisors: Nei Pereira Jr., *PhD*; Aline Machado de Castro, *DSc.*

The general objective of this study is the development of a bioprocess that maximizes the hydrolases production by *Penicillium funiculosum* ATCC 11797, using an optimized mixture of partially delignified cellulignin (PDC) and wheat bran (WB), which is reported as an excellent source of proteins, amino acids and vitamins. First, the pre-inoculation time, which was 72 h and corresponded to 10% of the total volume of the production medium, was studied. A CCRD experimental design was used to optimize the concentration of PDC and WB, reaching 15.1 g/L and 5 g/L, respectively. Two configurations of bioreactors were tested, a bubble column (BC) and a stirred tank reactor (STR), the latter being more efficient, generating a concentrated enzymatic cocktail that had the following activities: FPase 13767 U/L; CMCase 282789 U/L; β-glucosidase 31518 U/L; Avicelase 30896 U/L; Xylanase 246322 U/L and Total Proteins 1183 mg/L. It was also evaluated the electrophoretic profile of the preparations obtained, demonstrating, for example, that there is probably a single 134 kDa protein responsible for β-glucosidase activity present in the concentrate. The hydrolytic potential of the obtained concentrates was also evaluated. No kinetic differences were found in glucose release from the BC and STR concentrates, demonstrating the great stability of the fungus in producing the hydrolases, even under different rheological conditions. The solid loading in the hydrolysis process for cocktail performance was analyzed, reaching 96.4% hydrolysis efficiency in 72h (25g/L solid loading and 10mg/g protein load). It was studied the adoption of the solid fed-batch in the hydrolysis, which generated a syrup with 98.6 g/L of glucose, in 192h. By reducing the initial solids loading for the fed-batch to 50 g/L,, the glucose concentration reached 84 g/L, but in half the process time. Finally, the influence of BSA and PEG4000F on the enzymatic action was investigated. The last one is more efficient, releasing 62% more glucose (synergism of 1.62) than without the addition of the supplements, proving to be a viable alternative to produce a glucose-rich syrup.

Keywords: Hydrolases; *Penicillium funiculosum*; Sugarcane bagasse; Enzymatic hydrolysis; Wheat bran

Sumário

1.Introdução 1
2.Objetivos 3
3.Revisão Bibliográfica 5
3.1. Produção de Cana-de-açúcar e Etanol: cenário nacional 5
3.2. Produção de Trigo e Farelo de trigo: cenário nacional 6
3.3. Composição do Farelo de Trigo 8
3.4. Biomassa Lignocelulósica 9
3.4.1 Celulose 11
3.4.2 Hemicelulose 12
3.4.3 Lignina 12
3.5. Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos 13
3.6. Glicosil Hidrolases (GH) 15
3.6.1Celulases (GH) 16
3.7. Sinergismo do Complexo Celulásico 18
3.8. Sinergismo do Complexo Celulásico com outras proteínas não hidrolíticas... 19
3.8.1 Módulo de ligação ao carboidrato (CBM) 19
3.8.2 Expansinas e swoleninas. 19
3.8.3 LPMOs 21
3.9. Produção de Hidrolases 21
3.10.Engenharia de Produto 23
4.Materiais e Métodos 26
4.1. Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar e caracterização da biomassa..... 26
4.2. Microrganismo utilizado: conservação, ativação e suspensão de esporos 29
4.3. Composição do meio de pré-inóculo e de produção 30
4.4. Avaliação do potencial produtor de uma linhagem mutante de *P. funiculosum* 31
4.5. Levantamento do perfil cinético de crescimento em glicose e lactose 31
4.6. Determinação da melhor fonte de carbono para produção de celulases e xilanases..... 32
4.7. Determinação da melhor carga de sólidos para produção de celulases e xilanases..... 33

4.8. Determinação do melhor tempo de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases..... 33
4.9. Determinação do tamanho de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases..... 34
4.10. Avaliação do potencial do farelo de trigo (FT) como indutor suplementar na produção de celulases e xilanases..... 34
4.11. Planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD..... 35
4.12. Validação do planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD 36
4.13. Comparação da produção enzimática em biorreator do tipo coluna de bolhas e biorreator agitado mecanicamente 37
4.14. Concentração dos Extratos Brutos Enzimáticos..... 38
4.15. Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) de bagaço de cana utilizando os preparados enzimáticos 40
4.15.1 Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos produzidos na coluna de bolha e no STR 40
4.15.2 Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos em diferentes cargas de sólidos..... 40
4.15.3 Hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos para uma carga de sólidos inicial de 100 g/L 41
4.15.4 Estudo da hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos e enzimas..... 41
4.15.5 Estudo do efeito sinérgico de BSA e PEG4000F na hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos 42
4.15.6 Quantificação dos açúcares por HPLC..... 43
4.15.7 Cálculo da Eficiência de Hidrólise (%)..... 43
4.16. Procedimentos analíticos 43
4.16.1 Preparo do reagente DNS 44
4.16.2 Preparo do tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5.0 44
4.16.3 Quantificação da atividade avicelásica..... 45
4.16.4 Quantificação da atividade β-glucosidásica..... 45
4.16.5 Quantificação da atividade CMCásica..... 46
4.16.6 Quantificação da atividade em Papel de Filtro (FPase)..... 46
4.16.7 Quantificação da atividade xilanásica 47
4.16.8 Determinação do teor de proteínas 47

4.16.9Eletroforese SDS-PAGE..... 47
4.16.10Zimogramas 48
5.Resultados e Discussão 50
5.1. Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar e caracterização das biomassas.. 50
5.2. Avaliação do potencial produtor de uma linhagem mutante de *P. funiculosum* 51
5.3. Perfil de Crescimento de *P. funiculosum* em glicose e lactose 52
5.4. Determinação da melhor fonte de carbono para produção de celulases e xilanases..... 52
5.5. Determinação da melhor carga de sólidos para produção de celulases e xilanases.....54
5.6. Determinação do melhor tempo de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases.. 56
5.7. Determinação do tamanho de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases..... 57
5.8. Avaliação do potencial do farelo de trigo (FT) como indutor suplementar na produção de celulases e xilanases..... 58
5.9. Planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD..... 60
5.10.Validação do Planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD 66
5.11.Comparação da produção enzimática em dois biorreatores diferentes: coluna de bolhas e agitado mecanicamente 68
5.12.Avaliação Eletroforética dos preparados enzimáticos produzidos..... 74
5.13.Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada de bagaço de cana utilizando os preparados enzimáticos obtidos 76
5.13.1Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos produzidos na coluna de bolha e no STR 76
5.13.2Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos com diferentes cargas de sólidos 77
5.13.3Hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos 79
5.13.4Estudo da hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos e enzimas..... 81
5.13.5Estudo dos efeitos sinérgicos de BSA e PEG4000F na hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos 84
6.Conclusão e Sugestões..... 86

7.Referências Bibliográficas 89

Índice de Figuras

Figura 3.1. Evolução da produção de cana-de-açúcar, bagaço e etanol no Brasil. Fonte: adaptado de UNICADATA (2017) 5

Figura 3.2. Produção de cana-de-açúcar no Brasil por regiões. Fonte: adaptado de UNICADATA (2017) 6

Figura 3.3. Evolução da produção de trigo, farelo de trigo, importação e exportação e suprimento nacional disponível no Brasil. Fonte: adaptado de ABITRIGO (2017) 7

Figura 3.4. Produção de Trigo no Brasil por regiões. Fonte: adaptado de ABITRIGO (2017) 8

Figura 3.5. Estrutura recalcitrante das fibras lignocelulósicas. Fonte: adaptado de SANTOS *et al.* (2012) 10

Figura 3.6. Estrutura da celulose com as ligações de hidrogênio. Fonte: adaptado de SANTOS *et al.* (2012) 11

Figura 3.7. Estrutura da hemicelulose com a representação da xilana. Fonte: adaptado de SANTOS *et al.* (2012) 12

Figura 3.8. Estrutura característica da lignina. Fonte: SANTOS *et al*. (2012) 13

Figura 3.9. Exemplo de uma CBH I atuando sobre uma fibrila de celulose. Fonte: adaptado de HIMMEL *et al.* (2000) 16

Figura 3.10. Modelos de ação do complexo celulásico sobre a fibra de celulose. Fonte: CASTRO & PEREIRA JR. (2010) 18

Figura 3.11. Representação da ação de expansinas entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose, rompendo as ligações de hidrogênio (setas vermelhas). Fonte: FRY (1994) 20

Figura 4.1 Aspectos do bagaço de cana *in natura* (A), após o pré-tratamento ácido somente (B), após o pré-tratamento básico somente 27

(C), após os pré-tratamentos ácido e alcalino consecutivos (D) e farelo de trigo cominuído (E).

Figura 4.2. Placas de PDA-Peptona para *P. funiculosum* 29

Figura 4.3. Sistema Multifors 2 utilizado para produção de hidrolases por *P. funiculosum* 32

Figura 4.4. Produção de enzimas em biorreatores instrumentados Coluna de Bolhas (A) e *STR* (B). 38

Figura 4.5. Sistema *Hollow Fiber* para Microfiltração (esquerda) e Ultrafiltração (direita). 39

Figura 5.1. Perfis de produção de β-glucosidases para os fungos nativos e mutante 51

Figura 5.2. Perfil cinético de crescimento de *P. funiculosum* em glicose 52

Figura 5.3. Perfis de produção de celulases, xilanases e proteínas utilizando bagaço in natura, CA, CAPD, CPD e Avicell 53

Figura 5.4. Perfis de produção de celulases, xilanases e proteínas utilizando diferentes cargas de CPD: 2, 5, 10, 15 e 20 g/L 55

Figura 5.5. Atividades máximas alcançadas no ensaio comparativo entre CPD (barras claras) e CPD+Farelo de Trigo (barras escuras) 58

Figura 5.6. Atividades máximas alcançadas no ensaio comparativo entre CPD (barras claras) e CPD+Amido (barras escuras) 59

Figura 5.7. Gráfico de Pareto para Fpase 61

Figura 5.8. Gráfico de Pareto para CMCase 62

Figura 5.9. Gráfico de Pareto para β-glucosidase 62

Figura 5.10. Gráfico de Pareto para Xilanase 63

Figura 5.11. Gráfico de Pareto para Proteínas Totais 63

Figura 5.12. Superfícies de resposta para FPase (A), CMCase (B), β-glucosidase (C), Xilanase (D) e Proteínas Totais (E) 66

Figura 5.13. Superfície de resposta para a função *Desirability* 67

Figura 5.14. Perfis Cinéticos de produção de celulases e β-glucosidases por *P. funiculosum* em biorreator do tipo coluna de bolhas 69

Figura 5.15. Perfis Cinéticos de produção de xilanases e proteínas totais por *P. funiculosum* em biorreator do tipo coluna de bolhas 69

Figura 5.16. Perfis Cinéticos de produção de celulases e β-glucosidases por *P. funiculosum* em biorreator do tipo STR 70

Figura 5.17. Perfis Cinéticos de produção de xilanases e proteínas totais por *P. funiculosum* em biorreator do tipo STR 70

Figura 5.18. Proporções relativas dos Extratos Brutos (EB) e concentrados (Conc) para a coluna de bolhas (CB) e STR 74

Figura 5.19. Avaliação Eletroforética dos preparados enzimáticos concentrados. Raia 1 – padrão de massa molecular (Pd); Raia 2 – Concentrado do biorreator STR e Raia 3 – Concentrado do biorreator em Coluna de Bolhas (CB). A: SDS-Page em condição desnaturante; B: zimograma para atividade β-glucosidase; C: zimograma para atividade CMCásica e D: zimograma para atividade Xilanásica 75

Figura 5.20. Perfis Cinéticos de hidrólise dos coquetéis produzidos nas diferentes conformações de biorreatores 76

Figura 5.21. Eficiências de Hidrólise (E.H.) para os dois coquetéis em diferentes tempos na hidrólise 77

Figura 5.22. Perfis Cinéticos de hidrólise para as cargas de sólidos testadas 78

Figura 5.23. Eficiências de hidrólise para as cargas de sólidos testadas 79

Figura 5.24. Perfil Cinético de liberação de glicose, carga de sólidos e E.H. para a hidrólise em batelada alimentada de sólidos 80

Figura 5.25. Perfil Cinético de liberação de glicose para a hidrólise em batelada alimentada de sólidos. Alimentação de sólidos em 6, 24 e 48h. CE = Carga Enzimática e BSA = Albumina Sérica Bovina 82

Figura 5.26. Eficiências de Hidrólise para as bateladas alimentadas de sólidos. Alimentação de sólidos em 6, 24 e 48h. CE = Carga Enzimática e BSA = Albumina Sérica Bovina 82

Figura 5.27. Grau de Sinergismo de BSA e PEG4000F na Hidrólise em bateladas alimentadas de sólidos. Alimentação de sólidos em 6, 24 e 48h 84

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Composição do farelo de trigo 9

Tabela 3.2. Classificação das celulases de acordo com o código EC, nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas 17

Tabela 3.3. Trabalhos sobre sinergismos entre proteínas acessórias e hidrolases encontrados na literatura 21

Tabela 4.1. Composição do meio de cultura utilizado no pré-inóculo de Penicillum funiculosum, otimizado por MAEDA (2010) 30

Tabela 4.2. Níveis aplicados ao DCCR 36

Tabela 4.3. Matriz do planejamento DCCR 36

Tabela 4.4. Componentes do reagente DNS. 44

Tabela 4.5. Composição do gel de separação e do gel de empilhamento para Eletroferese SDS-Page. 48

Tabela 5.1. Composição dos materiais lignocelulósicos e do farelo de trigo 50

Tabela 5.2. Produtividades volumétricas (Qp) máximas alcançadas para cada material utilizado 54

Tabela 5.3. Produtividades volumétricas (Qp) máximas alcançadas para cada carga de sólido 56

Tabela 5.4. Produtividades volumétricas (Qp) máximas alcançadas para cada tempo de pré-inóculo testado 57

Tabela 5.5. Produtividades volumétricas (Qp) máximas alcançadas para 10% e 5% de pré-inóculo 57

Tabela 5.6. Produtividades volumétricas (Qp) máximas alcançadas para CPD e CPD+FT 59

Tabela 5.7. Resultados para o planejamento DCCR de otimização de CPD e FT 61

Tabela 5.8. Tabela da ANOVA para a atividade PFásica 64

Tabela 5.9. Tabela da ANOVA para a atividade CMCásica 64

Tabela 5.10. Tabela da ANOVA para a atividade β-glucosidásica 65

Tabela 5.11. Tabela da ANOVA para a atividade Xilanásica 65

Tabela 5.12. Tabela da ANOVA para a Concentração de Proteínas Totais 65

Tabela 5.13. Tabela Valores preditos conforme função Desirability 67

Tabela 5.14. Produtividades volumétricas (Qp) máximas alcançadas para coluna de bolhas e STR 71

Tabela 5.15. Atividades enzimáticas das etapas de concentração do extrato da coluna de bolhas 72

Tabela 5.16. Atividades enzimáticas das etapas de concentração do extrato do STR 72

Tabela 5.17. Atividades enzimáticas específicas das etapas de concentração do extrato provenientes do biorreatores Coluna de Bolha e STR 73

Índice de Abreviações

AFEX: Ammonia Fiber Explosion (expansão de fibra com amônia)

ANOVA: Analysis of variance (análise de variância)

BC: bagaço de cana-de-açúcar

BG: β-glucosidase

BSA: Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)

CA: Celulignina Ácida

CAPD: Celulignina Alcalina Parcialmente Deslignificada

CB: coluna de bolhas

CBHI: celobiohidrolase tipo I

CBHII: celobiohidrolase tipo II

CBM: módulo de ligação ao carboidrato

CE: carga enzimática ou proteica

CMC: Carboximetilcelulose

CONC: concentrado enzimático

CPD: celulignina parcialmente deslignificada

CS: carga de sólidos

D: *desirability*

DCCR: Delineamento Central Composto Rotacional

DNS: ácido 3,5-Dinitrosalicílico

E.H.: Eficiência de Hidrólise

EB: Extrato bruto

EC: *Enzyme Commission*

EnG: endoglucanases

ExG: Exoglucanases

FES: Fermentação em Estado Sólido

FS: Fermentação em Submerso

FT: farelo de trigo

GH: glicosil hidrolase

GHs: glucanohidrolases

GS: Grau de Sinergismo

HPLC: Cromatógrafo Líquido de Alta Performance

kDa: kiloDalton

LPMO: Monooxigenases Polissacarídicas Líticas

PDA: Potato Dextrose Ágar (Meio ágar-batata-glicose)

PEG4000F: polietilenoglicol

QP: produtividade volumétrica

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

STR: stirred tank reactor (reator agitado mecanicamente)

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

TRIS: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (trisaminometano)

$Y_{X/S}$: rendimento de células por substrato consumido

β-glucosidase: atividade em celobiose

μ_X: taxa específica de crescimento

1. Introdução

Atualmente, as buscas por fontes alternativas de energia estão cada vez mais intensas. Na tentativa de se aumentar a produtividade e competitividade de biocombustíveis, o etanol celulósico surge como uma importante estratégia. Porém, para que sua tecnologia de produção se estabeleça, novas alternativas de processos devem ser pensadas. A hidrólise enzimática é, definitivamente, umas das melhores rotas de produção de um xarope de açúcares fermentáveis e esta deve ser estudada e aprimorada. Um dos grandes entraves para a tecnologia são as enzimas empregadas no processo, já que grande parte disponível no mercado é controlada por grandes empresas internacionais.

Como mencionado, estudos apontam que a hidrólise enzimática desse material se mostra uma alternativa bastante promissora, entretanto, os custos de produção e obtenção dessas enzimas ainda são elevados. Liu *et al* (2016) estimam que o preço das celulases pode atingir $0,1 a $0,4/galão de etanol, O custo porém pode ser mais elevado considerando o fluxo de mercado internacional no momento. Os autores afirmam ainda que o preço diminui se as enzimas forem produzidas *on-site*, ou seja, pela própria planta industrial.

O material lignocelulósico possui estrutura fibrosa, composta, principalmente, por celulose (40 a 60%), hemicelulose (20 a 40%) e lignina (15 a 25%) (SUN & CHENG, 2002). A sua conversão enzimática é realizada por hidrolases (celulases e xilanases). Existem três tipos principais de celulases: endoglucanases, que clivam as regiões internas da celulose; exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e β-glucosidases, que catalisam a hidrólise de oligossacarídeos solúveis, como a celobiose, convertendo-os à glicose (LYND *et al*., 2014). O sinergismo entre as enzimas ocorre na medida em que uma enzima atua, liberando um produto que será utilizado como substrato para outra enzima, aumentando o rendimento da hidrólise (MAEDA, 2010). Mais recentemente, pesquisas sinalizam a existência de um mecanismo sinérgico das celulases com proteínas acessórias que auxiliam a desagregação ou afrouxamento das fibras de celulose, facilitando a ação do complexo

enzimático (ARANTES & SADDLER, 2010). Já as xilanases atuam na fração hemicelulósica, hidrolisando as ligações β-1-4 da xilana, liberando, principalmente, D-xilose (SANTOS, 2011).

Diversos microrganismos são capazes de produzir celulases e xilanases. Estudos realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química da UFRJ mostram que fungos como *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger* são excelentes produtores de hidrolases em fermentações submersas (MAEDA, 2011; DIAS, 2011; OLIVEIRA, 2013; ROCHA, 2013). *P. funiculosum* é considerado um bom produtor de hidrolases, sendo capaz de produzir um sistema celulásico completo (RAO *et al*.,1984), já tendo sido observada a produção de um extrato contendo quantidades balanceadas de hidrolases (CASTRO *et al*., 2010).

Portanto, o desenvolvimento de um bioprocesso de produção tanto das enzimas como dos processos hidrolíticos em âmbito nacional é de extrema importância para o sucesso do etanol de segunda geração brasileiro. Este trabalho tem como objetivo principal maximizar a produção de hidrolases por *P. funiculosum*, gerando um coquetel enzimático de alta eficiência, através da utilização das técnicas de engenharia de produto.

2. Objetivos

A procura por novas fontes de energia, independentes à cadeia de produção de petróleo e mais ecologicamente amigáveis, vem crescendo a cada ano. O bioetanol emergiu como uma potencial alternativa energética e é alvo de estudos e pesquisas mundiais. Nesse sentido, o Brasil vem avançando a cada ano em estudos relacionados à produção de etanol de segunda geração, que utiliza o bagaço de cana-de-açúcar gerado da produção de etanol de primeira geração. Contudo, para a viabilidade técnica e econômica desse processo, um preparado enzimático hidrolítico otimizado deve ser produzido *in situ*. Dessa forma, o presente projeto possui os seguintes objetivos:

- **Objetivo Geral:**

Maximizar a produção de hidrolases por *P. funiculosum*, gerando um coquetel enzimático de alta eficiência, através da utilização das técnicas de engenharia de produto.

- **Objetivos específicos:**
  - Testar uma linhagem mutante de *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 presente no LADEBIO/UFRJ;
  - Selecionar entre o fungo mutante ou nativo para prosseguimento aos experimentos;
  - Avaliar os parâmetros cinéticos do fungo em glicose e lactose como fonte de carbono;
  - Determinar a melhor fonte de carbono para produção de celulases e xilanases;
  - Determinar a carga de sólidos para produção de celulases e xilanases;
  - Determinar o tempo e a concentração de pré-inóculo;
  - Avaliação do potencial do farelo de trigo como indutor suplementar na produção das hidrolases;

- Otimizar a proporção entre farelo de trigo e celulignina parcialmente deslignificada (CPD) no meio de produção por meio de um DCCR;
- Avaliar o potencial de um biorreator agitado pneumaticamente na produção de hidrolases: coluna de bolhas;
- Concentração por micro e ultrafiltração dos extratos brutos produzidos e determinação das atividades enzimáticas nas diferentes frações;
- Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos, comparando os tipos de biorreatores (coluna de bolhas e STR);
- Avaliação hidrolítica do preparado em diferentes cargas de sólido;
- Avaliar a utilização de batelada alimentada de sólidos na hidrólise de CPD, utilizando o preparado concentrado;
- Avaliar a utilização de BSA e PEG4000F como agentes suplementares nas hidrólises em batelada alimenta de sólidos.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Produção de cana-de-açúcar e etanol: cenário nacional

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na última safra, 2016/2017, foram produzidas 652 milhões de toneladas, como pode ser observado na Figura 3.1. Uma grande parcela desse total (50 a 60%) é direcionada à produção de etanol, que segue a mesma tendência histórica que a produção de cana. Em 2016/2017 pouco menos de 28 bilhões de litros de etanol de primeira geração foram produzidos através da moagem primária da cana (caldo) (UNICADATA, 2017).

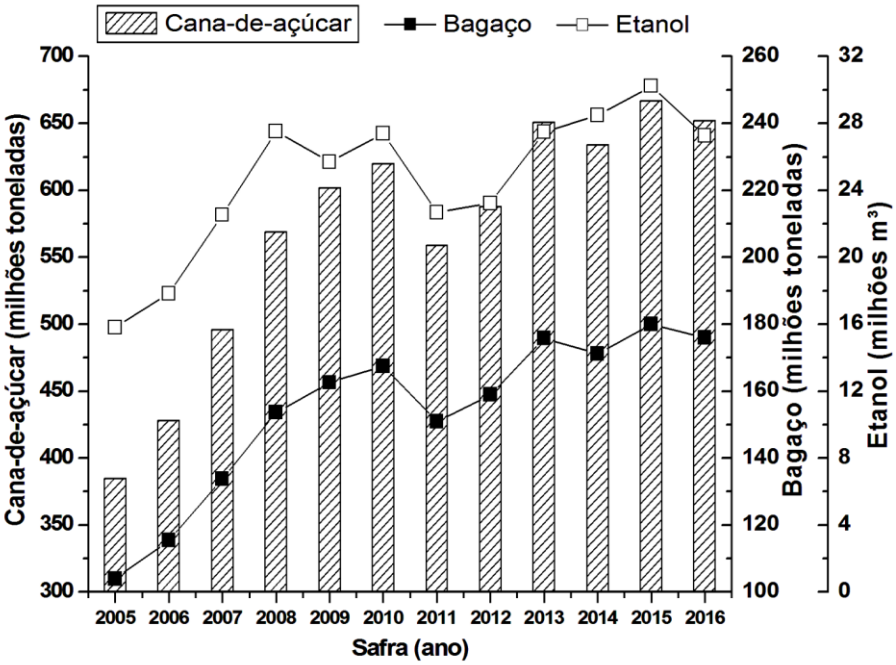

Figura 3.1. Evolução da produção de cana-de-açúcar, bagaço e etanol no Brasil. Fonte: adaptado de UNICADATA (2017)

No cenário nacional, a região Sudeste, destacando o estado de São Paulo, corresponde a 66% de toda a produção e o grande eixo Sul-Centro-Sudeste corresponde a 93% na última safra de 2016/2017, como

visto na Figura 3.2. Portanto, a região produtora de mais impacto no país é a Sudeste.

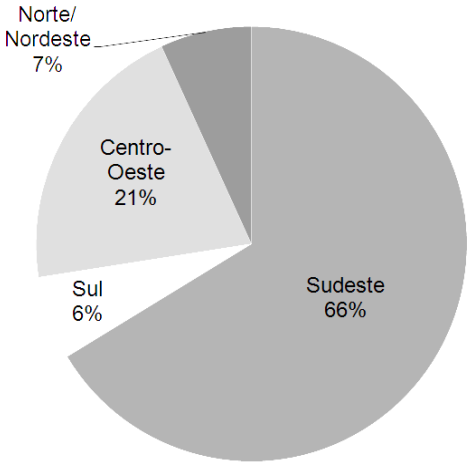

Figura 3.2. Produção de cana-de-açúcar no Brasil por regiões.
Fonte: adaptado de UNICADATA (2017)

Estima-se que em torno de 27% em massa do total de cana-de-açúcar seja referente ao bagaço (FIESP/CIESP, 2001), um subproduto gerado no processamento da cana, sendo assim, na safra de 2016/2017 foram produzidos 176 milhões de toneladas (Figura 3.1). Grande parte deste resíduo é utilizado para a geração de energia direta através da sua queima controlada nas próprias usinas, porém ainda há um excedente gigantesco e o mesmo pode ser utilizado para a geração de produtos com maior valor agregado. Como é o caso dos biocombustíveis e de outras biomoléculas de interesse industrial, pois esta biomassa se trata de um material lignocelulósico com enorme aplicabilidade biotecnológica.

3.2. Produção de Trigo e Farelo de trigo: cenário nacional

O Brasil correspondeu a 0,89% da produção mundial de trigo na safra de 2016, não sendo reportado como um grande produtor deste cereal. Mesmo assim, a produção nacional em 2016 correspondeu a 6,7 milhões de toneladas, valor que não garante o suprimento interno do cereal, que em grande parte é direcionado ao consumo humano. Na safra de 2016/2017 foram importadas cerca de 6 milhões de toneladas, ou seja 89% da produção nacional

(ABITRIGO, 2017). Estima-se que 20-25% do trigo seja referente ao farelo (porção excedente ao endosperma) (EVERS & MILLAR, 2001), o que corresponde a 3,4 milhões de toneladas de farelo produzidas na safra de 2016/2017. A Figura 3.3 retrata o cenário brasileiro em produção de trigo, farelo de trigo, assim como a importação e exportação do cereal.

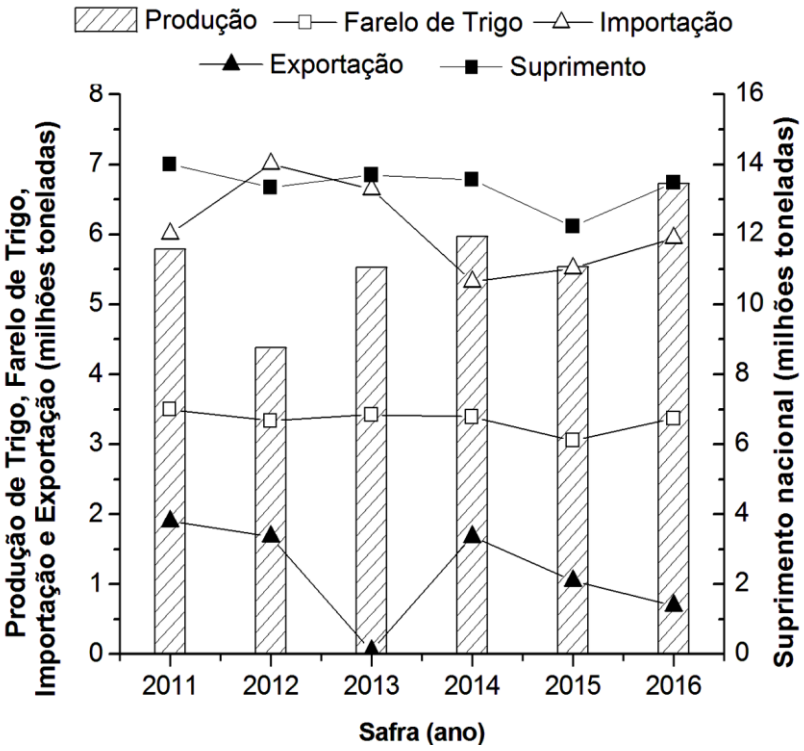

Figura 3.3. Evolução da produção de trigo, farelo de trigo, importação e exportação e suprimento nacional disponível no Brasil. Fonte: adaptado de ABITRIGO (2017)

A região Sul do país corresponde a 42% de toda produção, seguida da região Norte/Nordeste com 30%, Sudeste com 25% e Centro-oeste com 3% (FIGURA 3.4). Novamente, o macro eixo Sul-Centro-Sudeste corresponde com mais da metade da produção nacional, 70% na safra 2016/2017. Sendo esta a mesma região onde a cana-de-açúcar é produzida, a utilização do farelo de trigo na produção de enzimas celulolíticas pode ser facilitada, pois os mesmos embargos e soluções em logística serão, praticamente, os mesmos.

