

**URSULA FABIOLA RODRÍGUEZ ZÚÑIGA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE  
CELULASES ESPECÍFICAS NA CADEIA PRODUTIVA DO ETANOL DE  
SEGUNDA GERAÇÃO**

**Tese apresentada à Escola de Engenharia de São  
Carlos, Universidade de São Paulo, como parte  
dos requisitos para a obtenção de Título de  
Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.**

**Orientador: Prof. Dr. Silvio Crestana**

**São Carlos**

**2010**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

R696d      Rodríguez Zúñiga, Ursula Fabiola  
Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração / Úrsula Fabíola Rodríguez Zúñiga ; orientador Silvio Crestana. -- São Carlos, 2010.

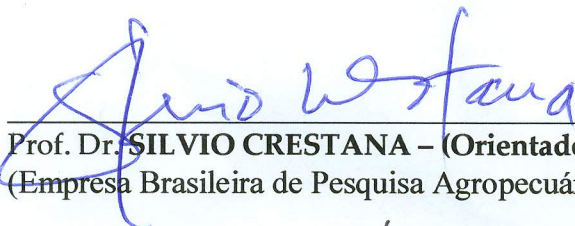
Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. Biocombustíveis. 2. Etanol celulósico.  
3. Fermentação em estado sólido. 4. Celulasas. 5. Bagaço de cana-de-açúcar. 6. Caracterização espectroscópica. I. Título.

**FOLHA DE JULGAMENTO**

Candidato(a): **Ingeniera Quimica URSULA FABIOLA RODRÍGUEZ ZÚÑIGA.**

Tese defendida e julgada em 15.12.2010 perante a Comissão Julgadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. **SILVIO CRESTANA – (Orientador)**  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)


APROVADA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. **TADEU FABRICIO MALHEIROS**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

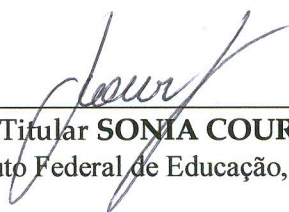
APROVADO

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **ANTONIO APRIGIO DA SILVA CURVELO**  
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

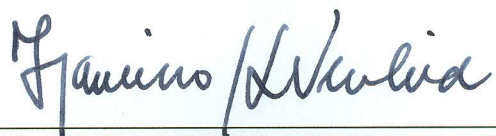
APROVADO

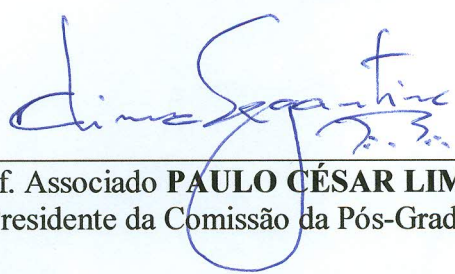
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Titular **ROBERTO DE CAMPOS GIORDANO**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Titular **SOMIA COURI**  
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro/IFRJ)

Aprovado

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Associado **FRANCISCO ARTHUR DA SILVA VECCHIA**  
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Engenharia Ambiental

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Associado **PAULO CÉSAR LIMA SEGANTINE**  
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

## DEDICATÓRIA

À Deus, fonte de vida, paz e  
infinita sabedoria.

A maior benção na minha vida  
“A Família”, pelas ausências e  
preocupações que sentiram por min,  
pelo exemplo de amor, os  
ensinamentos e pelo continuo  
estímulo à superação, dedico lhes esta  
conquista com infinita gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Silvio Crestana pela oportunidade concedida, orientação, e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grata também pela iniciativa do trabalho e liberdade de ação decisiva para o meu desenvolvimento pessoal.

À Dra. Cristiane Farinas, amiga e co-orientadora pela disposição em me encaminhar nas atividades e cuja dedicação, apoio e amizade tornaram possível a concretização deste projeto.

Ao Dr. Victor Bertucci Neto, pela disponibilização do bioreator de colunas acompanhamento e apoio contínuos durante todo o doutorado.

À Dra. Sonia Couri por ceder o *A. niger* e pelas sugestões, críticas e incentivo e à equipe da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial a Dra. Mônica Damaso e a Dra. Selma Terzi.

Ao Dr. José Manuel Marconcini, que gentilmente cedeu o bagaço de cana para a experimentação deste trabalho.

A Embrapa Pecuária Sudeste, ao Dr. Gilberto, Cristina, Victor e Mariana pelo auxílio no trabalho de análise de materiais lignocelulósicos.

Ao IQSC pelas instalações nas análises de caracterização, ao Prof. Antonio Aprígio pelo apoio com o laboratório de Físico-química Orgânica, ao Dr. Marcio de Paula da Central de Análises Químicas Instrumentais pelas micrografias.

Ao Prof. Dr. Castelleti do Departamento de Engenharia de Materiais pela catalogação fotográfica dos substratos.

Aos Profs. Dra. Raquel Giordano e Dr. Roberto Giordano pelo apoio e colaboração na viabilização de várias etapas deste trabalho no Departamento de Engenharia Química da UFscar e a Profa. Dra. Teresa Zangirolami pela contribuição na definição dos modelos estatísticos empregados.

Ao Instituto de Química da UFSCar, especialmente à técnica Luciana Vizotto pelas análises de Infravermelho.

Ao Prof. Dr. Adílson Gonçalves do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia da USP de Lorena, pela oportunidade de treinamento nos procedimentos analíticos do NREL e ao Prof. Dr. George Jackson pelas contribuições na discussão da microscopia.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, pelas disciplinas oferecidas e aos funcionários da secretaria da pós-graduação, Claudete, Nelson e José Luiz, pela paciência e grande ajuda durante todo o período do doutorado;

Aos funcionários dos laboratórios de Embrapa Adriana, Joana, Marcelo, Silviane, René e Wilson pela ajuda e profissionalismo em todas as etapas práticas do trabalho.

À secretaria de projetos de Embrapa, à Ana Maria, Edílson e a Teresinha B. pela atenção e prontidão na resolução de assuntos financeiros.

Ao Valentim Monzane pela sempre solícita ajuda na parte gráfica.

Aos secretários, telefonistas, estagiários, técnicos, pesquisadores, etc., a todos os colegas da Embrapa, pela valiosa colaboração.

A todos os amigos e colegas presenciaram a evolução do Laboratório de Agroenergia, em especial a Viviane, Francielle, Adriana, Camila, Fernanda, Rodrigo, Gabriela, Carla, Ana Laura, Daiane, Jaqueline, Rosângela, Mariana, Priscila, Rafael, Gabriel, Renan, Felipe, Djeine, Marcel, Cláudio, Larisa e Alfredo pelo companheirismo, solidariedade e gratos momentos de convivência no decorrer do trabalho experimental;

Minha enorme gratidão pelas correções gramaticais e erros no português aos amigos Carla, Cléber, Douglas, Fernanda, Francis e Márcia.

À pos-doutoranda Dasciana Rodrigues e a todos os colegas dos Laboratórios de Tecnologia Enzimática e Bioquímica do DEQ da UFScar (Mirela, Claudia, Anny, Gislene, Lucia, Viviane.....) pela simpática acolhida e pela enorme ajuda na realização dos experimentos de hidrólise.

Aos amigos e colegas Aline, Joana, Martha, Cléber, Kelly, Tatiana, Fernanda, Alexandra, André, Clarice, Douglas, Edilene, Eduarda, Elisângela, Eliangela, Franciele, Francis, Humberto, Larissa, Lílian, Lívia, Lucimar, Lucinéia, Luíza, Maria Alice, Mateus, Marcel, Poliana, Rafael, Roberta e Vivian pela companhia e momentos de amizade. Às amigas do doutorado Carol e Bruna, pela partilha, consultoria e os momentos de conversa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa pela infra-estrutura e excelente ambiente de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite;

A todas as demais pessoas que contribuíram, direta e indiretamente, para que o presente texto pudesse ser desenvolvido.

## RESUMO

RODRÍGUEZ ZÚÑIGA, U.F. (2010). **Desenvolvimento de um Bioprocesso para Produção de Celulases Específicas na Cadeia Produtiva do Etanol de Segunda Geração**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010 – Orientador: Prof. Dr. Silvio Crestana.

Ameaças na sustentabilidade do desenvolvimento mundial em consideração ao aquecimento global, a dependência energética e a demanda exponencial pela produção de alimentos têm levado ao crescente interesse por fontes alternativas renováveis de energia como a biomassa vegetal. Neste cenário, a viabilização do etanol sem competição por terra cultivável a partir do bagaço de cana-de-açúcar (BC) pela rota enzimática é peça chave para a produção integrada e sustentável dos biocombustíveis visando otimização de recursos, redução de resíduos e minimização de impactos ambientais negativos. Entretanto, a sua comercialização precisa ser ainda consolidada através da economicidade nos insumos de hidrólise (enzimas celulases) e de uma maior eficiência na etapa de pré-tratamento da lignocelulose. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo contribuir na redução dos custos de produção celulases utilizando um resíduo característico da indústria brasileira, o BC, para produção de celulases específicas através da tecnologia de fermentação em estado sólido com o microorganismo *Aspergillus niger*. A proposta desenvolvida consiste em bioprocesso com pré-tratamento hidrotérmico do BC condizente a seu uso como substrato fermentativo, complementação deste substrato com 35% de farelo de soja e meio de suplementação com acréscimo de protéicas, umidade de fermentação de 80% e uso de circulação forçada em bioreator de coluna instrumentado visando o balanço hídrico e térmico do processo. As celulases específicas assim produzidas exibiram atividades de FPase: 0,045; CMCase: 1,10; xilanase: 9,17 e  $\beta$ -glicosidase:0,33 UI mL<sup>-1</sup>, e sua ação sinérgica sobre o BC explodido resultou na conversão em açúcares redutores de 15% após 22 horas de hidrólise. A direta aplicabilidade e especificidade do coquetel enzimático produzido mostram a proposta do bioprocesso como uma tecnologia de elevado potencial de integração no modelo de produção de etanol celulósico, anexo a uma usina convencional. Esta alternativa de desenvolvimento a maior escala indica uma oportunidade nacional para o crescimento sustentável na produção de bioetanol e a expansão das vantagens associadas com o uso de biocombustíveis no âmbito mundial.

Palavras-chave: Biocombustíveis. Etanol celulósico. Fermentação em estado sólido. Celulases. Bagaço de cana-de-açúcar. Caracterização espectroscópica.

## ABSTRACT

RODRÍGUEZ ZÚÑIGA, U.F. (2010). **Bioprocess Development for the Production of Specific Cellulases in the Production Chain of Second Generation Ethanol**. Doctoral Thesis – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2010 – Advisor: Prof. Dr. Silvio Crestana.

Threats to sustainability of world development in regards to global warming, energy dependence and the exponential demand for food production have led to growing interest in alternative renewable sources of energy such as biomass. In this context, the viability of ethanol from sugar cane bagasse cane (SCB) by enzymatic pathway, without competition for farmland, is the key for sustainable and integrated biofuels production aiming to optimize resources, waste reduction and negative environmental impacts minimization. However, its commercialization needs to be further consolidated through the economy of hydrolysis enzymes (cellulases) and efficiency improvements in lignocellulosic pre-treatment. Thus, this study aimed to contribute for the reduction of costs in cellulases production using a traditional brazilian industrial waste, the SCB, in order to obtain specific cellulases with the microorganism *Aspergillus niger* by solid state fermentation. The proposal of bioprocess developed consists of SCB hydrothermal pre-treatment towards to its use as fermentation substrate, complementation of this substrate with 35% of soybean bran and supplementation medium with protein sources addition, moisture fermentation of 80% and use of a column bioreactor instrumented with forced aeration aiming suitable control of water and thermal balance of the process. Thus, specific cellulases produced exhibited activities of FPase=0.045; CMCase=1.10; xylanase=9.17 and  $\beta$ -glucosidase=0.33 IU mL<sup>-1</sup>, and their synergy action over exploded SCB resulted in 15% of reducing sugar conversion after 22 hours of hydrolysis. The direct applicability and specificity of the enzymatic cocktail produced shows the proposed bioprocess as a high potential technology for integration into the production model of cellulosic ethanol, joint to a conventional power plant. This development alternative to larger scale indicates a national opportunity for sustainable growth in bioethanol production and associated benefits expansion with the worldwide use of biofuels.

Keywords: Biofuels. Cellulosic ethanol. Solid state fermentation. Cellulases. Sugarcane bagasse. Spectroscopic characterization.



## SUMARIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPITULO 1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>   | <b>1</b>  |
| <i>REFERÊNCIAS</i> .....  | 3         |
| <b>CAPITULO 2: SUSTENTABILIDADE DO ETANOL CELULÓSICO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....</b>                        | <b>5</b>  |
| 2.1. <i>INTRODUÇÃO</i> .....  | 5         |
| 2.2 <i>PERSPECTIVA HISTÓRICA DO ETANOL BRASILEIRO</i> .....   | 7         |
| 2.2.1 <i>IMPACTOS ECONÔMICOS E AMBIENTAIS</i> .....   | 8         |
| 2.4 <i>PRODUÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS PELA INDÚSTRIA CANAVIEIRA</i> .....                             | 10        |
| 2.3 <i>ASPECTOS TECNOLÓGICOS DO ETANOL CELULÓSICO</i> .....   | 12        |
| 2.5 <i>PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE CELULASES</i> .....                                     | 15        |
| 2.6 <i>PANORAMA MUNDIAL DO ETANOL CELULÓSICO</i> .....  | 17        |
| 2.6.1 <i>INICIATIVAS TECNOLÓGICAS BRASILEIRAS</i> .....   | 19        |
| 2.7 <i>ANÁLISES TECNO-ECONÔMICAS PROSPECTIVAS</i> .....   | 21        |
| 2.8 <i>PROPOSTA CONCEITUAL DE INTEGRAÇÃO TECNOLÓGICA SUSTENTÁVEL</i> .....                                    | 26        |
| 2.10 <i>CONCLUSÕES</i> .....  | 28        |
| <i>REFERÊNCIAS</i> .....  | 29        |
| <b>Capítulo 3. Adaptação e Caracterização do Bagaço de cana-de-açúcar para Produção de Celulases</b><br>..... | <b>35</b> |
| 3.1. <i>INTRODUÇÃO</i> .....  | 35        |
| 3.2 <i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i> .....  | 37        |
| 3.2.1 <i>Composição Lignocelulósica – Bagaço de cana-de-açúcar (BC)</i> .....                                 | 37        |
| 3.2.2 <i>Parâmetros de caracterização da biomassa lignocelulósica</i> .....                                   | 41        |
| 3.2.2.1. <i>Índice de cristalinidade</i> .....  | 42        |
| 3.2.2.2. <i>Grau de polimerização</i> .....   | 43        |
| 3.2.2.3. <i>Acessibilidade e área superficial</i> .....   | 43        |
| 3.2.2.4 <i>Conteúdo e distribuição de lignina e hemicelulose</i> .....  | 43        |
| 3.2.3. <i>Técnicas espectroscópicas e de imagens para caracterização da biomassa</i> .....                    | 44        |
| 3.2.4 <i>Tecnologias de pré-tratamento para lignocelulose</i> .....   | 47        |
| 3.2.4.1 <i>Pré-tratamentos ácidos</i> .....   | 50        |
| 3.2.4.2 <i>Pré-tratamento hidrotérmico</i> .....  | 50        |
| 3.2.4.3 <i>Pré-tratamentos alcalinos</i> .....  | 51        |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.4.4 Pré-tratamentos biológicos.....   | 52 |
| 3.2.5 O BC como substrato para a fermentação em estado sólido .....                           | 53 |
| 3.3 <i>OBJETIVOS</i> .....  | 54 |
| 3.4 <i>MATERIAL E MÉTODOS</i> .....   | 55 |
| 3.4.1 Metodologia de pesquisa.....  | 55 |
| 3.4.2 Matéria prima.....  | 56 |
| 3.4.2 Pré-tratamentos .....   | 56 |
| 3.4.2.1 Pré-tratamento com ácido diluído .....  | 56 |
| 3.4.2.2 Pré-tratamentos alcalinos .....   | 57 |
| 3.4.2.3 Pré-tratamento combinado ácido/básico.....  | 57 |
| 3.4.2.4 Pré-tratamento hidrotérmico.....  | 57 |
| 3.4.2.5 Cálculos de rendimento .....  | 58 |
| 3.4.3 Caracterização dos Materiais Lignocelulósicos .....                                     | 58 |
| 3.4.3.1 Análises de umidade e cinzas. ....  | 59 |
| 3.4.3.2 Análise de componentes do BC.....   | 59 |
| 3.4.3.3. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....                           | 60 |
| 3.4.3.4 Análise por difração de raios X (DRX).....  | 60 |
| 3.4.3.5 Análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ..... | 61 |
| 3.4.3.6. Documentação fotomicrográfica .....  | 61 |
| 3.4.4 Avaliação da produção de celulasas sobre o BC in natura e pré-tratado.....              | 61 |
| 3.5 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....   | 62 |
| 3.5.1 Análise química e visual dos PTs.....   | 62 |
| 3.5.2 Análise morfológica dos BC in natura e após PTs por MEV .....                           | 66 |
| 3.5.3 Análise da cristalinidade do BC in natura e após PTs por DRX .....                      | 69 |
| 3.5.4 Análises de FTIR no BC in natura e após PTs.....  | 71 |
| 3.5 FES para produção de celulasas.....   | 72 |
| 3.6 <i>CONCLUSÕES</i> .....   | 75 |
| <i>REFERÊNCIAS</i> .....  | 77 |

## **CAPITULO 4. CELULASES ESPECÍFICAS A PARTIR DE BAGAÇO DE-CANA-DE-AÇÚCAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO – DESENVOLVIMENTO DO BIOPROCESSO ..... 84**

|   |    |
|---|----|
| 4.1 <i>INTRODUÇÃO</i> .....                                     | 84 |
| 4.2. <i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i> .....                         | 85 |
| 4.2.1. Enzimas do complexo lignocelulolítico .....              | 85 |
| 4.2.2 Classificação e mecanismos de ação das celulasas .....    | 86 |
| 4.2.3 Fundamentos microbiológicos da produção de celulasas..... | 89 |
| 4.2.4 Panorama mundial do mercado de celulasas.....             | 91 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.5 Celulases para biocombustíveis de 2 <sup>a</sup> geração.....                     | 93         |
| 4.2.6 Tecnologias para produção de celulases.....                                       | 94         |
| 4.2.6.1 Fermentação em estado sólido x Fermentação submersa.....                        | 95         |
| 4.2.7 Parâmetros operacionais na FES.....   | 96         |
| 4.2.7.1 Tipo de substrato e suporte.....  | 96         |
| 4.2.7.2 Umidade e atividade da água.....  | 96         |
| 4.2.7.3 Temperatura e pH.....   | 97         |
| 4.2.7.4 Aeração.....  | 97         |
| 4.2.8 FES para produção de celulases.....   | 97         |
| 4.2.9 Considerações Finais.....   | 102        |
| <b>4.3. OBJETIVO.....</b>   | <b>103</b> |
| <b>4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>104</b> |
| 4.4.1. Materiais usados na FES.....   | 105        |
| 4.4.1.1. Substratos.....  | 105        |
| 4.4.1.2. Microrganismo.....   | 106        |
| 4.4.1.3 Meios de cultivo para produção de celulases.....                                | 106        |
| 4.4.1.4 Meios de cultivo para manutenção e ativação do <i>A. niger</i> .....            | 107        |
| 4.4.2 Procedimentos Gerais de Fermentação em Estado Sólido.....                         | 108        |
| 4.4.2.1 Manutenção do fungo e produção do inóculo.....                                  | 109        |
| 4.4.2.2 Preparo do inóculo em sabugo de milho.....                                      | 109        |
| 4.4.2.3 Inoculação do meio de fermentação.....  | 109        |
| 4.4.2.4. Fermentação em Estado Sólido.....  | 110        |
| 4.4.2.5. Extração do complexo enzimático.....   | 111        |
| 4.4.2 Métodos Analíticos.....   | 111        |
| 4.4.2.1 Determinação de umidade e cinzas dos resíduos agroindustriais.....              | 111        |
| 4.4.2.2 Caracterização química dos resíduos utilizados.....                             | 111        |
| 4.4.2.3 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas.....                         | 112        |
| 4.4.3 Experimentos de FES.....  | 114        |
| 4.4.3.1 Cinética de Produção Enzimática.....  | 114        |
| 4.4.3.2 Ensaio de FES com diferentes substratos sólidos.....                            | 115        |
| 4.4.3.3 Ensaio de FES com mistura de substratos.....                                    | 115        |
| 4.4.3.4 Ensaio de FES para avaliação de indutores.....                                  | 115        |
| 4.4.3.5 Ensaio de FES com diferentes umidades e meios de suplementação.....             | 115        |
| 4.4.4. Delineamentos Experimentais para a definição da composição da suplementação..... | 116        |
| 4.4.4.1 Planejamento Fatorial Completo.....   | 116        |
| 4.4.4.2. Delineamento Central Rotacional.....   | 117        |
| <b>4.5. RESULTADOS.....</b>   | <b>117</b> |
| 4.5.1. Cinética de Produção Enzimática.....   | 117        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.2. Ensaio de FES comparando vários substratos .....                               | 119        |
| 4.5.3. Ensaio de FES com mistura de substratos .....                                  | 121        |
| 4.5.4. Ensaio de FES para avaliação de indutores .....                                | 123        |
| 4.5.5. Ensaio de FES com diferentes umidades e meios de suplementação .....           | 126        |
| 4.5.6 Considerações da avaliação preliminar dos parâmetros de FES .....               | 129        |
| 4.5.7 Delineamentos Experimentais para definição de composição da suplementação ..... | 130        |
| 4.5.7.1 Seleção de variáveis significativas - Planejamento Fatorial Completo .....    | 130        |
| 4.5.7.2 Delineamento Central Rotacional.....  | 135        |
| <b>4.6 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>145</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>147</b> |

## **CAPITULO 5: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM REATOR DE COLUNAS**

|  |            |
|--|------------|
| <b>INSTRUMENTADO .....</b>   | <b>153</b> |
| <b>5.1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>153</b> |
| <b>5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>154</b> |
| 5.2.1 Avanços e necessidades da tecnologia de Fermentação em Estado Sólido.....                | 154        |
| 5.2.2 Aspectos bioquímicos na FES.....   | 156        |
| 5.2.3 Biorreatores para FES .....  | 158        |
| 5.2.4 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos .....                                 | 159        |
| <b>5.3 OBJETIVOS.....</b>  | <b>161</b> |
| <b>5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>161</b> |
| 5.4.1 Material usado na FES .....  | 163        |
| 5.4.1.1 Biorreator .....   | 163        |
| 5.4.1.2 Microorganismo .....   | 164        |
| 5.4.1.3 Substrato.....   | 164        |
| 5.4.1.4 Meio de cultivo para produção de celulases.....  | 165        |
| 5.4.2 Material usado na hidrólise .....  | 165        |
| 5.4.2.1 Enzimas .....  | 165        |
| 5.4.2.2 Substrato para hidrólise .....   | 165        |
| 5.4.2.3 Sistema de Hidrólise.....  | 165        |
| 5.4.3 Metodologia para FES em biorreator de colunas instrumentado .....                        | 166        |
| 5.4.3.1 Análise respirométrica.....  | 167        |
| 5.4.4 Delineamentos Experimentais para definição de condições operacionais em biorreator ..... | 167        |
| 5.4.4.1 Planejamento Fatorial Completo .....   | 168        |
| 5.4.4.2 Delineamento Central Rotacional.....   | 168        |
| 5.4.5 Experimentos de Hidrólise do BC explodido.....   | 169        |
| 5.4.6 Métodos Analíticos .....   | 170        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.5 <i>RESULTADOS</i> .....   | 170        |
| 5.5.1 Delineamentos experimentais para definição das melhores condições de FES em biorreator de colunas ..... | 171        |
| 5.5.1.1 Seleção de variáveis significativas - Planejamento Fatorial Completo.....                             | 171        |
| 5.5.1.2 Delineamento Central Rotacional .....   | 175        |
| 5.5.2 Evolução da produção da CMCase e produção de CO <sub>2</sub> .....                                      | 182        |
| 5.5.3 Hidrólise Enzimática .....  | 184        |
| 5.6. <i>CONCLUSÕES</i> .....  | 188        |
| <i>REFERÊNCIAS</i> .....  | 189        |
| <b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....  | <b>195</b> |
| <b>PROPOSTAS FUTURAS</b> .....  | <b>197</b> |
| ANEXO 1. ....   | 1          |
| ANEXO 2. ....   | 2          |
| ANEXO 3. ....   | 3          |
| ANEXO 4. ....   | 4          |