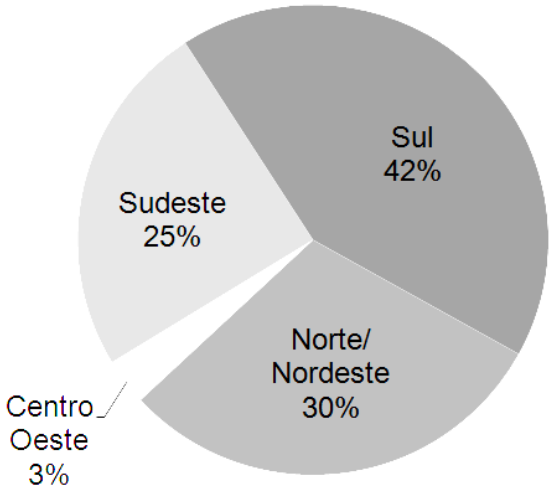

Figura 3.4. Produção de Trigo no Brasil por regiões.
Fonte: adaptado de ABITRIGO (2017)

3.3. Composição do Farelo de Trigo

O farelo de trigo é uma biomassa de composição variada, contendo amido, vitaminas, proteínas, aminoácidos, sais minerais. Generoso *et al* (2008) determinaram a composição química do farelo de trigo, resultando em 15,12% em massa do farelo correspondente ao teor de proteína bruta, 8,9% em fibra bruta e 4,35% em matéria mineral. No trabalho de Nunes *et al* (2001) pode-se encontrar uma caracterização química semelhante à anterior, na qual o farelo de trigo foi reportado contendo 16,78% em massa de proteína bruta, 9,99% de fibra bruta, 4,55% de lignina, 8,29% de celulose e 4,82% de material mineral. De acordo com o site do Departamento de Informática em Saúde da Escola Paulista de Medicina (http://www.tabnut.dis.epm.br/ - acessado em Outubro de 2017), é encontrado no farelo de trigo quantidades interessantes de vitaminas, como as vitaminas E e K, e aminoácidos, como glutamato e arginina. A Tabela 3.1 reporta alguns dos componentes principais do farelo de trigo.

Tabela 3.1. Composição nutricional do farelo de trigo

Categoria	Componente	%(m/m)
Principais	Proteína	15,55
	Gorduras totais	4,25
	Carboidratos	64,51
	Água	9,89
	Cinzas	5,80
Minerais	Fóforo	1,01
	Potássio	1,18
	Cobre	0,001
	Magnésio	0,61
	Manganês	0,012
Vitaminas	Vitamina E	0,0015
	Niacina	0,014
	Vitamina B6	0,0013
	Colina	0,074
	Vitamina K	$1,6*10^{-6}$
Aminoácidos	Arginina	1,09
	Glutamato	2,87
	Aspartato	1,13
	Prolina	0,88
	Leucina	0,93

Fonte: EPM-UNIFESP (http://www.tabnut.dis.epm.br/- Acessado em Outubro de 2017)

Todos os componentes relatados são importantes na produção de celulases por fungos filamentosos. Wayman & Chen (1992) reportam que as proteínas presentes são essenciais para uma boa produção de celulases, pois suprem o metabolismo do fungo e reduzem gastos com outros suplementos como peptona e uréia. SUN *et al*. (2007) comprovam através de seus experimentos que a presença de oligossacarídeos, proteínas e minerais presentes no farelo induzem uma maior produção de celulases.

Logo, o farelo de trigo configura uma excelente fonte de proteínas, minerais, vitaminas e aminoácidos para o crescimento do fungo produtor de celulases, podendo ser utilizado como suplemento do meio de cultivo já contendo outra biomassa indutora como o bagaço de cana-de-açúcar.

3.4. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima renovável e de grande importância, já que suas moléculas constituintes podem ser usadas para a

produção de diversos produtos, como o etanol (VASQUÉZ *et al*, 2007). Em sua estrutura também podem ser encontrados compostos nitrogenados, resinas, taninos, sais minerais, entre outros compostos. Figura 3.5 retrata a composição das fibras lignocelulósicas.

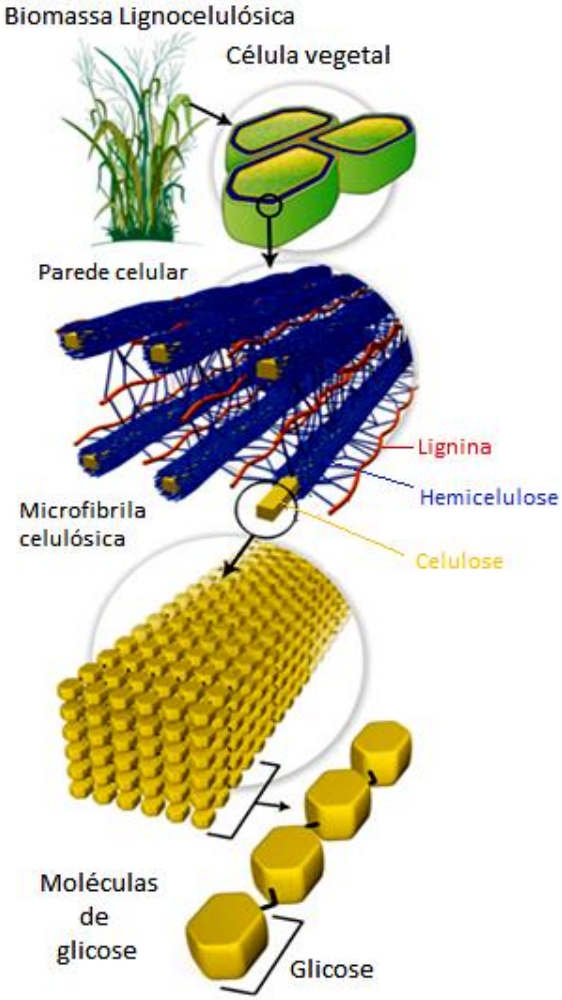

Figura 3.5. Estrutura recalcitrante das fibras lignocelulósicas.
Fonte: SANTOS *et al.* (2012)

O material lignocelulósico possui estrutura fibrosa, composta em grande parte por celulose (40 a 60%), hemicelulose (20 a 40%) e lignina (15 a 25%) (SUN & CHENG, 2002). Internamente, as fibrilas de celulose se encontram na forma de espirais, conferindo força e flexibilidade ao material, sendo envolvida pela lignina, que aumenta a resistência estrutural tanto ao ataque químico quanto ao enzimático. Já a hemicelulose faz a conexão entre a celulose e a lignina.

3.4.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo, composto por moléculas de glicose unidas por ligações β(1-4), formando uma cadeia polimérica linear e plana (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

A celulose tem como unidade de repetição a celobiose. As ligações de hidrogênio formadas determinam a rigidez da fibrila de celulose, dando uma alta resistência ao ataque de hidrólise (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

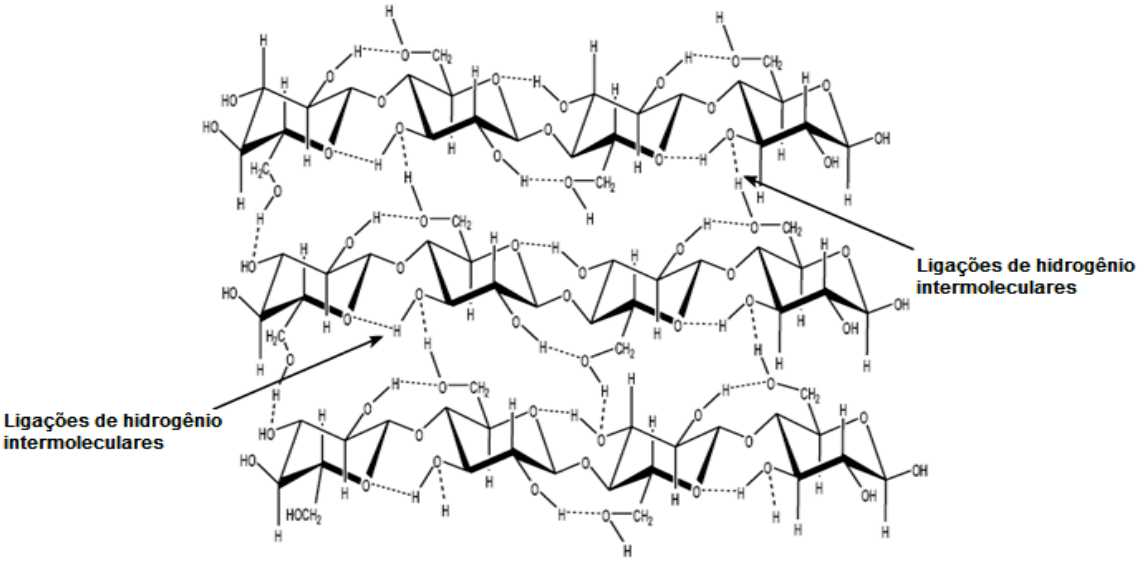

Figura 3.6. Estrutura da celulose com as ligações de hidrogênio.
Fonte: SANTOS *et al.* (2012)

Uma enorme quantidade de celulose é produzida mundialmente por ano devido à fotossíntese, cerca de 100 bilhões de toneladas, fazendo com que a celulose seja o principal recurso natural renovável do mundo (LYND *et al.*, 2002). Portanto, desenvolver tecnologias para seu aproveitamento é de suma importância econômica. A hidrólise da celulose libera, principalmente, glicose, substrato preferencial para a produção de etanol por vias fermentativas. Logo, a utilização da celulose deve ser alvo de estudos e aperfeiçoamentos tecnológicos.

3.4.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são macromoléculas complexas compostas por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico (PEREIRA JR *et al.*, 2008). São, estruturalmente, ligadas à celulose, contribuindo para o alinhamento e organização das fibras de celulose (SUN & CHENG, 2002). A xilana é o principal componente da fração hemicelulósica, para a cana-de-açúcar, e devido à sua complexidade, torna-se necessário o uso de diversas enzimas para a sua degradação ou modificação (COLLINS *et al.*, 2005).

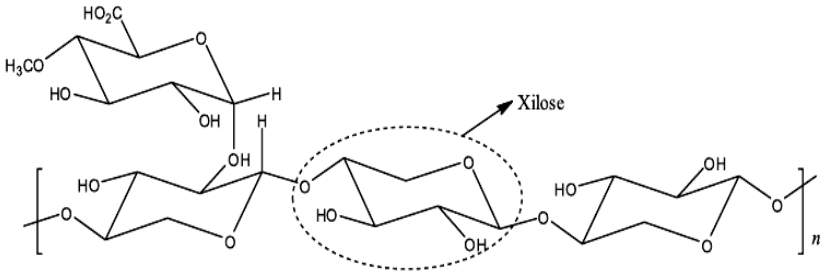

Figura 3.7. Estrutura da hemicelulose com a representação da xilana.
Fonte: SANTOS *et al.* (2012)

Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos comumente utilizados.

3.4.3 Lignina

A lignina é um heteropolímero amorfo que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina não é homogênea, possuindo regiões amorfas e estruturas globulares. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie vegetal para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose. No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, consequentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como

dificultar a recuperação da enzima após a etapa de hidrólise (SANTOS *et al.*, 2012). Também é responsável por promover resistência e dureza à parede celular, funcionando como um material de ligação, garantindo a manutenção das fibras celulósicas (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

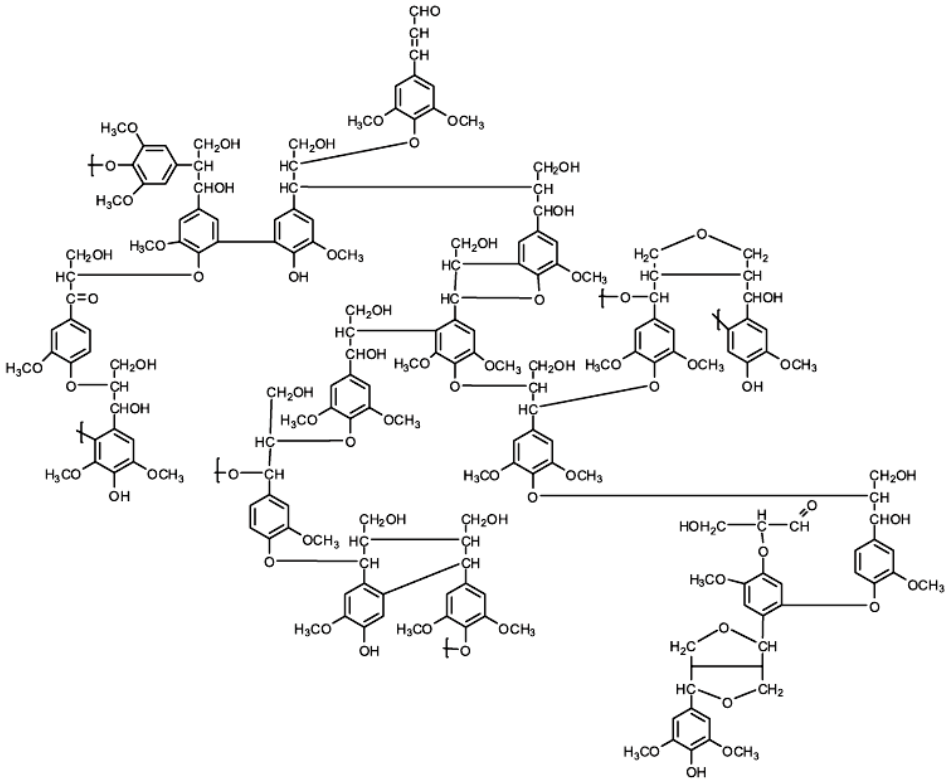

Figura 3.8. Estrutura característica da lignina.

Fonte: SANTOS *et al*. (2012)

3.5. Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos

O pré-tratamento do material lignocelulósico é reportado como uma das etapas mais importantes no processo de conversão deste polímero natural em um produto comercial, como enzimas hidrolíticas e etanol. De acordo com a literatura, o pré-tratamento permite reduzir a cristalinidade, alterar características macroscópicas e microscópicas do material lignocelulósico e aumentar a superfície de contato acessível ao ataque enzimático para que assim ocorra a hidrólise, liberando glicose como produto (OLOFSSON *et al.*, 2008; BETANCUR, 2010; SOCCOL *et al.*, 2010). Por meio da separação das frações de lignina, hemicelulose e celulose, consegue-se um aproveitamento mais eficiente e integral desta última.

Há diversos pré-tratamentos disponíveis, porém a escolha do procedimento que melhor se adéqua ao processo de desconstrução da fibra de celulose irá depender de muitos fatores, como os equipamentos disponíveis; se irá utilizar ou não outras frações da biomassa, como a hemicelulose; a geração de inibidores e potenciais moléculas tóxicas aos processos futuros; entre outros. Estes pré-tratamentos podem ser classificados como: biológicos, físicos, físico-químicos e químicos (ALVIRA *et al.*, 2010).

O pré-tratamento biológico utiliza microrganismos como agente de tratamento da biomassa. São utilizados principalmente fungos filamentosos, que produzem enzimas, como peroxidases (EC 1.11.1.7) e lacases (EC 1.10.3.2), que atuam sobre a lignina e hemicelulose, degradando-as (ALVIRA *et al.*, 2010). A principal desvantagem desta técnica é o longo tempo desprendido para a realização do tratamento, que pode inviabilizar o processo de utilização da biomassa, em contrapartida os baixos custos podem facilitar o seu uso, já que o bagaço de cana pode ter um longo tempo de estocagem antes do seu uso industrial, pois nem todo bagaço é aproveitado instantaneamente.

Os pré-tratamentos físicos se baseiam na redução da cristalinidade e do tamanho da partícula. Podem ser utilizados processos mecânicos, como a fragmentação, moagem ou esfarelamento, e processos de gaseificação, que é a queima em alta temperatura, formando o gás de síntese (ALVIRA *et al*, 2010).

Os métodos de pré-tratamento do tipo físico-químico tem como principal objetivo separar seletivamente a fração hemicelulósica podendo utilizar ácidos, bases, água (líquido e vapor) e solventes orgânicos (BETANCUR, 2010). Abaixo, são mencionados alguns processos físico-químicos utilizados.

A expansão com amônia (AFEX) utiliza uma solução de amônia a temperaturas entre 60°C e 100°C e altas pressões por período de tempo variável. Nestas condições, a amônia tem o efeito de inchamento das fibras da biomassa e conseqüente redução no grau de cristalinidade da celulose, o que facilita a posterior hidrólise enzimática (ALVIRA *et al*., 2010).

O pré-tratamento com água superaquecida (hidrotérmico) também se baseia na termopressurização, porém apresenta vantagens por não utilizar nenhum reagente químico e não necessitar de uma descompressão rápida. Este método objetiva a solubilização de hemicelulose, com pH mantido entre 4 e 7 (ALVIRA *et al*., 2010).

Pré-tratamentos químicos utilizam reagentes químicos para hidrólise do material lignocelulósico. Os pré-tratamentos básicos podem utilizar soda cáustica, hidróxido de cálcio, de potássio ou amônio, e são mais efetivos na remoção da lignina (ALVIRA *et al.*, 2010). De acordo com Zhang *et al.* (2010), utilizando 4% de soda cáustica no pré-tratamento consegue-se diminuir o teor em lignina em 56%. Maeda *et al* (2012) conseguiram reduzir o teor de lignina de 19,4% para 9,3% ao se pré-tratar o bagaço de cana com NaOH, após o mesmo já ter sido pré-tratado com ácido diluído, uma redução de 52%, aproximadamente.

Outro pré-tratamento químico bastante abordado na literatura é o ácido diluído. O uso de ácido sulfúrico diluído (0,5-1%) em condições moderadas de temperatura (120-190 ºC) propicia a solubilização da hemicelulose na forma de açúcares solúveis, como xilose. Uma das desvantagens do método é formação de inibidores no hidrolisado, que pode dificultar a fermentabilidade do mesmo (ZHANG & SHAHBAZI, 2011)

Cabe ressaltar que todos os pré-tratamentos possuem seus prós e contras, devendo ser analisado minuciosamente em sua aplicação, pois este irá impactar o custo e desempenho da planta industrial em que irá ser empregado.

3.6. Glicosil Hidrolases (GH)

São enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois carboidratos ou até mesmo entre um carboidrato e outro composto, sendo identificadas com o código EC 3.2.1.X segundo a Enzyme Commission (EC) da International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), onde o valor atribuído ao X é referente a enzima estudada (HENRISSAT, 1991).

3.6.1 Celulases (GH)

São glicosil hidrolases que clivam as ligações β(1-4) presentes na fibra de celulose, atuando sinergicamente na sua hidrólise, liberando açúcares fermentáveis (ZHANG & LYND, 2004).

O complexo de enzimas celulolíticas é formado, basicamente, por três grupos de enzimas que atuam em diferentes regiões da fibra, cada um atuando, sinergicamente, em diferentes partes da fibra de celulose:

- **Endoglucanases:** também chamada de endo-1,4-β-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4) são enzimas que clivam, de forma randômica, as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização (LYND *et al.*, 2002).;
- **Exoglucanases:** são constituídas por celobiohidrolases (CBHs) e por glucanohidrolases (GHs) (CASTRO & PEREIRA JR., 2010). São relatados dois tipos de celobiohidrolases (EC 3.2.1.91): CBH tipo I, que hidrolisa terminais redutores e CBH tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas podem apresentar inibição pelo produto da hidrólise, no caso celobiose. As glucanohidrolases (EC 3.2.1.74) atuam liberando glicose diretamente dos terminais do polímero (LYND *et al.*, 2002). A Figura 3.9 representa uma CBH tipo I atuando sobre uma fibrila de celulose.

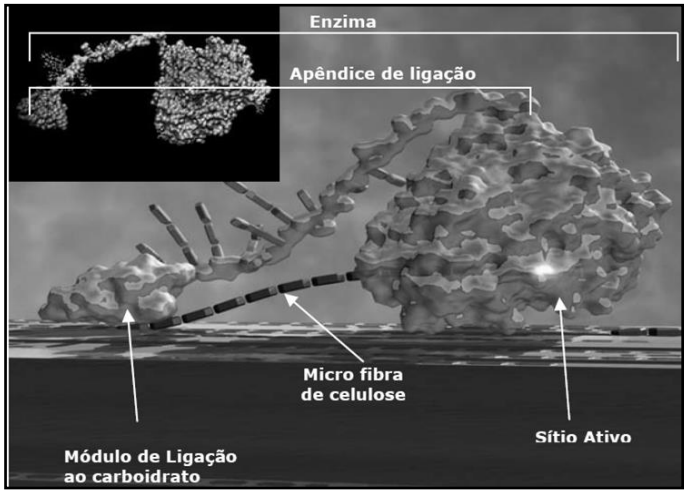

Figura 3.9. Exemplo de uma CBH I atuando sobre uma fibrila de celulose.

Fonte: HIMMEL *et al.* (2000)

- **β-glucosidases (BG) (EC 3.2.1.21):** conhecidas também por β-glucosídeo glucohidrolases atuam sobre a celobiose e oligossacarídeos solúveis, liberando glicose. Pode sofrer inibição por seu produto de hidrólise, a glicose (SINGHANIA *et al*, 2013).

A Tabela 3.2 relaciona as celulases aos seus respectivos códigos de acordo com a EC, nomes oficiais, nomes alternativos e especificidade de reação.

Tabela 3.2. Classificação das celulases de acordo com o código EC, nomes oficiais, nomes alternativos e reações catalisadas

Código EC	Nome oficial	Nomes alternativos	Reação catalisada
3.2.1.4	Celulase	Beta-1,4-endoglucan hidrolase; Beta-1,4-glucanase; Carboximetil celulase; Endo-1,4- β-D-glucanase; Endo-1,4- β-D-glucanohidrolase; Endoglucanase.	Hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose e beta-glucanas
3.2.1.21	β-glucosidase	Amigdalase; β -D-glucoside glucohidrolase; Celobiase; Gentobiase;	Hidrólise do terminal β-1,4-D-glicosídeo com liberação de glicose
3.2.1.74	Glucan 1,4-β-glucosidase	1,4- β-D-glucan glucohidrolase; Exo-1,4-beta-D-glucosidase; Exo-1,4-beta-glucanase; Exo-1,4-beta-glucosidase.	Hidrólise de ligações 1-4 em β-glicanas com liberação de glicose
3.2.1.91	Celulose 1,4-β-celobiosidase	1,4- β-celobiohidrolase; Exo-1,4- β-glucan celobiohidrolase; Avicelase; Exp-1,4- β-D-glucanase; Exoglucanase.	Hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas em celulose liberando celobiose

Fonte: NC-IUBMB (http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html - acessado em outubro de 2017)

3.7. Sinergismo do Complexo Celulásico

A hidrólise da celulose requer o sinergismo de diversas celulases em um sistema de reação heterogênea, o que dificulta a modelagem matemática para este mecanismo de reação. O sinergismo pode, então, ser definido como o aumento da atividade exibida por um extrato enzimático quando comparado à soma das atividades das enzimas individuais (CASTRO & PEREIRA JR., 2010). O sinergismo baseia-se na teoria de que o produto da ação de uma enzima é o substrato para outras enzimas, o que aumenta o rendimento total de obtenção do produto final (LYND *et al.*, 2002). Podem ser descritos, então, três tipos de sinergismo principais:

- **EnG-ExG:** as endoglucanases agem na região amorfa da fibra, formando terminais redutores e não redutores para a posterior ação da CBH I e CBH II;
- **ExG-ExG:** CBH I e CBH II atuam em conjunto na hidrólise dos terminais redutores e não-redutores disponibilizados pela ação das endoglucanases;
- **ExG-BG:** interação responsável pela liberação de glicose pela ação da β-glucosidase sobre a celobiose gerada pelas celobiohidrolases (CASTRO & PEREIRA JR., 2010).

A Figura 3.10 ilustra a ação sinérgica do complexo celulásico.

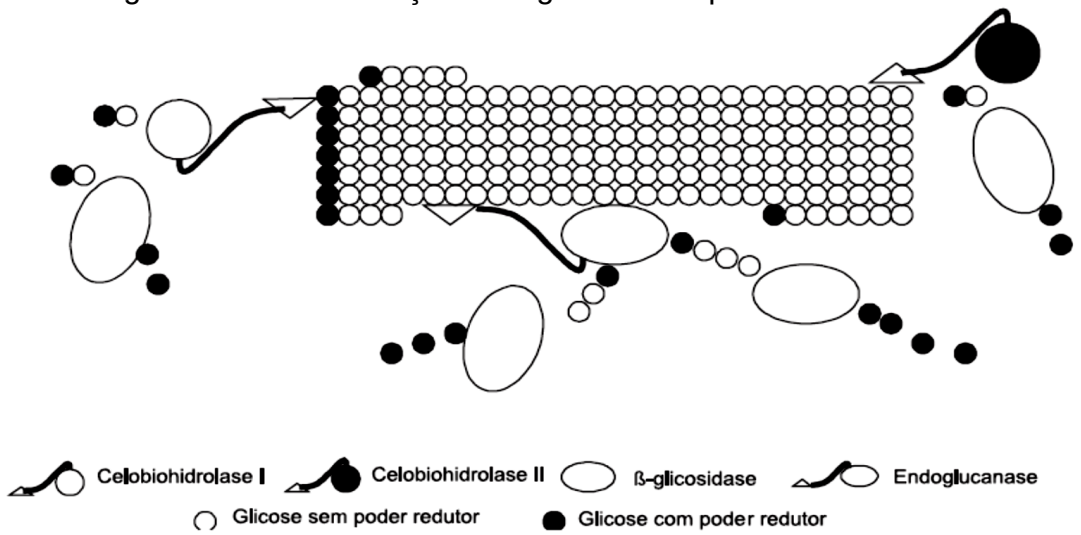

Figura 3.10. Modelos de ação do complexo celulásico sobre a fibra de celulose.

Fonte: CASTRO & PEREIRA JR. (2010)

3.8. Sinergismo do Complexo Celulásico com outras proteínas não hidrolíticas

Pesquisas sinalizam a existência de um mecanismo sinérgico das celulases com proteínas acessórias que auxiliam a desagregação ou afrouxamento das fibras de celulose, facilitando a ação do complexo enzimático (ARANTES & SADDLER, 2010).

De acordo com o trabalho de ARANTES & SADDLER (2010), essas proteínas acessórias não hidrolíticas podem ser classificadas em dois grupos: as que não possuem seu mecanismo catalítico ainda totalmente conhecido, como *swolenina, loosenina*, expansinas e CBMs da família 1 e 2; e as que possuem mecanismo catalítico oxidativo direto, como CBMs da família 33. Proteínas como a *swolenina*, expansinas e *looseninas* são conhecidas por promover a amorfogênese ("afrouxamento") da fibra de celulose através da ruptura das ligações de hidrogênio que mantém rígida a rede fibrosa. Portanto, estas proteínas podem ser utilizadas na diminuição da recalcitrância da biomassa, facilitando o ataque enzimático.

3.8.1 Módulo de ligação ao carboidrato (CBM)

As celulases produzidas por fungos são, geralmente, compostas por dois módulos: o domínio catalítico, que catalisa a hidrólise das ligações β-1,4 na celulose e o módulo de ligação ao substrato, que é relacionado ao processo de ligação ou acoplamento do complexo enzimático à fibra de celulose. (RAHKAINEN *et al*., 2013). Os CBMs facilitam a ação enzimática, pois reconhecem o local específico de atuação das mesmas, induzindo uma amorfogênese e desorganização da fibra.

3.8.2 Expansinas e *swoleninas*

Expansinas são proteínas encontradas na parede celular da maioria das plantas, que propiciam o afrouxamento da matriz lignocelulósica (KIM *et al*., 2014). Mesmo não possuindo atividade hidrolítica, o uso de expansinas em conjunto com as celulases convencionais vem demonstrando ganhos significativos nas eficiências de hidrólise finais, pois rompem as ligações de hidrogênio que mantém unidas as fibras de celulose e as fibras de

hemicelulose, facilitando a ação das celulases nas fibras de celulose (COSGROVE, 2017). A Figura 3.11 demonstra esquematicamente a ação das expansinas entre a microfibrilas de celulose e a hemicelulose, rompendo as ligações de hidrogênio existentes entre as duas frações.

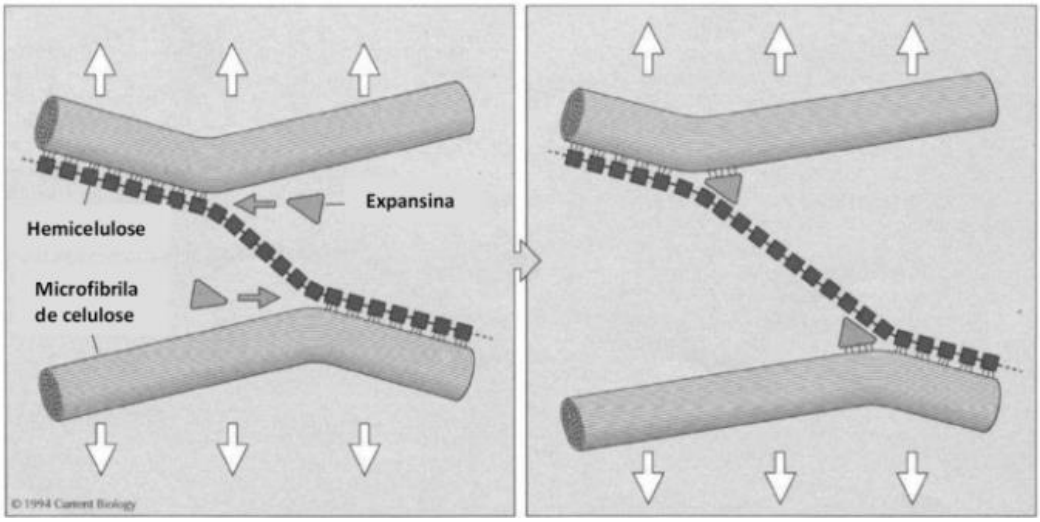

Figura 3.11. Representação da ação de expansinas entre as microfibrilas de celulose e hemicelulose, rompendo as ligações de hidrogênio.
Fonte: FRY (1994)

As swoleninas são similares às expansinas, promovendo um inchaço (*swelling*) nas fibras. Essas proteínas promovem mudanças estruturais na fibra de celulose, como a redução do tamanho de partícula e cristalinidade, facilitando, assim, o acesso das celulases (KIM *et al*., 2014).

Estudos (KANG *et al*., 2013; ROCHA *et al*., 2016) reportam o sinergismo positivo do complexo celulásico com as expansinas e/ou swolelinas, na medida em que se observam ganhos nas eficiências de hidrólise de biomassas lignocelulósicas, evidenciando uma maior facilidade de ataque enzimático devido à ação das proteínas acessórias. A Tabela 3.3 reporta estudos encontrados na literatura sobre sinergismos entre celulases e proteínas acessórias.

Tabela 3.3. Trabalhos sobre sinergismos entre proteínas acessórias e hidrolases encontrados na literatura

Hidrolases	Proteínas Acessórias	Substrato	Sinergismo	Referência
ENDO	LeEXP2	Papel de Filtro	1,4 - 9,8	LIU *et al*. (2014)
Celulase	Cms	Avicel	Positivo	Haque *et al*. (2015)
Celulase	Poswol	Avicel	Incremento de 51,5%	Kang *et al*. (2013)
Celulase	OsEXPA33	Celulose Cristalina	Positivo	Seki *et al*. (2015)
Celulase	Swollenin	*Miscanthus gigantheus*	Positivo	Rocha (2016)

Fonte: adaptado de LIU (2015)

3.8.3 LPMOs

As monooxigenases polissacarídicas líticas (LPMO) possuem atividade na celulose ou quitina, demonstrando a ação dessas proteínas em substratos altamente cristalinos. As LPMOs clivam as ligações glicosídicas β(1-4) desses substratos, levando à oxidação os carbonos C1 ou C4 (AGGER, 2014). Esse processo oxidativo auxilia na desorganização das fibras celulósicas, facilitando o acesso das celulases às fibras. Sendo assim, as LPMOs atuam em sinergismo com as celulases na degradação de celulose (DIMAROGANA *et al*., 2013).

3.9. Produção de hidrolases

Celulases podem ser produzidas por um grande número de organismos, dentre eles bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas, actinobactérias, fungos filamentosos e também plantas e animais (KUHAD *et al.*, 2011).

Dentre esses organismos destacam-se os fungos filamentosos, sendo alguns deles pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, que são utilizados industrialmente para produção de celulases (GODFREY E WEST, 1996 apud CASTRO, 2006).

Celulases podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação submersa (FS). A FES caracteriza-se como um processo que ocorre na ausência ou em teores ínfimos de “água livre”, onde a umidade varia entre 30-80%, empregando-se um material sólido como suporte. Seu uso demanda conhecer outras variáveis ao processo, como porosidade composição, capacidade de absorção de água do material suporte. Umas das grades desvantagens da FES é o difícil controle de transferência de massa e calor, porém tem menores custos de produção e possui um ambiente mais natural para o crescimento de fungos filamentosos (SCHIMIDELL *et al.*, 2001, COUTO & SANROMÁN, 2005).

Processos de FS, por outro lado, possuem água como componente majoritário. O meio reacional pode ser agitado e ter suprimento de oxigênio externo, em caso de fermentações aeróbicas (PEREIRA JR. *et al.*, 2008). Umas das desvantagens é o alto gasto energético associado aos processos de esterilização, purificação e sistemas de agitação. Todavia, o controle do bioprocesso é facilitado assim como a transferência de calor e massa. Devido à sua maior produtividade, esta estratégia é mais aconselhada na produção de enzimas (PEREIRA JR. *et al.*, 2008; CASTRO & PEREIRA JR, 2010; HANSEN *et al.*, 2015).

Maeda *et al* (2012) em seu trabalho demonstraram a alta capacidade do fungo *Penicillium funiculosum* ATCC 11797 em produzir celulases por FS, atingindo altas atividades enzimáticas, como cerca de 11.000 U/L em atividade CMCásica e 900 U/L de atividade FPásica. Rocha *et al* (2013), adotando FS como modelo de fermentação, chegou a atividades em torno de 27.000 U/L para CMCases e 1.225 U/L para FPases, utilizando o fungo *Trichoderma harzianum* IOC 3844 como microrganismo produtor das enzimas.

Logo, a escolha da melhor estratégia de fermentação torna-se uma tarefa decisiva no processo já que pode afetar o controle, a escolha de equipamentos e a produtividade do bioprocesso.

3.10. Engenharia de Produto

Para um produto se firmar em um mercado extremamente competitivo este precisa não apenas ser ancorado ao seu preço, mas principalmente na sua funcionalidade, no seu valor agregado e nas suas formas de obtenção (FAVRE *et al*., 2002). Todos esses fatores em conjunto formam a opinião do mercado consumidor a respeito do uso ou desuso de um determinado produto ou serviço. A esta situação cabe ressaltar o importante papel da engenharia de produto, na medida em que o sucesso de uma determinada indústria ou serviço está intimamente ligado à aceitação do consumidor que irá utilizar o produto final.

Todo e qualquer produto e/ou serviço pode sofrer melhorias perante uma mudança no perfil de consumação do mesmo e isto se deve ao fato de que a aplicação da engenharia de produto é extremamente importante nos setores industriais onde os produtos finais contêm os princípios ativos em concentrações relativamente baixas, como é o caso dos coquetéis enzimáticos hidrolíticos. O conceito de engenharia de produto é amplo e pode ser aplicado às diversas indústrias como a alimentícia, farmacêutica, cosméticos e agroquímicos e estima-se que cerca de 30% dos produtos relacionados a estas indústrias passam por algum processo de modificação, melhorias ou formulação (KIND, 1999).

A indústria química sempre se preocupou em ofertar um produto descrevendo os seus componentes principais. A tendência atual é enfatizar as propriedades do mesmo, fazendo com que as modificações, tanto a nível molecular, quanto a nível macroscópico, sejam pensadas de maneira a atender as demandas individuais dos consumidores (FAVRE *et al*., 2002).

Levando-se em consideração a aplicabilidade dos preparados enzimáticos, a engenharia de produto pode ser aplicada para promover a formulação ideal, estabelecendo as proporções e concentrações de cada enzima que resultarão na melhor performance do produto final. Diversas técnicas podem ser utilizadas para alcançar este objetivo, como mistura de diferentes extratos enzimáticos, cultivo em consórcios entre microrganismos,

adição de estabilizantes, adição de proteínas acessórias ou até mesmo o uso de engenharia genética.

Wen *et al.* (2005) fez uso de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus phoenicis* cultivados em conjunto para obter um extrato com as características necessárias para hidrolisar um material lignocelulósico. Para obter o efeito sinérgico entre endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidase que é exigido para uma hidrólise eficiente, *A. phoenicis* foi incluído ao cultivo para aumentar a quantidade de β-glucosidase e, consequentemente, a eficiência hidrolítica, ao passo que a capacidade de *T. reesei* de produzir enzimas celulásicas não foi suficiente para obter resultados satisfatórios, pois o extrato produzido por esse fungo, apesar de apresentar alta atividade celulásica, foi deficiente em β-glucosidase. Kolasa *et al*. (2014) cultivaram *Trichoderma reesei* RUT-C30 com linhagens de *Aspergillus* sp, alcançando altas eficiências de hidrólise, cerca de 80%.

Outra melhoria que pode ser feita é em níveis moleculares, como modificação genética na estrutura da enzima, fazendo com que a mesma obtenha características diferentes e mais bem adaptáveis ao processo onde a mesma será utilizada, por exemplo, a modificação da enzima *Cel6A* no trabalho de Lavigne *et al* (2009), que reduziu os efeitos inibitórios causados pela própria glicose gerada na ação enzimática.

Ainda no campo da engenharia genética, pode-se ainda realizar a inserção de genes heterólogos, de maneira que a linhagem modificada produza um extrato enzimático mais eficiente do que a linhagem nativa. Por exemplo, BOWER (2005), inseriu genes codificadores de endoglucanases em *T. reesei* e obteve um extrato mais eficiente do que aquele produzido pelo fungo nativo. Outro grande exemplo de microrganismo modificado geneticamente é *Trichoderma reesei* RUT-C30, que é capaz de produzir celulases que sofrem menos inibição com produtividade em até 20 vezes maior que o fungo nativo (GUTIERREZ *et al*.,2015).

Outros elementos que podem ser utilizados para melhorar o desempenho do extrato enzimático são as proteínas acessórias, que aumentam a atividade catalítica, atuando em sinergismo com o complexo

celulásico. Deste grupo fazem parte as chamadas *swolleninas*, proteínas produzidas por fungos e bactérias que são capazes de promover um maior espaçamento entre as fibras de celulose e as expansinas, proteínas que promovem o rompimento das ligações de hidrogênio entre as fibras de celulose (KIM *et al.*, 2013; JÄGER *et al.*, 2011).

Aditivos podem ser utilizados para manter a integridade dos preparados até o momento de sua utilização. Tais aditivos podem consistir de proteínas estabilizantes, sais, preservantes e outros componentes, como glicerol, sorbitol e manitol, que têm a função de manter a função catalítica do preparado (EUROPEAN COMISSION, 2002).

4. Materiais e Métodos

4.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização da biomassa

Primeiramente, o bagaço passou por um pré-tratamento ácido, descrito por Betancur & Pereira JR (2010), com adição de uma solução de ácido sulfúrico 1% v/v com uma relação sólido:líquido de 1:2,8 (g:mL) utilizando um borrifador, para que a mistura de biomassa e ácido ficasse bem homogênea, a 121°C por 30 minutos. Após este procedimento, foram obtidas duas frações: uma líquida (hidrolisado de hemicelulose) e uma sólida (celulose e lignina). As duas fases foram separadas com auxílio de uma presa hidráulica a pressão de 10 kg/cm^2 e o sólido remanescente, denominado celulignina ácida (CA), foi lavado com água e uma solução de soda cáustica 2M até atingir pH 5.

Uma parte deste sólido foi então submetido a segunda fase do pré-tratamento: o tratamento alcalino. Adicionou-se uma solução de soda cáustica 2% m/v, com relação sólido:líquido de 1:20 (g:mL), a 121°C por 30 minutos, método otimizado por Vásquez *et al.* (2007). Novamente, duas frações foram obtidas: uma líquida (sendo a lignina seu componente majoritário) e uma sólida (denominada de celulignina parcialmente deslignificada - CPD). A separação das fases foi feita com a mistura ainda quente, utilizando um filtro. O sólido obtido foi lavado com água destilada até todo o excesso de lignina ser removido e colocado em uma estufa de circulação a 65ºC para secar.

Uma parte do bagaço *in natura* foi submetida somente ao pré-tratamento alcalino, para redução do teor de lignina no material, o procedimento foi análogo ao descrito acima. O sólido remanescente fora denominado celulignina alcalina parcialmente desligninifcada (CAPD).

Após a etapa de secagem, todas as biomassas foram cominuídas em moinho (MF10 Basic marca IKA®) e seu tamanho padronizado por uma peneira de 0,5 a 1mm de abertura. A Figura 4.1 mostra o aspecto do bagaço *in natura* e após os pré-tratamentos.

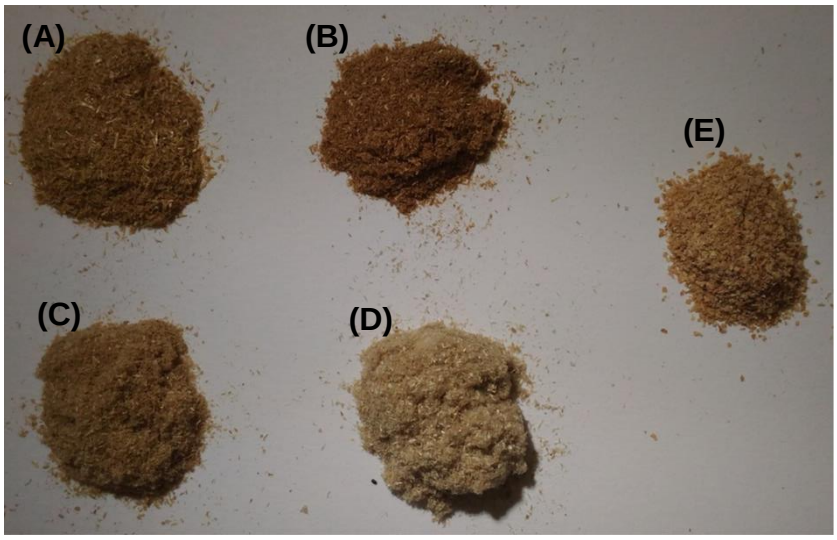

Figura 4.1 Aspectos do bagaço de cana *in natura* (A), após o pré-tratamento ácido somente (B), após o pré-tratamento básico somente (C), após os pré-tratamentos ácido e alcalino consecutivos (D) e farelo de trigo cominuído (E).

Todas as biomassas foram caracterizadas segundo procedimento descrito por Sluiter *et al*. (2005) e Ververis *et al*. (2007). Primeiramente, os cadinhos do tipo Gooch nº3 foram calcinados na mufla a 575 °C por 5 horas. 0,3g de amostra foram transferidos para erlenmeyers de 250 ml e adicionados 3,0 mL de H_2SO_4 72 %, incubando-se os frascos a 30°C por uma hora. Após esse período, foram adicionados aos frascos 84 mL de H_2O deionizada, diluindo-se o ácido para 4%. Os frascos foram autoclavados por uma hora a 121°C. Os hidrolisados foram filtrados nos cadinhos previamente calcinados e pesados (W0), lavando o resíduo com água destilada para remover todo o hidrolisado. Os resíduos sólidos foram secos a 100°C por 24 horas e os cadinhos pesados (W1). Após a pesagem W1, os cadinhos foram calcinados em mufla a 550°C por 5 h, resfriados e pesados (W2). Os hidrolisados foram então neutralizados $Ca(OH)_2$ para pH entre 5,5 e 6,0, filtrados em papel filtro, com auxílio de funil de büchner e avolumados para 200mL com água deionizada. Foram então mensuradas as concentrações de açúcares redutores totais (C2) pelo método de DNS e glicose (C1) pelo método de enzimático de glicose oxidase (GOD). Os teores de glucana, xilana e lignina foram calculados pelas Equações 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4:

$$Glucanas\ \left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{0,9}{0,96}\right) * C1 * \left(\frac{v}{m}\right) * \alpha * 1000 \quad (4.1)$$

Onde,

0,90 = Proporção estequiométrica mássica

0,96 = rendimento de sacarificação

C1 = concentração de glicose (g/L)

v = volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

α= diluição da amostra (se houver)

$$Xilanas\ \left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{0,88}{0,93}\right) * (C2 - C1) * \left(\frac{v}{m}\right) * \alpha * 1000 \quad (4.2)$$

Onde,

0,88 = Proporção estequiométrica mássica

0,93 = rendimento de sacarificação

C1 = concentração de glicose (g/L)

C2 = concentração de açúcares redutores (g/L)

v = volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

α = diluição da amostra (se houver)

$$Lignina\ \left(\%\frac{m}{m}\right) = \frac{W1-W2}{(m)} * 100 \quad (4.3)$$

Onde,

W1 = massa do resíduo seco da filtragem (g)

W2 = massa do resíduo após calcinação (g)

m = massa da amostra seca (g)

$$Cinzas\ \left(\%\frac{m}{m}\right) = \frac{W2-W0}{(m)} * 100 \quad (4.4)$$

Onde,

W0 = massa do cadinho vazio (g)

W2 = massa do resíduo após calcinação (g)

m = massa da amostra seca (g)

4.2. Microrganismo utilizado: conservação, ativação e suspensão de esporos

A linhagem utilizada nesse projeto foi *Penicillium funiculosum* ATCC 11797. As culturas foram mantidas em placas de Petri diferentes contendo meio ágar batata dextrose (PDA) enriquecido com 0,2% p/v de peptona e seus esporos conservados em glicerol 20% a 4°C em microtubos separados.

A cada experimento foi realizada a ativação dos microrganismos em novas placas de PDA - Peptona (0,2%) (Figura 4.2) incubadas em estufa a 30°C por períodos diferentes: 7 a 12 dias. Dessa forma, os experimentos foram padronizados e também se reduziram os riscos de alterações genéticas por repiques sucessivos.

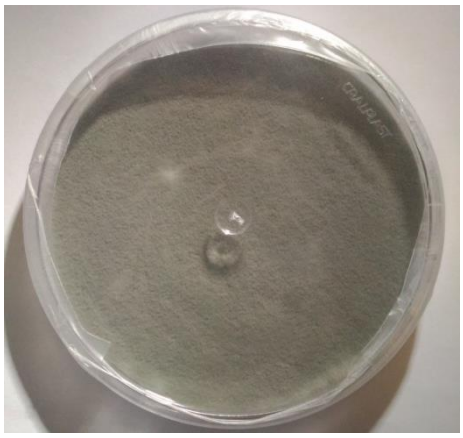

Figura 4.2. Placas de PDA-Peptona para *P. funiculosum*

A suspensão de esporos dos microrganismos foi realizada a partir da raspagem de uma placa PDA-Peptona, com o auxílio de uma alça, e transferência dos esporos para um tubo de centrífuga do tipo *falcon* com 10 mL de água destilada estéril em fluxo laminar. Após agitação em *vortex* (K550 G, Genie) por 30 segundos, uma alíquota foi retirada para a diluição necessária ao experimento com água destilada em um microtubo de 2 mL. Desta diluição, uma alíquota foi retirada e transferida para a câmara de Neubauer (Loptiklabor) para quantificação de esporos em microscópio óptico (Leica, modelo DM2000).

4.3. Composição do meio de pré-inóculo e de produção

Cada microrganismo necessita de uma condição própria de cultivo, requerendo condições especiais como o tempo de cultura, os nutrientes do meio de cultivo, a temperatura de incubação e condições estáticas ou agitação. Dessa forma, tanto a etapa de propagação celular quanto as etapas de produção enzimática utilizadas foram previamente otimizadas para se obter um alto rendimento em atividades enzimáticas.

Os pré-inóculos de *P. funiculosum* foram preparados em frascos Erlenmeyer, com volume referente a 10%(v/v) do meio de produção e inoculados com 10^6 esporos/mL em meio Mandels e Weber (1969) otimizado por Maeda (2010) (Tabela 4.1). O meio foi previamente autoclavado a 0,5 atm por 20 minutos, porém a glicose foi esterilizada separadamente por ser um composto termolábel, juntamente com a solução de KH_2PO_4. Após o inóculo, os frascos foram mantidos a 30°C com agitação orbital de 200 rpm durante e 72 horas para *P. funiculosum*.

Tabela 4.1. Composição do meio de cultura utilizado no pré-inóculo de *Penicillum funiculosum*, otimizado por MAEDA (2010)

Componente do Meio de Cultura	Concentração	
Biomassa	15	g/L
Glicose	3	
Ureia	1	
Extrato de Levedura	0,36	
$(NH_4)_2SO_4$	4	
KH_2PO_4	2	
$CaCl_2.2H_2O$	0,4	
$MgSO_4.7H_2O$	0,3	
$FeSO_4.7H_2O$	5	mg/L
$MnSO_4.4H_2O$	1,6	
$ZnSO_4.7H_2O$	1,4	
$CoCl_2.6H_2O$	2	

Fonte: Mandels & Weber (1969), Maeda (2010)

O meio de produção padrão possuía os mesmos compostos e concentrações reportadas na Tabela 4.1, excetuando a glicose.

4.4. Avaliação do potencial produtor de uma linhagem mutante de *P. funiculosum*

A linhagem mutante do fungo *P. funiculosum* foi desenvolvida pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB) e disponibilizada para estudos deste projeto sob os termos de cooperação científica firmados entre LADEBIO/Escola de Química/UFRJ, Petrobras e o supracitado laboratório.

A literatura reporta que há um déficit na produção de β-glucosidases pelo fungo e isso denota uma baixa eficiência de hidrólise do extrato produzido, sendo necessária uma suplementação para que se atinjam altas eficiências (MÉNDEZ, 2016). Na tentativa de se aumentar a expressão de β-glucosidases em *P. funiculosum*, metodologias de mutação clássica foram aplicadas, originando uma linhagem mutante, que foi inicialmente reportado como superexpressora. Sendo assim, os experimentos envolvidos nessa seção se destinam à avaliação do potencial produtor de β-glucosidases do fungo mutado em relação ao nativo, foram utilizados fungos nativos de dois bancos diferentes presentes no laboratório (Nativo e Nativo2). Os meios de pré-inóculo e produção são os mesmos, excetuando a glicose no de produção, e foram descritos anteriormente (meios padrão). Todo o procedimento empregado foi análogo para ambas as linhagens, padronizando o ensaio. Amostras foram retiradas para a dosagem da atividade β-glucosidásica. As mesmas foram centrifugadas a 2500 x*g* por 10 minutos a 10ºC, para a retirada de biomassa, e armazenadas a 4ºC até o momento da análise.

4.5. Levantamento do perfil cinético de crescimento em glicose e lactose

A linhagem nativa do fungo *P. funiculosum* foi cultivada na presença de glicose e lactose como fontes de carbono. O meio utilizado foi o mesmo reportado na Tabela 4.1, porém a concentração de glicose foi de 10g/L, assim como a concentração de lactose. O ensaio foi realizado no sistema de frasco de sacrifício, onde a cada amostragem um frasco é retirado por completo e

analisado. O conteúdo do frasco foi filtrado em membranas com poros 0,22 µm e sua massa seca foi determinada com o uso de uma balança de análise de umidade (MB23, Ohaus). As Equações 4.5, 4.6 e 4.7 abaixo foram utilizadas para os cálculos dos parâmetros cinéticos.

$$\mu_X = \frac{dLnX}{dt} \tag{4.5}$$

$$Y_{X/S} = \frac{dX/dt}{-dS/dt} \tag{4.6}$$

$$t_D = \frac{ln2}{\mu_X} \tag{4.7}$$

4.6. Determinação da melhor fonte de carbono para produção de celulases e xilanases

Os meios de pré-inóculo e produção padrão são os mesmos descritos anteriormente, exceto pelas fontes de carbono. Foram testados o bagaço de cana in natura, CA, CAPD, CPD e Avicel® como fontes indutoras da produção de celulases e xilanases. Utilizou-se o sistema de biorreatores em paralelo com até 6 vasos reacionais de 1L de volume total (Multifors 2, INFors HT), a Figura 4.3 é uma foto do aparato utilizado por este sistema.

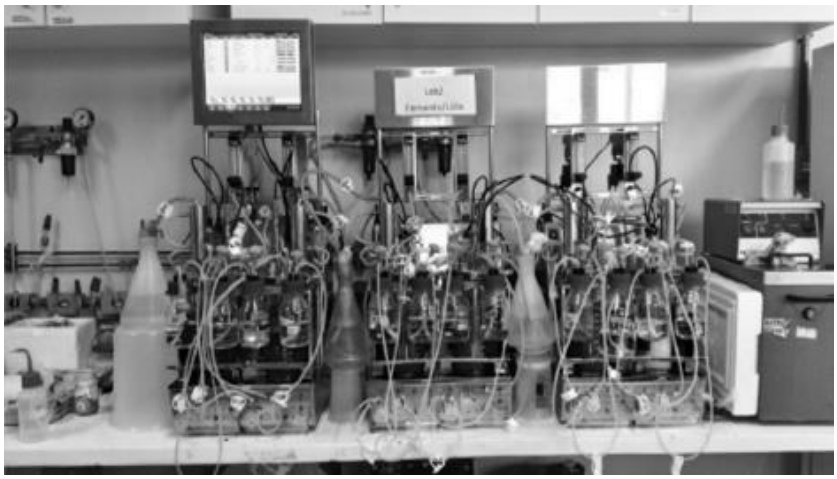

Figura 4.3. Sistema Multifors 2 utilizado para produção de hidrolases por *P. funiculosum*

Cada reator possuía volume útil de 600 mL. O pré-inóculo (60 mL - 10% v/v) foi transferido assepticamente para cada vaso reacional, conforme otimizado por Maeda (2010). Os biorreatores possuíam sistema de agitação mecânica com três impelidores FBT de seis pás e sem chicanas; eletrodo de temperatura; eletrodo de pH e eletrodo de controle de O_2 dissolvido. O sistema também era dotado de controle automático de temperatura, pH, agitação, aeração. O ajuste de pH também foi feito utilizando soluções de HCl 2M e NaOH 2M e teve seu valor mantido em 5,0. A temperatura foi mantida a 30°C, a agitação em 200 rpm e aeração entre 20% e 40% de saturação e espuma controlada, por meio da adição de agente anti-espumante, por 62 horas. Alíquotas foram retiradas para a dosagem das atividades enzimáticas e teor de proteínas totais, após um procedimento de centrifugação (2500 x*g*) para a retirada da biomassa microbiana e lignocelulósica.

4.7. Determinação da melhor carga de sólidos para produção de celulases e xilanases

Os meios de pré-inóculo e produção padrão foram os mesmos descritos anteriormente, exceto pelas concentrações de CPD utilizadas. Foram testados 2, 5, 10, 15 e 20 g/L de CPD como fontes indutoras da produção de celulases e xilanases e para poder avaliar a influência da carga de sólidos na produção enzimática. Utilizou-se o mesmo sistema de biorreatores em paralelo com 5 vasos reacionais (Multifors 2, INFors HT). Todos os parâmetros dos bioprocessos anteriores foram mantidos. Alíquotas foram retiradas para a dosagem das atividades enzimáticas e teor de proteínas totais, após um procedimento de centrifugação (2500 x*g*) para a retirada da biomassa.

4.8. Determinação do melhor tempo de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases

Os meios de pré-inóculo e produção padrão são os mesmos descritos anteriormente, exceto pelos tempos de pré-inóculo. Foram testados tempos de 0, 20, 24, 48 e 72 horas de pré-inóculo para avaliação da sua influência na

produção enzimática. Utilizou-se o mesmo sistema de biorreatores em paralelo com 5 vasos reacionais (Multifors 2, INFors HT). Todos os parâmetros dos bioprocessos anteriores foram mantidos. O tempo de 0 hora correspondia a inoculação do biorreator com esporos diretamente, sem que eles passassem para fase vegetativa, ou seja, o frasco de pré-inóculo era inoculado com 10^6 esporos/mL e imediatamente era transferido assepticamente para o biorreator. Alíquotas foram retiradas para a dosagem das atividades enzimáticas e teor de proteínas totais, após um procedimento de centrifugação (2500 x*g*) para a retirada da biomassa.

4.9. Determinação do tamanho de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases

Nessa etapa, estudou-se a influência do tamanho do pré-inóculo para a produção enzimática. Utilizaram-se os mesmos meios de pré-inóculo e produção padrão, mudando somente os volumes de pré-inóculo. Foram testados 5 e 10% (v/v). Utilizou-se o mesmo sistema de biorreatores em paralelo com 2 vasos reacionais (Multifors 2, INFors HT). Todos os parâmetros dos bioprocessos anteriores foram mantidos. Alíquotas foram retiradas para a dosagem das atividades enzimáticas e teor de proteínas totais, após um procedimento de centrifugação (2500 x*g*) para a retirada da biomassa.

4.10. Avaliação do potencial do farelo de trigo (FT) como indutor suplementar na produção de celulases e xilanases

O farelo de trigo é considerado um co-produto de relativo baixo custo, cerca de R$0,63/Kg reportado em sites especializados em venda dessa biomassa (Venda de trigo - http://www.vendadetrigo.com.br/estados/250-farelo - acessado outubro de 2015). Diversos trabalhos abordam sua utilização em rações animais por conter teores de fibra, proteínas e aminoácidos interessantes. Generoso *et al*. (2008) determinaram a composição química desta biomassa: proteínas brutas 15,12%, Gorduras 3,54%, Fibra bruta 8,9%, Fibra detergente neutro (FDN) 38,38%, Fibra detergente ácido (FDA) 12,80%,

Matéria mineral 4,35%. Esses valores reforçam o grande potencial do farelo de trigo como fonte de carbono, porém é necessário averiguação do seu potencial como indutor da produção de hidrolases, devido aos fatos apresentados na seção anterior.