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <i>Figura 2.1 - Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Adaptado de Hahn-Hägerdal et al. (2006).</i> .....   | 13 |
| <i>Figura 2.2 - Custos de inversão de capital. Adaptado de Kazi et al. (2010).</i> .....  | 23 |
| <i>Figura 2.3 - Intervalos de redução dos GEE (em barras) ou dados específicos (pontos) relatados pelo uso de biocombustíveis (não foram considerados os impactos devido à mudança no uso da terra). Extraído de Sim et al. (2010).</i> .....   | 25 |
| <i>Figura 2.4 - Processo proposto de hidrólise anexa à destilaria padrão. Modificada de Rossell et al. (2009).</i> .....  | 27 |
| <i>Figura 3.1 - Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Adaptado de Rubin (2008).</i> .....  | 39 |
| <i>Figura 3.2 – Representação da molécula de celulose. Adaptado de Ramos (2003).</i> .....  | 40 |
| <i>Figura 3.3 - Monossacarídeos constituintes das poliooses. Adaptado de Pitarello (2007).</i> .....  | 40 |
| <i>Figura 3.4 - Monômeros precursores da lignina (a) álcool trans-para-cumárico, (b) álcool trans-conefírico e (c) álcool trans-sinapílico. Adaptado de Whetten e Sederoff (1995).</i> .....  | 41 |
| <i>Figura 3.5 – Fluxograma da metodologia nos pré-tratamentos avaliados para o BC.</i> .....  | 55 |
| <i>Figura 3.6 – Efeitos físicos nos pré-tratamentos registrados em estereoscópio e câmera digital para um aumento de 4 vezes a)BC “in natura” b) BC após pré-tratamento hidrotérmico, c) BC após pré-tratamento ácido, d)BC após pré-tratamento básico Na(OH), e) BC após pré-tratamento básico Ca(OH)<sub>2</sub>, f)BC após pré-tratamento combinado.</i> ..... | 63 |
| <i>Figura 3.7 - Fotomicrografias do BC “in natura”. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura.</i> .....  | 66 |
| <i>Figura 3.8 – Fotomicrografias do BC após o PT hidrotérmico. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura.</i> .....   | 67 |
| <i>Figura 3.9 – Fotomicrografias do BC após o PT ácido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura.</i> .....  | 67 |
| <i>Figura 3.10 – Fotomicrografias do BC após o PT básico a)PT com Na(OH) e b) PT com Ca(OH)<sub>2</sub>. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada Figura.</i> .....   | 68 |
| <i>Figura 3.11 – Fotomicrografias do BC após PT combinado. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada Figura.</i> .....   | 68 |
| <i>Figura 3.12 - Difratoogramas de raios X das amostras de BC in natura e após PTs.</i> .....   | 70 |
| <i>Figura 4.1 - Hidrólise enzimática da celulose. Fonte Arantes e Sadler (2010).</i> .....  | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| <i>Figura 4.2 - Macro e micromorfologia do A. niger. Fonte: Joint Genome Institute (DOE, 2010).</i> .....   | 90  |
| <i>Figura 4.3 – Fluxograma para definição de parâmetros de FES e meio de suplementação para o substrato BC. FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; CA: casca de arroz.</i> .....  | 104 |
| <i>Figura 4.4 - Fluxograma das etapas sequencias nos experimentos de FES.</i> .....   | 108 |
| <i>Figura 4.5 - Câmera de Neubauer usada para contagem de esporos.</i> .....  | 110 |
| <i>Figura 4.6 - Produção de FPase (eixo à direita), CMCase e xilanase (eixo à esquerda) em relação ao tempo (h) de FES pelo A. niger no FT.</i> .....   | 118 |
| <i>Figura 4.7 - Produção enzimática após 72 h de FES pelo A. niger em vários substratos lignocelulósicos. (Meio de suplementação: Czapeck modificado, umidade de 50% base úmida e [inóculo] = <math>1 \times 10^7</math> esporos g substrato<sup>-1</sup>).</i> .....               | 120 |
| <i>Figura 4.8 - Correlação entre a concentração de proteína e atividade FPase. Ajuste linear <math>R^2=0,97</math>.</i> .....   | 120 |
| <i>Figura 4.9 - Influência da proporção dos substratos: BC + FS e BC + FT na produção de FPase (Produção de 100% FS = <math>4,5 \text{ U g}^{-1}</math> não considerada com fins comparativos)</i> .....  | 122 |
| <i>Figura 4.10 - Influência da proporção dos substratos: BC + FS e BC + FT na produção de CMCase<sup>1</sup>.</i> .....   | 122 |
| <i>Figura 4.11 - Influência da proporção dos substratos: BC + FS e BC + FT na produção de xilanases<sup>1</sup>.</i> .....  | 122 |
| <i>Figura 4.12 - Produções de FPase obtidas após 48 e 72 h de FES com o uso de diferentes indutores de celulasas (Meio de suplementação: Mandels e Weber básico, umidade de 50% base úmida e [inóculo] = <math>1 \times 10^7</math> esporos g substrato<sup>-1</sup>).</i> .....    | 124 |
| <i>Figura 4.13 - Produções de CMCase obtidas após 48 e 72 h de FES com o uso de diferentes indutores de celulasas (Meio de suplementação: Mandels e Weber básico, umidade de 50% base úmida e [inóculo] = <math>1 \times 10^7</math> esporos g substrato<sup>-1</sup>).</i> .....   | 125 |
| <i>Figura 4.14 - Produções de xilanase obtidas após 48 e 72 h de FES com o uso de diferentes indutores de celulasas (Meio de suplementação: Mandels e Weber básico, umidade de 50% base úmida e [inóculo] = <math>1 \times 10^7</math> esporos g substrato<sup>-1</sup>).</i> ..... | 125 |
| <i>Figura 4.15 - Efeito da umidade na atividade enzimática em mistura 90%BC + 10%FS com diferentes meios de suplementação em FES com A. niger após 72 h.</i> .....  | 127 |
| <i>Figura 4.16 - Efeito do meio nutricional na atividade enzimática por A.niger em mistura 90%BC + 10%FS com 80% de umidade após 72 h de FES.</i> .....   | 128 |
| <i>Figura 4.17 - Superfície de resposta para a FPase (<math>\text{UI g}^{-1}</math>) em função da concentração de extrato de levedura e a proporção de FS</i> .....   | 142 |



|  |            |
|--|------------|
| <i>Figura 4.18 - Superfície de resposta para a xilanase (UI g<sup>-1</sup>) em função da concentração de extrato de levedura e a proporção de FS.....</i>  | <i>142</i> |
| <i>Figura 4.19 - Diagrama de Pareto com o feito das variáveis % de FS, concentração de extrato de levedura e idade do inóculo (d) sobre a atividade de CMCase.....</i>   | <i>144</i> |
| <i>Figura 5.1 - Hidrólise enzimática da celulose. Fonte Pereira Jr. (2008). .....</i>  | <i>160</i> |
| <i>Figura 5.2 - Fluxograma experimental das etapas seguidas experimentais .....</i>  | <i>162</i> |
| <i>Figura 5.3 - Foto ilustrativa do biorreator de colunas utilizado nas FES deste trabalho. ....</i>   | <i>163</i> |
| <i>Figura 5.4 - Equipamentos utilizados na hidrólise do BC explodido com enzimas produzidas no biorreator de colunas instrumentado. ....</i>   | <i>166</i> |
| <i>Figura 5.5 - Superfície de resposta para a FPase (UI g<sup>-1</sup>) em função da U% do substrato e vazão do ar de circulação (mL min<sup>-1</sup>). ....</i>   | <i>180</i> |
| <i>Figura 5.6 - Superfície de resposta para a CMCase (UI g<sup>-1</sup>) em função da U% do substrato e vazão do ar de circulação (mL min<sup>-1</sup>). ....</i>  | <i>181</i> |
| <i>Figura 5.7 - Superfície de resposta para a xilanase (UI g<sup>-1</sup>) em função da U% do substrato e vazão do ar de circulação (mL min<sup>-1</sup>). ....</i>  | <i>182</i> |
| <i>Figura 5.8 - Evolução de CO<sub>2</sub> (curvas) e atividade de CMCase (*) durante a FES com A. niger em BC (65%) e FS (35%) com 80% de U%, aeração de 30 mL min<sup>-1</sup> e U% relativa do ar de 80%.....</i>   | <i>183</i> |
| <i>Figura 5.9 - Conversão do BC explodido com celulasas específicas (Carga enzimática: 5 FPU g<sup>-1</sup> BC explodido; 50 °C e pH 4,8; 72 horas). Atividade enzimática (UI mL<sup>-1</sup>): FPase 0,05; CMCase 1,10; xilanase 9,17 e β-glicosidade 0,33.....</i> | <i>185</i> |
| <i>Figura 5.10 - Conversão do BC explodido com Celluclast 1,5L à diferentes concentrações (50 °C e pH 4,8; 8 dias). Atividade enzimática (UI mL<sup>-1</sup>): FPase, 37,2 e CMCase, 24,9. Fonte. Adriano et al. (2008)....</i>                                      | <i>185</i> |
| <i>Figura 5.11 - Concentração de açúcares produzida na hidrólise de BC explodido com celulasas específicas. Carga enzimática: 5 FPU g<sup>-1</sup> de BC durante 72 h. ....</i>  | <i>187</i> |



## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <i>Tabela 2.1 Linha de tempo do Proálcool.</i> .....  | 7   |
| <i>Tabela 2.2 Custos de etanol e balanços energéticos segundo à matéria-prima.</i> .....  | 9   |
| <i>Tabela 2.3 Exemplos de plantas piloto e demonstrativas para a produção de etanol celulósico.</i> .....   | 18  |
| <i>Tabela 2.4 Custos estimados na produção de etanol celulósico.</i> .....  | 22  |
| <i>Tabela 2.5 Custos estimados da matéria-prima e insumos químicos (ano base de cálculo 2007).</i> .....  | 23  |
| <i>Tabela 3.1 Diferenças entre celulose e polioses</i> .....  | 41  |
| <i>Tabela 3.2 Pré-tratamentos implementados para o BC.</i> .....  | 48  |
| <i>Tabela 3.3 Composição química do BC in natura e após os diferentes processos de PT.</i> .....  | 64  |
| <i>Tabela 3.4 Solubilização dos componentes do BC após PTs.</i> .....   | 65  |
| <i>Tabela 3.5 IC% do BC in natura e após PTs.</i> .....   | 70  |
| <i>Tabela 4.1 Celulases comercializadas no mercado, origem e atividade relatada.</i> .....  | 92  |
| <i>Tabela 4.2 Aspectos positivos e negativos da FES.</i> .....  | 95  |
| <i>Tabela 4.3 Tabela resumo de exemplos com trabalhos científicos usando FES para produção de celulasas.</i> .....  | 100 |
| <i>Tabela 4.4 Especificações dos substratos utilizados na FES.</i> .....  | 105 |
| <i>Tabela 4.5 Composição dos meio Mandels e Weber modificado usado na FES por A. niger.</i> .....   | 106 |
| <i>Tabela 4.6 Composição do meio de sacarose usado na FES por A. niger.</i> .....   | 107 |
| <i>Tabela 4.7 Composição do meio Czapeck Dox modificado usado na FES por A. niger.</i> .....  | 107 |
| <i>Tabela 4.8 Composição do meio básico.</i> .....  | 107 |
| <i>Tabela 4.9 Soluções para o preparo do meio de sabugo de milho.</i> .....   | 108 |
| <i>Tabela 4.10 Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> para seleção do meio de suplementação.</i> .....   | 117 |
| <i>Tabela 4.11 Valores das variáveis independentes utilizadas no DCCR para três fatores.</i> .....  | 117 |
| <i>Tabela 4.12 Composição dos substratos lignocelulósicos usados na FES.</i> .....  | 119 |
| <i>Tabela 4.13 Tabela comparativa com as principais diferenças entre os meios avaliados.</i> .....  | 126 |
| <i>Tabela 4.14 Matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>(valores reais e codificados) com as respostas de atividades enzimáticas FPase, CMCase e xilanase após 72 de FES com A. niger.</i> ..... | 131 |
| <i>Tabela 4.15 Efeito dos fatores estudados no planejamento completo 2<sup>4</sup> sobre as atividades enzimática FPase, CMCase e xilanase.</i> .....   | 133 |

|   |     |
|---|-----|
| <i>Tabela 4.16 Matriz do DCCR com níveis reais e codificados da variável resposta: atividade enzimática FPase, valores preditos pelo modelo e desvios relativos.</i> .....  | 136 |
| <i>Tabela 4.17 Matriz do DCCR com níveis reais e codificados da variável resposta: atividade enzimática CMCase, valores preditos pelo modelo e desvios relativos.</i> .....   | 137 |
| <i>Tabela 4.18 Matriz do DCCR com níveis reais e codificados da variável resposta: atividade enzimática xilanase, valores preditos pelo modelo e desvios relativos.</i> .....   | 138 |
| <i>Tabela 4.19 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valores t e p valor provenientes do DCCR para otimização do meio de suplementação.</i> .....  | 140 |
| <i>Tabela 4.20 ANOVA do modelo quadrático para predição das atividades enzimáticas representativas das enzimas celulolíticas (UI g<sup>-1</sup>).</i> .....   | 141 |
| <i>Tabela 4.21 Parâmetros de verificação para validação dos modelos.</i> .....  | 141 |
| <i>Tabela 4.22 Dados relativos à produção de celulasas e xilanasas com Aspergillus por FES.</i> .....   | 145 |
| <i>Tabela 5.1 Algumas aplicações de biorreatores em FES</i> .....   | 159 |
| <i>Tabela 5.2 Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para seleção de meio de suplementação.</i> .....  | 168 |
| <i>Tabela 5.3 Valores das variáveis independentes utilizadas no DCCR para dois fatores.</i> .....   | 168 |
| <i>Tabela 5.4 Matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> das variáveis estudadas com os valores reais entre parênteses e as respostas das atividades enzimáticas FPase, CMCase e xilanase, após 72 h de FES com A. niger.</i> ..... | 171 |
| <i>Tabela 5.5 Efeito dos fatores estudados no planejamento completo 2<sup>3</sup> sobre as atividades enzimática FPase, CMCase e xilanase.</i> .....  | 173 |
| <i>Tabela 5.6 Matriz do DCCR das variáveis em estudo com valores reais entre parênteses e as respostas em atividades das enzimas FPase, CMCase e xilanase.</i> .....  | 175 |
| <i>Tabela 5.7 Resultados dos efeitos, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para otimização das condições operacionais no biorreator.</i> .....   | 178 |
| <i>Tabela 5.8 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para FPase com exclusão de variáveis não significativas.</i> .....  | 179 |
| <i>Tabela 5.9 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para CMCase com exclusão de variáveis não significativas.</i> .....   | 179 |
| <i>Tabela 5.10 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para xilanase com exclusão de variáveis não significativas.</i> .....  | 179 |
| <i>Tabela 5.11 Parâmetros de verificação para validação dos modelos pela ANOVA.</i> .....   | 180 |

|  |            |
|--|------------|
| <i>Tabela 5.12 Comparação das atividades celulásicas alcançadas neste trabalho e atividades encontradas em preparado comercial. ....</i>               | <i>184</i> |
| <i>Tabela 5.13 Comparação do rendimento em AR na hidrólise enzimática de BC com diferentes pré-tratamentos. ....</i>                                   | <i>186</i> |
| <i>Tabela 5.14 Comparação do rendimento em glicose (gL<sup>-1</sup>) na hidrólise enzimática de BC com complexos celulolíticos da literatura. ....</i> | <i>187</i> |



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| ACV     | Análise de Ciclo de Vida                             |
| AEAC    | Álcool Etílico Anidro Combustível                    |
| AEHC    | Álcool Etílico Hidratado Combustível                 |
| AnGlc   | Anidroglicose  |
| ANOVA   | Análise de Variância                                 |
| AR      | Açúcares Redutores                                   |
| ASTM    | American Society for Testing and Materials           |
| Aw      | Atividade da água                                    |
| BC      | Bagaço de Cana-de-açúcar                             |
| BIOEN   | Programa Fapesp de Bioenergia                        |
| BNDES   | Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social |
| CBH     | Celobiohidrolases                                    |
| Cbio    | Complexo Bioenergético (Petrobras)                   |
| CENPES  | Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Petrobras    |
| CLAE    | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência             |
| cm      | Centímetro(s)  |
| CMC     | Carboximetilcelulose                                 |
| CMCase  | Atividade endoglucanase                              |
| CNAL    | Conselho Nacional de Álcool                          |
| CONAB   | Companhia Nacional de Abastecimento                  |
| CTBE    | Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol          |
| CTC     | Centro de Tecnologia Canavieira                      |
| DC      | Domínio catalítico (na estrutura das celulasas)      |
| DCCR    | Delineamento Composto Central Rotacional             |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                            |
| DNS     | (Acido) Dinitrosalicílico                            |
| DOE     | Department of Energy (United States of America)      |
| DRX     | Difração de Raios X                                  |
| EESC    | Escola de Engenharia de São Carlos                   |
| EGases  | Endoglucanases                                       |
| EMBRAPA | Empresa de Pesquisa Agropecuária                     |

|          |  |
|----------|--|
| EUA      | Estados Unidos de América                                    |
| EXGases  | Exoglucanases  |
| FAOSTAT  | Food and Agriculture Organization of The United Nations      |
| FAPESP   | Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo                   |
| FDA      | Fibra em Detergente Acido                                    |
| FDN      | Fibra em Detergente Neutro                                   |
| FES      | Fermentação no Estado Sólido                                 |
| FINEP    | Financiadora de Estudos e Projetos                           |
| Fpases   | Filter Paper Hydrolases                                      |
| FS       | Farelo de soja   |
| FSm      | Fermentação Submersa   |
| FSS      | Fermentação e Sacarificação Simultâneas                      |
| FT       | Farelo de trigo  |
| FTIR     | Fourier Transformed InfraRed (Spectroscopy)                  |
| g        | Gramas   |
| GEE      | Gases do Efeito Estufa                                       |
| GP       | Grau de Polimerização  |
| h        | Hora(s)  |
| IAC      | Instituto Agronômico de Campinas                             |
| IBGE     | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística              |
| IC%      | Índice de Cristalinidade                                     |
| IEA      | International Energy Association                             |
| INT      | Instituto Nacional de Tecnologia                             |
| IQSC/USP | Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo |
| kWh      | KiloWatt por hora  |
| L        | Litros   |
| LGE      | Litro Equivalente de Gasolina                                |
| Ltda     | Limitada   |
| M        | Milhão   |
| m/m      | Relação massa por massa                                      |
| m/v      | Relação massa por volume                                     |
| MAPA     | Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento           |



|          |  |
|----------|--|
| MET      | Microscopia Eletrônica de Transmissão                              |
| MEV      | Microscopia Eletrônica de Varredura                                |
| MFA      | Microscopia de Força Atômica                                       |
| min      | Minuto(s)  |
| MLC      | Modulo de ligação à carboidratos (na estrutura de celulase)        |
| MPa      | MegaPascal(s)  |
| NIPE     | Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético                 |
| NIR      | Near Infrared (Spectroscopy)                                       |
| NREL     | National Renewable Energy Laboratory                               |
| pH       | Potencial Hidrogeniônico   |
| PTs      | Pré-tratamentos  |
| RL       | Região de Ligação (na estrutura de celulases)                      |
| RMN      | Ressonância Magnética Nuclear                                      |
| RPE      | Ressonância Paramagnética Eletrônica                               |
| rpm      | Rotações por minuto  |
| SDS-PAGE | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis          |
| T        | Temperatura  |
| t        | Tempo  |
| U%       | Umidade  |
| UFSCar   | Universidade Federal de São Carlos                                 |
| UI       | Unidade Internacional (para quantificação de atividade enzimática) |
| ÚNICA    | União da Agroindústria Canavieira de São Paulo                     |
| UNICAMP  | Universidade Estadual de Campinas                                  |
| URSS     | União de Repúblicas Socialistas Soviéticas                         |
| USD      | United State Dolars  |
| UV/vis   | Ultravioleta/visível   |
| v/v      | Relação volume por volume  |
| ZAE      | Zoneamento Agroecológico (da cana-de-açúcar)                       |
| βGases   | β-glicosidases   |



## CAPITULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

Espera-se que o etanol de 2ª geração produzido a partir da biomassa celulósica, seja comercializado nos próximos cinco anos com a visão de complementar a produção do etanol de 1ª geração e substituir gradativamente as fontes de combustível fóssil na matriz energética mundial (GNANSOUNOU e DAURIAT, 2010; SEABRA et al., 2010; GLOBAL BIOENERGY PARTNERSHIP, 2008).

A importância do etanol celulósico está na capacidade de uso de matéria prima renovável a baixo custo, sem a competição direta com a produção de alimentos diminuindo os riscos ambientais relacionados com a degradação do solo e água e a efetiva mitigação dos gases do efeito estufa (SOLOMON et al., 2007; MACEDO et al., 2008; GOLDEMBERG e GUARDABASSI, 2009, SPATARI et al., 2010). Benefícios tais no âmbito global são promovidos através de marcos jurídicos e tratados internacionais visando a sua concreta introdução no mercado de combustíveis, pois seu estágio tecnológico ainda não atingiu maturidade comercial.

Neste sentido, diversos grupos de pesquisa vêm trabalhando intensamente em prol da viabilidade técnica e econômica do processo baseado na hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares da biomassa vegetal susceptíveis à fermentação etanólica (SIMS et al., 2010, SOCCOL et al., 2010, BUCKERIDGE et al, 2010). Entre os fatores com maior participação na economia do processo pode-se mencionar a logística da matéria prima, o elevado gasto energético global e o custo das enzimas hidrolíticas (GALBE et al., 2007).

De forma paralela, a conjugação dos trabalhos científicos com as iniciativas estatal e privada deu como resultado a instalação de uma quantidade considerável de plantas de produção em diferentes estágios de desenvolvimento nos EUA e na Europa, principalmente (SIMS et al., 2010).