Primeiramente, foi avaliado o potencial do farelo de trigo como componente suplementar do meio de produção de hidrolases. Utilizaram-se os mesmos meios de pré-inóculo e produção padrão. O experimento consistia em um biorreator controle, contendo somente CPD (15 g/L) e outro contendo CPD (15 g/L) + Farelo de Trigo (5 g/L). Utilizou-se o mesmo sistema de biorreatores em paralelo com 2 vasos reacionais (Multifors 2, INFors HT). Todos os parâmetros dos bioprocessos anteriores foram mantidos. Alíquotas foram retiradas para a dosagem das atividades enzimáticas e teor de proteínas totais, após um procedimento de centrifugação (2500 xg) para a retirada da biomassa.

Posteriormente, foi avaliado o efeito do amido na expressão de hidrolases. Pré-ínóculos foram realizados conforme descrito no item 4.3, os meios de produção continham: somente CPD 15 g/L (controle), CPD 15 g/L mais amido 5 g/L.

4.11. Planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD

Com o objetivo de se determinar a concentração ótima de CPD e Farelo de Trigo (FT) a técnica de planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregada. Primeiramente, assumiu-se a premissa de que a concentração de farelo de trigo não ultrapassasse 1/3 da concentração usual de CPD (15 g/L), ou seja, a concentração máxima de FT era de 5 g/L. Esta premissa foi estipulada, pois o uso dessa biomassa deve ser somente de caráter de suplementação e não deve se sobrepor à CPD, que é a biomassa de maior interesse em uso. Sendo assim, as Tabelas 4.2 e 4.3 mostram os níveis adotados neste experimento e a matriz do planejamento DCCR. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer com volume útil de 50 mL. Primeiramente, o pré-inóculo foi realizado de forma única, para

que houvesse sua padronização. O meio utilizado foi o descrito na Tabela 4.1. As condições do pré-inoculo foram 30°C, agitação de 200 rpm por 72h. Os frascos de produção foram inoculados assepticamente pela adição de 10% (v/v) do pré-inóculo. A composição do meio de produção foi a mesma da Tabela 4.1, exceto pela glicose e pela adição de CPD e Farelo de Trigo descritos na tabela 4.3. Os frascos foram incubados por 72 horas a 30°C e agitação de 200 rpm. Ao final das 72 horas o conteúdo de cada frasco foi centrifugado (2500 xg) e suas atividades enzimáticas e teor de proteínas foram mensuradas.

Tabela 4.2. Níveis aplicados ao DCCR

Variáveis	**Níveis**				
	-1,41	-1	0	1	1,41
CPD (g/L)	10	11,45	15	18,55	20
FT (g/L)	0	0,73	2,5	4,27	5

CPD: celulignina parcialmente deslignificada; FT: farelo de trigo

Tabela 4.3. Matriz do planejamento DCCR

Experimento	CPD (g/L)	FT (g/L)
1	11,45	0,73
2	11,45	4,27
3	18,55	0,73
4	18,55	4,27
5	10	2,5
6	20	2,5
7	15	0
8	15	5
9 (C)	15	2,5
10 (C)	15	2,5
11 (C)	15	2,5

4.12. Validação do planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD

Com o objetivo de se validar a condição ótima, a função *Desirability* foi utilizada. O programa Statistica 7.0 foi utilizado para determinação do valor dessa função e para geração das superfícies de respostas que auxiliam na compreensão dos resultados obtidos. Frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio foram conduzidos com as concentrações ótimas de

CPD e Farelo de Trigo determinadas por 72 h a 30°C e agitação de 200 rpm. Nesse experimento, o sistema de frasco de sacrifício foi utilizado, onde para cada ponto da cinética um frasco é totalmente utilizado. Foram avaliados os tempos de 12, 24, 35, 48 e 72 h de cultivo, dando um total de 5 frascos. Cada frasco foi retirado de tempo em tempo para a dosagem das atividades enzimáticas e teor de proteínas totais, após um procedimento de centrifugação (2500 xg) para a retirada da biomassa. Os valores referentes à 72 h foram comparados aos valores preditos pelo modelo encontrado pelo programa ao se usar a função *Desirability.*

4.13. Comparação da produção enzimática em biorreator do tipo coluna de bolhas e biorreator agitado mecanicamente

Como a produção de hidrolases é um bioprocesso bastante aerado, estudou-se a utilização de um sistema onde a agitação fosse exclusivamente pneumática e, portanto, o biorreator de coluna de bolhas foi escolhido para avaliação. Em paralelo, um reator do tipo agitado mecanicamente (STR) foi utilizado para comparação.

Para produzir hidrolases em biorreator de coluna de bolhas, o pré-inóculo foi transferido assepticamente para o vaso reacional de 12 L de um biorreator (FerMac 310/60, Electrolab) com volume útil de 10 L na proporção 10% v/v, conforme otimizado por Maeda (2010) para *P. funiculosum* e nas condições ótimas para CPD e farelo de trigo. O biorreator possuía eletrodos de temperatura, de pH e de oxigênio dissolvido.

Para produzir hidrolases em biorreator agitado mecanicamente, o pré-inóculo foi transferido assepticamente para o vaso reacional de 5L de um biorreator (Biostat B, B. Braun Biotech. Int.) com volume útil de 4 L na proporção 10% v/v, conforme otimizado por Maeda (2010) para *P. funiculosum* e nas condições ótimas para CPD e Farelo de Trigo. O biorreator possuía sistema de agitação mecânica com três impelidores FBT de seis pás; eletrodos de temperatura, de pH e de oxigênio dissolvido. O sistema também é dotado de controle automático de temperatura, pH, agitação (200 a 300 rpm) e aeração.

Em ambos os processos o ajuste de pH também foi feito utilizando soluções de HCl 2M e NaOH 2M e este foi mantido em 5.0, assim como a temperatura a 30°C e aeração de 20% a 40% de saturação e espuma controlada, por meio da adição de agente anti-espumante, por 60 horas. A Figura 4.4 representa os dois biorreatores utilizados.

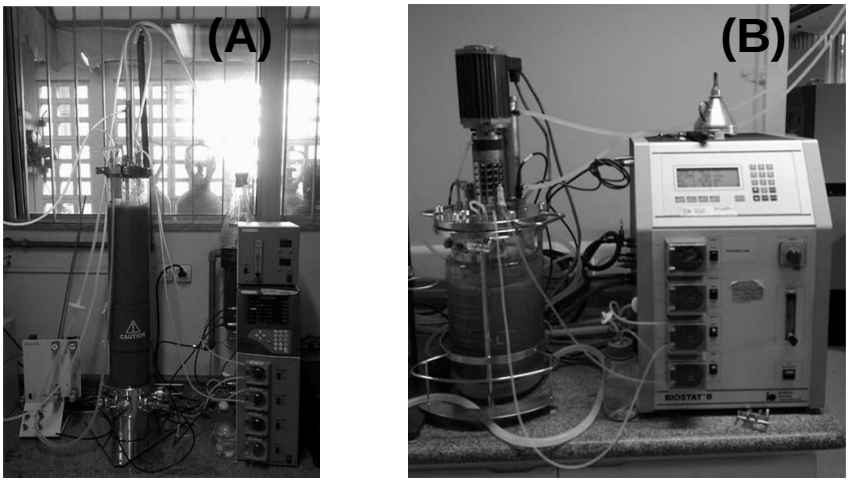

Figura 4.4. Produção de enzimas em biorreatores instrumentados
Coluna de Bolhas (A) e *STR* (B).

Durante o período de operação dos biorreatores foram retiradas alíquotas de 10 mL em intervalos de tempo até o final do processo. Essas amostras foram centrifugadas a 2500 xg por 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi utilizado para quantificar atividades enzimáticas, cuja metodologia será descrita posteriormente.

4.14. Concentração dos Extratos Brutos Enzimáticos

Após cada fermentação em biorreator, os meios fermentados foram filtrados em lã de vidro com bomba a vácuo originando duas fases: a sólida, chamada de torta (contendo micélio e resíduos de CPD), e a líquida, chamada de extrato bruto enzimático.

Os extratos enzimáticos foram concentrados em duas etapas utilizando um sistema de filtração *hollow fiber* (modelo QuixStand, marca GE Healthcare):

sistema de filtração tangencial com membranas de fibras ocas de polissulfona (Figura 4.5). Primeiramente, os extratos enzimáticos foram microfiltrados utilizando membranas de 0,2µm para remoção de células e algum material particulado remanescente da etapa anterior de filtração em lã de vidro. Na etapa seguinte, chamada de ultrafiltração, os extratos foram concentrados em membranas de 5 kDa, com pressão máxima de 10 psi em temperatura ambiente.

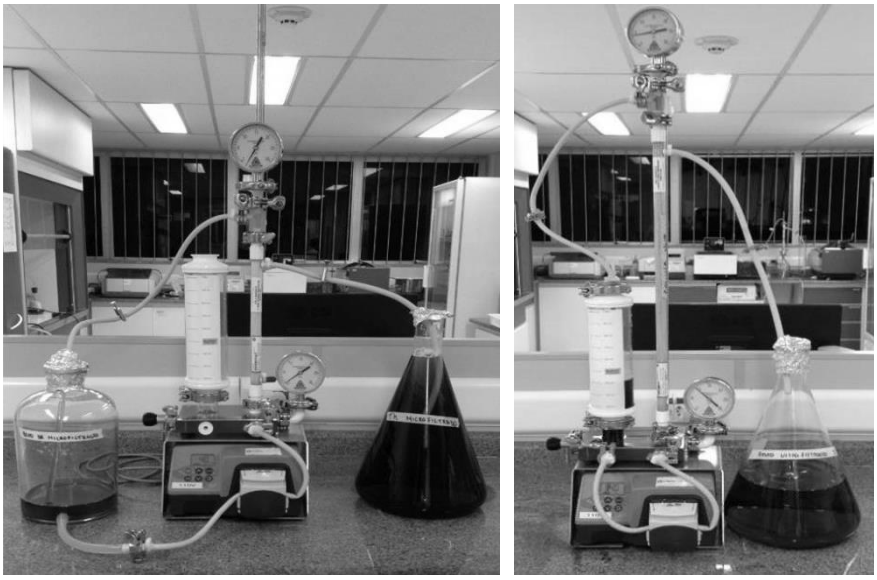

Figura 4.5. Sistema *Hollow Fiber* para Microfiltração (esquerda) e Ultrafiltração (direita).

Durante a etapa de concentração, foram coletadas amostras do extrato bruto enzimático, do permeado e do extrato ultrafiltrado (chamado de concentrado) para a quantificação das atividades enzimáticas segundo o protocolo descrito posteriormente neste capítulo. Os cálculos das perdas foram realizados com base nas atividades encontradas no permeado em relação ao extrato bruto. Ao final, 2 concentrados foram produzidos, um proveniente do biorreator de coluna de bolhas e outro do STR.

4.15. Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) de bagaço de cana utilizando os preparados enzimáticos

4.15.1 Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos produzidos na coluna de bolha e no STR

Visando avaliar a eficiência de hidrólise dos coquetéis enzimáticos produzidos, um ensaio em frasco agitado foi realizado. Os experimentos foram conduzidos em microtubos, em triplicata, contendo 1,5 mL de volume reacional, 25 g/L de celulignina parcialmente deslignificada (CPD) e uma carga protéica de 10 $mg_{proteína}/g_{celulose\ presente\ na\ CPD}$. Os frascos foram incubados sob agitação vertical, 50ºC por 48 horas. Tubos foram sendo retirados com o tempo para dosagem dos açúcares, sendo centrifugados a 2500 xg por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a 4ºC até a sua análise.

4.15.2 Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos em diferentes cargas de sólidos

Para avaliar a eficiência de hidrólise do coquetel enzimático, proveninente do STR, em diferentes cargas de sólidos e os possíveis impactos na geração de um xarope rico em glicose, o experimento foi conduzido em microtubos cônicos do tipo centrifuga, em triplicata, contendo 1 mL de volume reacional e uma carga proteica de 10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$. Já as cargas de sólido testadas foram 25, 50 100 e 150 g/L de celulignina parcialmente deslignificada (CPD). Os frascos foram incubados sob agitação vertical, 50ºC por 48 horas. Tubos foram sendo retirados com o tempo para dosagem dos açúcares, sendo centrifugados a 2500 xg por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a 4ºC até a sua análise.

4.15.3 Hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos para uma carga de sólidos inicial de 100 g/L

Na tentativa de se aumentar a eficiência de hidrolise e a liberação de glicose um experimento em batelada alimentada de sólidos foi realizado e este consistiu em iniciar a hidrólise com um carga de sólidos de 100 g/L de CPD, fazendo duas alimentações de 50 g/L no decorrer do ensaio (72 e 144h). A carga de proteínas (coquetel enzimático proveniente do STR) foi fixada em 10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ em relação a carga de sólidos de 100 g/L iniciais. O experimento foi conduzido em tubos cônicos do tipo centrifuga, em triplicata, contendo 10 mL de volume reacional. Os frascos foram incubados sob agitação vertical a 50ºC. Amostras foram sendo retirados com o tempo para dosagem dos açúcares, sendo centrifugados a 2500 xg por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a 4ºC até a sua análise.

4.15.4 Estudo da hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos e enzimas

Objetivando a redução do tempo total de hidrólise em batelada alimentada, ensaios em batelada alimentada de sólidos foram realizados e estes consistiam em iniciar a hidrólise com um carga de sólidos de 50 g/L de CPD, fazendo três alimentações de 50 g/L no decorrer do ensaio (6, 24 e 48h). Ao primeiro experimento foi adicionado a carga total de enzimas (10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$) em relação aos 200 g/L de CPD finais. Ao segundo foi adicionado a carga enzimática de forma particionada, fazendo uma adição inicial de 2,5 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ e mais três alimentações de 2,5 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ (nos tempos de 6, 24 e 48h), totalizando os 10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ finais. O terceiro e quarto experimentos consistiam de uma única carga enzimática inicial de 2,5 $mg_{proteína}/g_{celulose}$, em relação à carga de sólidos de 200g/L finais, sendo o quarto ensaio acrescido de albumina sérica bovina (BSA) na proporção 1:1 em relação à carga enzimática, para se avaliar a sinergia entre as celulases e esta proteína não hidrolítica, pois evitam as ligações improdutivas entre as enzimas e a lignina residual presente na biomassa utilizada, como reporta o estudo de Méndez *et al* (2017). O coquetel enzimático

utilizado nesse experiemnto foi o proveniente do STR. Os experimentos foram conduzidos em tubos cônicos do tipo centrifuga, em triplicata, contendo 10 mL de volume reacional. Os frascos foram incubados sob agitação vertical a 50ºC. Amostras foram sendo retirados com o tempo para dosagem dos açúcares, sendo centrifugados a 2500 xg por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a 4ºC até a sua análise.

4.15.5 Estudo do efeito sinérgico de BSA e PEG4000F na hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos

As mesmas condições descritas no item 4.15.4. para o experimento em batelada alimentada sólido com carga protéica de 10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ (coquetel enzimático proveniente do STR) adicionadas por completo no início do processo foram utilizadas, acrescentando ainda BSA e PEG4000F na proporção 1:1 em relação à carga enzimática para avaliação dos graus de sinergismo (GS) com o complexo hidrolítico. Os experimentos foram conduzidos em tubos cônicos do tipo centrifuga, em triplicata, contendo 10 mL de volume reacional. Os frascos foram incubados sob agitação vertical a 50ºC. Amostras foram sendo retiradas com o tempo para dosagem dos açúcares, sendo centrifugados a 2500 x*g* por 10 minutos e o sobrenadante armazenado a 4ºC até a sua análise. O grau de sinergismo pode ser calculado pela Equação 4.8, descrita abaixo:

$$GS = \frac{ART_{suplemento}}{ART_{controle}} \tag{4.8}$$

Onde,

GS é o grau de sinergismo; $ART_{controle}$ é a concentração (g/L) de glicose liberada após hidrólise enzimática no experimento controle, ou seja, sem a adição de BSA ou PEG4000F; $ART_{suplemento}$ é a concentração (g/L) de glicose liberada após hidrólise enzimática quando se utiliza BSA ou PEG4000F como suplementos.

GS superior a 1 significa que o suplemento auxilia positivamente na hidrólise e quanto maior for de 1, maior também é a liberação de glicose.

4.15.6 Quantificação dos açúcares por HPLC

As amostras foram submetidas a um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Shimadzu-RID-10A, detector de índice de refração, coluna Hi-plex H – Agilent – 60ºC). A fase móvel foi H_2SO_4 5 mM, a um fluxo de 0,6 mL/min. Como padrão foi utilizado glicose.

4.15.7 Cálculo da Eficiência de Hidrólise (%)

A eficiência de hidrólise em glicose foi calculada através da Equação 4.9:

$$E.H.(\%) = \frac{GLH}{GT \times 1{,}11} \times 100 \qquad (4.9)$$

Onde,

E.H. é eficiência da hidrólise enzimática (%); GLH é a concentração (g/L) de glicose liberada após hidrólise enzimática; GT é a concentração (g/L) de glicose que poderiam ser obtida com eficiência de 100% (glicose teórica). O fator 1,11 está relacionado à adição de uma molécula da água (18 g/mol) para a liberação de uma molécula de glicose (180 g/mol), após o rompimento de cada ligação covalente durante a hidrólise da celulose.

4.16. Procedimentos analíticos

Foram quantificadas as atividades celulásicas (FPase, CMCase, Avicelásica, β-glucosidásica) e xilanásica, bem como a concentração de proteínas totais. Os protocolos utilizados basearam-se na medição da intensidade de cor formada, para cada reagente específico usado, com o auxílio de um espectrofotômetro, de acordo com adaptações de Ghose (1987),

Adney & Baker (1996) e Eveleigh *et al.* (2009). As atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais (UI), sendo que uma unidade de atividade equivale a liberação de 1 µmol de açúcar redutor respectivo por minuto. Dessa forma, pôde-se avaliar e discutir acerca dos métodos implementados neste trabalho e os seus impactos na produção de enzimas hidrolíticas. Foram realizadas, também, análises eletroforéticas, onde separa-se por tamanho molecular as proteínas presentes na amostra.

4.16.1 Preparo do reagente DNS

O reagente DNS foi preparado seguindo-se as quantidades apresentadas na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Componentes do reagente DNS.

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

Fonte: MILLER (1959)

Os dois primeiros componentes foram dissolvidos na água previamente. Todos os outros componentes foram adicionados em seguida. A solução foi armazenada ao abrigo de luz por 24 horas e depois filtrada em papel de filtro.

4.16.2 Preparo do tampão citrato de sódio 0,05M, pH 5.0

O tampão citrato de sódio 0,05M é preparado a partir da mistura de duas soluções, uma de ácido cítrico 0,1 M e a outra de Citrato de Sódio 0,1 M. Para preparar 1 L deste tampão, são misturados 205 mL da solução de ácido cítrico 0,1 M, 295 mL da solução de citrato de sódio 0,1 M e 500 mL de água destilada. O pH é ajustado para 5 com a adição das soluções de citrato de sódio (para aumentar o pH) ou ácido cítrico (para diminuir o pH).

4.16.3 Quantificação da atividade avicelásica

Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 µL de enzima diluída em tampão de citrato de sódio 50mM e pH 5, e 50 µL de solução Avicell® 2% m/v (20 g/L). A mistura foi incubada a 50 ^{o}C por 15 minutos e depois levada ao banho fervente por 5 minutos. Depois, 300 µL de reagente ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) foram adicionados aos microtubos, os quais foram levados ao banho de 100°C por 5 minutos. Após este intervalo, 1,5 mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional também foram feitos a fim de excluir as suas interferências nas leituras das absorvâncias dos microtubos experimentais. Cada análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540 nm e depois, as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

4.16.4 Quantificação da atividade β-glucosidásica

Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 µL de enzima diluída em tampão de citrato de sódio 50 mM e pH 5, e 50 µL de solução de celobiose 2% m/v (20g/L). Durante 15 minutos, a mistura foi incubada a 50°C e depois levada ao banho fervente por 5 minutos. Após este intervalo de tempo, utilizou-se o kit glicose oxidase (GOD) para quantificar a glicose liberada pelo método da glicose oxidase. Após a adição do reagente do kit, os microtubos foram incubados a 37°C por 10 minutos. Após este intervalo, 1 mL de água destilada foi adicionado, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato, padrão do kit e branco reacional também foram feitos a fim de excluir as suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Cada análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 505 nm e depois, as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

4.16.5 Quantificação da atividade CMCásica

Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 µL de enzima diluída em tampão de citrato de sódio 50 mM e pH 5, e 50 µL de solução de carboximetilcelulose (CMC) 2% m/v (20 g/L). Os microtubos foram incubados, durante 15 minutos, a 50°C e, posteriormente, levados ao banho a 100°C por 5 minutos. Depois, 300 µL de reagente DNS foram adicionados e os microtubos foram levados ao banho fervente por 5 minutos. Após este intervalo, 1,5 mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional também foram feitos a fim de excluir as suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Cada análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540nm e depois, as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

4.16.6 Quantificação da atividade em Papel de Filtro (FPase)

Uma tira de papel de filtro de 1x6 cm enroscada foi inserida em um tubo de ensaio para atuar como substrato na quantificação da atividade de celulose total. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5 e 0,5 mL de enzima diluída neste mesmo tempão. Os tubos foram levados ao banho a 50ºC durante 1 hora e, posteriormente, ao banho fervente por 5 minutos. Em seguida, 3 mL do reagente DNS foram adicionados em cada tubo, os quais foram incubados por 5 minutos em banho de 100ºC. Após este intervalo de tempo, 20 mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Tubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional também foram feitos a fim de excluir as suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Cada análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se o tubo de ensaio com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540nm e depois, as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

4.16.7 Quantificação da atividade xilanásica

Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 µL de enzima diluída em tampão de citrato de sódio 50 mM e pH 5, e 50 µL de solução de xilana 2% m/v. Os microtubos foram incubados, durante 15 minutos, a 50°C e, em seguida, levados ao banho a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 300 µL de reagente DNS e os microtubos foram incubados a 100°C por 5 minutos. Após este intervalo, 1,5 mL de água destilada foram adicionados, seguido de homogeneização.

Microtubos para controle de enzima, controle de substrato e branco reacional também foram feitos a fim de excluir as suas interferências nas leituras de absorvância dos microtubos experimentais. Cada análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se o microtubo com branco experimental para calibrar o espectrofotômetro a 540 nm e depois, as absorvâncias dos sobrenadantes dos demais microtubos foram registrados.

4.16.8 Determinação do teor de proteínas

Primeiramente, foi construída uma curva padrão a partir de uma solução de albumina bovina sérica (BSA) com concentrações variando de 50 a 1000 mg/L. Para o protocolo de quantificação de proteínas foram utilizados microtubos de 2 mL aonde 20 µL de amostra (água para o branco), diluída em água destilada, foram adicionados a 1000 µL de reativo Bradford (BioRad) (Bradford, 1976).

A solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Cada análise foi realizada em triplicata. A absorvância dos microtubos foi lida em 595 nm, calibrando-se a sua leitura com o branco experimental.

4.16.9 Eletroforese SDS-PAGE

Determinou-se o perfil eletroforético, em condições desnaturantes, dos concentrados produzidos com o objetivo de identificar proteínas majoritárias.

As amostras foram preparadas com tampão de amostra, fervidas por cinco minutos e aplicados no gel, que foi confeccionado de acordo com os componentes descritos na Tabela 4.5. Foi utilizado como marcador de massa molecular o padrão Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards (Biorad), que abrange a faixa 10-250 kDa.

Tabela 4.5. Composição do gel de separação e do gel de empilhamento para Eletroforese SDS-Page.

Componente	Gel de separação (10%)	Gel de empilhamento
TRIS/HCl 1,5M pH 8,8	2,5 mL	-
TRIS/HCl 1M pH 6,8	-	1,25 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL
Acrilamida 30%	3,3 mL	1,3 mL
Persulfato de amônio 10%	100 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL
H2O	4 mL	7,35 mL

O gel foi submetido a uma voltagem de 150 V e corrente de 20 mA/gel em um sistema de cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra system, marca Bio-Rad). Após a corrida, os géis foram corados com solução corante (metanol 40%, ácido acético 10 % e coomasie brilhante R-250 0,1 %) por 30 minutos e descorados com ácido acético 10% e metanol 25% até a aparição das bandas características.

4.16.10 Zimogramas

Para o zimograma de celulases com atividade CMCásicas (CMC) e Xilanásicas, foi adicionada 0,2 % m/v de CMC e Xilana para cada composição do gel de poliacrilamida, respectivamente; e para β-glucosidases, o preparo do gel seguiu os mesmos procedimentos para o gel SDS/PAGE, porém de caráter não desnaturante.

Para revelação de celulases com atividade em CMC e Xilana, os géis foram imersos em solução Triton x-100 1% (v/v) e mantidos sob agitação constante durante 30 min, para remoção do SDS. Os géis foram colocados em recipientes com tampão citrato e incubados a 50°C por 20 min. Na sequência,

foram corados com solução vermelho de congo 0,1% (m/v) por 30 min, sendo, posteriormente, lavados sucessivas vezes com solução de NaCl 1 M. Após completo aparecimento das bandas os géis foram lavados com solução de ácido acético 5% (v/v) e imediatamente foto documentados.

Para o gel de atividade de β-glucosidases, o gel foi imerso em solução Triton x-100 1% (v/v) e mantido sob agitação constante durante 30 min, para remoção do SDS. Em seguida, a solução foi substituída por tampão citrato de sódio pH 5,0, 50 mM e mantida sob agitação constante durante 20 minutos. O procedimento de lavagem com tampão foi repetido três vezes. A revelação foi realizada com solução de esculina 0,1% (m/v). Após 30 minutos de incubação sob agitação a 50°C a solução de cloreto férrico 0,03% (m/v) foi adicionada à temperatura ambiente. Ao aparecimento das bandas, o gel foi foto documentado.

5. Resultados e Discussão

5.1. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização das biomassas

A Tabela 5.1 apresenta a composição da biomassa lignocelulósica antes e após as etapas de pré-tratamentos utilizadas e a composição do farelo de trigo, que foi empregado como um dos componentes do meio de produção de hidrolases. A utilização do pré-tratamento ácido seguido do alcalino mostrou-se mais eficiente na geração de um material com maior teor em glucanas.

Tabela 5.1. Composição do bagaço de cana e do farelo de trigo *in natura* e das frações pré-tratadas do bagaço de cana

	%Glucanas	**%Xilanas**	**%Lignina**	**%Cinzas**
In natura	34,8±1,5	18,5±1,1	25,9±2,1	1,5±0,4
CA	46,5±1,2	5,9±0,2	29,1±1,1	1,8±0,9
CAPD	48,6±2,0	19,1±0,9	7,0±0,7	2,1±0,4
CPD	70,6±5,8	2,1±0,4	9,2±0,8	2,4±1,1
Farelo de Trigo	20,8±3,1	20,1±1,1	15,2±0,7	2,2±0,3

CA: celulignina ácida; CAPD: celulignina alcalina parcialmente deslignificada; CPD: celulignina parcialmente deslignificada;

O pré-tratamento ácido é reportado na literatura como o responsável por remover grande parte da hemicelulose (xilanas) presente no bagaço, o que pode ser corroborado pelos resultados obtidos na Tabela 5.1, onde se observa uma redução de 18,5% para 5,9% no teor deste polissacarídeo na amostra que foi submetida somente ao procedimento com ácido diluído e para 2,1% na celulignina parcialmente deslignificada. Por conseguinte, o pré-tratamento alcalino é responsável pela redução do teor de lignina e pode ser observada sua importância quando é analisada a redução de 25,9% no bagaço *in natura* para 7,0% na CAPD e 9,2% na CPD. O uso do pré-tratamento ácido e em sequência o alcalino gera um material com altos teores em glucanas, que é o objetivo deste procedimento. Os resultados obtidos foram de acordo com os encontrados por Méndez *et al.* (2016), onde é reportado os seguintes valores para as frações pré-tratadas: CA: teor de glucanas igual a 47,8±0,1; teor de

xilanas 14,6±0,3; teor de lignina 25,7±0,5 e teor de cinzas 0,1±0,04; CAPD: teor de glucanas igual a 57,8±1,1; teor de xilanas 19,3±1,1; teor de lignina 5,3±0,2 e teor de cinzas 0,5±0,02; e CPD: teor de glucanas igual a 67,1±0,1; teor de xilanas 12,5±0,6; teor de lignina 5,5±0,8 e teor de cinzas não determinado.

5.2. Avaliação do potencial produtor de uma linhagem mutante de *P. funiculosum*

Com o objetivo se avaliar se o potencial produtor de uma linhagem mutante do fungo e que o mesmo estivesse realmente "super-expressando" β-glucosidases um experimento comparativo foi realizado. A Figura 5.1 apresenta os perfis de produção desta classe enzimática por duas linhagens de *P. funiculosum* nativo presentes no banco de culturas do LADEBIO e pela linhagem mutante do mesmo fungo.

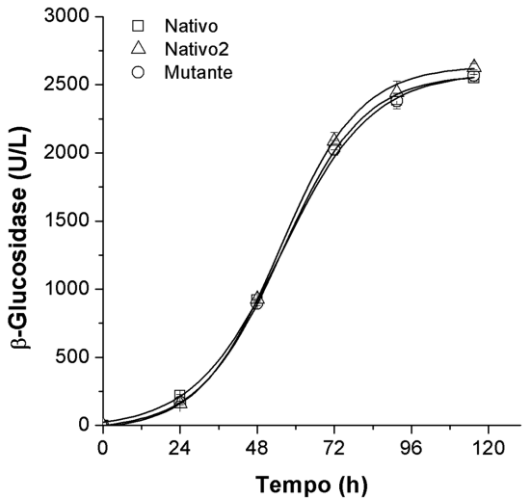

Figura 5.1. Perfis de produção de β-glucosidases para os fungos nativos e mutante (30ºC, 200 rpm)

Após análise dos resultados, pode-se afirmar que o processo de mutação não foi bem sucedido e a produção enzimática de interesse se manteve inalterada à encontrada quando o fungo nativo é utilizado, não sendo reportadas melhorias na produtividade de β-glucosidases. Logo, o fungo nativo foi escolhido para dar prosseguimento aos experimentos de produção enzimática.

5.3. Perfil de Crescimento de *P. funiculosum* em glicose e lactose

Com o objetivo se levantar o perfil de crescimento do fungo em estudo em dois tipos de açúcares diferentes, foi realizado um experimento utilizando glicose e lactose como fontes de carbono. A Figura 5.2 mostra o perfil de crescimento em glicose. Não foi observado crescimento do fungo em lactose.

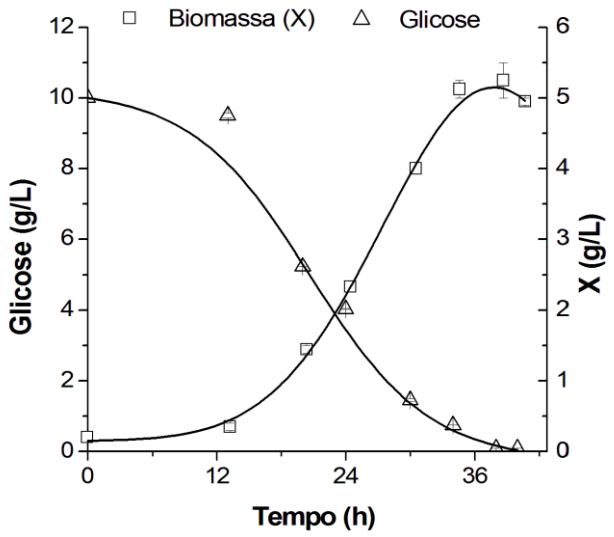

Figura 5.2. Perfil cinético do crescimento de *P. funiculosum* em glicose (30ºC, 200 rpm)

O fungo apresentou uma fase *lag* de aproximadamente 12 horas, quando então a fase exponencial foi iniciada, se mantendo até 34 horas de cultivo, após a qual a cultura entrou em fase estacionária e de morte em seguida. O fungo apresentou uma taxa específica de crescimento (μ_x) de 0,0796 h^{-1}, fator de rendimento de células por substrato ($Y_{X/S}$) de 0,51 $g_{células}/g_{glicose}$ e tempo de duplicação (t_D) de 12,6 h.

5.4. Determinação da melhor fonte de carbono para produção de celulases e xilanases

Foram testadas diferentes frações do bagaço de cana (*in natura*, CA, CAPD, CPD) e Avicell® como fontes indutoras da produção de celulases e xilanases. A Figura 5.3 mostra os perfis de produção enzimática e proteínas para cada material utilizado.

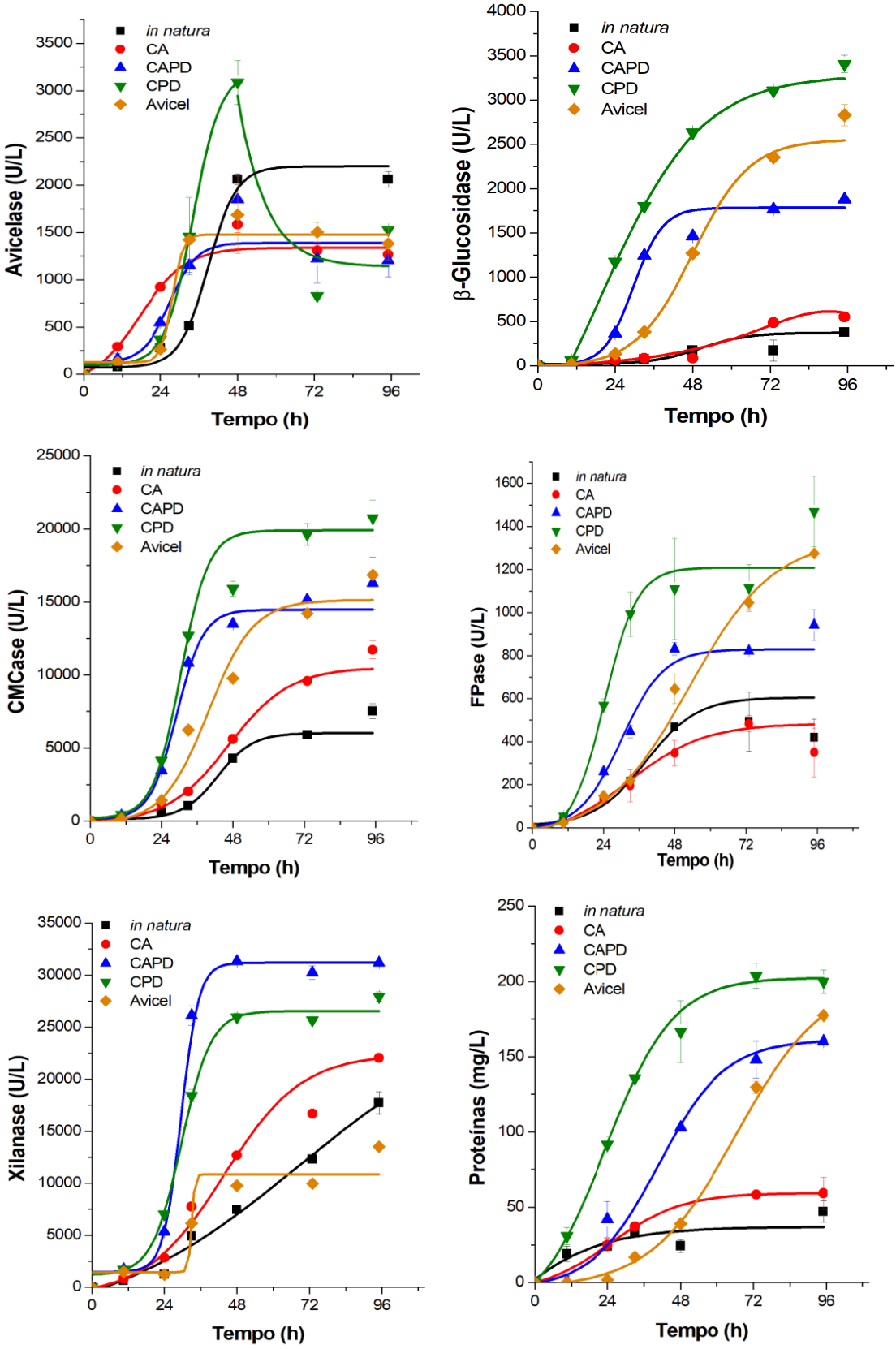

Figura 5.3. Perfis de produção de celulases, xilanases e proteínas utilizando bagaço *in natura*, CA, CAPD, CPD e Avicell (30ºC, 200 rpm, OD entre 30 e 50%, 1 vvm)

Da avaliação dos perfis cinéticos, constata-se que CPD é a melhor fonte indutora de produção de celulases, muito provavelmente por conter maior teor em celulose entre as biomassa provenientes da cana-de-açúcar, induzindo uma maior expressão na síntese destas enzimas. No tocante à produção de xilanases, o melhor resultado foi obtido com CAPD, sendo o material que contém o maior teor em hemicelulose e menor em lignina, razão pela qual seja plausível que CAPD leve a uma maior indução na produção de xilanases. Por outro lado, CPD foi a fonte, depois de CAPD, que levou ao melhor resultado na síntese de xilanases, embora possuindo o menor teor de hemicelulose. Acredita-se que isto, muito provavelmente, deva-se aos menores teores de lignina em ambas as fontes, o que aumenta o acesso do fungo filamentoso às porções polissacarídicas. A Tabela 5.2 mostra os valores de produtividades volumétricas (Q_p) máximas alcançadas para cada material utilizado.

Tabela 5.2. Produtividade volumétrica (Q_p) máxima alcançada para cada material utilizado

Produtividade Máxima	*in natura*	CA	CAPD	CPD	Avicell
Avicelases (U/L.h)	42,9	33,0	38,5	**64,3**	35,2
CMCases (U/L.h)	89,3	131,4	328,1	**331,4**	203,5
FPase (U/L.h)	9,8	7,2	17,3	**30,1**	14,3
β-glucosidases (U/L.h)	3,5	6,6	37,7	**54,9**	32,2
Xilanases (U/L.h)	186,7	264,2	**652,7**	557,9	203,6
Proteínas (mg/L.h)	1,0	1,1	3,1	**4,1**	1,9

CA: celulignina ácida; CAPD: celulignina alcalina parcialmente deslignificada; CPD: celulignina parcialmente deslignificada

Levando-se em consideração as produtividades apresentadas, CPD foi escolhida como a melhor fonte indutora para a produção de hidrolases e foi utilizada nos ensaios posteriores.

5.5. Determinação da melhor carga de sólidos para produção de celulases e xilanases

Foram avaliadas as concentrações de 2, 5, 10, 15 e 20 g/L de CPD como fontes indutoras da produção de celulases e xilanases. A Figura 5.4 mostra os perfis de produção enzimática e proteínas para cada carga de sólido utilizada.

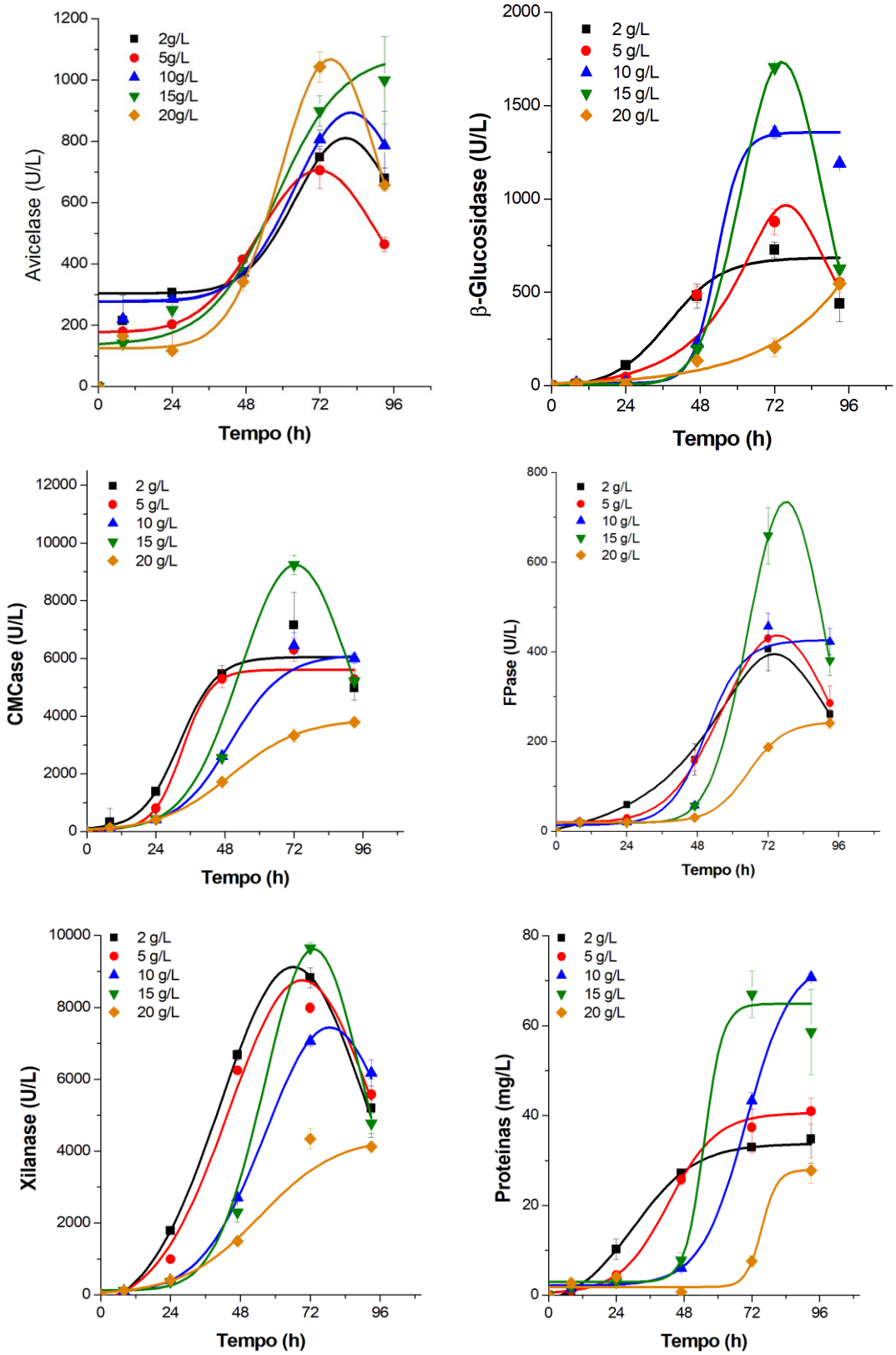

Figura 5.4. Perfis de produção de celulases, xilanases e proteínas utilizando diferentes cargas de CPD (30ºC, 200 rpm, OD entre 30 e 50%, 1 vvm)

Analisando os resultados, pode-se observar que a carga de CPD impacta diretamente na produção enzimática. Nota-se, ainda, que 15g/L de CPD foi a mais adequada, obtendo-se atividades máximas de β-glucosidases de 1706 U/L, FPase de 660 U/L, CMCase de 9240 U/L, Avicelase de 864 U/L, Xilanase de 9651 U/L e proteínas totais de 67 mg/L. A Tabela 5.3 apresenta as produtividades volumétricas (Q_p) máximas alcançadas em cada caso.

Tabela 5.3. Produtividade volumétrica (Q_p) máxima alcançada para cada carga de sólido

Produtividade Máxima	2 g/L	5 g/L	10 g/L	15 g/L	20 g/L
Avicelases (U/L.h)	10,4	10,3	11,2	12,0	**13,9**
CMCases (U/L.h)	116,2	112,5	89,5	**128,3**	46,2
Fpase (U/L.h)	5,6	6,0	6,3	**9,2**	2,6
β-Glucosidases (U/L.h)	10,2	12,2	18,8	**23,7**	5,9
Xilanases (U/L.h)	122,5	132,9	98,0	**134,0**	60,3
Proteínas (mg/L.h)	0,6	0,6	0,8	**0,9**	0,3

Baixas cargas sólidas não suprem a demanda do microrganismo, fazendo com que a fonte de carbono se esgote antes da produtividade máxima esperada. Por outro lado, altas cargas de sólidos podem causar efeitos que desaceleram o crescimento, devido ao aumento da viscosidade do meio, reduzindo a transferência de massa total, ou seja, há menor difusão de O_2 para o suprimento de todos os outros nutrientes, incluindo a própria fonte de carbono. Por conseguinte, a concentração de 15 g/L de PDC mostrou ser a melhor para o aumento da produtividade em hidrolases por *P. funiculosum*.

5.6. Determinação do melhor tempo de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases

Foram avaliados os tempos de 0, 20, 24, 48 e 72 horas de pré-inóculo a fim de se verificar a possível influência na produção enzimática. A Tabela 5.4 mostra os valores de produtividade máxima alcançados para cada tempo de pré-inóculo testado.

Tabela 5.4. Produtividade volumétrica (Q_p) máxima alcançada para cada tempo de pré-inóculo testado

Produtividade Máxima	0 hora	20 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Avicelases (U/L.h)	**16,13**	16,03	15,33	8,76	13,95
CMCases (U/L.h)	13,11	15,73	11,12	8,63	**66,47**
Fpase (U/L.h)	1,71	1,37	1,38	1,44	**2,78**
β-Glucosidases (U/L.h)	2,10	2,50	1,22	0,06	**5,77**
Xilanases (U/L.h)	17,75	22,44	12,49	8,22	**80,03**
Proteínas (mg/L.h)	0,28	0,46	0,08	0,03	**0,49**

Os tempos de pré-inóculo são importantes na medida em que propicia uma melhor adaptação do fungo ao meio em que está exposto, reduzindo os tempos da fase *lag* e aumentando as taxas cinéticas. Observou-se uma redução da fase *lag* e uma maior produção enzimática com o aumento do tempo de pré-inóculo. Estes dois fatores somados ocasionaram o aumento da produtividade enzimática, que pode verificado nos resultados no maior tempo (72h), sendo este o tempo determinado como o melhor para o preparo do inóculo.

5.7. Determinação do tamanho de pré-inóculo para produção de celulases e xilanases

Nessa etapa, estudou-se a influência do tamanho do pré-inóculo para a produção enzimática. Foram ensaiados os tamanhos de 5% e 10% (v/v). A Tabela 5.5 mostra os valores de produtividade máxima alcançados para cada tempo de pré-inóculo avaliado.

Tabela 5.5. Produtividade volumétrica (Q_p) máxima alcançada para cada atividade enzimática e proteína com diferentes concentrações de pré-inóculo

Produtividade Máxima	10%	5%
Avicelases (U/L.h)	12,0	**20,6**
CMCases (U/L.h)	**128,3**	65,1
Fpase (U/L.h)	**9,2**	3,5
β-Glucosidases (U/L.h)	**23,7**	8,4
Xilanases (U/L.h)	**134,0**	67,1
Proteínas (mg/L.h)	**0,9**	0,4

Observa-se que 10% (v/v) de inóculo geram melhores resultados, efeito esperado, já que há uma maior quantidade de biomassa celular disponível para a produção enzimática. Como os valores de produtividade máxima alcançados são, na grande maioria, o dobro do observado quando comparados com aqueles obtido no cultivo com menor concentração de células, fixou-se 10% v/v como o tamanho de inóculo que deve ser utilizado.

5.8. Avaliação do potencial do farelo de trigo (FT) como indutor suplementar na produção de celulases e xilanases

Foi avaliado o potencial do farelo de trigo como componente suplementar do meio de produção de hidrolases. O experimento consistiu em realizar dois cultivos: um em biorreator controle, contendo somente CPD (15 g/L) e outro contendo CPD (15 g/L) + FT (5 g/L). A Figura 5.5 mostra as atividades máximas alcançadas nos dois casos em 72h de cultivo.

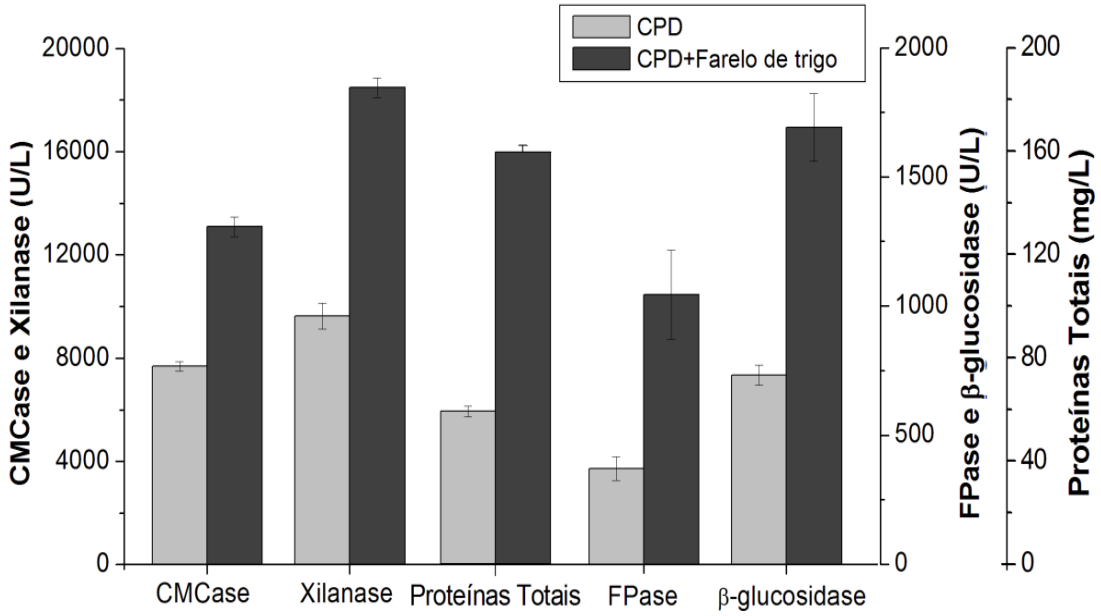

Figura 5.5. Atividades máximas alcançadas no ensaio comparativo entre CPD (barras claras) e CPD+Farelo de Trigo (barras escuras) (30ºC, 200 rpm, 72h)

Pode-se observar que o farelo de trigo induz uma maior produção enzimática e sua utilização deve ser mais estudada. A Tabela 5.6 mostra as produtividades máximas obtidas.

Tabela 5.6. Produtividade volumétrica (Q_p) máxima alcançada para CPD e CPD+FT

Produtividade Máxima	CPD	CPD+FT
Avicelases (U/L.h)	**34,9**	19,4
CMCases (U/L.h)	159,1	**272,2**
Fpase (U/L.h)	7,0	**14,0**
β-Glucosidases (U/L.h)	17,0	**32,2**
Xilanases (U/L.h)	200,1	**384,5**
Proteínas (mg/L.h)	1,2	**1,9**

CPD: celulignina parcialmente deslignificada; FT: farelo de trigo

Com o objetivo de se analisar se o amido presente no farelo de trigo é o responsável pelo aumento da produtividade, um experimento foi realizado, cultivando-se o fungo na presença de amido. A Figura 5.6 mostra o resultado para as atividades encontradas (em 72h de cultivo) quando as hidrolases são produzidas na presença ou ausência deste polissacarídeo.

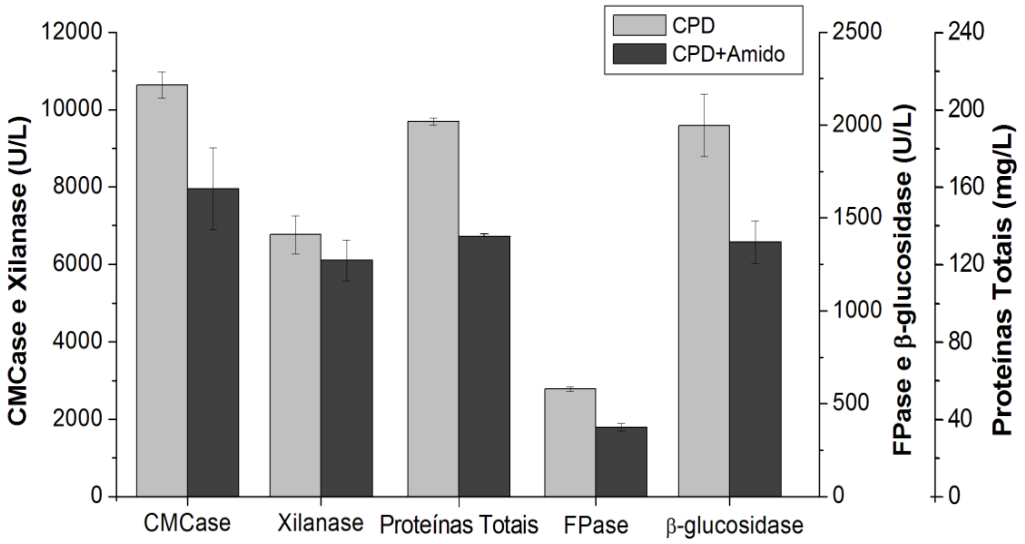

Figura 5.6. Atividades máximas alcançadas no ensaio comparativo entre CPD (barras claras) e CPD+Amido (barras escuras) (30ºC, 200 rpm, 72h)

Como pode ser observado, o efeito do amido não se manifestou positivamente na produção de hidrolases, chegando a reduzir em 31% a atividade β-glucosidásica, 25% a CMCásica e 17% a concentração de proteínas, não sendo o responsável pelo aumento na produtividade observada ao se utilizar o farelo de trigo.

No século passado, WAYMAN & CHEN (1992) já haviam estudado o farelo de trigo com indutor na produção de celulases por *Trichoderma reesei* Rut C-30 ATCC 56765, chegando à conclusão de que as proteínas presentes no trigo e seus derivados, como o farelo, são essenciais para uma boa produção de celulases, pois suprem o metabolismo do fungo e reduzem gastos com outros suplementos como peptona e uréia. Em pesquisas mais recentes, SUN *et al.* (2008) também identificaram a interessante aplicabilidade do farelo na indução da produção de celulases, agora pelo fungo *Penicillium decumbens* 114-2, comprovando que não é o amido presente no farelo que induz a produção das celulases, mas que toda a composição desta biomassa é importante, principalmente as proteínas e minerais presentes, corroborando com os resultados obtidos nesta dissertação. Segundo esses autores, a composição do farelo de trigo em celooligossacarídeos é um dos mais significantes fatores para a produção de celulases e xilanases.

Com os valores de produtividade, apresentados na Tabela 5.6, fica evidente a importância da utilização do farelo de trigo como suplemento do meio de produção, chegando a dobrar para algumas classes enzimáticas. Portando, define-se aqui a utilização do farelo de trigo como suplemento do meio e sua concentração foi determinada em experimentos posteriores.

5.9. Planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD

Como o farelo de trigo se mostrou eficiente na tentativa de aumentar a produtividade, um planejamento experimental do tipo DCCR foi executado. A Tabela 5.7 mostra os resultados para o planejamento DCCR. Pode-se constatar a forte influência que o farelo de trigo imprime na produção de todas as classes enzimáticas mensuradas e na concentração de proteínas totais, chegando a valores máximos de 758,2 U/L para FPase, 11466,7 U/L para CMCase, 2810,1 U/L para β-glucosidase, 9544,3 U/L para xilanase e 282,6 mg/L de proteínas totais e todos esses valores foram obtidos quando a concentração máxima de farelo de trigo estipulada foi utilizada, ou seja, 5 g/L.

Os gráficos de Pareto abaixo, Figuras 5.7 ate 5.11, mostram os efeitos e significâncias das variáveis utilizadas.