No contexto nacional, apesar do menor financiamento para o desenvolvimento tecnológico de produção de etanol de 2ª geração, pode-se dizer que o modelo brasileiro de hidrólise enzimática integrado a uma usina de produção apresenta as maiores vantagens competitivas (BAUDEL et al., 2005; SEABRA et al., 2010). A reutilização de resíduos e a otimização de recursos materiais e energéticos são fatores diretamente refletidos na economia do produto representando uma alternativa tecnológica sustentável e uma oportunidade de

desenvolvimento com a abordagem dos principais obstáculos tecnológicos adequados às oportunidades fornecidas pela realidade brasileira (CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

Assim, o presente trabalho iniciou-se como resposta à necessidade de pesquisa tecnológica, identificada em 2007, relacionada com o elevado custo das enzimas celulases, um dos maiores obstáculos para a efetiva inclusão do etanol celulósico na matriz energética mundial. Como estratégia, visando a economicidade do processo, adotou-se a alternativa da fermentação em estado sólido (FES) como tecnologia para produção enzimática e a utilização do bagaço de cana-de-açúcar (BC) como fonte de carbono e suporte para o microorganismo fermentativo. O uso deste resíduo como substrato no bioprocessamento agregou ainda a vantagem em relação à especificidade do extrato enzimático obtido para a hidrólise do próprio BC.

Como todo processo biotecnológico, a FES exige o desenvolvimento de várias etapas sequenciais. A implementação de cada uma delas é apresentada em forma de capítulos no presente estudo, cujo conteúdo é descrito a seguir:

Como etapa de triagem o capítulo dois apresenta o diagnóstico da situação atual e o nível de desenvolvimento técnico-científico do etanol de 1ª e 2ª geração em contextos nacional e internacional. A sustentabilidade do etanol celulósico foi abordada de forma prospectiva devido ao estágio tecnológico do processo de hidrólise enzimática.

O capítulo três dá início ao estudo do bioprocessamento com a caracterização da matéria prima através de técnicas espectroscópicas e convencionais de análise e a subsequente aplicação de vários pré-tratamentos para seleção de uma metodologia que permita diminuir a recalcitrância do BC. A finalidade desta etapa foi o acondicionamento do BC para ser usado como substrato microbiano na FES para produção enzimática de celulases.

Em sequência o capítulo quatro descreve as várias estratégias abordadas para formulação do meio nutriente complementar ao BC, a suplementação baseou-se principalmente na adição de fontes de nitrogênio dada à composição inicial do substrato utilizado. Desta maneira, realizaram-se sucessivas FES seguindo a metodologia estatística de planejamento experimental tendo como variável resposta às atividades enzimáticas obtidas em termos de: atividade sinérgica das celulases ou FPase, endoglucanase ou CMCase e xilanase.

A continuação, com o estabelecimento do método de pré-tratamento para o substrato e a formulação do meio de nutriente, o capítulo cinco avançou no *up-stream* do processo de FES utilizando um bioreator de colunas com controle dos parâmetros de umidade e vazão do ar. Esta etapa experimental também foi planejada com ferramentas estatísticas visando à seleção

das melhores condições de FES em relação às variáveis controladas pelo reator refletidas na produção enzimática. A condição operacional com a melhor produção de celulases foi adotada para o teste de especificidade em hidrólise enzimática real do BC tendo como parâmetro de comparação a hidrólise realizada com um preparado celulásico comercial.

Finalizando, o capítulo seis condensa as principais Conclusões e Sugestões para a realização de trabalhos futuros nas várias áreas de conhecimento abordadas no estudo.

Em resumo, apresenta-se um compêndio de diversas metodologias aplicadas na área dos biocombustíveis de 2ª geração que abrange desde procedimentos físico-químicos de pré-tratamento da biomassa vegetal e sua apropriada caracterização até o desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção enzimática e aplicação na hidrólise de um material lignocelulósico.

Com isto, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma proposta de bioprocessos para produção de celulases específicas por tecnologia de fermentação em estado sólido (FES) através do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar (BC) visando à viabilização do etanol celulósico integrado no processo de 1ª geração. Além disso, busca-se também contribuir com as iniciativas de pesquisa e desenvolvimento técnico-científico fornecendo uma alternativa para a produção de celulases e ao mesmo tempo elevar o valor agregado de um dos principais resíduos da indústria sucroalcooleira.

## **REFERÊNCIAS**

- BAUDEL, H.M., ZAROR, C., ABREU, C.A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Industrial Crops Production*, v. 21, p. 309–315, 2005.
- CERQUEIRA LEITE, R.C., LEAL, M.R.L.V.L., CORTEZ, L.A.B., GRIFFIN, W.M., SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?. *Energy*, v. 34, p. 655–661, 2009.
- BUCKERIDGE, M., SANTOS, W.D., DE SOUZA, A.P., 2010. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Cortez, L.A.B. (Coord.), Edgard Blucher (Eds.), *Etanol: Pesquisa & Desenvolvimento*, in press.
- GALBE, M., SASSNER, P., WINGREN, A., ZACCHI, G. Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 108, p. 303–327, 2007.
- GLOBAL BIOENERGY PARTNERSHIP (2008). A review of the current state of bioenergy development, G8 + 5 countries. Rome - FAO/GBEP. Disponível em: [http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user\\_upload/gbep/docs/BIOENERGY\\_INFO/0805\\_GBEP\\_Report.pdf](http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/BIOENERGY_INFO/0805_GBEP_Report.pdf); 2008. Acesso em: out 2010.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4980–4991, 2010.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. Are biofuels a feasible option?. *Energy Policy*, v. 37, p. 10-14, 2009.

MACEDO I.C., SEABRA J.E.A., da SILVA J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 585-597, 2008.

SEABRA, J.E.A.; TAO, L.; CHUM, H.L.; MACEDO, I.C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, p. 1065-1078, 2010.

SIMS, R.E.H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, v.101, p. 1570-1580, 2010.

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

SOLOMON, B.D.; BARNES, J.R.; HALVORSEN, K.E. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass Bioenergy*, v. 31:p. 416–425, 2007.

## **CAPITULO 2: SUSTENTABILIDADE DO ETANOL CELULÓSICO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.**

---

### **2.1. INTRODUÇÃO**

A atual conjuntura internacional desenhada pela futura insuficiência de combustíveis fósseis e as mudanças climáticas geradas pela emissão irracional de gases de efeito estufa tem resultado em ações governamentais a favor do uso de biocombustíveis (IEA, 2009; THE ROYAL SOCIETY, 2008; DOE, 2009, PLANO NACIONAL DE ENERGIA 2006-2010). A produção de energia a partir da biomassa atende a vários requisitos de sustentabilidade. No aspecto ambiental promove o sequestro de carbono, gera um menor nível de emissões dos gases do efeito estufa (GEE) e apresenta um menor ciclo de produção, com o processo quase que inteiramente controlado pelo homem. Os impactos sócio-econômicos positivos estão relacionados com a geração de empregos rurais, diversificação da matriz energética, aumento de exportação e a possibilidade de complementar a demanda energética global (GOLDEMBERG, 2007; MACEDO et al., 2008; OMETTO e ROMA, 2010).

Contudo, o potencial de difusão dos biocombustíveis de primeira geração (produzidos a partir de alimentos) é limitado. A sua sustentabilidade varia de acordo com a matéria-prima utilizada, pois é atualmente discutida e analisada através de fatos como: a iminente competição por terras agricultáveis (SEARCHINGER et al., 2008), os elevados custos de processamento que frequentemente necessitam de subsídios governamentais (SOLOMON et al., 2007; SOCCOL et al., 2010) e a efetiva redução dos GEE uma vez que não são consideradas as mudanças no uso do solo (SEARCHINGER, et al., 2008; EIA, 2008).

No Brasil, o álcool derivado da cana-de-açúcar tem se apresentado competitivo nestas avaliações ainda com as vantagens do potencial uso do bagaço de cana para a produção de etanol de 2ª geração e a possibilidade de integração em uma cadeia produtiva consolidada.

O etanol de 2ª geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, pode seguir duas rotas tecnológicas: (i) a rota bioquímica, com aplicação de catalisadores ou enzimas para hidrólise da biomassa e a subsequente fermentação microbiana e (ii) a rota termoquímica, através do processo de gaseificação seguido da síntese catalítica dos gases obtidos (BROWN, 2005). No entanto, a rota enzimática apresenta um estágio mais avançado de desenvolvimento científico-tecnológico assim como uma maior capacidade de integração nas instalações

industriais de 1ª geração. Diferentemente do etanol da sacarose, o etanol celulósico precisa de um pré-tratamento físico-químico para disponibilizar a celulose às enzimas hidrolíticas na etapa de sacarificação. Com este intuito podem ser usados agentes ácidos, básicos ou solventes (MOSIER et al., 2005). No processo seguinte os carboidratos componentes da celulose e hemicelulose são hidrolisados para formar monossacarídeos (glucose e xilose, principalmente). Os açúcares são assim fermentados por leveduras ou bactérias para produção de etanol. O produto obtido pode seguir o processo convencional do etanol de 1ª geração onde é concentrado em colunas de destilação e purificado podendo ser usadas tecnologias como a preevaporação (KALYANI et al. 2008), ou osmose reversa (HSU e TAN, 1993).

Apesar das reconhecidas vantagens do etanol celulósico sobre os biocombustíveis de 1ª geração os custos de produção da hidrólise enzimática não atingiram ainda níveis competitivos comparáveis com o etanol sacarídeo e a gasolina, devido à complexidade da matéria-prima e do processo de produção. No entanto, diferentes frentes de pesquisa nacionais e internacionais continuam trabalhando exaustivamente para sua viabilidade, sendo que as primeiras plantas em escala comercial começaram a ser construídas com a efetiva produção prevista para os próximos cinco anos (SEABRA et al., 2010; LEBER, 2010; GNANSOUNOU e DAURIAT, 2010).

Neste contexto, o presente capítulo visa o delineamento de um panorama coerente de informações da produção do etanol celulósico com ênfase no bagaço de cana como matéria-prima base da tecnologia de hidrólise enzimática no Brasil. Com este objetivo são apresentadas as principais alternativas, oportunidades e ameaças desta rota tecnológica, produto da pesquisa e iniciativas nacionais e internacionais. De forma complementar avalia-se o potencial de incorporação do processo bioquímico em destilaria autônoma com os decorrentes impactos ambientais e seu apelo no conceito de “sustentabilidade prospectiva”.

A integração do conhecimento da conjuntura global e a análise da situação nacional representam o ponto de partida para a definição de valores e princípios a serem considerados no delineamento de um sistema de suporte a decisão. O mesmo que fornecerá no futuro as bases para o estabelecimento do conceito de desenvolvimento sustentável e sua aplicação na avaliação estratégica de tecnologias de 2ª geração.



## **2.2 PERSPECTIVA HISTÓRICA DO ETANOL BRASILEIRO**

No Brasil, a história dos biocombustíveis teve início entre os anos 1905 e 1925, com testes pioneiros realizados com álcool combustível pelo Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Em 1931, o governo decretou a obrigação da mistura de 5% de álcool na gasolina importada. Com a primeira crise mundial do petróleo, em 1973, a procura por novas fontes de energia ressurgiu e o governo brasileiro lançou o Programa Brasileiro do Álcool, o Proálcool, cujo avanço é registrado Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Linha de tempo do Proálcool.

| Ano  | Evento   |
|------|--|
| 1975 | Lançamento do programa, cujo empenho inicial era produzir etanol para adição na gasolina (gasohol). Participação de grupos políticos, militares, industriais, acadêmicos e da mídia.   |
| 1978 | Produção dos primeiros carros movidos exclusivamente a álcool. A produção alcooleira passa de 600 M de L por ano, (1975/1976) para 3,4 bilhões L (1979/1980).  |
| 1979 | Criação do Conselho Nacional de Álcool (CNAL) e da Comissão Executiva Nacional do Álcool (Cenal), para agilizar o programa. Proporção de carros produzidos no Brasil aumentaria de 0,46% para 26,8% em 1980 atingindo 76,1% em 1986.   |
| 1980 | Subsídios governamentais expandiram a capacidade de usinas produtoras de etanol e a instalação de usinas autônomas   |
| 1984 | Aproximadamente 94% dos veículos de passageiros foram abastecidos com álcool, começo da crise do ProÁlcool devido à combinação de vários fatores como a estabilização dos preços de álcool, incerteza política, incremento na produção interna de diesel, mudanças políticas internacionais e o colapso da URSS. |
| 1988 | Queda significativa dos preços de petróleo, coincidente com escassez de recursos para subsidiar programas de estímulo aos energéticos alternativos.  |
| 1990 | Crise do Proálcool com uma produção de 11,7 bilhões de L em 372 destilarias  |
| 1993 | A Lei n. 8.732 obriga uso de álcool anidro como aditivo da gasolina na faixa de 20 a 25%.  |
| 2003 | A Volkswagen lança o motor flex fuel (bicombustível), com sistema desenvolvido pela Bosch. A popularização da tecnologia eleva o consumo de etanol   |
| 2006 | Vendidos cerca de 1,4 milhões (M) de carros flex, 78% do total comercializado. Em 2007, essa participação sobe para 85,6%.   |
| 2008 | 25 bilhões de L produzidos em 448 unidades. 5,16 bilhões destinados para exportação, 2 vezes a exportação da gasolina.   |

Fontes: IBGE (2009); Udop (2009).

O mundo produziu em 2008, aproximadamente, 66 bilhões de L de bioetanol combustível, sendo que os EUA e o Brasil detêm 90% desta produção, com cerca 35 e 25

bilhões de L, respectivamente (MUSSATTO et al., 2010). As exportações mundiais de bioetanol movimentaram 13% e 10% da produção mundial, respectivamente em 2007 e 2008, com estimativa de manutenção desse nível em 2009 (UNICA, 2009), além de se mostrarem extremamente voláteis em termos de preços e destinos.

No Brasil, é prevista uma expansão da produção do bioetanol de 27 bilhões de L registrada em 2009 para 104 bilhões de L em 2025 visando atender as demandas do mercado interno e externo como medida internacional de segurança energética e ambiental (OPENPR, 2010).

Além de novas unidades produtivas, o aumento na produção deverá ser atingido através da redução de custos do processo e a implementação de tecnologias emergentes que terão impactos significativos na sustentabilidade de produção de cana, como plantio direto, tecnologia de colheita mecânica de baixa compactação do solo, agricultura de precisão e tecnologia da informação. Recentemente, o programa realizado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), o Grupo Ridesa e o Centro da Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) resultou em um incremento de 1,6% no rendimento anual do cultivo. A melhora varietal nos cultivares do estado de São Paulo ainda necessita de adaptação em novas áreas brasileiras (MAPA, 2008).

Com mais de 90% do genoma da cana sequenciado, os grupos de pesquisa têm a capacidade de desenvolver variedades transgênicas com maior concentração de açúcar, maior resistência à seca e a doença e adaptação ainda maior a diferentes climas e solos. São possíveis também melhoras no processo de fermentação visando sua operação de modo contínuo, atingindo eficiências de 92% (ORELLANA e BONALUME, 2006).

No tocante às melhoras tecnológicas no processo visando o aproveitamento integral do bagaço de cana, Goldemberg (2007) projetou que seria possível produzir 2 bilhões de L de etanol celulósico sem expandir a área plantada, respeitando as condições de sustentabilidade econômica, social e ambiental. Cabe destacar que toda a logística e infraestrutura já estabelecidas para o mercado do etanol convencional poderão ser aproveitadas na medida em que o etanol celulósico se torne viável comercialmente (CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

### **2.2.1 IMPACTOS ECONÔMICOS E AMBIENTAIS**

Atualmente podem ser produzidos 6000- 7500 L por hectare de etanol com custos aproximados de USD 0,25 – 0,30 L<sup>-1</sup> (TABAK, 2009; DUAILIBI, 2008). De acordo com o IBGE (2009) 70% deste preço de produção se deve à matéria-prima, embora as análises

projetem reduções contínuas com o aumento de escala das usinas como tendência dos últimos 30 anos. Uma planta brasileira de etanol de 19 M L por ano requer um investimento em torno de USD 65–100 M em custos de capital, gerando de 30 – 50 postos de trabalho e custos operacionais calculados em USD 45–60 M (SOLOMON et al., 2007).

A Tabela 2.2 mostra os custos e resultados de balanços energéticos do bioetanol produzidos no Brasil e no mundo. A combinação de fatores como a eficiência fotossintética, ampla disponibilidade de recursos naturais e mão-de-obra barata permitiram ao Brasil uma rápida industrialização e desenvolvimento industrial em grande escala. Contudo a complexidade no processamento da cana-de-açúcar é menor quando comparada com as outras matérias-primas e a possibilidade da co-geração de energia (quando eficiente) a partir do bagaço de cana residual refletem na competitividade do etanol brasileiro no mercado mundial dos biocombustíveis (MACEDO et al., 2008; CERQUEIRA LEITE et. al., 2009).

Tabela 2.2 Custos de etanol e balanços energéticos segundo à matéria-prima.

| Matéria-prima  | Custo (USD por L) | Balanco energético (output renovável/input fóssil) |
|--|-------------------|--|
| Cana de açúcar brasileira, sem impostos de importação. | 0,20              | 10,2; Macedo (2008)                                |
| com impostos de importação                             | 0,36              |  |
| Beterraba, Europa                                      | 0,76              | 2,1; Woods e Bauen (2003)                          |
| Milho, EUA   | 0,47              | 1,4; Pacheco (2006)                                |
| Trigo  | 0,45              | 1; Moreira et al. (2008)                           |
| Etanol celulósico, EUA                                 | 0,60              | 10; Pacheco (2006)                                 |

Adaptado de: Goldemberg et al. (2007); Macedo et al. (2008).

A indústria dos biocombustíveis é sustentada em muitos países por medidas comerciais protecionistas, como altas tarifas para importação, subsídios para exportação; e quotas de produção, preços fixados ao produtor e preços regulados ao consumidor (SOLOMON et al., 2007; MUSSATTO et al 2010). Assim como pode-se observar na Tabela 2.2 o custo de produção do bioetanol na Europa é três vezes maior que no Brasil e o etanol do milho, produzido nos EUA é o dobro (IEA, 2009).

O bioetanol de cana é também favorável no balanço energético. O processo derivado do milho apresenta balanços de 1:1,4 (1 kcal energia consumida na produção de etanol apresenta um ganho de 1,4 kcal no etanol produzido) (KIM e DALE, 2005). Outro aspecto importante na avaliação de ciclo de vida (ACV) do bioetanol é o uso de energia fóssil na conversão dos

açúcares em etanol. A cana de açúcar necessita 4 vezes menos energia que o milho: 1,6 bilhões de kcal frente a 6,6 bilhões (ANDREOLI e SOUZA, 2007). Além do suprimento de alimento e energia, a cadeia produtiva do bioetanol da cana apresenta contribuições ambientais relacionadas com o seqüestro de carbono no solo e a concreta redução dos GEE (MACEDO e SEABRA, 2008; AMARAL et al., 2009; OMETTO e ROMA, 2010).

Em recente publicação acerca do ACV do bioetanol, D'agosto e Ribeiro (2009) determinaram diminuições de 7,9 a 8,4% de CO<sub>2</sub> quando compararam automóveis movidos a etanol e a gasolina. Esta é uma diferença significativa dado que a análise considera desde o combustível fóssil usado no transporte dos fertilizantes até sua utilização para distribuição final. Ainda neste sentido, os autores comentaram que os ganhos ambientais poderiam ser maiores após aprimoramento da tecnologia automotiva visando a redução de emissões NO<sub>x</sub>.

Por outro lado Ometto e Roma (2009) realizaram uma avaliação crítica visando o decréscimo dos impactos ambientais associados à produção do bioetanol. As recomendações finais foram: eliminação total da queima na colheita, a adoção de práticas agrícolas benéficas ao ambiente, o uso de combustível renovável ao invés do fóssil no transporte e maquinaria, a eliminação da lavagem prévia ao processo e a implementação do reuso e reciclo de água industrial. Ometto e Roma (2009) sugerem a inclusão de indicadores ambientais e sociais para garantir a expansão sustentável e planejada da cultura de cana-de-açúcar. A extensão da pesquisa em aspectos sociais e de biodiversidade deverá atender a principal debilidade no aspecto social relacionada com a existência de empregos temporários, baixos salários, alta rotatividade e dificuldade na capacitação dos trabalhadores.

Em 2009, o governo brasileiro publicou o Zoneamento Agroecológico da Cana-de-açúcar (ZAE Cana) (PL 6.077/ 2009). O ZAE teve como objetivo o fornecimento de subsídios técnicos para formulação de políticas públicas visando o ordenamento da expansão e a produção sustentável de cana-de-açúcar. A área disponível determinada para plantação de cana foi de 19% do território brasileiro. Áreas como a Floresta amazônica, o Pantanal e Mata Atlântica remanescente são protegidas para esta finalidade.

## **2.4 PRODUÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS PELA INDÚSTRIA CANAVIEIRA.**

A Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2010 e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, realizaram em abril de 2010, o primeiro

levantamento da safra 2010/11 de cana-de-açúcar. A área nacional de cana colhida destinada à atividade sucroalcooleira, na presente safra, foi estimada em 8 M de hectares. O Estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 54,35% (4,4 M de hectares). A previsão do total de cana moída é de 664,33 M de toneladas com incremento de 9,9% em relação à safra 2009/10.

A cana destinada para produção de álcool deve gerar um volume total de 28,5 bilhões de L de etanol (8,4 bilhões de L de álcool anidro e 20,14 bilhões de L de álcool hidratado) (CONAB, 2010).

A disponibilidade de bagaço está atrelada a eficiência energética da usina. Atualmente, o excedente de bagaço disponível para hidrólise ou outros usos se situa entre 7% - 10% do bagaço total, que é de aproximadamente 280 kg tn de cana produzida<sup>-1</sup> (base úmida). O restante do bagaço, obtido no processamento, é empregado como combustível primário na geração de vapor e energia elétrica. Essa condição se dá em usinas com destilaria anexa com ciclos de operação de 1,9–21 MPa, 573 K para geração de vapor e energia.

Em destilarias autônomas, excedentes de bagaço da ordem de 50% do bagaço total podem ser atingidos pela otimização do sistema de produção de vapor e energia, operando com geração de vapor na pressão de 6,5-9,0 MPa e empregando turbinas e geradores de alta eficiência para venda de energia elétrica<sup>1</sup> (RAMJEAWON, 2008). Soma-se a isso uma estimativa obtida dos estudos realizados sobre recuperação de palhico<sup>2</sup>, que considera uma quantidade adicional de biomassa lignocelulósica recuperável de 140 kg (base seca) por tonelada de cana (RIPOLI e RIPOLI, 2008). Uma fração da palha pode ser também deixada na superfície do solo, pois tem importância na melhoria da sua fertilidade, por meio do retorno dos nutrientes via processo de mineralização, diminuição dos processos erosivos e maior retenção de água, além de propiciar aumento na microbiota do solo (BERTONCINI, 2008).

Segundo registros da ÚNICA, no final do ano 2010, serão produzidos aproximadamente 372 M de toneladas de resíduos lignocelulósicos. Esses excedentes de bagaço, palha e das pontas que deixam de ser queimados no campo representam o diferencial de integração para a revolução energética da cadeia produtiva da cana-de-açúcar após viabilização da produção de

---

<sup>1</sup> Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica, criado através da Lei 10.438, de 26 de abril de 2002).

<sup>2</sup> Lei estadual n 11.241, de 19 de setembro de 2002.

bioetanol 2ª geração. Neste sentido, Macedo (2005) relata que se 50% do bagaço excedente fosse coletado e usado para geração de etanol, poderia gerar um adicional de 3700 - 4000 L hectare<sup>-1</sup>, reduzindo o uso da área cultivável em 33-38%.