Tabela 5.7. Resultados para o planejamento DCCR de otimização de CPD e FT

Experimento	FPase (U/L)	CMCase (U/L)	β-glucosidase (U/L)	Xilanase (U/L)	Proteína (mg/L)
1	377,2	6366,0	1382,3	4275,3	73,1
2	562,9	9417,8	2658,9	5901,0	177,7
3	377,4	6909,6	1237,1	6408,1	75,2
4	518,8	10129,1	2529,5	8026,1	176,2
5	358,1	6907,5	1692,3	4384,9	110,2
6	370,1	7075,7	1410,4	5687,1	96,6
7	484,7	8598,5	1771,5	6494,0	152,9
8	**759,2**	**11466,7**	**2810,1**	**9544,3**	**282,6**
9 (C)	682,1	11104,2	2480,5	7574,0	218,4
10 (C)	699,8	10954,5	2486,0	7263,9	213,3
11 (C)	657,7	11064,1	2487,7	7864,1	244,6

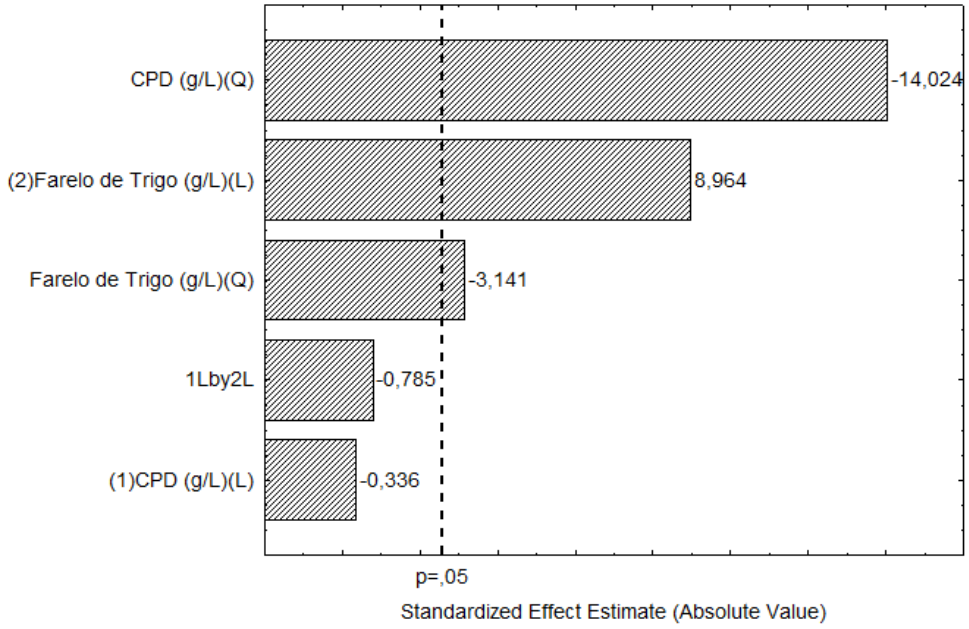

Figura 5.7. Gráfico de Pareto para **FPase**

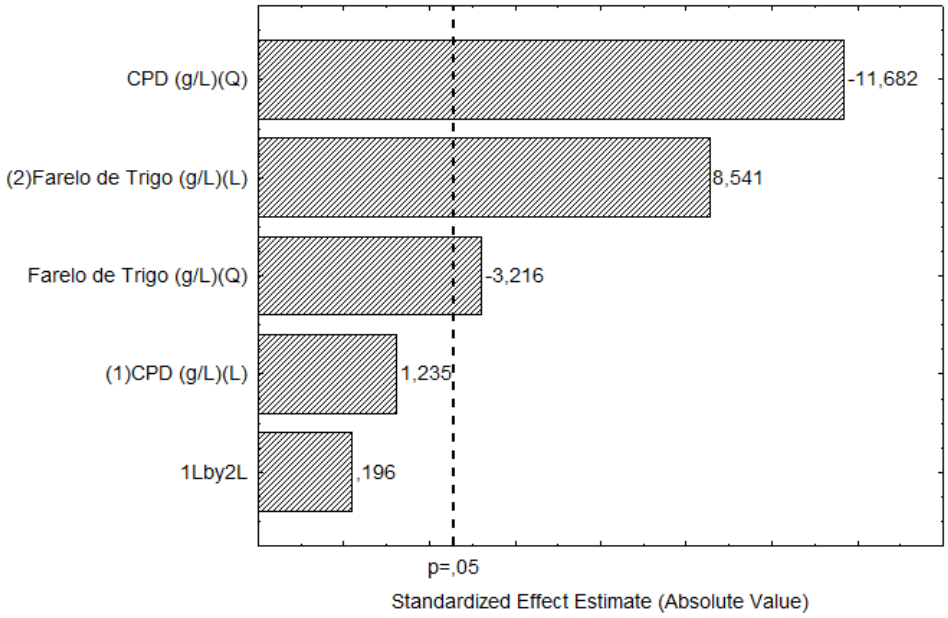

Figura 5.8. Gráfico de Pareto para **CMCase**

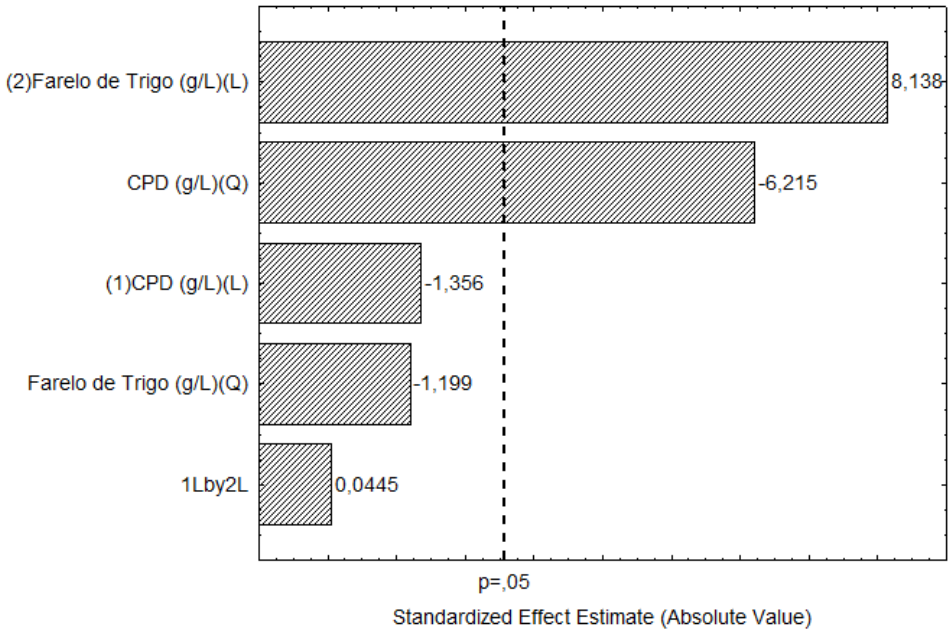

Figura 5.9. Gráfico de Pareto para **β-glucosidase**

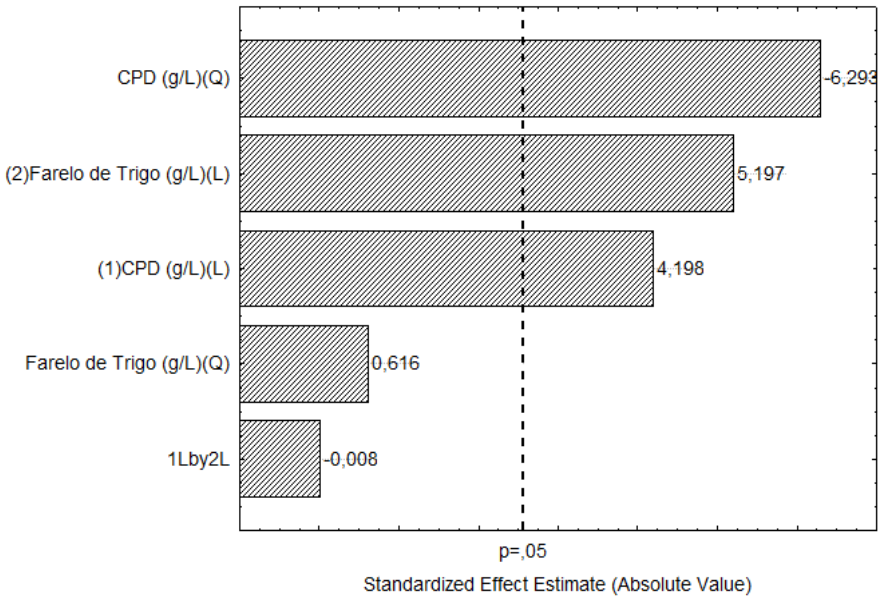

Figura 5.10. Gráfico de Pareto para **Xilanase**

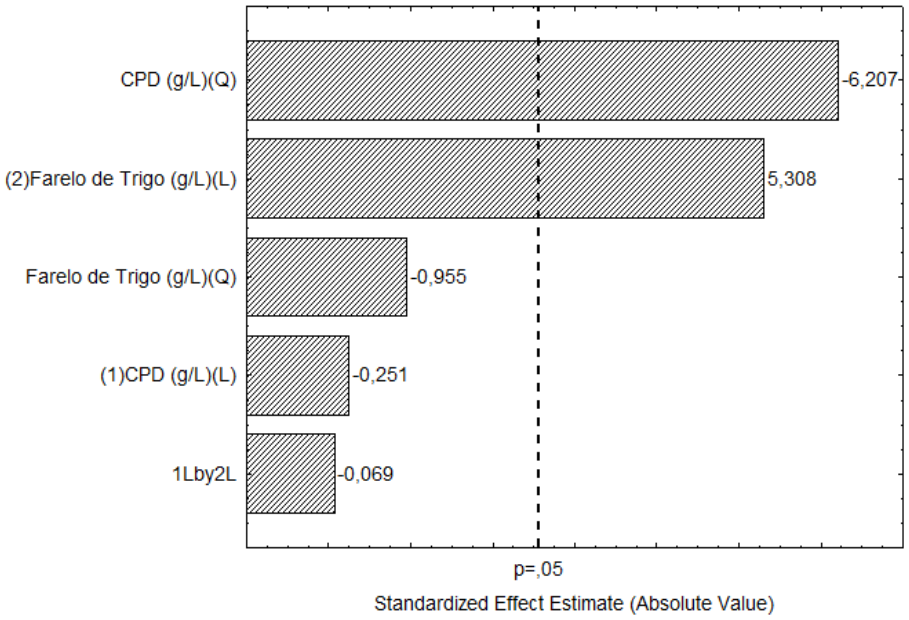

Figura 5.11. Gráfico de Pareto para **Proteínas Totais**

Podemos observar que o efeito linear do farelo de trigo é significativo em todos os parâmetros avaliados, porém seu efeito quadrático não evidencia que o aumento das atividades é linear com o aumento de sua concentração. Contudo, estipulou-se a concentração máxima de farelo de trigo em 5g/L, sendo avaliado seu efeito somente nesta faixa.

As Tabelas 5.8 até 5.12 são as análises de variância (ANOVA) para os parâmetros analisados. Pode-se observar pelo parâmetro *Lack of fit* ou falta de ajuste do modelo que não houve significância (p>0,05), ou seja, que o modelo se ajustou bem para CMCase e β-glucosidase. O efeito quadrático da CPD foi significante (p<0,05) para todas as classes enzimáticas e proteínas, denotando que houve otimização para este componente do meio. Já para o farelo de trigo, o efeito quadrático apresentou significância (p<0,05) para as atividades FPásica, CMCásica e β-glucosidásica, entretanto seus efeitos lineares foram significativos em todas as variáveis testadas. Os efeitos quadráticos significativos evidenciam comportamento curvilíneo e convexo em determinadas regiões das superfícies de respostas geradas.

Tabela 5.8. Tabela da ANOVA para a **atividade PFásica**

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	*F*	p_{valor}
(1) CPD (L)	90,4	1	90,4	0,202	0,697
CPD (Q)	156512,3	1	156512,3	350,630	0,003
(2) Farelo de Trigo (L)	63952,7	1	63952,7	143,271	0,007
Farelo de Trigo (Q)	7803,2	1	7803,2	17,481	0,053
1x2	490,2	1	490,2	1,098	0,405
Lack of fit	3045,3	3	1015,1	2,274	0,320
Erro Puro	892,7	2	446,4		
Total	225783,2	10			

Tabela 5.9. Tabela da ANOVA para a **atividade CMCásica**

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	*F*	p_{valor}
(1) CPD (L)	279300	1	279300	46,540	0,021
CPD (Q)	24956862	1	24956862	4158,609	0,000
(2) Farelo de Trigo (L)	13336062	1	13336062	2222,213	0,000
Farelo de Trigo (Q)	1882151	1	1882151	313,626	0,003
1x2	7028	1	7028	1,171	0,392
Lack of fit	903954	3	301318	50,209	0,020
Erro Puro	12003	2	6001		
Total	39503128	10			

Tabela 5.10. Tabela da ANOVA para a **atividade β-glucosidásica**

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	*F*	p_{valor}
(1) CPD (L)	56630	1	56630	3953,058	0,001
CPD (Q)	1189327	1	1189327	83021,475	0,001
(2) Farelo de Trigo (L)	2038765	1	2038765	142316,89	0,001
Farelo de Trigo (Q)	44049	1	44049	3074,856	0,001
1x2	62	1	62	4,332	0,173
Lack of fit	155011	3	51670	3606,880	0,001
Erro Puro	29	2	14		
Total	3452618	10			

Tabela 5.11. Tabela da ANOVA para a **atividade Xilanásica**

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	*F*	p_{valor}
(1) CPD (L)	4657908	1	4657908	51,704	0,019
CPD (Q)	10458911	1	10458911	116,096	0,009
(2) Farelo de Trigo (L)	7138061	1	7138061	79,234	0,012
Farelo de Trigo (Q)	102010	1	102010	1,132	0,399
1x2	15	1	15	0,000	0,991
Lack of fit	1131892	3	377297	4,188	0,199
Erro Puro	180177	2	90089		
Total	25309404	10			

Tabela 5.12. Tabela da ANOVA para a **Concentração de Proteínas Totais**

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	*F*	p_{valor}
(1) CPD (L)	42,36	1	42,36	0,099	0,783
CPD (Q)	25892,44	1	25892,44	60,313	0,016
(2) Farelo de Trigo (L)	18924,98	1	18924,98	44,083	0,022
Farelo de Trigo (Q)	604,14	1	604,14	1,407	0,357
1x2	3,17	1	3,17	0,007	0,939
Lack of fit	2486,81	3	828,94	1,931	0,359
Erro Puro	858,60	2	429,30		
Total	48754,43	10			

A Figura 5.12 representa as superfícies de respostas encontradas na análise. Pode-se observar ponto de máximos em todos os parâmetros

analisados, evidenciando que há um valor ótimo nas faixas dos níveis das variáveis (fatores) estudadas.

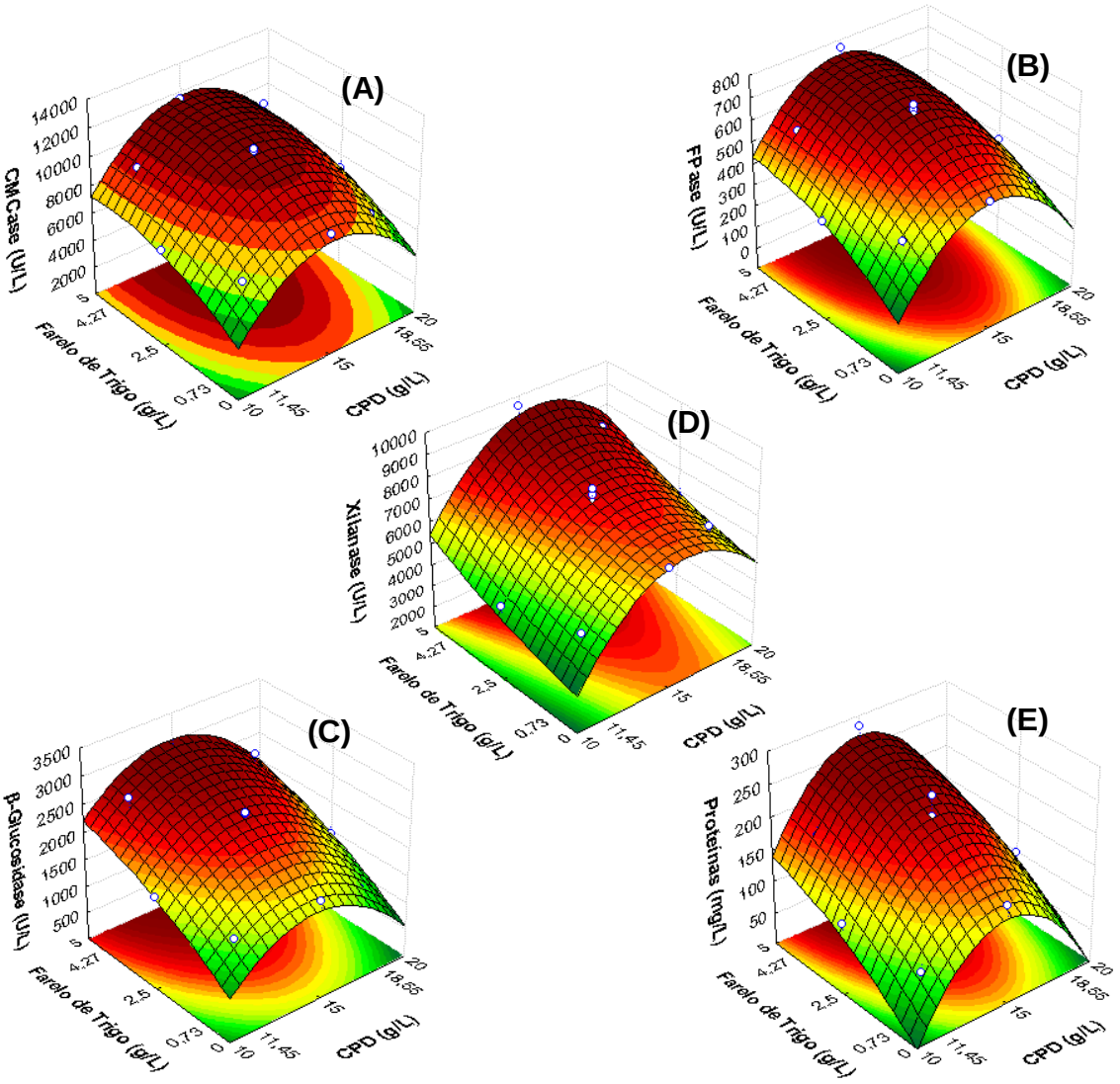

Figura 5.12. Superfícies de resposta para FPase (A), CMCase (B), β-glucosidase (C), Xilanase (D) e Proteínas Totais (E)

5.10. Validação do Planejamento experimental para determinação da concentração de farelo de trigo e CPD

Com o objetivo de se validar a condição ótima, a função *Desirability* foi utilizada. Foi determinado o modelo e os valores que maximizam a equação, levando-se em consideração todos os fatores e parâmetros envolvidos. A função *Desirability* obtida teve valor de 0,96, que significa que a função gerada atende 96% do máximo obtenível. A Figura 5.13 corresponde à superfície de

resposta da função *Desirability*. Os valores ótimos para concentração de CPD e Farelo de Trigo foram 15,1 g/L e 5 g/L, respectivamente.

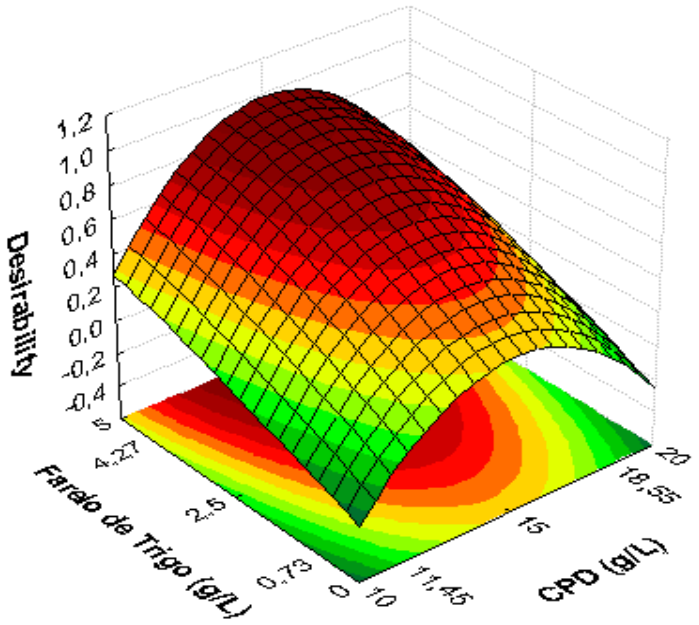

Figura 5.13. Superfície de resposta para a função *Desirability*

A Tabela 5.13 corresponde aos valores preditos pelos modelos e aos valores encontrados experimentalmente.

Tabela 5.13. Valores preditos conforme função *Desirability*

Parâmetros	Limites		Valores Preditos	Valores Experimentais
	-0,95%	+0,95%		
FPase (U/L)	660	803	731	780±54
CMCase (U/L)	11455	11982	11719	12129±837
β-glucosidase (U/L)	3006	3032	3019	2376±124
Xilanase (U/L)	8171	10214	9193	9501±504
Proteínas Totais (mg/L)	199	340	269	203±0

Ao se comparar os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho com outros encontrados na literatura, observam-se ganhos nas atividades determinadas. Em seus estudos de otimização de meio para produção de celulases por *Penicillium brasilianum* KUEB15, JUNG *et al*. (2015) obtiveram atividade CMCásica de 1180 U/L, utilizando palha de milho com fonte de carbono. MARJAMAA *et al*. (2013) obtiveram atividades xilanásicas de 760 U/L, β-glucosidásica de 1340 U/L, Endoglucanases de 3190 U/L, FPásica

de 740 U/L e Proteínas de 340 mg/L, utilizando palha de trigo pré-tratada como fonte de carbono, para cultivos com o fungo *Penicillium pulvillorum* TUB F-2220.

A técnica de planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) em conjunto com o método de superfície de resposta foram eficazes na determinação da concentração de farelo de trigo e de CPD que devem ser utilizadas para maximizar, na faixa proposta, a produção das hidrolases.

5.11. Comparação da produção enzimática em dois biorreatores diferentes: coluna de bolhas e agitado mecanicamente

Dentre os requerimentos para a seleção e construção de biorreatores, três são de destacada importância quando se tenciona cultivar fungos filamentosos. Estes sistemas reacionais devem apresentar ótimas condições de mistura (baixo e uniforme cisalhamento); permitir uniforme suspensão de sólidos e possibilitar adequado transporte de massa, particularmente em relação à transferência de oxigênio.

Embora os clássicos biorreatores de mistura completa, também conhecidos como biorreatores do tipo STR (*stirred tank reactor*), sejam amplamente utilizados nos cultivos microbianos, o emprego deste tipo de configuração, quando os microrganismos, agente do processo fermentativo, são fungos filamentosos, pode não ser uma opção adequada tendo em vista o intenso cisalhamento que imprimem. Desta forma, outras configurações de biorreator devem ser ensaiadas.

Neste contexto, a produção de hidrolases foi avaliada em biorreator do tipo coluna de bolhas, com agitação pneumática portanto, e seu desempenho comparado com o clássico biorreator STR, utilizando-se das mesmas condições operacionais. O detalhamento destas duas configurações foi descrito no capítulo de Materiais e Métodos, na seção 4.13.

As Figuras 5.14 a 5.17 mostram os perfis cinéticos de produção de hidrolases e proteínas totais por esses dois tipos de biorreatores.

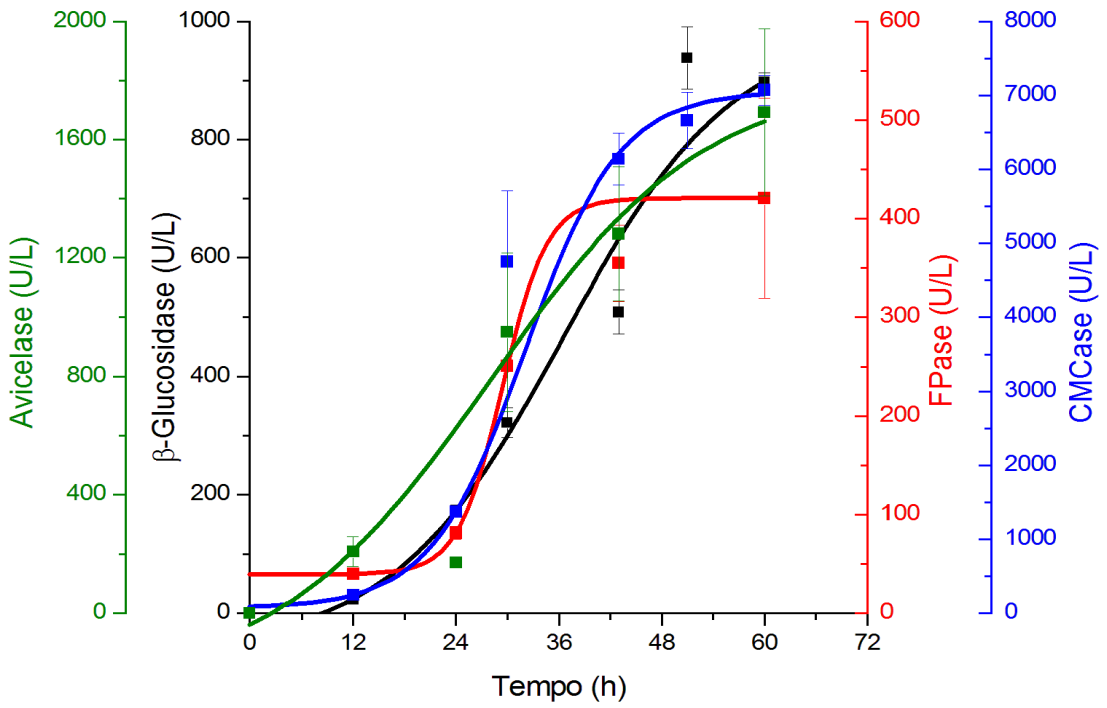

Figura 5.14. Perfis cinéticos de produção de **celulases e β-glucosidases** por *P. funiculosum* em **biorreator do tipo coluna de bolhas** (30ºC, 1 vvm, OD entre 30 e 50%)

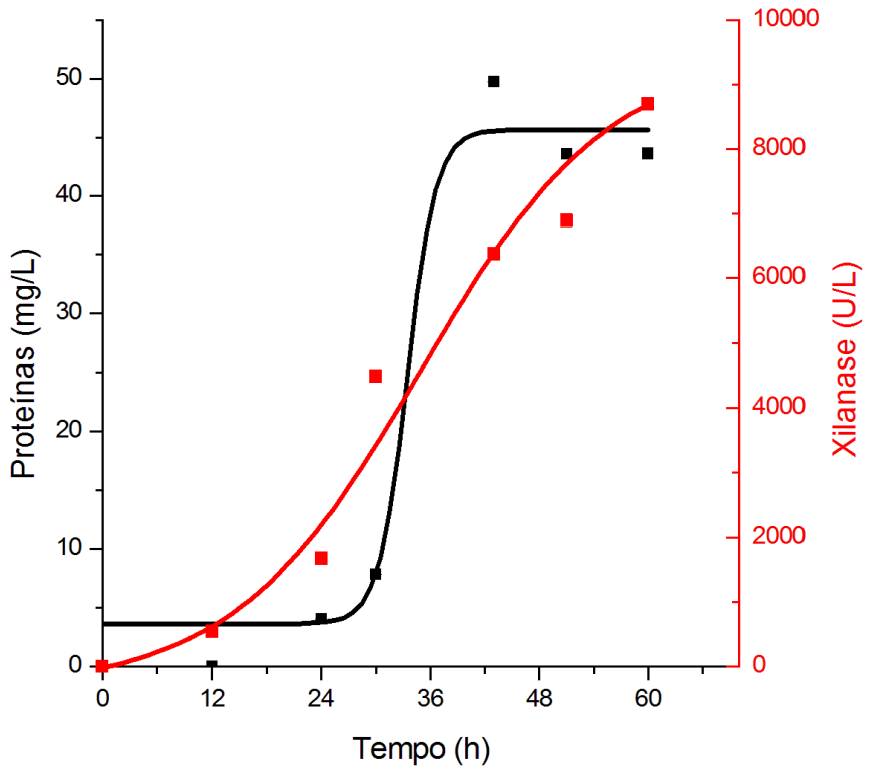

Figura 5.15. Perfis cinéticos de produção de xilanases e proteínas totais por *P. funiculosum* em **biorreator do tipo coluna de bolhas** (30ºC, 1 vvm, OD entre 30 e 50%)

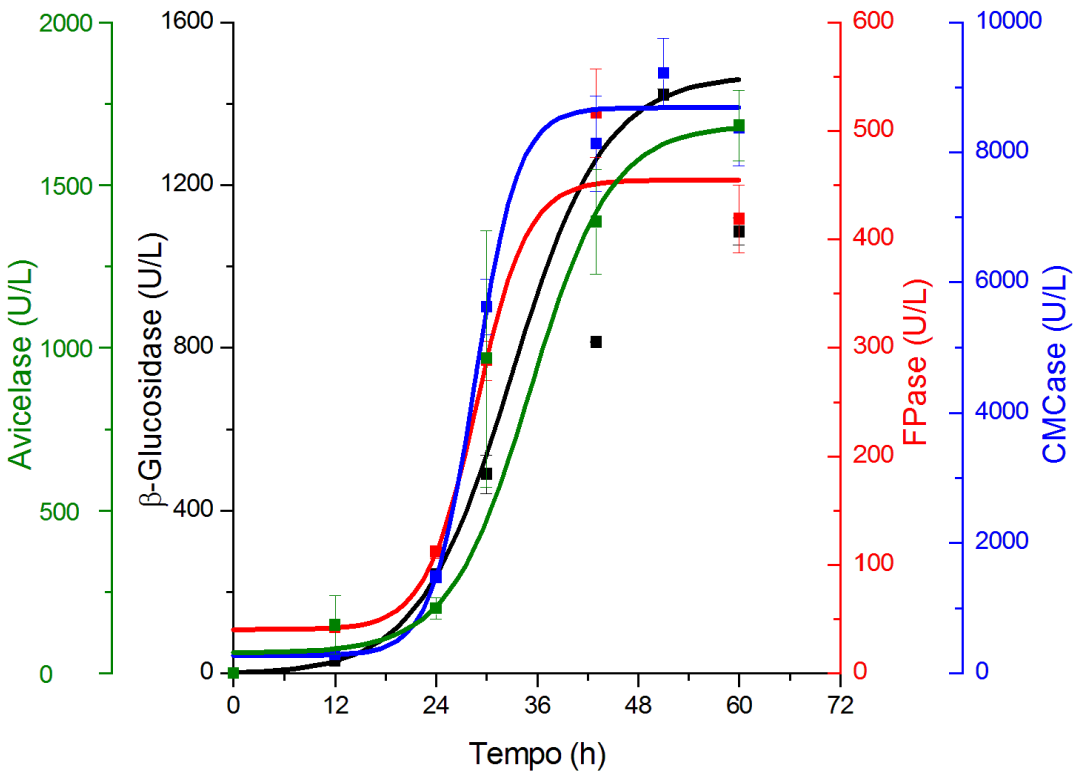

Figura 5.16. Perfis cinéticos de produção de **celulases e β-glucosidases** por *P. funiculosum* em **biorreator do tipo STR** (30ºC, 1 vvm, OD entre 30 e 50%)

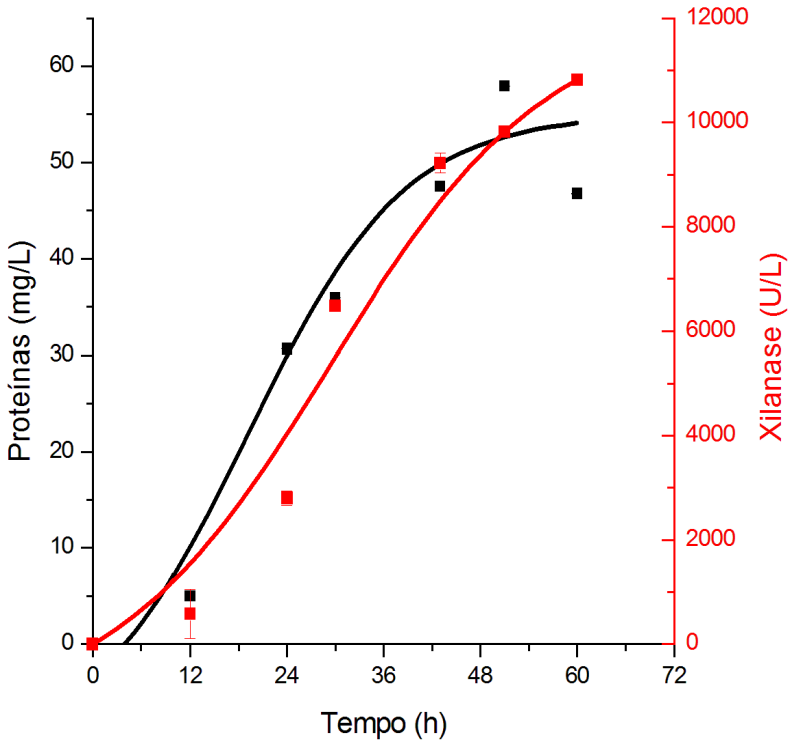

Figura 5.17. Perfis cinéticos de produção de xilanases e proteínas totais por *P. funiculosum* em **biorreator do tipo STR** (30ºC, 1 vvm, OD entre 30 e 50%)

A observação dos perfis cinéticos mostra que o biorreator do tipo STR forneceu resultados mais interessantes, atingindo valores de atividades mais altos no mesmo tempo, o que têm como consequência o aumento da produtividade enzimática. Biorreatores do tipo STR possuem maior grau de mistura do que o de colunas de bolhas e uma associada transferência de massa mais efetiva, tanto de gases, como de oxigênio, quanto dos próprios nutrientes presentes no meio. Portanto, uma melhor disponibilidade de energia e nutrientes para o microrganismo refletirá diretamente no sistema de expressão protéica, que por sua vez impacta diretamente na produtividade enzimática volumétrica (Q_p), como pode ser observado na Tabela 5.14. O menor grau de mistura no biorreator tipo coluna de bolhas levou à decantação de CDP e a uma menor disponibilidade da fonte de carbono para o micro-organismo, razão pela qual este ensaio apresentou desempenho inferior comparado àquele no biorreator STR.