### **2.3 ASPECTOS TECNOLÓGICOS DO ETANOL CELULÓSICO**

Uma visão da tendência internacional no desenvolvimento de biocombustíveis, partilhada por muitos especialistas, é a de que os biocombustíveis de primeira geração (etanol de sacarose e amido; biodiesel produzido pela transesterificação de óleos e gorduras com etanol ou metanol) atualmente disponíveis serão seguidos pelos chamados “biocombustíveis de segunda geração”, que incluem o diesel produzido a partir de gás de síntese em processos termoquímicos e o etanol a partir de materiais lignocelulósicos por processos químicos e enzimáticos. O desenvolvimento industrial destas tecnologias (hidrólise e de gaseificação) possibilitará a transformação de fibras em combustíveis, através da fermentação do açúcar gerado pela hidrólise ou da síntese de compostos a partir dos gases, processo chamado de Fischer-Tropsch. Em seguida, nesta linha do tempo, biorrefinarias integradas serão construídas para aproveitamento integral de energia, biocombustíveis e um grande número de produtos químicos e bioquímicos a partir da biomassa como pigmentos, pinturas, essências aromáticas, enzimas, hormônios entre outros (BROWN, 2005; SOCCOL et al., 2010; CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

O processo de produção do etanol de segunda geração exhibe várias alternativas tecnológicas devido à elevada complexidade e variedade de matérias-primas. O desenvolvimento e inovação dessas possibilidades é atualmente agenda governamental, industrial e acadêmica refletida na quantidade de pesquisas em escala de laboratório, piloto e em plantas demonstrativas (DOE, 2007; BANERJEE et al., 2010; CARDONA et al., 2010).

A rota tecnológica com maior potencial de integração nas usinas comerciais consiste em um método de pré-tratamento para disponibilizar os polissacarídeos componentes (CARDONA et al., 2010; MOSIER et al., 2005) seguida de hidrólise ácida ou enzimática para obtenção de açúcares (hexoses e pentoses) e fermentação microbiana destes açúcares a etanol (LYND et al., 2002; SEABRA et al., 2010) e finalmente a separação e concentração do etanol produzido por destilação-retificação-desidratação (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

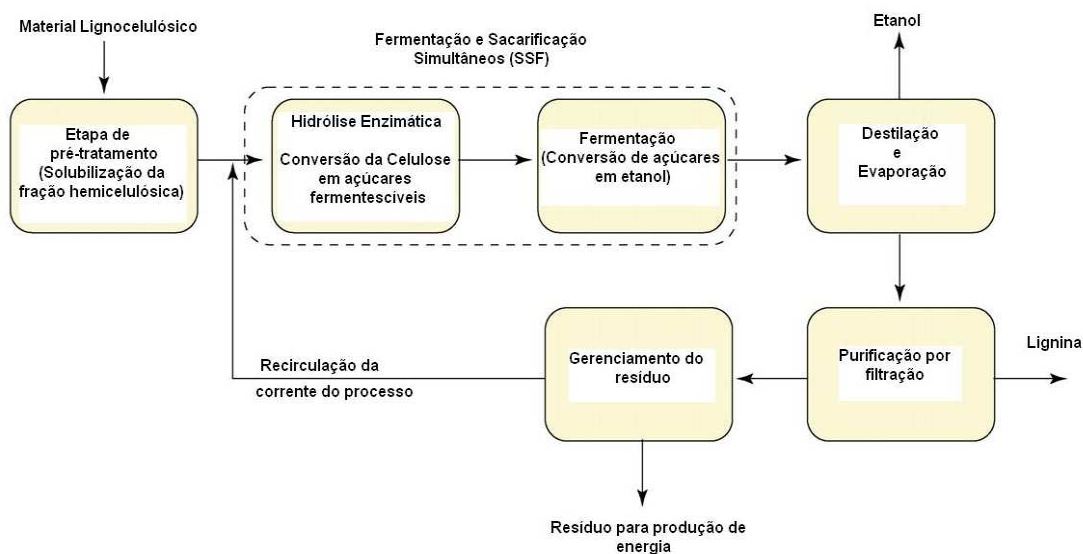


Figura 2.1 - Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Adaptado de Hahn-Hägerdal et al. (2006).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos para modificar a estrutura rígida que caracteriza a lignocelulose. Eles podem ser classificados como físicos (moagem, irradiação), químicos (ácido, alcalino, com solventes orgânicos) e físico-químicos (explosão a vapor, hidrotérmicos e oxidação úmida). Em geral estes últimos são os mais eficientes (MOSSIER et al., 2005). O pré-tratamento é etapa chave na bioconversão, cuja finalidade é a obtenção de uma polpa celulósica altamente digerível com a mínima formação de inibidores nos processos subsequentes de hidrólise e fermentação.

Dentre as alternativas estudadas para o bagaço de cana, o pré-tratamento por explosão a vapor foi proposto como um dos mais promissores devido a sua compatibilidade em sistemas de biorrefinaria (BALAT et al., 2008). Neste processo o material lignocelulósico é exposto a condições de elevada pressão seguidas de elevadas temperaturas e descompressão repentina. O resultado é uma quebra substancial da estrutura lignocelulósica devido a hidrólise da hemicelulose e despolimerização da celulose e lignina (BALAT et al., 2008; CARDONA et al., 2010).

A tecnologia por explosão a vapor (praticada em algumas usinas brasileiras) apresenta menores custos de inversão e menor impacto ambiental durante sua operação devido à ausência de reagentes químicos (RUIZ et al., 2008). Por outro lado, a explosão a vapor produz um material pré-tratado com baixa densidade e precisa de lavagem prévia à hidrólise e fermentação para remoção de inibidores.

Na etapa seguinte, duas são as opções tecnológicas mais relevantes na obtenção de açúcares a partir da celulose: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. A hidrólise ácida é uma tecnologia bastante estudada, embora a sua implementação tenha sido barrada devido às condições severas do processo. A frequente degradação da celulose e a formação de inibidores recalcitrantes no processo fermentativo têm sido as principais desvantagens deste tipo de hidrólise. A construção de reatores necessita de materiais resistentes à corrosão com elevado custo, as instalações representam elevados riscos à integridade e a operação gera efluentes tóxicos (BASTOS, 2007).

A hidrólise enzimática fornece uma utilização mais eficiente dos carboidratos, pois as enzimas celulases apresentam elevada especificidade de ação sobre a celulose evitando assim a formação de produtos inibidores em condições moderadas de operação (50-60°C). Apesar dessa potencialidade, a rota enzimática apresenta limitações tecnológicas como o alto custo das enzimas e a baixa produtividade (ADSUL et al., 2005; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

As pesquisas abordando a preparação e aplicação das celulases estão em contínuo desenvolvimento. Meyer et al. (2009) indicam o uso de enzimas auxiliares como as xilanases e as feruloil esterase para a completa hidrólise da polpa celulósica (celulose + hemicelulose). Por outro lado são também selecionados novos microrganismos celulolíticos a partir de técnicas avançadas de engenharia genética (MIURA et al., 2004). A rota enzimática ainda proporciona a alternativa da sua operação em forma separada ou conjugada com a fermentação alcoólica no processo conhecido como Fermentação e Sacarificação Simultânea (FSS). Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens relacionadas com a produtividade, estabilidade do processo, contaminação microbiana, inibição enzimática pelo produto, e a possibilidade de aproveitamento de subprodutos como lignina e leveduras (MUSSATTO e ROBERTO, 2004; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006, SOCCOL et al., 2010). Os açúcares derivados da hidrólise do bagaço consistem em uma mistura de hexoses (glicose) e pentoses (principalmente xilose), sendo desejável que todos eles sejam convertidos a etanol. No entanto, as linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não metabolizam xilose ou outras pentoses e são bastante sensíveis à inibição por subprodutos gerados no pré-tratamento. A limitação apresentada pelas leveduras gera a necessidade de desenvolvimento de microrganismos mais robustos, capazes de produzir etanol a partir dos hidrolisados de bagaço. A busca de linhagens de leveduras capazes de utilizar xiloses é uma das estratégias abordadas. Linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli* foram



desenvolvidas com a capacidade de co-fermentar glicose e xilose (YOMAN et al., 1999; LIU e QURESHI, 2009). A tecnologia de DNA recombinante vem sendo usada para clonagem e seqüenciamento de genes de interesse industrial.

A concentração de etanol é um parâmetro relevante na avaliação da viabilidade do processo. A fermentação alcoólica da solução de açúcares com  $70 \text{ g L}^{-1}$  de glicose deve atingir uma produção de  $35 \text{ g L}^{-1}$  de etanol. Comparativamente o licor da cana apresenta 120-160  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose que após fermentação resulta em concentrações etanólicas em torno a 60-80  $\text{g L}^{-1}$ . A etapa final de separação e concentração do etanol é uma tecnologia bem estabelecida sendo utilizada e comercializada na produção de etanol de 1ª geração.

## **2.5 PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE CELULASES**

No âmbito da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, as celulases são insumos que impactam significativamente o processo, podendo representar até 18% do custo operacional de uma planta de hidrólise enzimática (ZHUANG et al., 2007). As tecnologias para produção de celulases e sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos são processos em continuo desenvolvimento, e chave para o aumento da produtividade e economicidade da rota enzimática.

O complexo enzimático de celulases é constituído por uma mistura de várias enzimas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase). Os microorganismos produtores podem ser bactérias (*Bacillus*, *Cellulomonas* e *Clostridium*) ou fungos. A produção industrial é dominada por várias espécies fúngicas e envolve os gêneros *Trichoderma sp.*, *Penicilium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Humicola sp* e *Fusarium sp.* A obtenção de preparados com alta atividade celulolítica depende do microrganismo utilizado e do processo de produção das enzimas. O formulado celulolítico ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases (WEN et al., 2005); pela produção isolada das celulases e posterior mistura dos extratos purificados, em proporções pré-otimizadas (LI et al., 2005) ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros (SRIVASTAVA et al., 1999). Técnicas de genética clássica (mutagênese) ou biologia molecular podem ser empregadas com este intuito. No que se refere à melhora no processo, torna-se relevante o aproveitamento e reciclo das enzimas no reator de hidrólise. As operações de separação como a microfiltração e ultrafiltração por membranas são os mais indicados na

literatura (MORES et al., 2001) representando uma redução de 0,048 USD L<sup>-1</sup> no custo do produto final.

O setor comercial das celulases é dominado internacionalmente pelas empresas Genencor e Novozymes, esta última com uma fábrica no Brasil, Curitiba, a Novozymes Latin America Ltda.

No contexto nacional, a comercialização de preparados celulásicos movimentou até setembro de 2010, USD 1 M, com a exportação de 23 toneladas e a importação de 67 toneladas de preparados celulásicos, provenientes da União Européia e norte-americanos (ALICEWEB, 2010).

Devido a viabilidade econômica do etanol de segunda geração depender fortemente do abastecimento de enzimas a preços competitivos, as empresas Genencor e Novozymes vêm lançando continuamente no mercado preparados celulásicos cada vez mais aprimorados e a menores custos. Neste sentido, foram lançadas recentemente por ambas as empresas líderes, duas novas linhas de enzimas capazes de tornar competitiva a produção de etanol celulósico (LEBER, 2010). A companhia dinamarquesa Novozymes, anunciou a venda do complexo direcionado a hidrólise da biomassa, o Cellic CTec2 (celulase) e o Cellic HTec2 (hemicelulase). A empresa calcula que com esta inovação, o preço do etanol celulósico deve ser reduzido para US\$ 0,54 L<sup>-1</sup>, valor similar ao do etanol de milho e da gasolina comercializada nos EUA. A diminuição no custo de fabricação da enzima foi de 80%, ficando em US\$ 0,13 L<sup>-1</sup> de etanol produzido.

Paralelamente a Genencor - Danisco (com sede na Califórnia) anunciou a produção de enzimas a custo semelhante, triplicando a eficiência dos seus produtos, mas ainda não foram disponibilizados comercialmente.

O artigo ainda informa que a Novozymes, em parceria com a empresa POET, maior produtora de etanol de milho dos EUA, planejam abrir em 2011 uma planta demonstrativa com capacidade para 95 M de L de etanol produzido com estas enzimas e com palha e espigas de milho como matéria-prima. No ano passado, a POET registrou a marca no preço de etanol celulósico de US\$ 0,60 por L (LEBER, 2010). Estes avanços iriam capacitar a indústria do etanol celulósico em larga escala para a comercialização do produto em USD 0,60 por L em 2011. No entanto, estes avanços precisam ser acompanhados e corroborados com investimento em plantas industriais de etanol além da ação colaborativa de empresas de biotecnologia, indústria de biocombustíveis, centros acadêmicos e governo.

## 2.6 PANORAMA MUNDIAL DO ETANOL CELULÓSICO

Apesar do significativo progresso científico na viabilização do etanol celulósico, existem ainda desafios técnicos e econômicos a serem superados antes da concretização de investimentos em escala comercial. Segundo o Acordo de Implementação de Bioenergia (IEA, 2009)<sup>3</sup>, as tecnologias de processamento foram qualificadas como imaturas devido ao panorama internacional de operação em escala piloto, representando menos de 0,1% da fabricação mundial de combustíveis líquidos.

As maiores iniciativas neste sentido foram registradas pelo Programa do Departamento de Energia do governo dos EUA, que em 2007 financiou a construção de doze plantas de etanol celulósico e biorrefinarias em escala de demonstração além da instalação de três centros de pesquisa especializados com investimentos de mais de USD 1 bilhão (WALTZ, 2008). Os objetivos iniciais de 500 M L por ano de etanol celulósico foram largamente superados, só a planta da empresa POET produz 100 M ano<sup>-1</sup> de etanol a partir de sabugo e palha de milho por hidrólise enzimática. O governo do Canadá, por sua vez, vem apostando no apoio de empresas privadas com mais de USD 500 M visando a construção de plantas de etanol e biodiesel. Produto desta parceria, a Iogen Corporation, a Shell e a Codexis instalaram em Ottawa a planta para venda comercial do etanol celulósico. O projeto permite o processamento de 20–30 toneladas diárias de palha de trigo para produzir aproximadamente 5000 – 6000 L dia<sup>-1</sup> também por via enzimática. As enzimas celulasas são produzidas diretamente na IOGEN, o processo de fabricação é por fermentação submersa, empregando uma linhagem de *Trichoderma*. A cultura do fungo é realizada em presença de uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e fatores de crescimento complexos como água de maceração do milho e sais. Como fonte de carbono para multiplicação do microrganismo, se utiliza a glicose, e para induzir a produção de enzimas, uma vez esgotada, se adicionam celobiose, lactose ou oligômeros de glicose. O processo é realizado em fermentadores com agitação e aeração, em condições assépticas a 30°C e pH 4-5. A fermentação se completa em aproximadamente 170 horas. O complexo celulolítico obtido depois de retirada a biomassa é concentrado (estabilização com acréscimo de benzoato de sódio como preservativo para estocagem) e aplicado na hidrólise do material lignocelulósico (IOGEN, 2010).

---

<sup>3</sup> The Implementing Agreement on Bioenergy é um acordo colaborativo internacional estabelecido em 1978 pela IEA visando a cooperação e a troca de informação entre os programas de P&D das nações no tema de bioenergia. O objetivo é acelerar a prática de sustentabilidade e o custo competitivo da bioenergia garantindo a segurança energética dos países membros.

Contudo os projetos de construção piloto de etanol celulósico continuam em aumento também na Europa, Japão, China e Índia onde os principais investidores são o governo e as empresas privadas como a Inbicon, Abengoa, British Petroleum, Sekab, Nippon Oil Corporation, Praj Industries, entre outras. Algumas dessas experiências internacionais estão listadas e referenciadas na Tabela 2.3 e no Anexo 1.

Tabela 2.3 Exemplos de plantas piloto e demonstrativas para a produção de etanol celulósico.

| Empresa  | Matéria-prima   | Capacidade<br>M L ano <sup>-1</sup> | Tecnologia  |
|--|---|-------------------------------------|---|
| Abengoa (Madrid, Espanha)                                  | Sabugo de milho, palha de trigo, capim.                         | 5                                   | Hidrólise enzimática: fermentação.  |
| ALICO (Florida, EUA)                                       | Madeira, subprodutos cítricos, resíduos de borracha e plástico. | 51                                  | Termoquímica: gaseificação e fermentação.                                   |
| BioEthanol (Osaka, Japão)                                  | Resíduos de madeira.  | 1,4                                 | Hidrólise enzimática: fermentação   |
| BlueFire Ethanol (Califórnia, EUA).                        | Lixo urbano, palha de trigo.                                    | 11,2                                | Hidrólise enzimática  |
| Coskata (Pensilvânia, EUA)                                 | Palha de trigo, casca de arroz.                                 | 140                                 | Combinação de processos hidrólise enzimática e gaseificação                 |
| Inbicon (Kalundborg, Dinamarca)                            | Palha de milho, palha de trigo                                  | 10                                  | Combinação de processos hidrólise enzimática e gaseificação                 |
| Mascoma (Tennessee, EUA).                                  | Capim e madeira.  | 18,5                                | Hidrólise enzimática e produção de biogás                                   |
| POET (South Dakota, EUA)                                   | Palha e sabugo de milho.  | 92,8                                | Hidrólise enzimática: fermentação.  |
| Range Fuels (Soperton, EUA)                                | Resíduos de madeira.  | 70                                  | Termoquímica: gaseificação  |
| China Resources Alcohol Corporation (ZhaoDong City, China) | Palha de milho  | 6,3                                 | Hidrólise enzimática  |
| Verenium (Pensilvânia, EUA).                               | Bagaço de cana-de-açúcar, madeira.                              | 5,1                                 | Hidrólise enzimática: fermentação.  |
| Zea Chem (Oregon, EUA)                                     | Resíduos de madeira   | 5,1                                 | Combinação de hidrólise enzimática e gaseificação. Hidrogenólise da lignina |

Fonte: Modificado de Waltz (2008) e Margeot et al. (2010).

Hoje o custo de instalação de uma planta comercial de etanol celulósico é calculado em torno de USD 100 M. No entanto, todas as iniciativas de investimento a larga escala estão na fase projetiva (GNANSOUNOU e DAURIAT, 2010). Segundo Sims et al. (2010) uma planta comercial em larga escala deve produzir entre 150-200 ML ano<sup>-1</sup> em 7000 horas de operação efetiva e com o processamento de 0,35 – 0,6 M toneladas de biomassa lignocelulósica.

Segundo as previsões de Faaij e Londo (2010) e em concordância com a Tabela 2.3 os diferentes processos e matérias-primas para obtenção de biocombustíveis líquidos coexistirão nos próximos 50 anos, mas o potencial das fontes lignocelulósicas passará a ser relevante quando forem aproveitados os resíduos das cadeias produtivas alimentares e agroindustriais, dando-se preferência ao uso da terra para produção de alimentos.

Em 2020 são esperadas produções no montante de 61 bilhões L de etanol celulósico, se forem alcançadas as metas propostas por EUA, China, Europa, Japão e Brasil (OPENPR, 2010). A legislação dos EUA prevê uma participação de 64% no mercado enquanto que aquelas da Europa e China propõem porcentagens de 10,4 e 11,5% respectivamente.

### **2.6.1 INICIATIVAS TECNOLÓGICAS BRASILEIRAS**

No Brasil, três são as iniciativas privadas frequentemente mencionadas. Uma delas é a Dedini Indústrias de Base S.A., que realiza pesquisa e desenvolvimento em processos e equipamentos de hidrólise (DEDINI INDÚSTRIAS DE BASE, 2008). Desde 2003, a Dedini vem testando em uma unidade piloto de capacidade para 5 mil L diários de bioetanol, o processo de produção de bioetanol com base no bagaço e na palha de cana. Nesse processo, patenteado como Dedini Hidrólise Rápida (DHR), um solvente hidro-alcoólico desestrutura a matriz celulose-hemicelulose-lignina, dissolvendo a lignina, hidrolisando a hemicelulose e expondo a celulose para a ação de ácido sulfúrico diluído, que promove rapidamente (10 a 15 minutos) a hidrólise dessa fração, sob temperaturas de 170 - 190 °C e pressões da ordem de 2,5 MPa. Como, nesse processo, a fração das pentoses não é aproveitada, os rendimentos são relativamente baixos, da ordem de 218 L de bioetanol por tonelada de bagaço seco (OLIVÉRIO e SOARES, 2007). Além disso, as condições operacionais são severas gerando efluentes perigosos e de elevada toxicidade.

Por outro lado, a Petrobrás inaugurou o projeto Complexo Bioenergético (CBio) para produção de etanol com a parceria da empresa japonesa Mitsui e da brasileira Itarumã Participações. Esta unidade iniciará a produção de 200 M L de etanol convencional voltado para o mercado japonês (ABIFINA FACTO, 2008). Paralelamente, a produção de etanol de 2ª

geração através da hidrólise enzimática vem sendo testada em escala piloto. A unidade experimental instalada no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Petrobras (Cenpes), no Rio de Janeiro produz 280 L por tonelada de bagaço seco. Nesta fase, a obtenção de dados deverá permitir a implementação do projeto e a construção de uma planta de demonstração no CBio para início de operação em 2011 (ABIFINA FACTO, 2008).

Mais recentemente, a empresa Oxiten S.A., do grupo Ultra com financiamento do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), iniciou a construção de uma biorrefinaria piloto para viabilizar comercialmente o processo de obtenção de etanol por hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose; e de etilenoglicol e propilenoglicol, por hidrogenólise, a partir desses açúcares (OXITENO, 2008)

No âmbito estatal cabe destacar a iniciativa do Ministério de Ciência e Tecnologia, com a construção de uma plataforma para hidrólise enzimática de bagaço de cana em escala-piloto junto ao Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (Campinas, SP) (CTBE, 2010).

Paralelamente, se integram nesta missão nacional estratégica, iniciativas das instituições de pesquisa e desenvolvimento acadêmicas em parceria com entidades governamentais e privadas. Assim:

No contexto do Plano Nacional de Agroenergia (PNA 2006-2011) à Embrapa tem a missão de coordenar ações institucionais e um programa de PD&I que otimize processos e matérias-primas atuais e potenciais no Brasil, nas plataformas de etanol, biodiesel, florestas energéticas e resíduos, para a obtenção de biocombustíveis e de co-produtos. Estas diretrizes estratégicas tem abrangência em três vertentes que implicam no desenvolvimento de tecnologia agrícola, industrial e estudos transversais (socioeconômicos, ambientais, mercado, gestão e elementos para subsidiar políticas públicas), conectando o conhecimento agrônomo, o conhecimento industrial e o mercado de energia. A criação da Embrapa Agroenergia unidade de tema básico, visa a coordenação das iniciativas nas diferentes unidades em relação ao desenvolvimento de processos para o aproveitamento da energia de biomassa, com foco na busca e melhoramento de matérias-primas para fins energéticos e os processos de conversão e tecnologias de 2ª geração.

O Projeto Bioetanol, do Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético (NIPE), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), com o apoio da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), tem por objetivo estudar a produção de etanol por hidrólise enzimática. O projeto é composto por 14 instituições, que englobam 23 grupos de pesquisa nacionais, com

colaboração de cinco instituições internacionais. As atividades do grupo são divididas em quatro grandes áreas: 1. Caracterização do bagaço e da palha – métodos analíticos padrão; 2. Produção de celulases; 3. Hidrólise e fermentação do bagaço e da palha; e 4. Análise e otimização do uso de energia – disposição de rejeitos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) também incentiva o desenvolvimento de estudos sobre hidrólise e produção de etanol através do Programa Fapesp de Bioenergia (Bioen). O Bioen começou em 2008 e tem prazo de duração de dez anos. O programa está estruturado em torno de cinco grandes áreas de pesquisa. Uma delas é sobre biomassa e genômica, bioquímica, biologia celular e fisiologia. As outras são o processo de fabricação de biocombustíveis, as aplicações do etanol para motores automotivos, estudos sobre biorrefinarias e alcoolquímica, e impactos sociais e ambientais do uso de biocombustíveis

Como pode ser observado, esta área de pesquisa vem ganhando impulso, o número de pesquisadores e técnicos envolvidos com a pesquisa tende a crescer de forma exponencial devido ao diferenciado potencial brasileiro para liderar o mercado em biocombustíveis de segunda geração.

Pode-se concluir que dada a complexidade envolvida na tecnologia de transformação do bagaço em etanol por hidrólise enzimática, existem ainda ações a serem executadas em vias da sua viabilização comercial no Brasil. Em primeiro lugar, a articulação entre todas as iniciativas referidas para formar um banco de dados referencial do estado de arte e nível de desenvolvimento tecnológico nacional. Assim também são requeridas novas unidades-piloto em escala intermediária, que visem a subsequente escala de demonstração para verificar o desempenho do processo em todos seus estágios. Uma vez definidas as opções de processo e rotas tecnológicas mais adequadas é primordial a sua integração concreta como unidade anexa a uma destilaria de etanol de cana-de-açúcar convencional.

### **2.7 ANÁLISES TECNO-ECONÔMICAS PROSPECTIVAS**

A avaliação dos impactos ambientais, econômicos e sociais do etanol celulósico está em nível de prospecção e se baseia atualmente na construção de cenários hipotéticos e simulações computacionais. No entanto, vantagens em relação à segurança energética nacional, o desenvolvimento da agroindústria e comunidades rurais, a redução na dependência de

combustíveis fósseis, sequestro de carbono no solo e mitigação dos GEE tem caráter consensual no mundo (IEA, 2008; NREL, 2007).

A estimativa dos custos de produção do etanol celulósico é imprecisa. Ainda com a definição da rota enzimática como tecnologia base, existem diferentes opções de aplicação que por sua vez vão ter diversos efeitos nas variáveis ambientais e sócio-econômicas atingidas. O custo de produção representa um parâmetro decisório na comparação entre diversas alternativas tecnológicas, mas deve ser tomado com cautela quando diferentes realidades são analisadas (GNANSOUNOU e DAURIAT, 2010). Por exemplo, os custos previstos para os EUA geralmente estão em torno de USD 0,34–0,47 L<sup>-1</sup> (JECHURA et al., 2003) e na Europa ascendem para USD 0.36–0.8 L<sup>-1</sup> (SASSNER et al., 2008). A principal diferença está na disponibilidade de matéria-prima e no tamanho da planta de conversão. A Tabela 2.4 ilustra as diferenças nos valores publicados pelo IEA, 2008 e outros autores.

Tabela 2.4 Custos estimados na produção de etanol celulósico.

| Cenário           | Custo de produção (USD LGE <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup> | Referencia            |
|-------------------|---|-----------------------|
| Otimista (2010)   | 0,8   | IEA (2008)            |
| Pessimista (2010) | 0,9   | IEA (2008)            |
| Otimista (2030)   | 0,55  | IEA (2008)            |
| Pessimista (2030) | 0,65  | IEA (2008)            |
| Otimista (2050)   | 0,55  | IEA (2008)            |
| Pessimista (2050) | 0,60  | IEA (2008)            |
| SSF <sup>a</sup>  | 0,6   | Wallace et al. (2005) |
| CB <sup>b</sup>   | 0,45  | Sendich et al. (2006) |

<sup>a</sup>Sacarificação e fermentação simultânea, <sup>b</sup> Bioprocesso consolidado, <sup>c</sup> LGE: L equivalente de gasolina com uma variação de preço entre USD 100 e 130 por barril.

Uma análise técnica econômica mais detalhada foi publicada por Kazi et al. (2010) para contextos norte-americanos. A produção de etanol de palha de milho via enzimática foi analisada em cenários prospectivos para os próximos 5 - 8 anos e com a integração a uma planta de etanol convencional. A capacidade do processo assumida foi de 2000 toneladas de palha por dia, nas seguintes unidades operacionais: manejo da matéria prima, pré-tratamento e detoxificação, hidrólise enzimática e fermentação, produção enzimática *in situ*, recuperação do produto, tratamento de efluentes, armazenamento do produto e da matéria prima e geração de vapor e energia. Os modelos de cada unidade de processo foram desenvolvidos no simulador ASPEN Plus<sup>TM</sup>.

O custo resultante de inversão para instalação da planta foi de USD 164 M, com uma produtividade de 256 L de etanol tonelada<sup>-1</sup> de biomassa e uma produção anual estimada em



170 M L etanol. Os insumos, enzimas, nutrientes (custos operacionais variáveis) contaram com 37% do total enquanto que os custos fixos (salários, manutenção e seguros) com 6%. A distribuição dos custos de investimento e de produção podem ser observados na Tabela 2.5 e na Figura 2.2. Foi considerada a produção de enzimas *in situ* devido a indisponibilidade deste insumo no mercado nas quantidades requeridas para uma planta de etanol em escala comercial.

Os maiores custos no sistema gerador de energia (turbogerador/caldeiras) e no pré-tratamento foram atribuídos à inexistência do sistema de cogeração e a necessidade de detoxificação anexa ao pré-tratamento.

Tabela 2.5 Custos estimados da matéria-prima e insumos químicos (ano base de cálculo 2007).

| Material                               | Preço (USD tonelada-1) |
|--|------------------------|
| Palha de milho                         | 83                     |
| Enzima (100 g proteína L-1)            | 507                    |
| Acido sulfúrico                        | 35                     |
| Cal hidratada                          | 99                     |
| Liquido de maceração de milho          | 226                    |
| Fosfato de amônia                      | 201                    |
| Propano                                | 374                    |
| Etapa separação (sistema de membranas) | 4990                   |
| Etapa de destilação                    | 2994                   |
| Químicos para tratamento de efluentes  | 7485                   |
| Polímero de clarificação               | 3575                   |
| Eletricidade (c kWh-1)                 | 5.4                    |

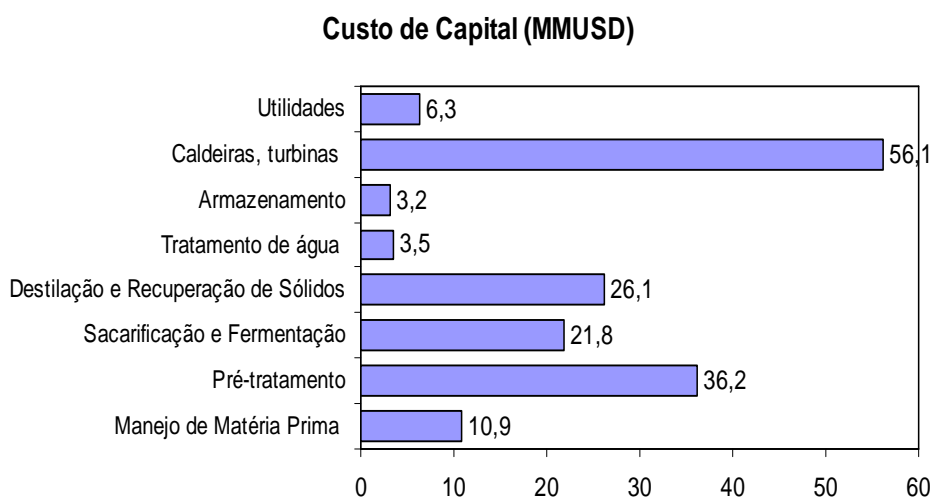


Figura 2.2 - Custos de inversão de capital. Adaptado de Kazi et al. (2010).

O preço de etanol celulósico calculado por Kazi et al. (2010) foi de USD 1,44 LEG<sup>-1</sup> no estágio atual de desenvolvimento, fornecendo um cenário mais realista. Os menores valores registrados na Tabela 2.4 se devem principalmente a projeções baseadas em cenários otimistas com o uso de processos como hidrólise e fermentação simultâneas, e fermentação de hexoses e xiloses no mesmo reator e outras vantagens tecnológicas, imaturas, no momento atual.

Finalmente, uma outra abordagem é apresentada pela Análise de Ciclo de Vida (ACV), metodologia que permite a comparação de diferentes opções para produção de etanol celulósico. Assim, Spatari et al. (2010) avaliaram o desempenho tecnológico e ambiental de algumas tecnologias de 2<sup>a</sup> geração usando indicadores do processo como rendimento de etanol e geração de eletricidade, além da quantidade de energia fóssil utilizada no sistema produtivo. Os impactos ambientais também foram computados nos simuladores Monte Carlo e Aspen Plus<sup>TM</sup> em relação às emissões dos GEE, poluentes atmosféricos (CO, NO<sub>x</sub>), gases orgânicos, óxidos de enxofre, matéria particulada e resíduos sólidos. Os resultados demonstraram a significância na seleção dos métodos de pré-tratamento, fermentação e separação do etanol. As tecnologias de melhor desempenho ambiental foram as de maior investimento inicial e de uma maior sofisticação tecnológica. A ACV permitiu também a identificação das etapas chaves em relação a emissão dos GEE e gasto de energia fóssil. A publicação conclui indicando medidas de atenuação e otimização da cadeia produtiva como o uso de biocombustíveis no sistema de transporte e distribuição e a diversificação de produtos resultantes da implementação de sistemas de biorrefinaria.

Apesar do reconhecido ganho ambiental através da substituição dos combustíveis fósseis pelo etanol de 2<sup>a</sup> geração, a quantificação nas emissões de GEE resulta em um amplo intervalo como é ilustrado na Figura 2.3.

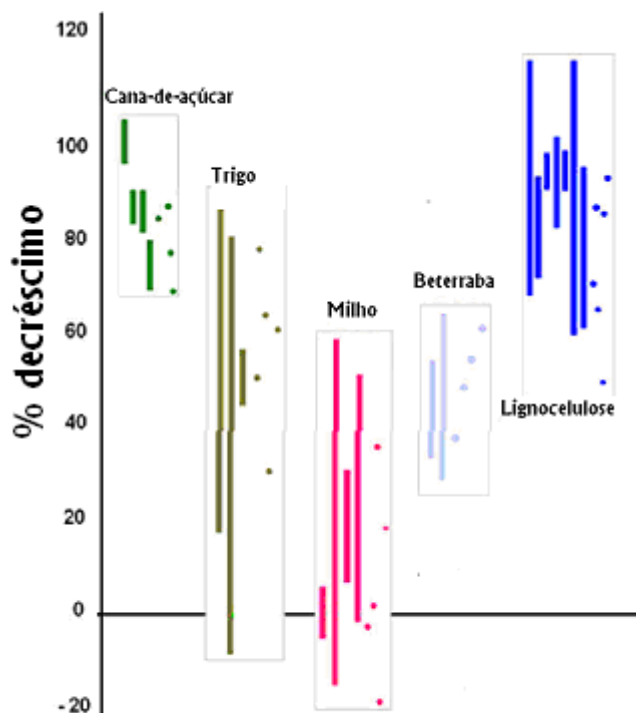


Figura 2.3 - Intervalos de redução dos GEE (em barras) ou dados específicos (pontos) relatados pelo uso de biocombustíveis (não foram considerados os impactos devido à mudança no uso da terra). Extraído de Sim et al. (2010).

Diferenças na definição de limites do sistema, localização e a necessidade de transporte e fertilização segundo a biomassa diversificam os resultados das cadeias produtivas. Aden et al. (2002) relatam que o uso do etanol derivado da palha de milho resulta em uma redução líquida de 75–150 g CO<sub>2</sub>eq km<sup>-1</sup> e o derivado do trigo em 15–110 g CO<sub>2</sub>eq km<sup>-1</sup>. Sims et al. (2010) publicaram os intervalos de redução nas emissões obtidas após mudança da gasolina mineral pelos biocombustíveis de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> geração. A Figura 2.3 mostra o resultado deste estudo.

Cabe ressaltar que todos os resultados encontrados na literatura foram produzidos com modelos de simulação desenvolvidos nos EUA e Europa, portanto aplicam informações baseadas nas plantas piloto existentes nessas realidades. Bases de dados neste sentido, também deverão ser criadas e continuamente alimentadas no Brasil para auxiliar na construção de modelos de simulação e projeção para realidades brasileiras. Um objetivo estratégico na viabilização e sustentabilidade do etanol a partir do bagaço de cana e outros materiais celulósicos é justamente a capacidade de antecipar e prever a variabilidade da produção segundo a conjuntura nacional e internacional.

Embora o caráter preliminar dos dados coletados, estes foram assumidas pelo Departamento de Energia dos EUA e pela AIE para delinear estratégias de incentivo ao uso dos biocombustíveis de 2ª geração na tentativa de diversificação da matriz energética mundial. Com isto as próximas plantas comerciais devem começar a operar nos próximos 5 anos.

Estas experiências internacionais podem ser adotadas e avaliadas no modelo de desenvolvimento brasileiro para produção de etanol celulósico. Neste sentido a realidade brasileira ostenta duas importantes vantagens competitivas as quais são a ampla disponibilidade e o baixo custo do bagaço de cana-de-açúcar, além de uma cadeia consolidada de produção de etanol de 1ª geração.

## **2.8 PROPOSTA CONCEITUAL DE INTEGRAÇÃO TECNOLÓGICA SUSTENTÁVEL**

No contexto nacional o elevado potencial de integração da rota de hidrólise enzimática no processo produtivo do etanol de 1ª geração permitirá ganhos no total de etanol produzido sem a necessidade de expansão da área plantada (ROSSELL et al., 2008; MELO, 2009). Em consideração ao processo, o arranjo tecnológico mais atraente adota a instalação de uma unidade de hidrólise anexa à operação convencional de uma destilaria de etanol, como mostra a Figura 2.4.

Essa unidade abrange as etapas de pré-tratamento do bagaço, a hidrólise enzimática e os pós-tratamentos do licor de hidrólise. O processamento continua na destilaria convencional, na qual o licor seria adicionado ao caldo de cana tratado e pré-concentrado para formar o mosto. O processo de fermentação alcoólica, destilação, retificação e desidratação do etanol e tratamento do vinhoto seriam realizados também na destilaria redimensionada para atender a produção adicional de etanol. A articulação de ambas as unidades teria como produtos finais o álcool etílico hidratado combustível (AEHC) e o álcool etílico anidro combustível (AEAC), além da bioeletricidade na qual é acoplada uma unidade de sacarificação do bagaço aproveitando ao máximo as facilidades da destilaria. A destilaria fornece as utilidades necessárias para operação da hidrólise: água de processo, de resfriamento, vapor e energia elétrica, assim como facilidades de estocagem de matéria-prima e etanol final.

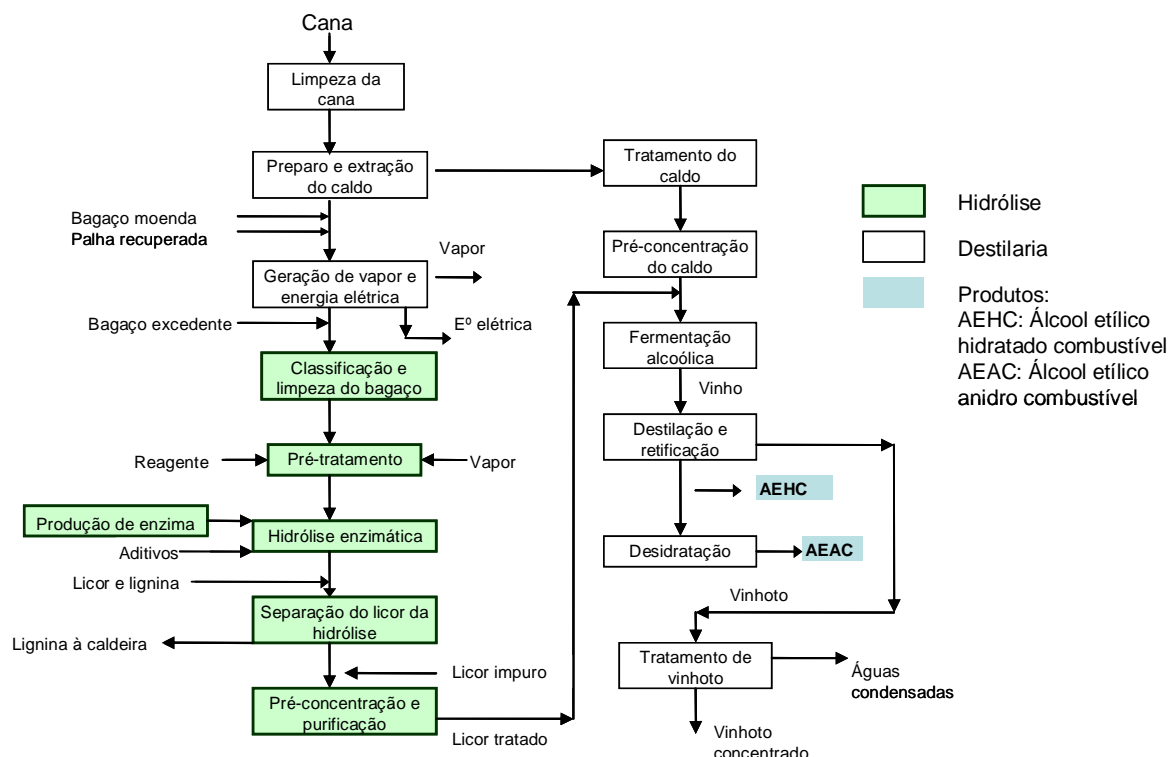


Figura 2.4 - Processo proposto de hidrólise anexa à destilaria padrão. Modificada de Rossell et al. (2008).

Rossell et al. (2008) simulou esta proposta tecnológica calculando os custos de produção em cenários com fermentação de 94% de hexoses e sem aproveitamento de pentoses. O pré-tratamento projetado foi com ácido sulfúrico diluído e a subsequente hidrólise com enzima comercial (48 h) em batelada. O custo da enzima assumido na simulação foi de USD 0,30 L<sup>-1</sup> de etanol produzido. A participação de 12% do combustível celulósico na produção total de 151 m<sup>3</sup> de etanol por dia resultou em um custo de R\$ 1,53 L<sup>-1</sup> (USD 0,85 L<sup>-1</sup> aproximadamente). Mais uma vez, ressalta a importância da produção *in situ* da enzima, visando independência tecnológica, maiores produtividades e melhor aproveitamento dos recursos da planta em vias da redução do preço do etanol celulósico.

Com relação aos principais impactos ambientais identificados no Diagrama de Fluxo (Figura 2.4) podem ser mencionados:

- A elevada captação e uso de água assim como a geração de vinhoto pobre em nutrientes na unidade de hidrólise. Entretanto, a tecnologia de digestão anaeróbia pode ser aplicada como método de tratamento e produção de biogás.
- A lignina (co-produto da separação de hidrólise) requer um tratamento adequado de queima.

- Os vapores provenientes do pré-tratamento e os efluentes líquidos com altas concentrações de químicos ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CaO}$ ) precisam também ser neutralizados e depurados.

Contudo, existem grandes incertezas quanto aos impactos ambientais na qualidade do ar, suprimento de água e efluentes líquidos, ocupação do solo e biodiversidade que merecem maior atenção e deverão ser objeto de estudo em futuras avaliações. Análises mais exaustivas neste sentido são primordiais, pois permitem identificar a utilização de recursos críticos em todo o ciclo de produção e uso do etanol celulósico. A organização desta informação e o estabelecimento dos “indicadores de sustentabilidade” para o produto, constitui a etapa seguinte no marco metodológico da Avaliação Ambiental Estratégica (AAE) (VICENTE e PARTIDÁRIO, 2006; EGLER, 2001).

No tocante à dimensão de impactos socioeconômicos, eles seriam decorrentes da adoção de uma nova tecnologia e da expansão global da produção de bioetanol. As projeções deverão considerar efeitos cumulativos incluindo maior povoamento, migração de grupos humanos, elevação de renda, introdução de serviços de infraestrutura, comércio e atividades industriais em diferentes níveis.

O objetivo desta perspectiva é assegurar que os aspectos econômicos, ambientais e sociais sejam considerados para subsidiar a tomada de decisão relacionada com a integração da produção do etanol celulósico no Brasil.

Todos estes critérios integrados de maneira sistêmica oferecem uma estrutura para integrar políticas públicas relacionadas ao crescimento sustentável da produção de bioetanol e, ao mesmo tempo, facilitar o diálogo com os atores relevantes, mesmo no presente estágio de desenvolvimento da tecnologia.

## **2.10 CONCLUSÕES**

- O advento da crescente produção de bioetanol de 1ª geração vem gerando grandes excedentes de bagaço, com potencial de serem transformados em etanol celulósico e aumentar significativamente a oferta deste biocombustível, sem necessidades da expansão da cultura e da competição por terra agricultável.
- Apesar deste potencial existem vários desafios tecnológicos e oportunidades a serem superados antes da viabilidade comercial da hidrólise enzimática. Este processo apresenta necessidades de desenvolvimento e pesquisa como i) complexos enzimáticos

específicos, otimizados e com custos competitivos; ii) redução no consumo energético na etapa de pré-tratamento; iii) seleção de microrganismos resistentes a inibição capazes de metabolizar pentoses e hexoses, iv) escalonamento efetivo em nível comercial com uma adequada recirculação de reagentes químicos e tratamento de efluentes e v) integração otimizada em um sistema industrial de produção de etanol.

- Neste sentido a inserção da tecnologia enzimática no contexto do setor sucroalcooleiro consiste na integração de uma planta produtora padrão com uma unidade de hidrólise. O processo brasileiro possui uma viabilidade econômica elevada em relação aos outros biocombustíveis de 2ª geração. As vantagens econômicas como os baixos custos da matéria-prima (bagaço de cana) e a disponibilidade da infraestrutura industrial existente serão refletidos diretamente no custo de produção e no favorecimento de um crescimento gradativo na produção de biocombustíveis.
- Como etapa prévia a comercialização é primordial a instalação de sistemas de produção em diferentes escalas visando a aquisição de bancos de dados característicos da realidade nacional que permitam, por sua vez, o diagnóstico e prognóstico dos cenários tecnológicos atuais e esperados. A estreita colaboração entre as iniciativas nacionais e as agências internacionais é também relevante na criação de um ambiente favorável ao desenvolvimento tecnológico, com o intuito do crescimento sustentável do setor energético.
- Para avaliação dos impactos esperados com a comercialização dos biocombustíveis de 2ª geração é necessário que se faça uma série de análises sobre a necessidade e a disponibilidade de recursos naturais, nível de desenvolvimento tecnológico, infraestrutura existente e necessária para atender aumentos nas demandas interna e externa, fronteiras sustentáveis de expansão da cultura de cana-de-açúcar. Toda esta informação busca o delineamento de um sistema coerente para projeção das complexas relações socioeconômicas e ambientais e delineamento do conceito de sustentabilidade aplicada aos biocombustíveis

## **REFERÊNCIAS**

ADEN A, RUTH M, IBSEN K, JECHURA J, NEEVES K, SHEEHAN J, WALLACE B: Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. NREL (National Renewable Energy Laboratory) NREL/TP-510-32438, 2002: Disponível em: <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/32438.pdf>. Acesso em: set 2010.

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. v 62, p. 6-10, 2005.

ALICEWEB. Disponível em <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> Acesso em: Fev. 2009.

AMARAL, W. A. N.; MARINHO, J. P.; TARASANTCHI, R.; BEBER, A.; GIULIANI, E. In *Sugarcane ethanol mitigation and the environment*. Zuurbier, P.; van de Vooren, J. (Eds) Wageningen Academic. 2008.