Tabela 5.14. Produtividades volumétricas (Q_p) máximas alcançadas para os biorretores tipo coluna de bolhas (CB) e agitado mecanicamente (STR)

Produtividade Máxima	CB	STR
Avicelases (U/L.h)	29,8	32,2
CMCases (U/L.h)	158,3	189,1
FPase (U/L.h)	8,2	12,0
β-Glucosidases (U/L.h)	18,4	27,9
Xilanases (U/L.h)	148,2	214,4
Proteínas (mg/L.h)	0,9	1,1

Depois de atingida a produção máxima, a operação foi interrompida e o meio fermentado foi filtrado, sendo a fração líquida denominada de extrato bruto, que foi concentrado em sistemas de membranas de fibras ocas. Geraram-se dois concentrados enzimáticos, um proveniente do biorreator colunas de bolhas e outro do STR. Os mesmos foram posteriormente utilizados na hidrólise da biomassa lignocelulósica pré-tratada a fim de se determinar a eficiência de hidrólise (EH) de cada concentrado enzimático e, assim, determinar qual sistema operacional produziu o preparado enzimático mais eficiente. Isto é importante porque a eficiência catalítica será função das proporções de cada entidade enzimática no concentrado. As Tabelas 5.15 e 5.16 exibem as atividades nos principais estágios, assim como a perda relativa

no processo de concentração enzimática. O fator de concentração foi de 100 vezes para coluna de bolha e de 38 vezes para o STR.

Tabela 5.15. Atividades enzimáticas das etapas de concentração do extrato produzido na **coluna de bolhas** – fator de concentração de 100X

Fração	FPase (U/L)	CMCase (U/L)	β-glucosidase (U/L)	Avicelase (U/L)	Xilanase (U/L)	Proteína (mg/L)	Volume (L)
Extrato Bruto	449	7.849	771	1.346	8.205	32	8,03
Concentrado	24.913	397.474	60.549	25.519	349.387	1.312	0,08
Permeado	50	312	45	194	527	-	7,86
Perdas (%)	10,9	3,9	5,7	14,1	6,3	-	-

Tabela 5.16. Atividades enzimáticas das etapas de concentração do extrato produzido no **biorreator STR** – fator de concentração de 38X

Fração	FPase (U/L)	CMCase (U/L)	β-glucosidase (U/L)	Avicelase (U/L)	Xilanase (U/L)	Proteína (mg/L)	Volume (L)
Extrato Bruto	531	8.252	1.040	1.369	9.887	84	3,25
Concentrado	13.767	282.786	31.518	30.896	246.322	1.183	0,086
Permeado	31	195	3	141	545	-	3,14
Perdas (%)	5,7	2,3	0,3	9,9	5,3	-	-

Conforme pode ser observado nas tabelas acima, os concentrados possuem proporções enzimáticas relativas à atividade FPásica (Fpase : CMCase : β-glucosidase : Avicelase : Xilanase : Proteína) de 1:16:2,4:1:14:0,1 e 1:20,5:2,3:2,2:17,9:0,1, para coluna de bolhas e STR, respectivamente e estão representadas graficamente para uma melhor visualização (Figura 5.18).

Levando em consideração as atividades específicas, razão entre a atividade volumétrica (U/L) e a concentração de proteína (mg/L) presente na amostra, pode-se analisar o procedimento de concentração enzimática, averiguando possíveis perdas de processo, assim como avaliar a proporção de cada entidade enzimática presente no coquetel em relação à quantidade de

proteína. Em outras palavras, este é um dado importante para o desenvolvimento de processos de produção de hidrolases, pois o aumento da atividade específica contribui para a redução dos custos na etapa de hidrólise enzimática (OLIVEIRA, 2013). A tabela 5.17 traz as atividades específicas no extrato bruto e no concentrado para cada um dos biorreatores utilizados.

Tabela 5.17. Atividades enzimáticas específicas das etapas de concentração do extrato provenientes do biorreatores CB e STR

Biorreator	**COLUNA DE BOLHAS**		**STR**	
Fração	**Extrato Bruto**	**Concentrado**	**Extrato Bruto**	**Concentrado**
FPase (U/mg)	14,03	18,99	6,32	11,64
CMCase (U/mg)	245,28	302,95	98,24	239,04
β-glucosidase (U/mg)	24,09	46,15	12,38	26,64
Avicelase (U/mg)	42,06	19,45	16,30	26,12
Xilanase (U/mg)	256,41	266,30	117,70	208,22
Proteína (mg/L)	32,00	1312,00	84,00	1183,00

Para todas as atividades específicas mensuradas, com exceção da avicelase para coluna de bolhas, foram observados aumentos, o que demonstra que o processo de concentração foi eficiente na medida em que não só concentrou as proteínas de interesse como, também, eliminou algumas de pequeno tamanho que não apresentavam atividades hidrolíticas, especificando ainda mais o coquetel enzimático para atividades celulolíticas e xilanolíticas.

A figura 5.18 apresenta um gráfico que mostra as proporções relativas dos extratos brutos e concentrados produzidos em cada biorreator.

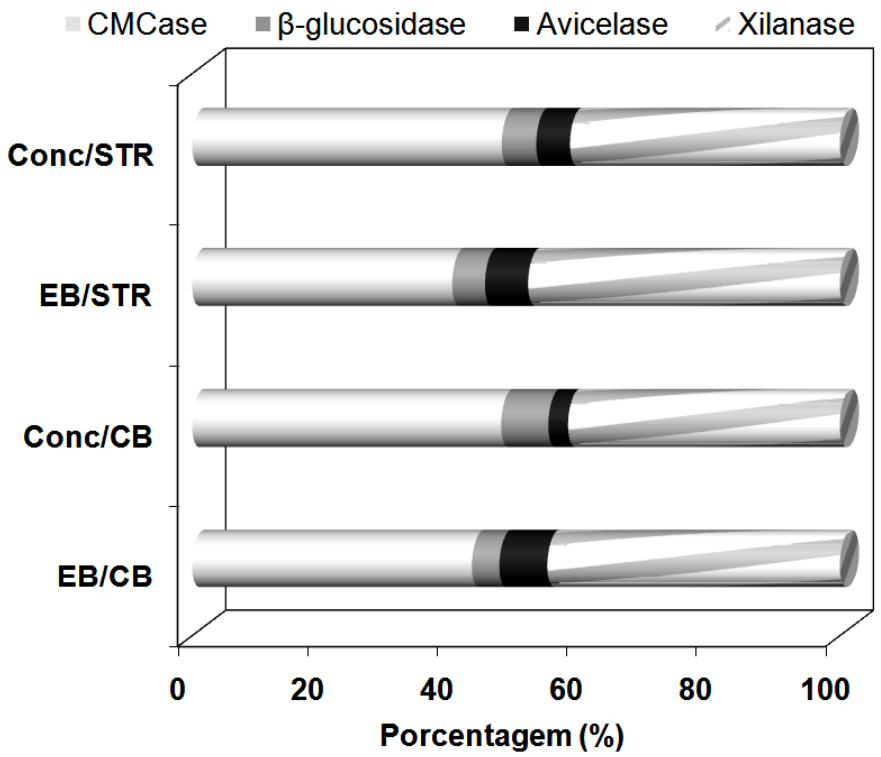

Figura 5.18. Proporções relativas dos Extratos Brutos (EB) e concentrados (Conc) para a coluna de bolhas (CB) e STR

5.12. Avaliação Eletroforética dos preparados enzimáticos produzidos

Para se avaliar os perfis protéicos dos concentrados preparados, foram realizados um SDS-PAGE e zimogramas para as atividades CMCásicas, xilanásicas e β-glucosidásicas. A Figura 5.19 retrata os géis obtidos.

Foram encontradas diversas proteínas nos concentrados, porém as com tamanhos de 120, 84, 59, 50, 45, 43, 35 e 30 kDa foram as mais significativas. Maeda (2010) identificou por tamanho molecular algumas proteínas purificadas de *P. funiculosum,* como CBH I (63,8 kDa), CBH II (51,1 kDa), β-glucosidase (77,3 kDa), endoglucanases (58,5 kDa) e proteína 7 (30 kDa). Possivelmente, as mesmas proteínas foram encontradas neste estudo, com exceção da β-glucosidase, que neste trabalho despontou como tendo um tamanho molecular de aproximadamente 134 kDa, como reportado no zimograma encontrado na Figura 5.19 B.

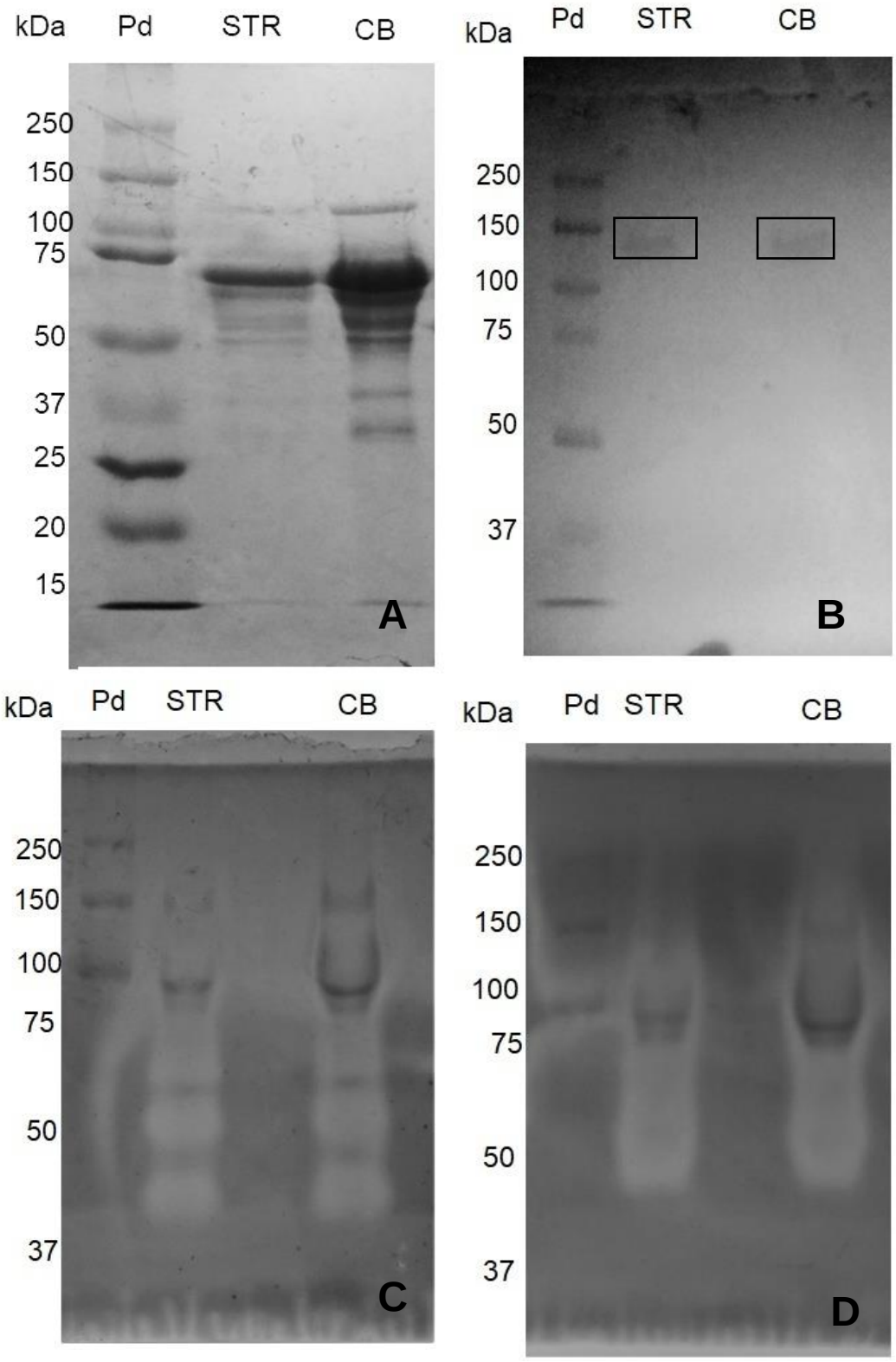

Figura 5.19. Avaliação Eletroforética dos preparados enzimáticos concentrados. Raia 1 – padrão de massa molecular (Pd); Raia 2 – Concentrado do biorreator STR e Raia 3 – Concentrado do biorreator em Coluna de Bolhas (CB). A: SDS-Page em condição desnaturante; B: zimograma para atividade β-glucosidase; C: zimograma para atividade CMCásica e D: zimograma para atividade Xilanásica

5.13. Hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada de bagaço de cana utilizando os preparados enzimáticos obtidos

5.13.1 Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos produzidos na coluna de bolha e no STR

Visando avaliar a eficiência de hidrólise dos coquetéis enzimáticos otimizados, um ensaio em frascos agitados foi realizado.

Houve significativa liberação de glicose já nas primeiras 15 horas de incubação, atingindo a concentração de 14,7 g/L para o extrato proveniente do biorreator STR e 11,3 g/L para a Coluna de Bolhas. Estes resultados são bastante expressivos em relação a outros encontrados na literatura. A Figura 5.20 mostra o perfil cinético de hidrólise em termos de liberação de glicose para os coquetéis produzidos.

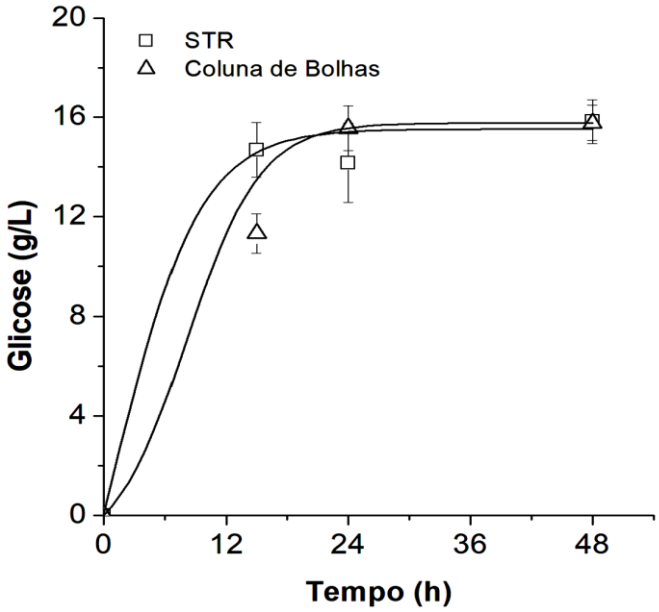

Figura 5.20. Perfis Cinéticos de hidrólise dos coquetéis produzidos nas diferentes conformações de biorreatores
(CPD 25 g/L e carga protéica de 10 mg/g)

Observa-se a semelhança entre os perfis cinéticos, demonstrando a grande estabilidade de produção enzimática do fungo, mesmo quando

submetido a diferentes sistemas de produção. Esse fato também é comprovado quando são calculadas as eficiências de hidrólise enzimática (Figura 5.21).

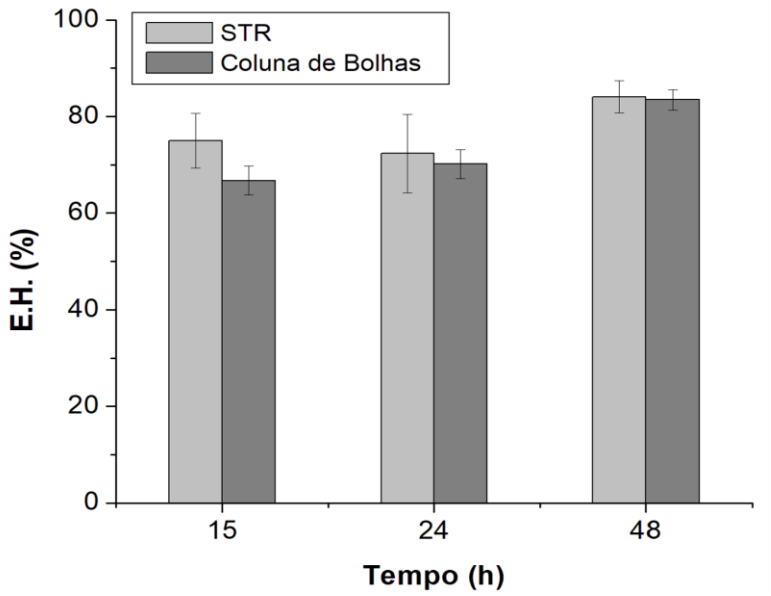

Figura 5.21. Eficiências de Hidrólise (E.H.) para os dois coquetéis em diferentes tempos na hidrólise (CPD 25 g/L e carga protéica de 10 mg/g)

Os resultados encontrados se mostram promissores, já que a eficiência máxima de hidrólise foi de 84% para o coquetel produzido em STR e 83% para o produzido na coluna de bolhas. Quando o tempo reacional é considerado, esses valores são mais altos do que o encontrado nos trabalhos de Méndez *et al* (2016), no qual foi reportada uma eficiência de hidrólise de 66%, atingida em 24h com um coquetel produzido pela mesma linhagem empregada neste trabalho.

5.13.2 Avaliação hidrolítica dos preparados enzimáticos com diferentes cargas de sólidos

Visando avaliar a influência da carga de sólidos na hidrólise, um ensaio em frascos agitados foi realizado. Quatro cargas de sólidos foram avaliadas (25, 50, 100 e 150 g/L) e amostragens foram realizadas nos tempos de 24, 48 e 72h para se avaliar o poder catalítico do preparado enzimático oriundo do STR.

Observa-se estabilização da liberação de glicose já nas primeiras 24h para as cargas de sólidos de 25 g/L e 50 g/L, sendo atingida as concentrações máximas de glicose de 18,8 g/L e 36,2 g/L, respectivamente. Já para as cargas de sólidos mais altas, observa-se uma liberação de glicose mais obstaculizada, muito possivelmente atribuída à resistência à transferência de massa, já que inicialmente o meio se apresentava com elevada densidade, devido às altas cargas de sólido presente. Na medida em que ocorre a liquefação do bagaço por ação das celulases, principalmente das endoglucanases, observa-se uma maior liberação de açúcares para o meio, chegando a 68,3 g/L para a carga de 100 g/L e 93,2 g/L para 150 g/L. A Figura 5.22 mostra o perfil cinético de hidrólise em termos de liberação de glicose para as cargas de sólidos investigadas.

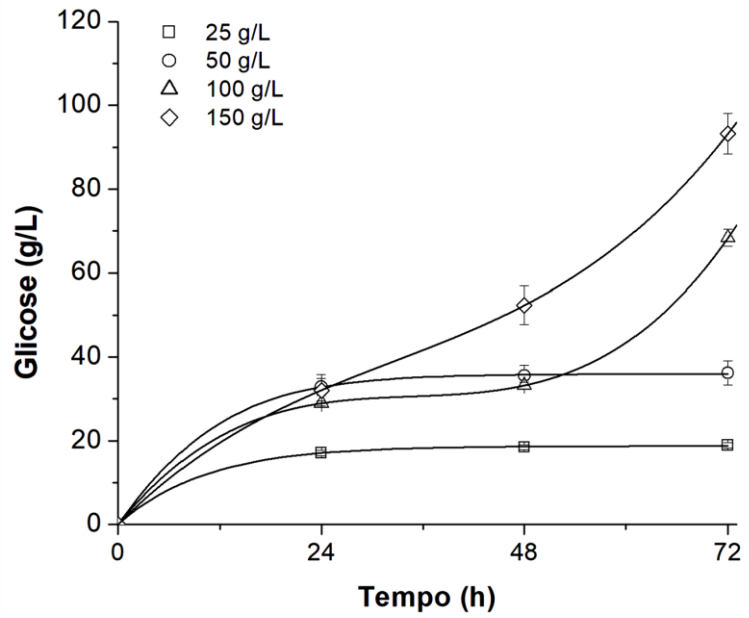

Figura 5.22. Perfis Cinéticos de hidrólise para as cargas de sólidos testadas (CPD 25, 50, 100 e 150 g/L e carga protéica de 10 mg/g)

Em relação às eficiências de hidrólise, podemos observar que, para as cargas de sólidos de 25 g/L e 50 g/L, as E.H. máximas foram de 96,4% e 92,4% alcançadas em 72 h, respectivamente. Ressalta-se que estes são valores muito elevados se comparados à literatura. Já para as cargas mais elevadas, 100 g/L e 150 g/L, observa-se baixas eficiências de hidólise no início do processo, atingindo valores de 36,9% e 27,3% em 24 h, respectivamente. Evidenciam-se, passando a etapa de liquefação, aumentos nas eficiências hidrolíticas para as cargas de sólidos mais elevadas, atingindo valores de

87,2% (100 g/L) e 79,3% (150 g/L). A Figura 5.23 apresenta as eficiências de hidrólise para as cargas de sólidos investigadas.

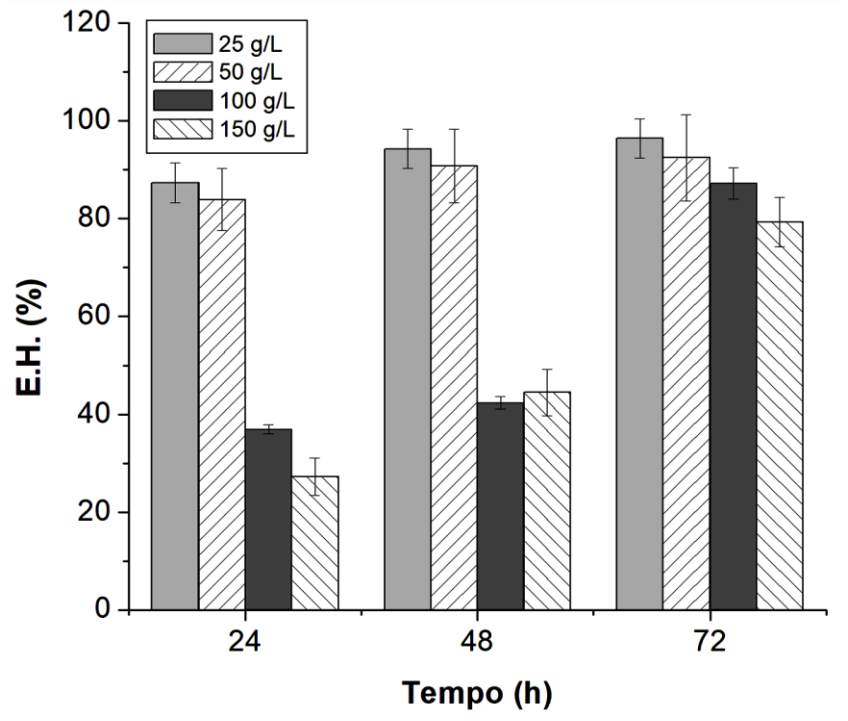

Figura 5.23. Eficiências de hidrólise para as cargas de sólidos avaliadas (CPD 25, 50, 100 e 150 g/L e carga protéica de 10 mg/g)

MODENBACH & NOKES (2013) reportam em seu trabalho que altas cargas de sólido diminuem a quantidade de água livre, que é essencial para as reações de hidrólise, dificultando a transferência de massa e a lubricidade do processo, o que foi observado também neste trabalho. Para contornar este problema, uma nova maneira de condução do processo foi adotada, a fim de garantir a produção de um “xarope” rico em glicose em menor tempo possível, para isso a estratégia de batelada alimentada de sólidos foi avaliada.

5.13.3 Hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos

Visando aumentar a liberação de glicose, reduzindo os problemas clássicos de transferência de massa, uma batelada alimentada de sólidos foi testada. Alimentações de 50 g/L foram realizadas em 72 h e 144 h de hidrólise. A Figura 5.24 exibe o perfil cinético de liberação de glicose, carga de sólidos e

eficiência de hidrólise. Observa-se que em 72h de processo, a concentração de glicose foi semelhante àquela obtida no experimento anterior com uma carga de sólido de 100 g/L, o que é razoável pois a alimentação de sólidos inicia-se neste tempo de processo. Porém, ao se adicionar CPD ao sistema, novamente a densidade do meio se eleva, dificultando a transferência de massa, refletindo diretamente na eficiência de hidrólise, como pode ser averiguado na queda da E.H. do tempo de 72h (79%) para tempo de 144h (73%). Mesmo havendo esse decréscimo, a liberação de glicose foi crescente, chegando a concentração de 86 g/L. Após a segunda alimentação não se pode observar os mesmos ganhos produtivos, pois o incremento na concentração de glicose foi menor se comparado à primeira alimentação, evidenciando uma perda da funcionalidade das enzimas presentes do meio. A alta quantidade de lignina presente na torta residual exerce um caráter inibitório, pois quantidades significantes de proteínas são adsorvidas neste material por meio de ligações improdutivas, que diminuem a quantidade de enzimas livres capazes de hidrolisar a celulose presente na CPD (Saini *et al*, 2016). A concentração de glicose se estabilizou nos tempos de 192 h até 216 h, caracterizando o término do processo de hidrólise, atingindo o valor de 98,6 g/L.

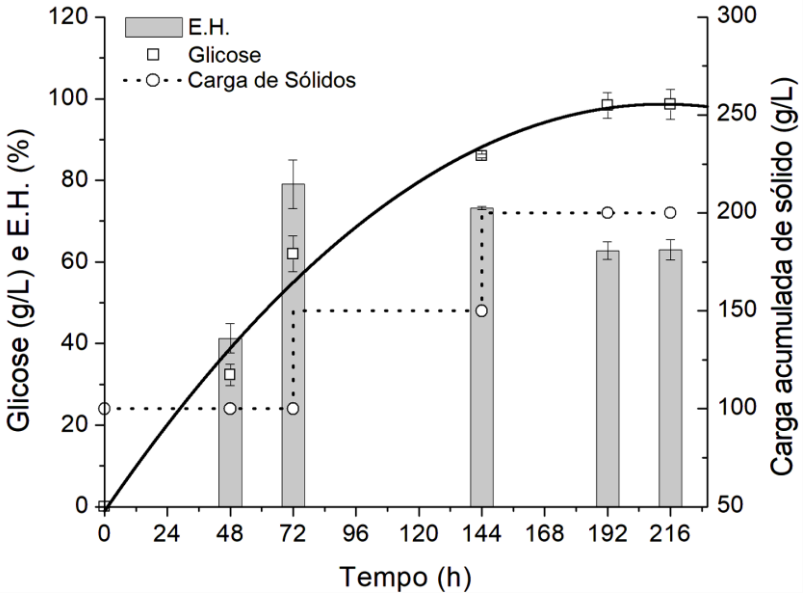

Figura 5.24. Perfil cinético de liberação de glicose, carga de sólidos e E.H. (%) para a hidrólise em batelada alimentada de sólidos (CPD) com carga protéica total de 10 mg/g

O tempo de processo foi relativamente longo, o que demonstra que parâmetros como carga de sólidos inicial e carga de proteínas devem ainda ser otimizados. O aumento da carga protéica se refletirá na diminuição do tempo de hidrólise, em contra partida uma quantidade maior de enzimas será requerida, impactando os custos do processo. Encontrar o ponto de equilíbrio entre o tempo e o custo deve ser prioridade em projeto industrial de uma planta produtora de xaropes concentrados em glicose, que podem ser empregados em diversos processos fermentativos para a geração dos mais diferentes produtos biotecnológicos de interesse comercial, inseridos no contexto de Biorrefinaria.