ANDREOLI C, SOUZA SP. Cana-de-acúcar: a melhor alternativa para conversão da energia solar e fóssil em etanol. *Economy and Energy*; v. 59, p.27–33, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUÍMICA FINA, BIOTECNOLOGIA E SUAS ESPECIALIDADES - FACTO ABIFINA, 2008. Disponível em: <http://www.abifina.org.br/factoNoticia.asp?cod=271>. Acesso em: set de 2010.

BALAT, M., BALAT, H., CAHIDE, O.Z. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy Science and Combustion*, v. 34, p. 551–573, 2008.

BANERJEE, S. MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; PANDEY, P. R. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefineries*, v. 4, p. 77–93, 2010.

BASTOS, V.D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. *BNDES Setorial*, v. 25, p. 5-38, 2007.

BERTONCINI, E. I. Workshop: ASPECTOS AMBIENTAIS DA CADEIA DO ETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR. Painel IV: Geração de Resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em: Agos de 2010.

BROWN RC. In: KAMM B, GRUBER PR, KAMM M (Eds). *Biomass refineries based on hybrid thermochemical/biological processing – an overview, in biorefineries, biobased industrial processes and products*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag; 2005.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO AVALIAÇÃO DA SAFRA AGRÍCOLA DE CANA-DE-AÇÚCAR - CONAB 2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso: out/2010.

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL - CTBE, 2010. Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br>>. Acesso em: jun. 2010.

CERQUEIRA LEITE, R.C.; LEAL, M.R.L.V.L.; CORTEZ, L.A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy* 34, 655–661. , 2009.

D'AGOSTO M. A.; RIBEIRO, S. K. *Renewable Sustainable Energy Rev.*, v. 13, p. 1326–1337, 2009.

DEDINI INDÚSTRIAS DE BASE. DHR Dedini Hidrólise Rápida. Disponível em: <<http://www.dedini.com.br/pt/dhr.html>>. Acesso em: ago. 2010.

DEPARTMENT OF ENERGY U.S. DEPARTMENT OF ENERGY. WASHINGTON: U.S. - DOE, 2009. Disponível em: <http://www.energy.gov>. Acesso em: mar de 2010.

DEPARTMENT OF ENERGY U.S. – DOE 2007. DOE Selects Six Cellulosic Ethanol Plants for up to 385 Million in Federal Funding. Disponível em: <http://www.energy.gov/news/4827.htm> . Acesso em set 2010.

DUAILIBI J. Ele é o falso vilão. *Revista Veja* 2008; 2008. Disponível online em: <[http://veja.abril.com.br/300408/p\\_058.shtml](http://veja.abril.com.br/300408/p_058.shtml)> Acesso em: set de 2010).



- EGLER, P.C.G. Perspectivas de uso no Brasil do processo de Avaliação Ambiental Estratégica. *Revista Parcerias Estratégicas*, v. 11, p. 177-188, 2001.
- FAAIJ, A.; LONDO, M. A roadmap for biofuels. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, p. 157-158, 2010.
- GALEMBECK, A.F.; SALES-BARBOSA C.A.; SOUSA, R.A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 571-581.
- GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4980–4991, 2010.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*, v. 808, p. 315, 2007.
- HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today *Trends in Biotechnology*. v. 24. p 549-556, 2006.
- HSU, J.H.; TAN, C.S. Separation of ethanol from aqueous solution by a method incorporating supercritical CO<sub>2</sub> with reverse osmosis. *Journal of Membrane Science*, v. 81, p.273–285, 1993.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009.. Disponível em: [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores). Acesso em: jul 2009.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - IEA, 2008. From 1st - to 2nd-generation biofuel technologies – an overview of current industry and RD&D activities. International Energy Agency, IEA/OECD, Paris. p 120. Disponível em: <http://www.iea.org/Textbase/stats/index.asp>. Acesso em: set. 2010.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY - IEA Bioenergy, 2009. Sustainable bioenergy – a reliable energy option. Report prepared for IEA Bioenergy Implementing Agreement, Disponível em: <http://www.iea.org/Textbase/stats/index.asp>. Acesso em: set. 2010.
- IOGEN MAKES IT POSSIBLE – IOGEN, 2010. Disponível em [http://www.iogen.ca/cellulose\\_ethanol/what\\_is\\_ethanol/process.html](http://www.iogen.ca/cellulose_ethanol/what_is_ethanol/process.html). Acesso em: out. 2010.
- JECHURA R. M: Incorporating Monte Carlo Analysis into techno-economic assessment of corn stover to ethanol NREL/PR-510-35313. AICHE Annual Meeting Proceedings. San Francisco, California, USA, 2003.
- KALYANI S, SMITHA B, SRIDHAR S, KRISHNAIAH A. Pervaporation separation of ethanol–water mixtures through sodium alginate membranes. *Desalination*, v. 229, p. 68–81, 2008.
- KAZI, F. K.; FORTMAN, J. A.; ANEX, R.P.; HSU, D.D. ADEN, A.; DUTTA, A. KOTHANDARAMAN, G. Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*, v. 89, p. S20-S28, 2010.
- KIM, S.; DALE, B.E. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 475–489, 2005.
- LEBER, J. Economics Improve for First Commercial Cellulosic Ethanol Plants. 16 de fevereiro do 2010. New York Times, Energy and Environment. Disponível em: <http://query.nytimes.com/search/site/search?query=jessica%20leben%20&amp;%20enzymes>. Acesso em: set. 2010.
- LI, X.-L.; DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; WU, Y.V.; SAHA, B.C. Profile of enzyme production by *Trichoderma reesei* grown on corn fiber fractions. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A*, v. 121, p. 321-334, 2005.
- LIU, S.; QURESHI, N. How microbes tolerate ethanol and butanol, *New Biotechnology*. Special issue on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 26, p. 117-121, 2009.

- LYND, L.R.; WIEMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 506–577, 2002.
- MACEDO, I., 2005. A Energia da Cana-de-Açúcar (Sugarcane's energy: twelve studies on Brazilian sugarcane agribusiness and its sustainability). UNICA (São Paulo Sugarcane Agroindustry Union). São Paulo, Brazil. Disponível em: <http://www.Portalunica.com.br/portalunica/>. Acesso em: set 2009.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A. In ZUURBIER, P. VAN DE VOOREN, J. (Eds). Sugarcane ethanol: Contribution to climate change mitigation. Wageningen Academic, Wageningen, 2008.
- MACEDO I.C., SEABRA J.E.A., da SILVA J.E.A.R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 585-597, 2008.
- MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M., SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 372-380, 2009.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. CANA-DE-AÇÚCAR E AGROENERGIA - MAPA, 2008. Disponível em <www.agricultura.gov.br> . Acesso em out. 2010.
- MEYER, A.S., ROSGAARD, L., SØRENSEN, H.R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, v. 50, p. 337–344, 2009.
- MIURA, S.; ARIMURA, T.; ITODA, N.; DWIARTI, L.; FENG, J. B.; BIN, C. H.; OKABE, M.; *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 97, p. 153, 2004.
- MOREIRA JR, VELÁZQUEZ SMSG, APOLINÁRIO SM, MELO EH, ELMADJIAN PH. CENBIO. Bioetanol para o transporte sustentável; 2008. Disponível em: <http://cenbio.iee.usp.br/download/publicacoes/bestagrener18jun2008.pdf> Acesso em: Feb. de 2010.
- MORES, W. D.; KNUTSEN, J. S.; DAVIS, R. H. Cellulase recovery via membrane filtration. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 91-93, pp. 297-309, 2001.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.96, p.673–686, 2005.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, v. 93, p. 1-10, 2004.
- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Review. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 817–830, 2010.
- OLIVÉRIO, J. L.; SOARES, P. A. Produção de álcool a partir do bagaço: o processo DHR –Dedini Hidrólise Rápida. Piracicaba: Dedini S/A Indústrias de Base, 2007. Disponível em: <<http://www.iea.usp.br/iea/online/midiateca/etanolcelulosicosoares.pdf>>. Acesso em: out. 2010.
- OMETTO, A. R.; ROMA, W. N. L. Atmospheric impacts of the life cycle emissions of fuel ethanol in Brazil: based on chemical exergy. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, p. 71-76, 2010.
- OPENPR, J. Worldwide cellulosic ethanol production in 2020 at least 16.5 billion gallons; 2010 Disponível em: <http://www.openpr.com/news/39944/Worldwide-cellulosic-ethanol-production-in-2020-at-least-16-5-billion-gallons.html>. Acesso em: Feb 2010.
- ORELLANA C, BONALUME NETO R. Brazil and Japan give fuel to ethanol market. *Nature Biotechnology*, v.24, p.232, 2006;

OXITENO apresenta projeto ao BNDES para construir biorrefinaria; quer obter etanol a baixo custo para fabricar produtos químicos. Inovação Unicamp – Boletim dedicado à inovação tecnológica, São Paulo, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/report/news-oxiteno060807.shtml>>. Acesso em: out. 2010.

PACHECO, M. U.S. Senate Full Committee Hearing—Renewable Fuel Standards (National Renewable Energy Laboratory, National Bioenergy Center, 19 June 2006); Disponível em: [http://energy.senate.gov/public/index.cfm?IsPrint=true&FuseAction=Hearings.Testimony&Hearing\\_ID=1565&Witness\\_ID=4427Oncorn ethanol](http://energy.senate.gov/public/index.cfm?IsPrint=true&FuseAction=Hearings.Testimony&Hearing_ID=1565&Witness_ID=4427Oncorn ethanol)>. Acesso em: set de 2008.

PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA 2006-2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, 2005, 120 p.

RAMJEAWON, T. Life cycle assessment of electricity generation from bagasse in Mauritius. *Journal of Cleaner Production*, v. 16, p. 1727–1734, 2008.

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. Vantagens do uso do Palhão para queima e produção de vapor. *Visão Agrícola*, v.8, p. 66-69, 2008.

ROSSELL, C.E.V.; MANTELATTO, P. E.; AGNELLI, J. A. M.; NASCIMENTO, J. Technology for Integrated Production of Poly(3-hydroxybutyrate), Sugar, and Ethanol. In KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. *Biorefineries – Industrial Processes and Products*. John Wiley & Sons, Ltd. 2008.

RUIZ, E., CARA, C., MANZANARES, P., BALLESTEROS, M., CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 42, p. 160–166, 2008.

SASSNER P, GALBE M, ZACCHI G: Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy*, v. 32, p. 422-430, 2008.

SEABRA, J.E.A.; TAO, L.; CHUM, H.L.; MACEDO, I.C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulose ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, p. 1065-1078, 2010.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R.A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T. H. Use of US croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land use change. *Science*, v. 319, p. 1238–1240, 2008.

SPATARI, S.; BAGLEY, D.M.; MACLEAN, H.L. Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies, *Bioresource Technology*, v. 101, p.654-667, 2010.

SIMS, R.E.H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, v.101, p. 1570-1580, 2010.

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

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

SOLOMON, B.D.; BARNES, J.R.; HALVORSEN, K.E. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. *Biomass Bioenergy*; v. 31:p. 416–425, 2007.

TABAK J. *Biofuels*. New York: Facts on File. Infobase Publishing; p. 204, 2009.

- THE ROYAL SOCIETY. SUSTAINABLE BIOFUELS: PROSPECTS AND CHALLENGES. London - THE ROYAL SOCIETY, 2008. Disponível em: <http://royalsociety.org/displaypagedoc.asp?id=428914>; 2008. Acesso em set 2010..
- UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO (ÚNICA, 2009). Disponível em <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: set de 2010.
- UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA - Udop, 2010. Disponível em <<http://www.udop.com.br/index.php?item=alcool>>. Acesso em: set de 2010.
- VICENTE, G.; PARTIDÁRIO, M.R. SEA – enhancing communication for better environmental decisions. *Environmental Impact Assessment Review*, v. 26, p. 696-706, 2006.
- WALTZ, E. Cellulosic ethanol booms despite unproven business models. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 1, 2008.
- WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 93, p. 121-124, 2005.
- WOODS, J.; BAUEN, A. Technology status review and carbon abatement potential of renewable transport fuels in the UK” (United Kingdom Department of Transport and Industry Report B/U2/00785/REP URN 03/982). Disponível em: <[www.dti.gov.uk/files/file15003.pdf](http://www.dti.gov.uk/files/file15003.pdf)>. Acesso em: set. 2008.
- YOMANO, L P.; YORK, S W.; INGRAM, L O. T1- Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 132-138, 1999.
- ZHUANG, J.; MARCHANT, M.A; NOKES, S. E. STROBEL, H J. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*, v. 23, p. 679-687, 2007.

## **Capítulo 3. Adaptação e Caracterização do Bagaço de cana-de-açúcar para Produção de Celulases**

---

### **3.1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos vem se observando no mundo um grande interesse pela utilização de resíduos agrícolas na obtenção de combustíveis renováveis, tais como o etanol celulósico. No Brasil, apesar da grande produção do etanol a partir da sacarose de cana-de-açúcar, a produção de álcool derivada de lignocelulose se apresenta como uma alternativa viável e sustentável em contextos de iminente crise energética (ALVIRA et al., 2010; CARDONA et al., 2010).

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar (BC) como fonte de carboidratos para a produção de etanol vem sendo amplamente estudada. Apesar do seu privilegiado potencial para produção de energia renovável, o BC apresenta características de recalcitrância ao ataque de agentes químicos e biológicos devido a sua composição constituída por uma complexa mistura de carboidratos poliméricos e lignina (ICIDCA, 1990; ARIN e DEMIRBRAS, 2004; NIGAM e SINGH, 2010).

Em geral, a produção de etanol a partir da biomassa vegetal consiste nas seguintes etapas: hidrólise de celulose e hemicelulose para produção de açúcares, fermentação dos mesmos, separação de lignina residual e, finalmente a recuperação e purificação de etanol produzido. Entretanto, a etapa de hidrólise visando à obtenção de monossacarídeos apresenta ainda dificuldades tecnológicas devido a fatores físico-químicos do processo e fatores estruturais da biomassa que prejudicam a digestibilidade da celulose (MOSIER et al., 2005).

Pode-se mencionar neste sentido a persistente barreira ao ataque hidrolítico constituída pelas interações química entre a celulose e hemicelulose e a íntima associação covalente entre a lignina e a hemicelulose. Além disso, a natureza cristalina da celulose representa uma limitação adicional para a hidrólise (CARDONA et al, 2010).

Com isto, uma etapa de pré-tratamento é necessária visando o aumento de susceptibilidade da biomassa vegetal através da remoção de lignina e hemicelulose, redução do caráter cristalino da celulose e o incremento da porosidade do material (KELLER et al., 2003, MOSIER et al., 2005; HENDRIX e ZEEMAN, 2009).

Neste sentido as pesquisas atuais visam a identificação e desenvolvimento de processos de pré-tratamento que garantam a eficiência nas etapas subseqüentes da conversão. No caso da hidrólise enzimática, são desejáveis biomassas pré-tratadas com baixos requerimentos de carga enzimática e melhores taxas cinéticas para a obtenção de açúcares fermentescíveis (LAUREANO-PEREZ et al., 2005; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009, ALVIRA et al., 2010).

Outra dificuldade tecnológica chave na produção do etanol de 2<sup>da</sup> geração é o elevado custo de produção de enzimas celulases, processo produtivo que é foco de pesquisa de diversas frentes tanto acadêmicas quanto industriais. Neste sentido, tem se apresentado como propostas de desenvolvimento e redução de custos, a seleção de matérias primas de ampla disponibilidade e o uso de tecnologias alternativas de fermentação (ZHUANG et al., 2007; CARDONA et al., 2010).

Assim, a fermentação em estado sólido (FES) através do uso do BC como substrato microbiano para síntese de celulases representa um importante decréscimo nos custos de produção, além das vantagens associadas com a elevada especificidade do complexo enzimático final. Neste caso, a etapa de pré-tratamento também é necessária e relevante, pois se pretende acondicionar um material lignocelulósico facilitando seu uso como fonte de carbono e energia na síntese microbiana das enzimas hidrolíticas (BERLIN, et al, 2007).

Existe uma grande variedade de pré-tratamentos a serem aplicados no BC. Entre as tecnologias mais difundidas pode-se mencionar: pré-tratamentos hidrotérmicos e por explosão a vapor, assim como pré-tratamentos baseados na adição de soluções ácidas, alcalinas, oxidantes e com solventes orgânicos cujos efeitos podem ser potencializados quando executados a elevadas temperaturas.

Todas estas tecnologias são aplicadas a uma ampla variedade de materiais lignocelulósicos com diferentes resultados, no entanto, as características desejáveis de um material pré-tratado são: a elevada disponibilidade de fibras reativas, hidrolisados hemicelulósicos não degradados e baixa concentração de compostos inibitórios para os microorganismos fermentativos (MOSIER et al., 2005; HENDRIX e ZEEMAN, 2009; CARDONA et al., 2010).

Em geral, se sabe que uma efetiva conversão dos carboidratos componentes da biomassa em açúcares para fermentação microbiana depende de dois fatores chave: as características químicas e estruturais do substrato antes e após processos de pré-tratamento e sua influência sobre os mecanismos de atuação enzimática (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000;

ZHANG e LYND, 2004; ALVIRA et al.; 2010). Dentre as principais propriedades da celulose que determinam a acessibilidade das enzimas pode-se mencionar: seu grau de polimerização e índice de cristalinidade, a composição e disposição da lignina e da hemicelulose, assim como a área superficial e o volume de poro do substrato a ser hidrolisado (ZHANG e LYND, 2004, HENDRIX e ZEEMAN, 2009; CARDONA et al., 2010).

Neste contexto, o presente capítulo objetiva a avaliação e comparação dos pré-tratamentos físico-químicos ácido, alcalino, combinado (ácido/básico) e hidrotérmico no BC através do monitoramento das mudanças na composição, estrutura e morfologia resultantes. Mais ainda, o material pré-tratado será aplicado na FES como substrato para o crescimento do *Aspergillus niger* e síntese de celulases. Adicionalmente, a caracterização realizada nos substratos pré-tratados permitirá um maior esclarecimento dos fatores e características relevantes no BC com influencia direta no desenvolvimento do *A. niger* e a indução enzimática de celulases.

## **3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.2.1 Composição Lignocelulósica – Bagaço de cana-de-açúcar (BC)**

As biomassas lignocelulósicas abrangem vários resíduos agrícolas tais como palhas, cascas, caules, pedúnculos, madeiras de coníferas e folhosas, resíduos de indústrias de polpa e papel, e colheitas herbáceas. Estes são acumulados na natureza representando por sua vez um grande passivo ambiental e uma fonte potencial de produtos biotecnológicos de elevado valor agregado (PITARELO, 2007; RAMOS, 2003; NIGAM e SINGH, 2010).

O grande aumento do interesse no aproveitamento integral dos resíduos lignocelulósicos tem se focado entre outros no BC, pois é um resíduo representativo da consolidada indústria de bioetanol brasileira. Produzido na proporção de 280 kg t<sup>-1</sup> de cana, o bagaço é oriundo da moagem da cana de açúcar e é composto por fibras e resíduos de caldo açucarado (CTC, 2010).

Embora o bagaço possa ser utilizado para a geração de energia ou como suplemento para alimentação animal, ainda há um grande excedente que pode ser aproveitado para produção de diversos bens da sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria prima são a produção de etanol, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, alcalóides e enzimas (CUNHA et al., 2005, PANDEY et al., 2000; SILVA et al., 2009).

Considerando o elevado teor de carboidratos presentes no BC, seu processamento biotecnológico é uma alternativa atrativa em contextos de biorrefinarias celulósicas, visando à produção associada à usinas sucroalcooleiras e integrando outros resíduos da cadeia produtiva, de modo a agregar valor a mesma (CUNHA et al., 2005; DIAS et al., 2009).

O BC apresenta-se na forma de fragmentos fibrosos e floculosos de natureza heterogênea, a granulometria depende do trabalho de moagem e da variedade da cana. Após processamento na usina, o BC residual é constituído por cerca de 50% de umidade, 45% de estruturas fibrilares (fibra e medula) e 5% de extrativos e componentes inorgânicos (ICIDCA, 1990).

No interior do colmo é exibida uma organização estrutural composta por tecido parenquimatoso, cuja função é armazenar o suco açucarado e vasos fibro-vasculares internos, cuja função é sustentar e conduzir alimentos e produtos elaborados ao longo das folhas da planta. Na moagem da cana, este ordenamento estrutural é perdido, confundido as diferentes partículas produzidas (ICIDCA, 1990).

A composição química do BC apresenta algumas diferenças em função da variedade de cana empregada e da localização dos cultivos, mas em geral sua estrutura é baseada em três polímeros: celulose  $(C_6H_{10}O_5)_x$ , hemiceluloses  $(C_5H_8O_4)_m$  como a xilana e lignina  $[C_9H_{10}O_3.(OCH_3)_{0,9-1,7}]$  (ARIN e DEMIRBAS, 2004). As microfibrilas de celulose representadas na Figura 3.1 fornecem força à parede celular e são o principal componente químico constituindo de 41-44% em massa seca do BC.

A celulose é um homopolissacarídeo linear, formada por unidades do monossacarídeo  $\beta$ -D-glicose (Figura 3.2) ligadas por enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$ . A anidroglicose é formada pela remoção de água de cada glicose e polimerizada formando longas cadeias de celulose que contem 5000–10,000 unidades. Pontes de hidrogênio intra e intermoleculares são formadas entre as longas cadeias de celulose originando microfibrilas cristalinas insolúveis em água (FENGEL e WEGENER, 1989). A unidade estrutural do polímero de celulose é chamada de celobiose e consiste em duas moléculas de anidroglicose (Figura 3.2).