5.13.4 Estudo da hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos e enzimas

Novamente, visando aumentar a liberação de glicose e reduzir o tempo do processo de hidrólise, uma nova estratégia de alimentação foi conduzida. Reduziu-se a carga de sólido inicial para 50g/L, sendo alimentados 50g/L por três vezes até atingir 200 g/L, e estudou-se adicionar toda a carga enzimática no início do processo ou em alimentações intermitentes junto com a alimentação de sólidos. Avaliou-se, também duas cargas de enzimas, assim como a adição de albumina sérica bovina (BSA), uma proteína não hidrolítica, que tem por finalidade aumentar a liberação de glicose. A Figura 5.25 retrata os perfis cinéticos de liberação de glicose pelas bateladas alimentadas estudadas e a Figura 5.26 exibe as eficiências de hidrólise (E.H.) alcançadas em 96 horas.

Como observado, a concentração máxima de glicose obtida foi de aproximadamente 84 g/L no tempo de 96h para o caso no qual a carga enzimática de 10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ foi totalmente adicionada no início do processo. Nota-se ainda, que adicionar a carga enzimática de forma alimentada não proporcionou melhorias ao sistema, já que a concentração de glicose e a eficiência hidrolítica (E.H.) foram mais baixas do que no caso anterior. Portanto, a melhor maneira de conduzir a batelada alimentada é adicionar toda a carga protéica inicialmente.

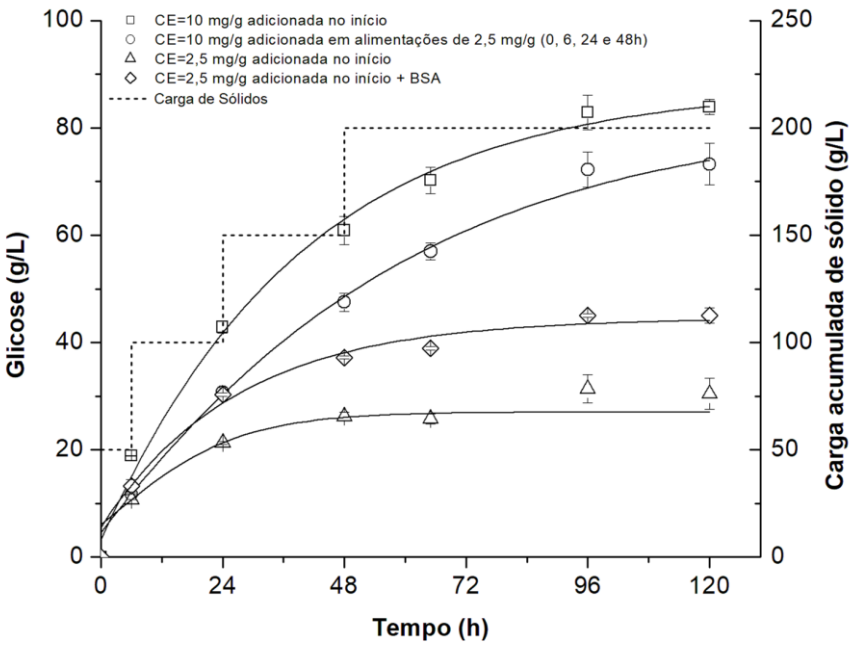

Figura 5.25. Perfil cinético de liberação de glicose para a hidrólise em batelada alimentada de sólidos (CPD) com adição da carga enzimática no início ou fracionada. Alimentação de sólidos em 0, 6, 24 e 48h. CE = Carga Enzimática e BSA = Albumina Sérica Bovina

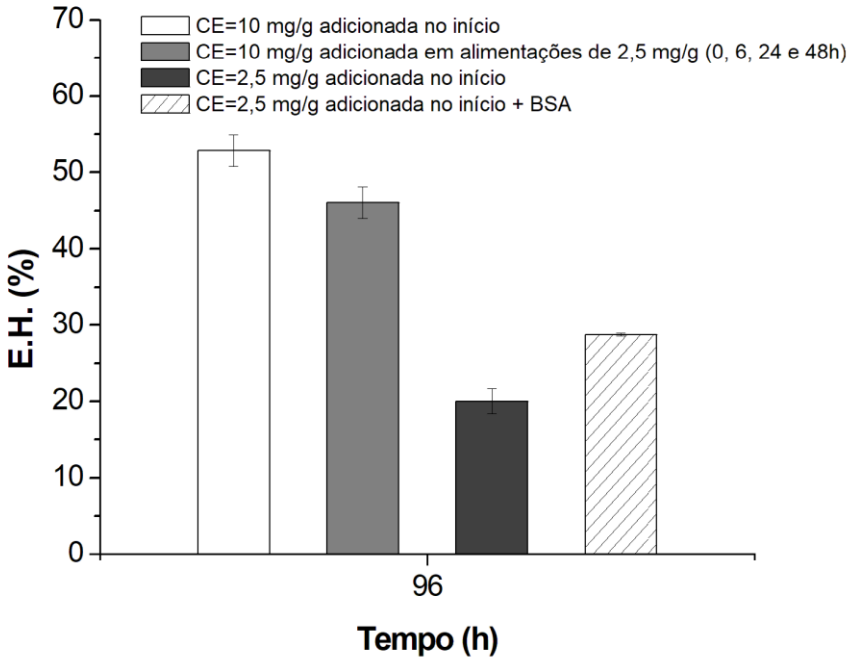

Figura 5.26. Eficiências de hidrólise para as bateladas alimentadas de sólidos (CPD) com adição da carga enzimática no início ou fracionada. Alimentação de sólidos em 0, 6, 24 e 48h (total=200 g/L). CE = Carga Enzimática e BSA = Albumina Sérica Bovina

Como esperado, a redução da carga enzimática de 10 para 2,5 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ também diminuiu a liberação de glicose e a eficiência de conversão, alcançando somente 37,4% da glicose em relação à hidrólise com a maior carga enzimática, o que se refletiu na redução da eficiência de hidrólise enzimática, que assumiu o valor de 20% apenas. Porém, ao se adicionar BSA ao sistema, essa porcentagem se eleva em 54%, evidenciando um sinergismo de grau 1,44 em relação aos processos com e sem BSA, ou seja, com o auxílio da proteína não hidrolítica, o sistema libera 44% a mais de glicose. Este sinergismo positivo entre BSA e celulases já foi reportado por Méndez *et al* (2017), que observaram um sinergismo de 1,33 quando uma carga de sólidos de 100 g/L e carga proteica de 7,5 mg/g foram utilizadas.

Em todos os experimentos houve pouca variação nas eficiências de hidrólise em cada sistema reacional estudado, que é um dos fundamentos da utilização da batelada alimentada de sólidos, isto é, não permitir uma queda abrupta na E.H. devido às dificuldades relacionadas à transferência de massa, calor e momento. A máxima eficiência de hidrólise encontrada foi de 53% para o caso onde a carga enzimática de 10 $mg_{proteína}/g_{celulose}$ foi totalmente adicionada no início do processo.

Corrêa *et al* (2016) em seus estudos alcançaram uma concentração de glicose de 47,9 g/L em 96h ao se utilizar batelada alimentada de sólidos para avaliar a melhor condição para se hidrolisar bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor. A carga de sólido utilizada foi de 200g/L finais e a carga enzimática (Cellic CTEC 2®) de 6,17 mg/g. Mesmo utilizando um complexo enzimático comercial, de alta eficiência hidrolítica, os resultados obtidos pelos autores foram aquém dos encontrados neste trabalho, pois mesmo utilizando uma carga enzimática de 10 mg/g, alcançou-se quase o dobro da concentração de glicose no mesmo tempo, ainda que utilizando um concentrado enzimático produzido localmente, fato que denota que o preparado enzimático, resultado deste trabalho, é altamente eficiente na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado para geração de glicose.

5.13.5 Estudo dos efeitos sinérgicos de BSA e PEG4000F na hidrólise enzimática em regime de batelada alimentada de sólidos

Estudou-se a adição de BSA e PEG4000F como suplementos à hidrólise. A Figura 5.27 apresenta os valores para o grau de sinergismo em diferentes tempos do processo de hidrólise.

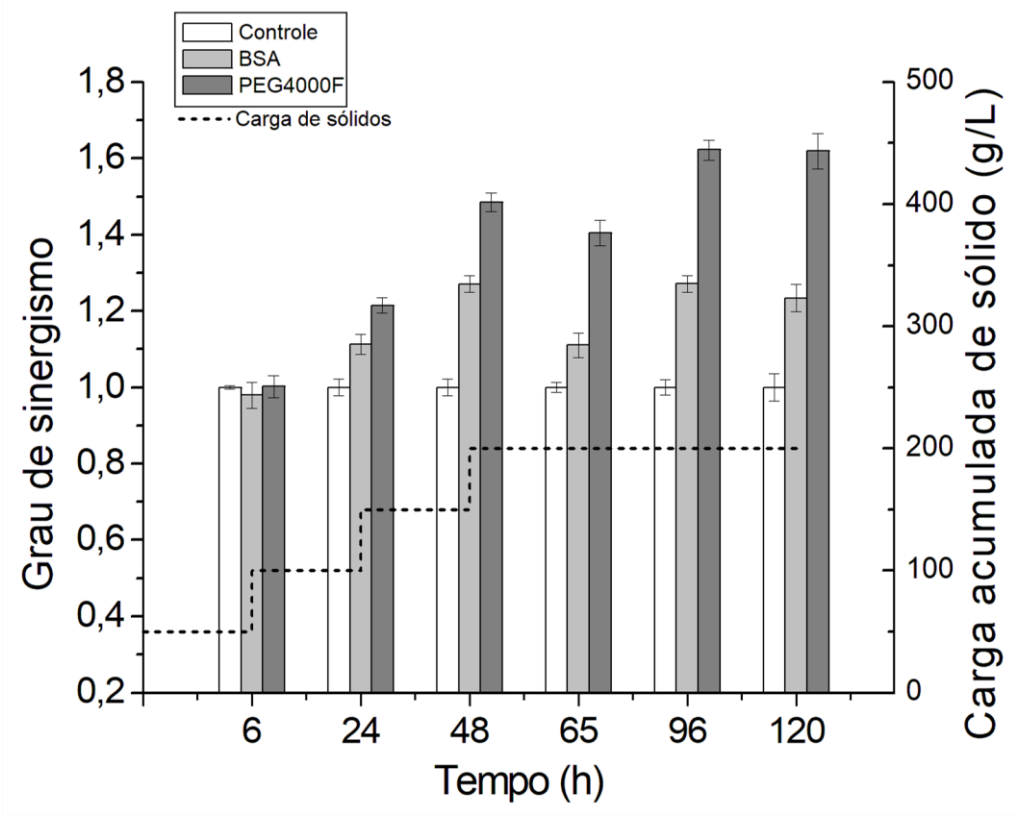

Figura 5.27. Grau de sinergismo de BSA e PEG4000F na hidrólise em batelada alimentada de sólidos (CPD). Alimentação de sólidos em 0, 6, 24 e 48h (carga protéica de 10 mg/g)

Observa-se a influência positiva tanto de BSA quanto de PEG4000F na liberação de glicose. De modo geral, o grau de sinergismo entre o suplemento e o coquetel enzimático cresce com o decorrer do processo, chegando a 1,62 para o PEG4000F em 96h horas e 1,27 para BSA no mesmo tempo. Esse ganho pode ser justificado pelo fato desses componentes ocuparem os sítios que dariam origem às ligações improdutivas (ECKARD *et al*, 2012). Na medida em que a hidrólise ocorre, o teor de lignina residual aumenta, já que esta

macromolécula polifenólica não é hidrolisada pelas enzimas presentes no coquetel enzimático. Ao se utilizar BSA ou PEG4000F as ligações que anteriormente se estabeleciam entre as enzimas e a lignina na ausência dessas substâncias, agora ocorrem em menor número, aumentando assim a eficiência de conversão e consequentemente liberando muito mais glicose para o meio, mesmo que se tenha utilizado uma baixa quantidade desses suplementos.

Méndez *et al* (2017) alcançaram sinergismo para uma hidrólise em batelada (25 g/L de sólidos e $mg_{proteína}/g_{celulose}$) de 1,15 e 1,13 para BSA e PEG4000F, respectivamente. Este trabalho alcançou valores mais elevados, porém as variáveis do processo foram diferentes, como a carga final de sólidos de 200 g/L, a carga enzimática e o próprio regime de condução, que foi em batelada alimentada de sólidos. Contudo, fica evidente que a influência do PEG4000F é mais acentuada nas condições investigadas, sendo uma metodologia que se mostra bastante promissora.

6. Conclusão e Sugestões

A primeira parte dos experimentos realizados neste trabalho teve o objetivo de viabilizar o processo de produção de um extrato enzimático de alta eficiência hidrolítica. Os resultados desses estudos permitiram elencar as seguintes conclusões:

- Primeiramente, a linhagem mutante avaliada não apresentou ~~os~~ resultados esperados e foi descontinuada para o processo de produção de celulases e xilanases.
- Celulignina parcialmente deslignificada (CPD) mostrou-se como a melhor fonte de indução da produção enzimática com concentração ótima no meio de cultivo de 15 g/L.
- Para aumentar a produtividade, o pré-inóculo de *Penicillium funiculosum* deve ser cultivado por 72h e seu tamanho deve corresponder a 10% (v/v) do volume do reator de produção.
- O farelo de trigo mostrou-se essencial para se aumentar a produtividade enzimática e por intermédio de um estudo de otimização foi determinado sua concentração no meio de produção como sendo de 5 g/L.
- Duas configurações de biorreator foram avaliadas, coluna de bolhas e STR, com o intuito de buscar aquele que gerava o melhor coquetel enzimático. Quando se avaliou os valores de produtividade enzimática, o biorreator do tipo STR mostrou-se mais eficiente, gerando um coquetel enzimático concentrado que possuía as seguintes atividades: FPásica de 13.767 U/L; CMCásica de 282.786 U/L; β-glucosidásica de 31.518 U/L; Avicelásica de 30.896 U/L; Xilanásica de 246.322 U/L e Proteínas Totais de 1.183 mg/L. Foram ainda levantados o perfis eletroforéticos dos preparados obtidos, revelando que há, provavelmente, uma única proteína de massa molar 134 kDa, responsável pela atividade β-glucosidásica presente no concentrado.

A segunda parte do trabalho visou avaliar o desempenho dos preparados enzimáticos produzidos, tendo como variáveis de resposta a concentração de glicose e a eficiência de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado. Assim, as seguintes conclusões são levantadas:

- No tocante à eficiência dos preparados enzimáticos obtidos nos biorreatores do tipo CB e STR conclui-se que não houve diferenças significativas entre eles, demonstrando a grande estabilidade fisiológica do fungo filamentoso em produzir as hidrolases, mesmo estando em condições reológicas distintas.

- A carga de sólidos de 25 g/L de CPD, quando hidrolisada com uma dose protéica de 10 mg/g, resultou nos maiores valores de eficiência de hidrólise enzimática, atingindo o valor de 96,4% em 72h. Não obstante, a mais elevada carga de sólidos (150 g/L) também, foi hidrolisada muito satisfatoriamente atingindo o valor de eficiência de hidrólise enzimática de 79,3% em 72h e gerando um xarope de glicose com concentração de 93,2 g/L.

- O emprego da bataleda alimentada, com alimentação inicial de CPD de 100 g/L, seguida de duas outras alimentações de 50 g/L mostrou-se eficiente, pois gerou um xarope de glicose com concentração de 98,6 g/L, porém em um tempo bastante elevado (192h).

- Nova abordagem foi então estudada, com carga inicial de sólidos de 50 g/L e adição de BSA e PEG4000F, com o intuito de reduzir o tempo de processo hidrólise enzimática. A redução da carga inicial de sólidos proporcionou uma diminuição no tempo total de reação para 96h, ou seja, metade do tempo do sistema reacional alimentado inicialmente com 100 g/L. A concentração final de glicose atingiu o valor de 84 g/L. Este ganho em tempo é industrialmente importante na medida que impacta a produtividade em glicose.

- A adição de PEG4000F se mostrou mais eficiente que a de BSA, nas proporções estudadas, gerando um grau de sinergismo de 1,62, ou seja, foram liberados 62% a mais de glicose do que sem a adição de

PEG4000F. Quando BSA foi utilizada o aumento na liberação de glicose foi de 30% quando comparada com a do controle, demonstrando ser uma alternativa viável para se produzir um xarope rico em glicose.

Sugestões para o futuro:

- ✓ Caracterizar mais detalhadamente a composição do farelo de trigo, a fim de determinar qual componente ou quais componentes que realmente propiciam o aumento da produtividade em hidrolases;
- ✓ Estudar a melhor ordem para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar: tratamento ácido diluído e posterior tratamento alcalino ou vice-versa;
- ✓ Caracterizar o secretoma de *Penicillum funiculosum*;
- ✓ Estudar formas de se reduzir as perdas na etapa de concentração;
- ✓ Estudar a influência de íons metálicos no processo de hidrólise;
- ✓ Desenvolver mais detalhadamente a estratégia de batelada alimentada de sólidos para os processos de hidrólise enzimática;
- ✓ Estudar a influência e otimizar o uso de suplementos, como BSA e PEG4000F, na hidrólise enzimática de celulignina parcialmente deslignificada;
- ✓ Estudar e otimizar a utilização de proteínas acessórias no processo de desconstrução da biomassa, com o objetivo de se aumentar a liberação de glicose e reduzir o tempo de processo;
- ✓ Otimizar o processo de hidrólise enzimática, associando-o ao processo de fermentação, simultaneamente.

7. Referências Bibliográficas

- ABITRIGO - http://www.abitrigo.com.br/ (acessado em Outubro de 2017).
- ADNEY, B.; BAKER, J., Measurement of cellulase activities national renewable energy laboratory. **Technical Report NREL/TP-510-42628**, 11, 1996.

- AGGER, J. W., ISAKSEN, T., VÁRNAI, A., VIDAL-MELGOSA, S., WILLATS, W. G., LUDWIG, R. ... & WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111(17), 6287-6292, 2014.

- ALVIRA, P., Tomás-Pejó, E., BALLESTEROS, M. J., & NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

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

- BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.3, 2010.

- BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.3, 2010.

- BOWER, B.S. Fusion proteins of an exocellobiohydrolase and an endoglucanase for use in the saccharification of cellulose and hemicellulose. **US patent** 2005093073. 2005.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

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

- CASTRO, A. M. D., CARVALHO, M. L. A, LEITE, S. G. F., PEREIRA JR, N. Cellulases from Penicillium funiculosum: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **J Ind Microbiol Biotechnol** v. 37, p.151–158. 2010.

- CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Saccharum spp.). 2006. 212f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2006.

- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

- CORRÊA, L. J., BADINO, A. C., & CRUZ, A. J. G. Power consumption evaluation of different fed-batch strategies for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioprocess and biosystems engineering**, 39(5), 825-833, 2016.

- COSGROVE, D. J. Microbial Expansins. **Annual Review of Microbiology**, 71(1), 2017.

- COUTO, S. R., & SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v.22, n.3, p.211-219, 2005.

- DIAS, D. S. B. D. Produção, caracterização parcial e aplicação de β-glucosidases de *Aspergillus niger*. 2011. 98f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2011.

- DIMAROGONA, M; TOPAKAS, E; CHRISTAKOPOULOS, Pl. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 19, p. 8455-8465, 2013.

- EPM-UNIFESP - http://www.tabnut.dis.epm.br/- (Acessado em Outubro de 2017).

- EUROPEAN COMISSION. Final Report: **Collection of Information on Enzymes**. Cooperation between the Federal Environment Agency of Austria and the Inter-University Research Center for Technology,

Work and Culture (IFF/IFZ). Disponível em http://www.agronavigator.cz/attachments/enzymerepcomplete.pdf

- ECKARD, A. D., MUTHUKUMARAPPAN, K., & GIBBONS, W. Pretreatment of extruded corn stover with polyethylene glycol to enhance enzymatic hydrolysis: optimization, kinetics, and mechanism of action. **BioEnergy Research**, 5(2), 424-438, 2012.

- EVELEIGH, D.E.; MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, p.1–8, 2009.

- FAVRE, E., MARCHAL-HEUSLER, L., KIND, M. Chemical Product Engineering: Research and Educational Challenges. **Trans IChemE**, v. 80, Part A. 2002.

- FRY, S. C. Plant cell expansion: Unzipped by expansins. **Current Biology**, v. 4, n. 9, p. 815-817, 1994.

- GENEROSO, Rafaela Antonia Ramos *et al*. Composição química e energética de alguns alimentos para frangos de corte em duas idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2008.

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

- GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology**. Second Edition. London: The Macmillan Press Ltda, 1996.

- GUTIÉRREZ, I; MORENO, N; MONTOYA, D. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2015.

- HANSEN, G. H., LÜBECK, M., FRISVAD, J. C., LÜBECK, P.S., ANDERSENA, B., Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation, **Process Biochemistry**. v. 50, p. 1327-1341. 2015.

- HAQUE, M. A., CHO, K. M., BARMAN, D. N., KIM, M. K., & YUN, H. D. A potential cellulose microfibril swelling enzyme isolated from Bacillus sp. AY8 enhances cellulose hydrolysis. **Process Biochemistry**, 50(5), 807-815, 2015.

- HENRISSAT B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochem.J**. v. 280, p. 309-316, 1991.

- HIMMEL, M. Cellulase Animation. **National Renewable Energy Laboratory**, 2000

- JÄGER, G., GIRFOGLIO, M., DOLLO, F., RINALDI, R., BONGARD, H., COMMANDEUR, U., FISCHER, R., SPIESS, A.C., BÜCHS, J. How recombinant swollenin from Kluyveromyces lactis affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. **Biotechnol Biofuels**. v. 4, p. 33. 2011.

- JUNG, D. U., YOO, H. Y., KIM, S. B., LEE, J. H., PARK, C., & KIM, S. W.Optimization of medium composition for enhanced cellulase production by mutant Penicillium brasilianum KUEB15 using statistical method. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 145-150, 2015.

- KANG, K., WANG, S., LAI, G., LIU, G., & XING, M. Characterization of a novel swollenin from Penicillium oxalicum in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. **BMC biotechnology**, 13(1), 42, 2013.

- KIM I.J., KO H.J., KIM T.W., CHOI I.G., KIM K.H. Characteristics of the binding of a bacterial expansin (BsEXLX1) to microcrystalline cellulose. **Biotechnol Bioeng**. v. 110, p. 401-407. 2013.

- KIM, I. J., LEE, H. J., CHOI, I. G., & KIM, K. H. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. **Applied microbiology and biotechnology**, 98(20), 8469-8480, 2014.

- KIND, M., Product Engineering. **Chemical Engineering and Processing**. v. 38, p. 405-410. 1999.

- KOLASA, M., AHRING, B. K., LÜBECK, P. S., & LÜBECK, M. Co-cultivation of Trichoderma reesei RutC30 with three black Aspergillus strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource technology**, v. 169, p. 143-148, 2014.

- KUHAD, R. C., GUPTA, R., SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications, **Enzyme Research**. v. 2011. 2011.

- LAVIGNE, J., HILL, C., TREMBLAY, A., ST-PIERRE., P., TOMASHEK, J. **Cellulase variants with reduced inhibition by glucose**. WO Patent 2,009,089,630; 2009.

- LIU, X., LIU, C., MA, Y., HONG, J., & ZHANG, M. Heterologous expression and functional characterization of a novel cellulose-disruptive protein LeEXP2 from *Lycopersicum esculentum*. **Journal of biotechnology**, 186, 148-155, 2014.

- LIU, X.; MA, Y.; ZHANG, M.. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 8, p. 1541-1551, 2015.

- LIU, G., ZHANG, J., & BAO, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 39(1), 133-140, 2016.

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

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

- 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. 264f. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

- MAEDA, R. N., SERPA, V. I., ROCHA, V. A. L., MESQUITA, R. A. A., SANTA ANNA, 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**, 46(5), 1196-1201, 2011.

- MAEDA, R. N., BARCELOS, C. A., SANTA ANNA, L. M. M., & PEREIRA JR., N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, 163(1), 38-44, 2013.

- MANDELS, M. & WEBER, J. The production of cellulases. **Ad. in Che**., v. 95, p. 391-414, 1969

- MARJAMAA, K., TOTH, K., BROMANN, P. A., SZAKACS, G., & KRUUS, K. Novel Penicillium cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 6-7, p. 358-369, 2013.

- NC-IUBMB - http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html - (acessado em outubro de 2017)

- MÉNDEZ, J. A., MODESTO, L. F. A., POLIKARPOV, I., & PEREIRA JR, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: Optimization and synergism studies. **Biotechnology progress**, 32(5), 1222-1229, 2016.

- MÉNDEZ, J. A., MORAES, A. O., MODESTO, L. F. A., CASTRO, A. M., & PEREIRA JR, N. Addition of Surfactants and Non-Hydrolytic Proteins and Their Influence on Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Bagasse. **Applied biochemistry and biotechnology**, 181(2), 593-603, 2017.

- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings–a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

- **NC-IUBMB.**: http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html - acessado em outubro de 2017.

- OLIVEIRA, M. P. G. Desenvolvimento de um produto enzimático para a eficiente hidrólise de biomassa lignocelulósica. 2013. 102f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013.

- OLOFSSON, K., BERTILSSON, M., & LIDÉN, G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol Biofuels** , v.1, n.7, p.1-14, 2008.

- PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Series on biotechnology, v. 2, p. 2-45, 2008.

- QUINLAN, R. J; *et al*. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, 2011.

- RAHIKAINEN, J. L., EVANS, J. D., MIKANDER, S., KALLIOLA, A., PURANEN, T., TAMMINEN, T KRUUS, K. Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme and microbial technology**, 53(5), 315-321, 2013.

- RAO. M., MISHRA, C. Properties and applications of Penicillium funiculosum cellulose immobilized on a soluble polymer. **Biotechnology Letters**. v. 6, n. 5, p. 319-322. 1984.

- RAO. M., MISHRA, C. Properties and applications of Penicillium funiculosum cellulose immobilized on a soluble polymer. **Biotechnol. Let..** v. 6, n. 5, p. 319-322. 1984

- ROCHA, V. A. L. Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G. 2014. 247f. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

- ROCHA, V. A. L., MAEDA, R. N., SANTA ANNA, L. M. M., & PEREIRA, N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by Trichoderma harzianum in optimized culture medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, 16(5), 1-1, 2013.

- ROCHA, V.A.L.; KERN, M.F.; MAEDA, R.N.; ELIAS, L.; SIMISTER, R.; STEELE-KING, C.; GÓMEZ, L.D. ; MCQUEEN-MASON, S.J. ; PEREIRA JR, N.. Characterisation of the cellulolytic secretome of Trichoderma harzianum during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. **Biotechnology Progress,** v. 1, 116-126, 2016.

- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; “Potencial Da Palha De Cana-De-Açúcar Para Produção De Etanol”, **Quim. Nova**, vol 35, Nº5, 1004-1010, 2012.

- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; “Potencial Da Palha De Cana-De-Açúcar Para Produção De Etanol”, **Quim. Nova**, vol 35, Nº5, 1004-1010, 2012.

- SCHMIDELL, W. & FACCIOTTI, M. C. R. **Biotecnologia Industrial**, Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, p.496. (Engenharia Bioquímica, v. 2). 2001.

- SEKI, Y., KIKUCHI, Y., YOSHIMOTO, R., ABURAI, K., KANAI, Y., RUIKE, T., ... & SAKAGUCHI, K. Promotion of crystalline cellulose degradation by expansins from Oryza sativa. **Planta**, 241(1), 83-93, 2015.

- SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SUKUMARAN, R. K., LARROCHE, C., & PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource technology**, 127, 500-507, 2013.

- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **NREL**, 14 p. 2005.

- SOCCOL, C. R., DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P., MEDEIROS, A. B. P., KARP, S. G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L. P., ... & DA SILVA BON, E. P. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4820-4825, 2010.

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

- SUN, X; LIU, Z; QU, Y.; LI, X. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 146, 119-128, 2008.

- UNICADATA – http://unicadata.com.br/ (acessado em Outubro de 2017).

- VASQUEZ, M.P. Desenvolvimento de bioprocesso de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2007.

- VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**, 98: 296–301, 2007.

- WAYMAN, M.; CHEN, S.. Cellulase production by Trichoderma reesei using whole wheat flour as a carbon source. **Enzyme and microbial technology**, v. 14, n. 10, p. 825-831, 1992.

- WEN, Z., LIAO, W., CHEN, S. Production of cellulase/β-glucosidase by the mixed fungi culture Trichoderma reesei and Aspergillus phoenicis on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3087 – 3094, 2005.

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

- ZHANG, B., SHAHBAZI, A., WANG, L., DIALLO, O., & WHITMORE, A. Alkali pretreatment and enzymatic hydrolysis of cattails from constructed wetlands. **American Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 328-332, 2010.

- ZHANG, B.; SHAHBAZI, A.. Recent developments in pretreatment technologies for production of lignocellulosic biofuels. J Pet Environ Biotechnol, v. 2, n. 2, p. 111, 2011.