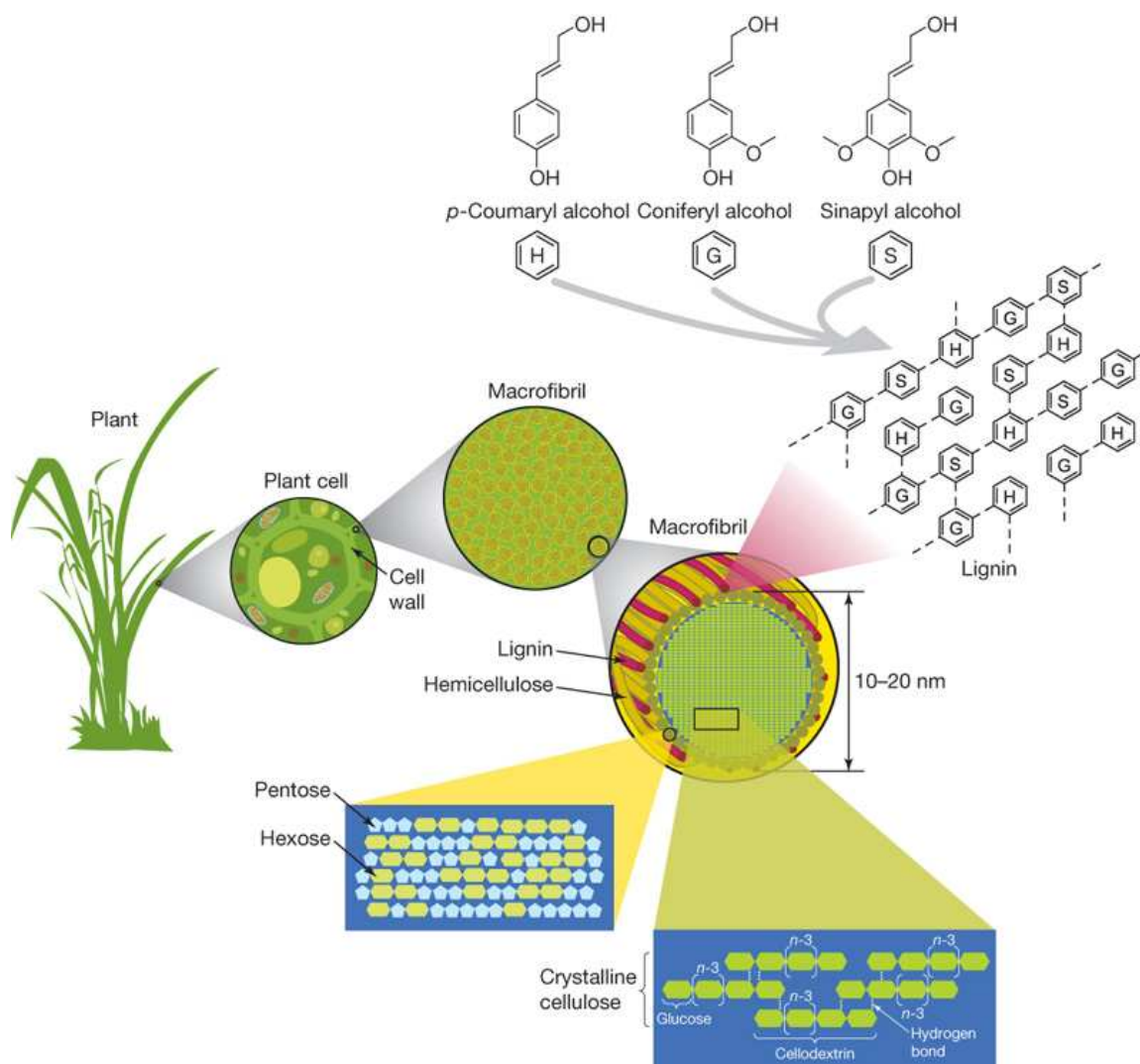


Figura 3.1 - Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Adaptado de Rubin (2008).

O segundo maior constituinte químico são as poliose ou hemicelulose que representam 25—27% da massa do bagaço seco. Em relação à celulose, as poliose não estão compostas por uma única substancia, mas sim por uma mistura de polissacarídeos ramificados de baixa massa molecular, os quais estão associados com a celulose e a lignina. As unidades de açúcares que formam as poliose são mostradas na Figura 3.3 e podem ser subdivididas em grupos tais como: pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses, sendo a xilose a pentose predominante. (FENGEL e WEGENER, 1989). A Tabela 3.1 mostra algumas diferenças entre a celulose e as poliose.

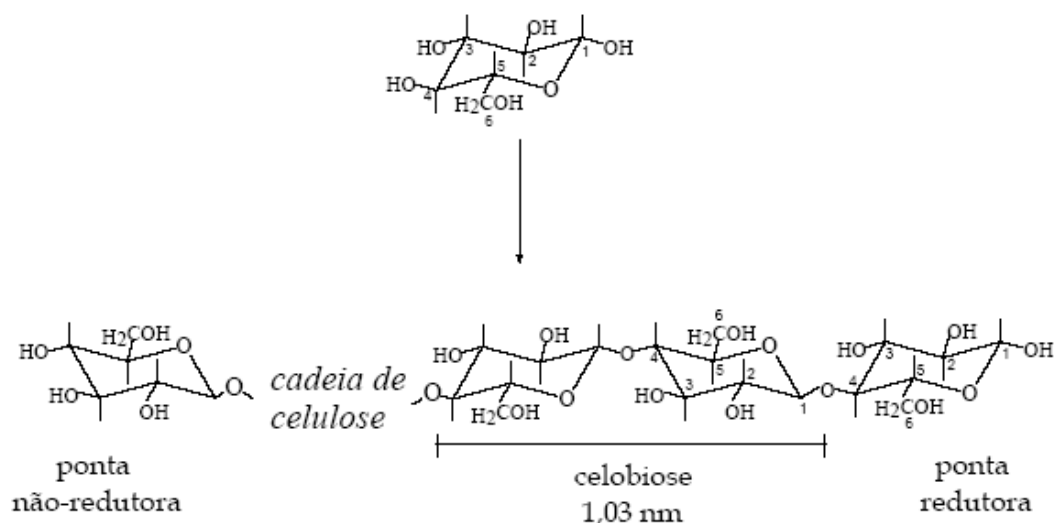


Figura 3.2 – Representação da molécula de celulose. Adaptado de Ramos (2003).

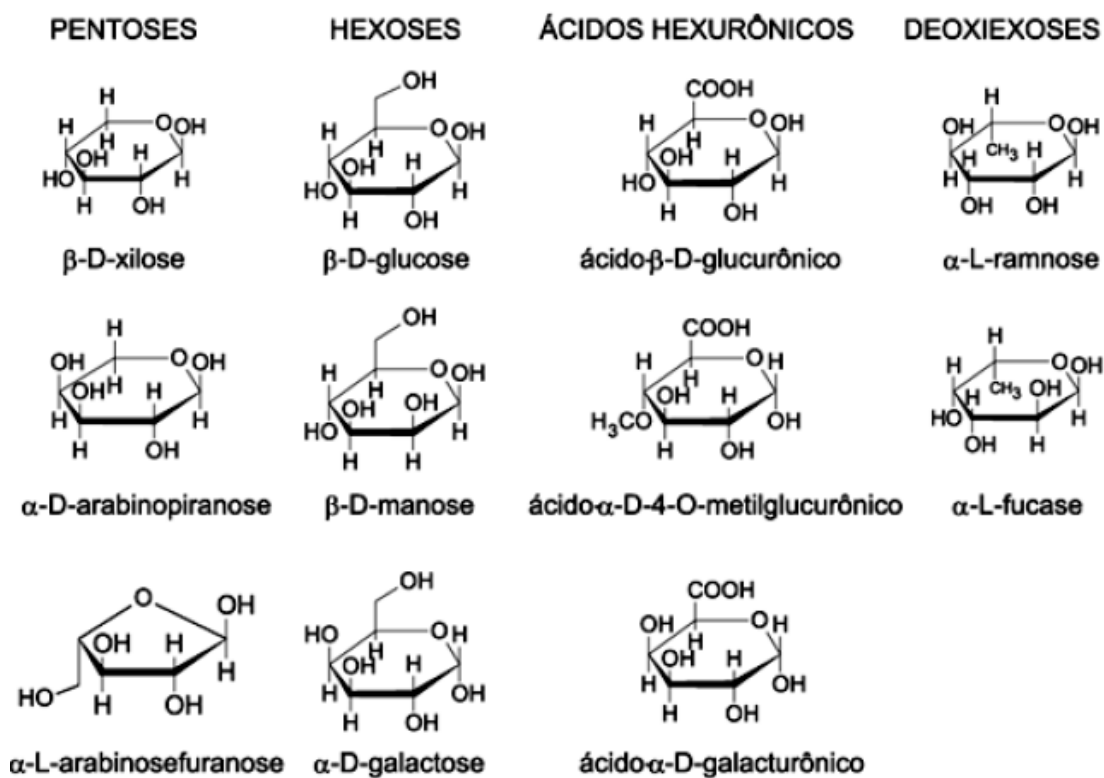


Figura 3.3 - Monossacarídeos constituintes das polioeses. Adaptado de Pitarello (2007).

A lignina é uma macromolécula ramificada e amorfa, sua estrutura é bastante heterogênea formando uma rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aryl-éter. As unidades monoméricas precursoras da lignina são: os álcoois trans-cumarílico, trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico, cuja representação química pode ser observada na Figura 3.4 (FENGEL e WEGENER, 1989).

Tabela 3.1 Diferenças entre celulose e polioses

| <b>Celulose</b>  | <b>Hemicelulose</b>                                       |
|--|---|
| <b>Unidades de glicose ligadas entre si.</b>                   | Unidades variadas de açúcares                             |
| <b>Grau de polimerização elevado</b>                           | Grau de polimerização baixo                               |
| <b>Forma de arranjo fibroso</b>                                | Não forma arranjo fibroso                                 |
| <b>Forma regiões amorfas e cristalinas</b>                     | Forma somente regiões amorfas                             |
| <b>É atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente</b> | É atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente. |

A lignina se encontra fortemente ligada à hemicelulose e às fibras de celulose, o complexo lignocelulósico assim formado é resistente e recalcitrante à conversão por agentes químicos e microbianos. O conteúdo de lignina no BC varia de 20-22%. Sua degradação é causada principalmente pela hidrólise das ligações tipo  $\beta$ -aril-éter, que são as mais abundantes, formando unidades modificadas de lignina. No entanto, ocorrem também reações de condensação de fragmentos da lignina formando moléculas de peso molecular mais alto (SUN et al., 2004).

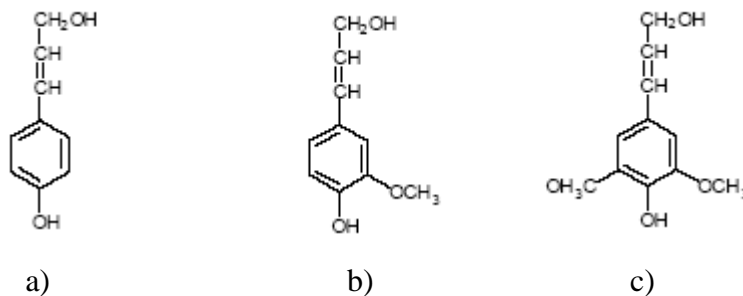


Figura 3.4 - Monómeros precursores da lignina (a) álcool trans-para-cumárico, (b) álcool trans-coneferílico e (c) álcool trans-sinapílico. Adaptado de Whetten e Sederoff (1995).

Os materiais lignocelulósicos contêm também uma extensa variedade de grupos químicos orgânicos de baixa massa molar *e.g.* extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. A composição inorgânica do BC está principalmente constituída pelas cinzas representadas pelos sais e óxidos de potássio, cálcio e magnésio seguidos de manganês e sódio (YU et al., 2008).

### 3.2.2 Parâmetros de caracterização da biomassa lignocelulósica

As tecnologias de processamento para a transformação da biomassa vegetal em biocombustíveis e commodities químicas dependem de uma série de características químicas e

estruturais inerentes aos materiais lignocelulósicos. Assim, entre os principais parâmetros de avaliação da celulose podem se mencionar: o grau de polimerização, o índice de cristalinidade, área superficial, a composição e disposição da lignina e a hemicelulose. O conhecimento destes e sua correlação com os rendimentos operacionais são de extrema importância no entendimento dos mecanismos de bioconversão (ZHANG e LYND, 2004; KUMAR et al., 2009).

A seguir é apresentada uma breve descrição dos principais fatores relevantes em bioprocessos de transformação.

### **3.2.2.1. Índice de cristalinidade**

A estrutura supramolecular da celulose apresenta regiões altamente ordenadas (cristalinas), estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas, onde as cadeias mostram uma orientação randomizada (amorfas) (FAN et al., 1987).

A proporção da parte cristalina com respeito à amorfa depende da origem e do processo de obtenção da celulose, e é normalmente definido como índice de cristalinidade (IC%), que quantifica a porcentagem da celulose cristalina no material. Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à processos de conversão, representando portanto, um indicador da reatividade da celulose.

A celulose nativa cristalina I é constituída por duas fases morfológicas: celulose I $\alpha$ , dominante na estrutura das bactérias e algas e a celulose I $\beta$ , dominante nas plantas superiores. A celulose nativa I pode ser convertida a outras formas cristalinas (II-IV) por vários tratamentos, as diferenças na sua estrutura supramolecular são baseadas no arranjo de ligações de hidrogênio, resultando em agregados com diferente estabilidade química e com diferentes propriedades físico-mecânicas (AKERHOLM et al., 2004).

No entanto, a interpretação do IC% e seu impacto nos processos de transformação devem ser realizados com cautela. Por exemplo, vários tratamentos que diminuem o IC% aumentam também a área superficial incrementando com isto taxas de hidrólises, no entanto, nestes casos o sucesso da hidrólise foi relacionada em maior grau com à efetiva adsorção da enzima no substrato que com a presença e concentração da celulose amorfa (ZHANG e LYND 2004).

### 3.2.2.2. Grau de polimerização

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através do grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de anidroglicose (AnGlc) que forma a cadeia de polissacarídeos. Este valor aumenta com a quantidade de ligações H intermoleculares e está inversamente relacionado com a solubilidade da celulose. As celodextrinas de GP de 2-6 são solúveis em água enquanto glucanos de GP ao redor de 30 apresentam as propriedades da celulose polimérica (FENGEL e WENEGER, 1989). Em plantas superiores, o GP da celulose nativa varia de 10000 a 15000 unidades de AnGlc. No entanto, todos os processos industriais que envolvem o isolamento da celulose geram uma diminuição de uma a duas ordens de grandeza nestes valores. Por exemplo, nos tratamentos alcalinos, o GP da celulose decresce até a faixa de 1000 a 1300 unidades de AnGlc, enquanto que nos processos de hidrólise ácida, a queda no GP atinge valores de 250 a 300 unidades de (FAN et al, 1987; FENGEL e WENEGER, 1989).

O IC% e o GP da celulose têm sido apontados como características interagentes e relevantes no sucesso da hidrólise enzimática (HIMMEL et al., 2007; MOSSIER et al, 2005).

### 3.2.2.3. Acessibilidade e área superficial

Num material celulósico fragmentado, as partículas apresentam uma área superficial externa e outra interna. Em geral, a área superficial interna da celulose é maior em 1-2 ordens de grandeza que a área externa. Assim, também a redução no tamanho de partícula leva a um incremento na área superficial específica e com isto, a acessibilidade da celulose (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

Pesquisas objetivando a hidrólise enzimática da celulose estabeleceram a adsorção das celulases na superfície das partículas como processo inicial e determinante para um efetivo ataque enzimático. Além disso, a geometria e a morfologia de partícula determinam também a acessibilidade dos enlaces  $\beta$ -glicosídicos para hidrólise. A acessibilidade da celulose é geralmente medida indiretamente pela adsorção de nitrogênio, argônio ou vapor de água, ou mediante mudanças dimensionais ou de massa após submersão em água ou líquidos orgânicos e suas unidades são relatadas em termos de  $m^2 g^{-1}$  (ZHANG e LYND, 2004).

### 3.2.2.4 Conteúdo e distribuição de lignina e hemicelulose

A presença de lignina e hemicelulose ou seus fragmentos dificultam o processamento da celulose. A lignina atua como uma barreira física natural e no contexto de hidrólise

enzimática pode formar complexos de elevada estabilidade com as enzimas. Os pré-tratamentos para remoção da lignina dependem do material, mas seus efeitos podem ser revertidos em função dos parâmetros usados existindo a possibilidade de relocação e deposição de frações químicas formadas (LAUREANO-PEREZ, et al., 2005).

A remoção de hemicelulose incrementa o tamanho dos poros no substrato e, portanto, a acessibilidade para a celulose. O grau de acetilação na hemicelulose é um fator importante pois, os radicais acetila são os protagonistas na formação de complexos resistentes constituídos por hemicelulose-lignina (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

### **3.2.3. Técnicas espectroscópicas e de imagens para caracterização da biomassa**

A caracterização das propriedades estruturais e morfológicas da biomassa vegetal é essencial para definir condições operacionais precisas e adequadas especialmente em processos de elevada heterogeneidade e grandes volumes na matéria prima (FARINAS et al., 2010).

Um dos principais fatores que determinam o processamento da biomassa é a sua composição química a qual, é variável dependendo da genética da planta, das condições ambientais no crescimento e dos métodos de colheita e armazenamento. Os resíduos industriais provenientes de outros processos produtivos como o BC introduzem uma variabilidade ainda maior, pois suas propriedades são resultado das operações precedentes (HAMES et al., 2003).

Atualmente, a caracterização da biomassa pode ser feita através de diversos métodos químicos em via úmida e via seca, destrutivos e não destrutivos. Os métodos não destrutivos são de grande interesse em razão das mínimas necessidades no preparo da amostra sem a ocorrência de degradação química do material, preservando suas propriedades. Além disso, os métodos químicos podem ser demorados e caros, inviabilizando sua aplicação no monitoramento em tempo real (FARINAS et al., 2010).

Existe uma grande necessidade para o desenvolvimento de métodos rápidos e precisos de caracterização de materiais naturalmente heterogêneos como lignocelulose. Sendo assim, as técnicas espectroscópicas representam uma possibilidade de análise eficiente, possibilitando informações sobre a composição, as suas propriedades moleculares e estruturais dos materiais vegetais.

Estes métodos são baseados na interação da radiação eletromagnética com as substâncias químicas. A natureza desta interação depende das propriedades de cada substância. As frequências nas quais a radiação é absorvida ou emitida são únicas para cada molécula, e fornecem elementos cognoscitivos acerca das características inerentes a cada substância.

Várias técnicas espectroscópicas têm sido amplamente aplicadas nas pesquisas com materiais, tais como Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Infravermelho próximo (NIR) e fluorescência (MARTIN-NETO et al., 2007).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em estado sólido permite o monitoramento dos núcleos do isótopo  $^{13}\text{C}$  e com isto a determinação indireta da concentração de compostos aromáticos e alifáticos nas amostras. Os resultados desta técnica fornecem informações sobre grupos funcionais como alquil, metoxílicos, fenólicos e carboxílicos, entre outros, que podem ser correlacionados com alguns componentes da biomassa como ligninas e carboidratos (STEVENSON, 1994; PRESTON, 1996).

Uma outra aplicação da técnica foi demonstrada por Atalla e Vanderhart (1999) quando calcularam o IC% e as diferentes formas cristalinas da celulose.

A espectroscopia na região espectral do infravermelho (IR) possibilita a identificação de vários tipos de ligações químicas e estruturas existentes numa molécula (STEVENSON, 1994). Entre as diversas funções químicas presentes nos materiais celulósicos que podem ser caracterizadas por IR podem ser citadas: radicais hidroxila-OH, radicais metila CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> estruturas C=O de carbonilas e carboxilas, ligações-C= presente em estruturas aromáticas, -COO- de acetatos, entre outros.

A técnica representa um método acessível e de interpretação simples quando são analisados compostos de relativa pureza. Contudo, matrizes complexas como a lignocelulose resultam em espectros sem picos bem definidos devido aos abundantes modos vibracionais presentes. A sua interpretação precisa de técnicas de análises matemáticas e a correlação com outros métodos analíticos. Na atualidade, a espectroscopia de IR é usada também na diferenciação de microfibrilas de celulose quanto à sua origem e tipo de polimorfismo cristalino (ATALLA E VANDERHART, 1999).

Alguns trabalhos também têm sido desenvolvidos utilizando a técnica de espectroscopia de IR próximo (NIR das siglas em inglês Near Infrared spectroscopy) em combinação com

métodos estatísticos de análise multivariada. A calibração adequada com o uso de padrões de composição conhecida permite analisar grande quantidade de amostras com baixo custo (TUCKER et al., 2001). Por outro lado polimorfismos da celulose podem também ser observados através da espectroscopia de difração de raios-X (DRX). O grau de cristalinidade relativa da celulose é determinado por esta técnica de forma rápida sem a necessidade de padrões. Nos materiais celulósicos esta análise é uma das mais utilizadas para comparar sua natureza e reatividade. A razão relativa entre as intensidades dos picos correspondentes à região cristalina e à região amorfa define o grau de cristalinidade (IC%) (KRASSIG, 1993).

Contudo, os métodos espectroscópicos podem ser aplicados tanto para amostras brutas em estado sólido quanto para amostras extraídas em estado líquido.

Neste sentido, a determinação de grupos fenólicos e estruturas aromáticas da lignina extraída em solução ácida pode ser feita também através das espectroscopias de absorção e/ou emissão de fluorescência na região ultravioleta/visível (UV/vis). Estas soluções podem ser mensuradas mediante a absorção à 205 nm conforme descrito por Zakis (1994). A Fluorescência de UV/vis (ou fotoluminescência) foi usada também por Castellan et al. (1996) na diferenciação de derivados da lignina em diferentes solventes. Eles detectaram os vários tipos de cromóforos presentes e suas interações com os solventes utilizados.

De forma complementar, o uso e desenvolvimento de ferramentas de imagens se fazem imprescindíveis dado que ainda não se tem atingido um entendimento completo acerca da estrutura e fisiologia molecular da célula vegetal (DOE, 2006).

A organização estrutural da biomassa exhibe arranjo tridimensional, além do mais, os fenômenos envolvidos na sua construção, maturação e desconstrução apresentam escala nanométrica (0,5nm - 50µm), por tanto, para seu esclarecimento são necessários artefatos capazes de atingir inspeções nestes níveis de medida. Pode-se citar neste sentido, tecnologias de imagens como tomografia de RMN, raios X, assim como as microscopias ótica, eletrônica de varredura e de tunelamento. Algumas delas são descritas a continuação.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido a base tradicional na pesquisa biológica. Os novos desenvolvimentos na técnica estão voltados na conservação de umidade natural das amostras, parâmetro crítico na avaliação morfológica.

A microscopia eletrônica de tunelamento (MET) hoje é a técnica de liderança na pesquisa biológica-estrutural com alta resolução. No entanto, esta técnica precisa de alguns



requisitos durante a sua operação como observações em ambientes ao vácuo e livres de contaminação, além de portamostras criogênicos, encarecendo a sua aplicação.

A microscopia de força atômica (MFA) fornece informações acerca das mudanças na superfície das amostras utilizando um dispositivo de contato de tamanho micrométrico. A grande vantagem da técnica é a possibilidade de operar em ambientes líquidos. Imagens com alta resolução podem ser usadas como suporte na interpretação dos efeitos de pré-tratamentos e de hidrólise enzimática na estrutura superficial da celulose (DOE, 2006).

Concluindo, a obtenção da caracterização precisa e detalhada da biomassa utilizando métodos econômicos e rápidos descritos anteriormente é uma peça chave na viabilidade dos processos de segunda geração.

### **3.2.4 Tecnologias de pré-tratamento para lignocelulose**

O principal objetivo da etapa de pré-tratamento é alterar a composição, quebrar a matriz lignocelulósica e com isto, retirar impedimentos estruturais visando a efetividade das etapas seguintes de conversão. Os processos de separação e aproveitamento de componentes nos materiais lignocelulósicos incluem várias técnicas de pré-tratamento, abrangendo processos físicos, químicos, mecânicos e biológicos e sua combinação (SUN e CHENG, 2002; MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). A praticabilidade econômica das alternativas depende da capacidade de se estabelecer uma estratégia para a transformação da fração derivada da biomassa em produtos rentáveis (SUN et al., 2004).

Por outro lado, a eficiência técnica do pré-tratamento deve ser medida em termos de rendimento, seletividade e funcionalidade, simplicidade operacional e segurança na higiene industrial e ambiental. Esta etapa influencia fortemente o custo do processo global, pois determina a composição, os rendimentos e a toxicidade finais. A configuração tecnológica a ser adotada depende também das variáveis de saída do pré-tratamento, além dos requerimentos de insumos ao longo da bioconversão (BAUDEL, 2006).

A Tabela 3.2 mostra alguns dos tratamentos de maior aplicação no BC, com suas respectivas condições operacionais e em alguns casos os rendimentos em açúcares. Altas taxas de sacarificação são registradas nos pré-tratamentos ácidos. A abundância de informação nos pré-tratamentos alcalinos e a deslignificação é derivada do conhecimento acumulado pela indústria de papel e celulose.

Tabela 3.2 Pré-tratamentos implementados para o BC.

| <b>Pré-tratamento</b>                           | <b>Agente</b>  | <b>Condições</b>  | <b>Observações</b>  | <b>Referencias</b>  |
|---|--|---|---|---|
| <b>Acido diluído</b>                            | HCl  | Concentração de ácido (1,2% v/v). 121°C, P: 1,1 kg cm <sup>-2</sup> , t: 4h<br>Concentração de ácido (2,5% v/v) mL de solução de ácido/g de bagaço. T 140°C, t:30min. | 30% da massa inicial foi convertida em açúcares redutores | Hernández-Salas et al. (2009).<br>Chandra et al. (2007).      |
|   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                         | Concentração de ácido (1,25% m/m) T 121°C, t:2 h, % sólidos: 10% (w/w).<br>Concentração de ácido (0,5 %) T 121°C, t:1h, P: 1,5 kg cm <sup>-2</sup> .                  |   | Cheng et al. (2008).<br>Vargas Betancur e Pereira Jr. (2010). |
|   | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                         | Concentração de ácido (4 %) T 122°C, t: 5h, 8 g de água/g de bagaço.  |   | Gámez et al. (2006).  |
|   | HNO <sub>3</sub>                                       | Concentração de ácido (6 %) T 122°C, t: 9,3 min, 8 g de água/g de bagaço.   |   | Rodríguez-Chong et al. (2004).                                |
| <b>Pré-tratamento combinado (enzima/álcali)</b> | Na(OH)   | Concentração da base (2% m/v), 121°C, P: 1,1 kgcm <sup>-2</sup> , t:4h, 0,19 mL de enzima/g bagaço  |   | Hernández-Salas et al. (2009).                                |
| <b>Pré-tratamento alcalino</b>                  | Na(OH)   | Concentração da base: 3%, 1:25(m/v), T: 50°C, t:3h.   | Hidrólise do 74,9% das hemiceluloses originais.           | Peng et al. (2009).   |
| <b>Explosão por vapor</b>                       | Água   | 121°C e 1,1 kg cm <sup>-2</sup> por 4 h.  |   | Hernández-Salas et al. (2009).                                |
|   | Água, SO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Concentração SO <sub>2</sub> : 2% de água em peso. Concentração de ácido: 0,25 g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 100 g de matéria seca. 180°C, t. 5min.            | Produção de glicose e xilose ao redor de 83% e 72%        | Sendelius (2005).   |

|  |  |  |  |                                 |
|--|--|--|--|---------------------------------|
| <b>Oxidação via úmida</b>                            | Água e oxigênio                              | 195°C, t. 15 min, pH alcalino, P de O <sub>2</sub> : 12 bar  | Teor de celulose: 70%, solubilização da hemicelulose: 93%.   | Martin et al. (2007).           |
| <b>Pré-tratamento AFEX (Ammonia fiber explosion)</b> | Amônia líquida                               | Explosão com vapor, P > 12 atm, T <sub>amb</sub> , t: 20-60 min.<br>Teor de sólidos 15-30% (1-2 kg NH <sub>3</sub> kg biomassa seca) | Prevalência dos polímeros celulose e hemicelulose sem liberação de açúcares. Efetivo para biomassa pouco lignificadas. | Mossier et al. (2005).          |
| <b>Pré-tratamento Organosolv</b>                     | Água e oxigênio                              | 185°C, t. 5 min, pH ácido, P de O <sub>2</sub> : 12 bar  | Elevada recuperação da xilose  | Martin et al. (2007).           |
|  | CO <sub>2</sub> supercrítico e butanol       | P: 7MPa e 190°C, 60% de butanol na mistura com água  | Deslignificação 94,5%  | Pasquini et al. (2005a)         |
|  | CO <sub>2</sub> supercrítico e etanol e água | P: 16MPa e 190°C, (1:1 v/v) na mistura etanol-água, t. 30-150 min  | Rendimento polpação: 32%, deslignificação: 88%   | Pasquini et al. (2005b)         |
|  | Dimetil formamida                            | 200-210 °C por 150 min e 40-60% de dimetilformamida.   | Deslignificação: 82%   | Rezayati-Charani et al. (2006). |

P: pressão, T: temperatura, t: tempo de reação, v/v: razão volumétrica, m/v: razão massa por volume. Adaptado de ALVIRA et al. (2010).

#### **3.2.4.1 Pré-tratamentos ácidos**

A hidrólise com soluções diluídas de ácido sulfúrico, hidrolórico ou acético (1–10% de teor de sólidos) causam a decomposição da hemicelulose em temperatura de operação moderada (100–150 °C). Cerca de 80-90% das hemiceluloses são recuperadas no extrato na forma de monômeros (xilose, arabinose, entre outros), deixando aproximadamente 50% da lignina passível de extração alcalina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

O pré-tratamento pode também ser conduzido com soluções de ácido concentrado para aumentar a solubilização da fração hemicelulósica. No entanto, o uso de elevadas concentrações favorece a formação de inibidores dos processos de fermentação mediante a geração de ácido acético causando reprecipitação de lignina solubilizada, e a formação de subprodutos de degradação tóxicos derivados da hemicelulose e da lignina solúvel (CHENG et al., 2008). Em consideração à temperatura, o incremento deste parâmetro diminui os tempos de residência nos reatores, aumentando as taxas de recuperação de xilose e a digestibilidade do resíduo sólido, assim, com os gastos energéticos do processo (LIU e WYMAN, 2003).

Em geral, o resíduo remanescente rico em celulose e lignina necessita ser acondicionado mediante a neutralização e correção de pH para a sua posterior utilização, evitando desta forma a inibição dos microrganismos fermentativos (SAHA, 2005). Por outro lado, os hidrolisados são também passíveis de fermentação quando apresentam concentrações aceitáveis de produtos inibitórios como hidroximetilfurfural e furfural (HERNANDEZ-SALAS et al., 2009).

#### **3.2.4.2 Pré-tratamento hidrotérmico**

O processo hidrotérmico é uma variação do pré-tratamento com ácido diluído utilizando água sob alta temperatura e/ou pressão. Condições tais que promovem a clivagem das ligações dos complexos lignina-carboidrato e a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses. A diminuição de pH produzida catalisa a reação da hidrólise da biomassa promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico) (MOSSIER et al., 2005).

Elevadas temperaturas na faixa de 180 a 220 °C e curtos períodos de reação causam além da dissolução da fração hemicelulósica, a extração de parte da lignina solúvel. O GP da

celulose também pode diminuir com o aumento do tempo e da temperatura de reação (ROGALINSKI et al., 2008).

Dentro das alternativas tecnológicas no tratamento hidrotérmico destaca-se a explosão a vapor, baseada na exposição do material a alta pressão por um tempo determinado após o qual, a pressão é aliviada repentinamente gerando uma massiva desagregação da matriz lignocelulósica, tornando as fibras de celulose mais expostas e acessíveis. Água quente pressurizada atua como solvente penetrando na estrutura fibrilar da biomassa, hidratando a celulose e retirando a fração hemicelulósica (SADDLER et al., 1993; MOSIER et al., 2005).

O subproduto sólido é constituído por fibras reativas e hidrolisado com uma mínima concentração de subprodutos tóxicos para os processos fermentativos (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

Além disso, os processos hidrotérmicos aportam concretamente na redução dos custos totais do processo, já que não requerem reatores altamente resistentes à corrosão, nem de tratamentos adicionais de detoxificação (usados nos tratamentos ácidos) (LIU e WYMAN, 2003).

À guisa de exemplo, Boussarsar et al. (2009) mostraram a máxima solubilização de hemicelulose e a mínima degradação de monômeros no pré-tratamento hidrotérmico do BC com temperaturas de 170°C durante 2 h. No entanto, análises termogravimétricas do sólido pré-tratado mostraram a presença de oligômeros de xilana e polímeros de largas cadeias. Por isso apesar dos menores custos desta tecnologia precisa-se de um maior desenvolvimento para sua efetiva aplicação em materiais com elevada recalcitrância.

#### **3.2.4.3 Pré-tratamentos alcalinos**

O pré-tratamento alcalino oferece condições moderadas de operação em consideração a pressão e temperatura. Em alguns casos, pode ser conduzido à temperatura ambiente, porém os tempos reacionais são elevados, na ordem de horas até dias. A diferença dos pré-tratamentos ácidos, a principal limitação ocorre devido a conversão de uma fração de álcali em sais irrecuperáveis as quais podem ser incorporadas no resíduo sólido (BERGGREN et al., 2003).

O principal efeito desejado na aplicação solução alcalina é a remoção da lignina, dissolução da hemicelulose e a disponibilização da celulose, efeitos decorrentes da cisão das ligações lignina-carboidrato e da fragmentação da macromolécula de lignina. O álcali

(geralmente soda ou cal) causa “inchamento” ou *swelling* da biomassa, e com isto o incremento da superfície específica e da porosidade do substrato (SUN e CHEN, 2002).

Soluções com hidróxido de cálcio têm sido usadas no pré-tratamento de palha de trigo, madeira de pinheiro, capim e palha de milho. A composição dos resíduos sólidos consiste em uma mistura de polissacarídeos com uma mínima quantidade de lignina remanescente (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

O pré-tratamento do BC utilizando hidróxido de sódio apresenta vantagens em termos de custo de reagente e segurança do processo. Após aplicação do álcali, o sólido produzido (majoritariamente celulose) pode ser usado na indústria de papel e celulose (BAUDEL, 2006).

#### **3.2.4.4 Pré-tratamentos biológicos**

Uma grande variedade de fungos e bactérias conseguem degradar lentamente a lignocelulose usando uma bateria de enzimas hidrolíticas e oxidativas (VITTI, 1988; CAMASSOLLA e DILLON, 2009).

As reações catalisadas por enzimas oxidativas têm um papel significativo na completa degradação da biomassa lignocelulolítica. Contudo, apenas alguns fungos na natureza, pertencentes à divisão *Basidiomycotina*, possuem sistemas capazes de degradar a lignina com eficiência (HATAKKA, 1994). Estes microorganismos conhecidos como “fungos degradadores de madeira” são classificados em três grupos: fungos de degradação branca, de degradação marrom e de degradação macia, no entanto, os que mostraram maior eficiência são os fungos de degradação branca (DURAN e SPOSITO, 1997).

Li et al. (2002) conseguiram resultados de 50% da degradação na lignina do BC com perdas menores a 10% nos polissacarídeos remanescentes em duas semanas de tratamento. Estes resultados na atividade deslignificadora foram obtidos pelo fungo *Phlebia sp. MG-60* após enriquecimento de meio de complementação rico definido por Kirk et al. (1978). Outros microorganismos testados na degradação do bagaço foram: *Phanerochaete chrysosporium ME-466*, *Phanerochaete sordida YK-624*, *Ceriporia sp. MZ-340* e *Pleurotus sajor-caju PS2001*, entre outros (CAMASSOLA e DILLON, 2009).

Os pré-tratamentos com microorganismos degradadores de lignina apresentam muitas vantagens como alternativa sustentável de processo, porém os longos tempos de operação de semanas e a freqüente inibição microbiana a partir dos próprios subprodutos da degradação inviabilizam sua difusão e aplicação em escala comercial.

### 3.2.5 O BC como substrato para a fermentação em estado sólido

O BC, resíduo representativo da agroindústria brasileira, é alvo de pesquisas visando usos alternativos e eficientes, além da combustão para geração de energia. Dentre os principais processos tecnológicos propostos podem se mencionar seu uso como matéria prima na indústria de papel e papelão, na fabricação de aglomerados, na indústria química e na construção civil, além de ser processado com fins de alimentação animal e produção de biomassa microbiana.

Neste sentido, os processos biotecnológicos oferecem uma diversidade ainda maior para o processamento do BC. Tais processos possuem uma série de vantagens em relação aos processos químicos convencionais. A maioria das matérias primas e insumos utilizados são de natureza orgânica possibilitando o reaproveitamento de resíduos sólidos principalmente de origem agrícola. Além do mais, a biotransformação gera resíduos e produtos de fácil degradação (ADSUL, 2004).

As enzimas, principais representantes destes processos, vêm substituindo em grande medida muitos componentes químicos utilizados na indústria de hoje. Entre as enzimas microbianas mais difundidas destacam-se as alfa-amilases e as amiloglicosidase, todas elas produzidas por processos de fermentação submersa. Assim também, outro grupo de enzimas de grande interesse são as celulases produzidas pelas espécies fúngicas *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, pois podem ser aplicadas na conversão de materiais lignocelulósicos em glicose para produção de etanol de 2<sup>a</sup> geração (ADSUL et al., 2005).

Estudos também demonstraram o grande potencial de processos como a fermentação no estado sólido para produção de algumas enzimas como as xilanases, cuja implementação industrial é de grande viabilidade e está sendo desenvolvida industrialmente (CASTRO e PEREIRA Jr. 2010).

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o crescimento do microrganismo em substratos sólidos na ausência de líquido na forma livre. A água livre indispensável ao crescimento dos microrganismos é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. A FES é considerada mais natural que outros tipos de fermentação (fermentação submersa), pois seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza (HESSELTINE, 1987).

Os fungos filamentosos são os mais utilizados na maioria dos processos de FES devido às suas características fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas. Assim também, materiais naturais ricos em polissacarídeos como o BC são substratos potenciais para estes processos, dadas as propriedades estruturais e composicionais favoráveis para serem utilizados pelos fungos como suporte e fonte de carbono e energia (PANDEY et al., 2000).

Os substratos sólidos utilizados na FES devem possuir partículas de porosidade e tamanho adequados com grande área superficial por unidade de volume, para facilitar a acessibilidade e a penetração do organismo no substrato. Portanto, na maioria dos casos estes materiais naturais precisam também de um tratamento e acondicionamento prévios à fermentação. Desta forma, a matriz do substrato pré-tratado deve conter ou ser capaz de absorver fontes nutricionais como carboidratos (celulose e açúcares), nitrogênio (amônia, uréia, peptídeos) e sais minerais, necessários para o crescimento microbiano e favorecer com isto, altas taxas de produtividade na síntese enzimática (RAIMBAULT, 1997).

### **3.3 OBJETIVOS**

Investigar os métodos de pré-tratamento: hidrotérmico, ácido, básico e combinado (ácido/básico) no bagaço de cana de açúcar (BC), de modo a facultar seu aproveitamento como substrato no processo de fermentação em estado sólido (FES) por uma linhagem de *A. niger* para a produção de celulases específicas.

Com isto, as mudanças produzidas na composição, estrutura e morfologia do BC serão avaliadas pelos seguintes objetivos específicos:

- Análises químicas dos efeitos nos seus componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina.
- Determinação dos efeitos macromoleculares em função do grau de cristalinidade por difração de raios X (DRX)
- Determinação dos efeitos produzidos nos grupos funcionais inferidos pela espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR).
- Análises micrográfica das estruturas físicas componentes pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Contudo, busca-se a obtenção de um substrato com as melhores características para FES, capaz de ser fonte de energia e nutrientes para o crescimento microbiano e produtividade enzimática de celulases com uma linhagem mutante de *Aspergillus niger*.



### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Metodologia de pesquisa

A Figura 3.5 apresenta o diagrama de fluxo seguido como estratégia experimental no presente estudo. As etapas que envolvem os pré-tratamentos e a fermentação em estado sólido (FES) foram os principais processos, cujos resultados foram indicadores de avaliação comparativa.

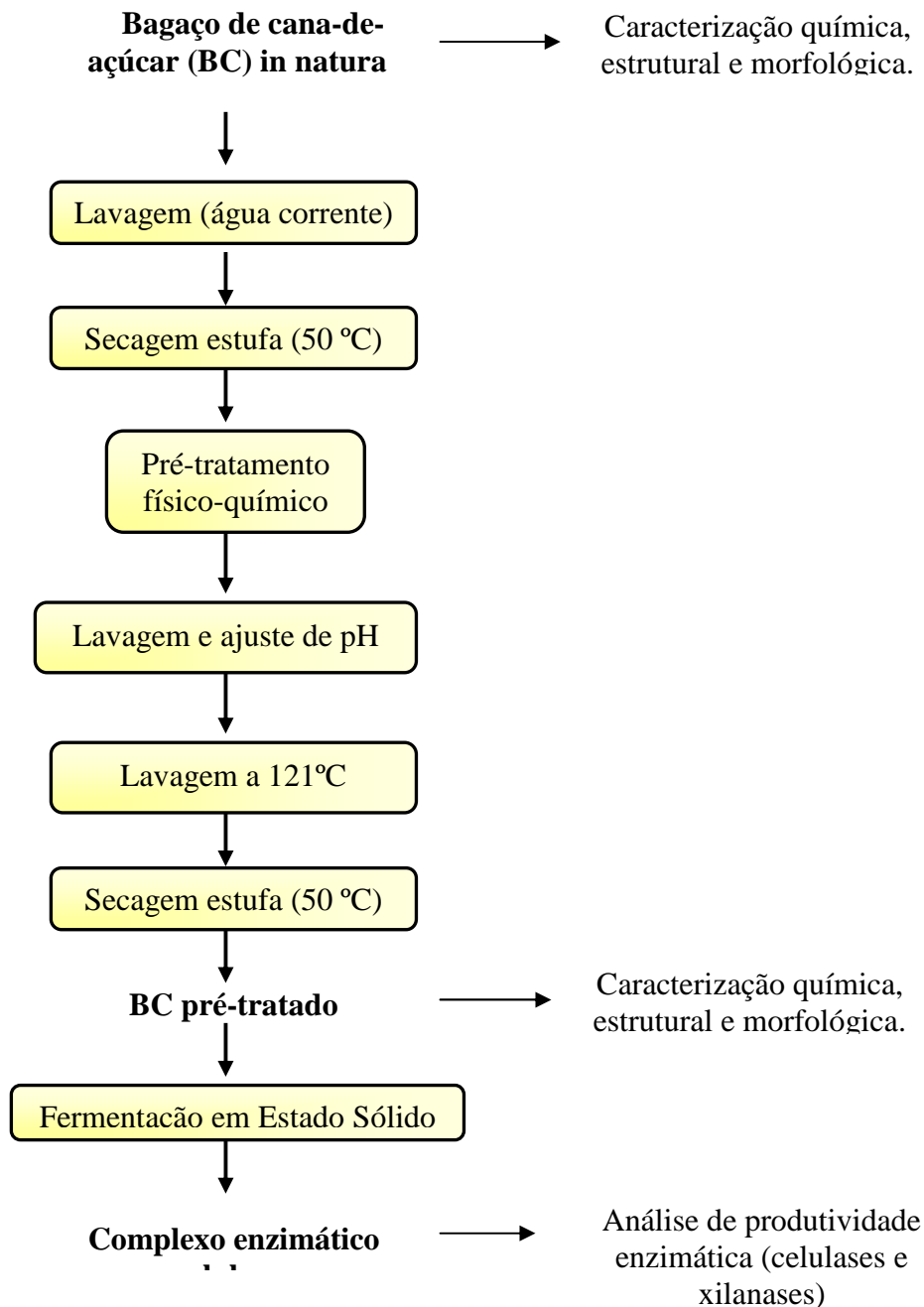


Figura 3.5 – Fluxograma da metodologia nos pré-tratamentos avaliados para o BC.

Em relação às ferramentas de caracterização utilizadas, amostras de BC antes e após pré-tratamentos, de composição previamente analisada, serão avaliadas com as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho, e difração de raios X. Por outro lado, a qualidade dos BC *in natura* e pré-tratados como substratos para sínteses de celulases será determinada experimentalmente por FES, cujos principais indicadores foram as análises do complexo enzimático em relação às enzimas FPase, CMCase e xilanase.

### 3.4.2 Matéria prima

O BC utilizado foi gentilmente fornecido pela empresa Edra Eco Sistemas Ltda, SP. O material originalmente composto por uma mistura de fibras e medula foi lavado industrialmente com água a 70° C afim de remover impurezas como terra e fuligem, seco ao ar livre e estocado em saco plástico até o uso nos experimentos.

### 3.4.2 Pré-tratamentos

Antes de iniciar os tratamentos químicos o bagaço foi moído em moinho de facas até uma granulometria de 4 mm e posteriormente lavado com água fria em uma peneira de 16 mesh (1mm). O material retido foi seco em estufa a 50°C durante 2 h e utilizado como amostra inicial em todos os pré-tratamentos.

Adicionalmente, uma parte deste BC lavado foi reservado e submetido à análises química, morfológica e estrutural, após os devidos preparos específicos para cada uma das técnicas utilizadas na caracterização.

#### 3.4.2.1 Pré-tratamento com ácido diluído

Amostras de 50 g do BC foram submetidas ao tratamento ácido mediante aplicação de solução de ácido sulfúrico a 2% m/v em uma relação sólido/liquido de 5%. O pré-tratamento foi feito em autoclave nas seguintes condições: 121°C e 1 atm por 60 minutos. Após descarga e separação da fração líquida, ajustou-se o pH no resíduo sólido com ajuda de uma solução Na(OH) 2mol L<sup>-1</sup> até atingir 5,5.

Em seguida o material foi lavado, filtrado e novamente autoclavado por 30 min com água destilada (5% de teor de sólidos). Finalmente o BC pré-tratado foi seco em estufa a 50°C durante 2 h, logo pesado e separado em 2 frações: uma para a caracterização e a outra para uso como substrato na FES com o microorganismo *A. niger*.

#### **3.4.2.2 Pré-tratamentos alcalinos**

Nos pré-tratamentos alcalinos utilizaram-se soluções de soda e cal (hidróxidos de Na(OH) e Ca(OH)<sub>2</sub>). Cada uma delas foi aplicada separadamente sobre 2 amostras de 50 g de BC na concentração de 2% m/v e com 5% de teor de sólidos. Utilizou-se igualmente aquecimento em autoclave com as mesmas condições às aplicadas no tratamento pré-tratamento ácido. Após filtração e lavagem, o ajuste do pH para 5,5 da fração sólida foi realizado com adição de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na concentração de 2 mol L<sup>-1</sup>.

Este material foi submetido às operações de lavagem com água corrente e autoclavagem seguindo a seqüência descrita no pré-tratamento com ácido diluído, até sua utilização e caracterização finais.

#### **3.4.2.3 Pré-tratamento combinado ácido/básico**

O objetivo deste pré-tratamento é a combinação dos efeitos de uma solução ácida para remoção da hemicelulose e de uma solução alcalina ou básica para solubilização da lignina visando à obtenção de uma polpa com elevado teor de celulose. O procedimento seguido foi proposto por Castro (2006).

Para isto, 50 g do BC foram embebidas em 2 L de solução aquosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ao 3% (v/v), a suspensão foi mantida em repouso por 24 h a temperatura ambiente. Após esse período a mesma foi exposta a tratamento térmico em autoclave por 40 minutos, a 121 °C e 1 atm. Após resfriamento e filtração, o BC hidrolisado foi lavado cinco vezes com água destilada, na proporção 1:4 (m/v). O resíduo sólido foi seco em estufa a 50 °C por cerca de 4 h, depois das quais se adicionou uma solução de NaOH 20% (m/v), com uma relação sólido:líquido de 1:20 (m/v). Esta suspensão foi submetida a mais um tratamento térmico por 20 min em autoclave a 120°C e 1 atm. Em seguida ao resfriamento, o material foi novamente lavado com água destilada até a redução do pH em 7, filtrado em papel de filtro e seco a 60 °C, até uma umidade aproximada de 10%. A polpa celulósica produzida foi também reservada com os mesmos fins experimentais dos pré-tratamentos anteriormente descritos.

#### **3.4.2.4 Pré-tratamento hidrotérmico**

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado mediante a adição de 1 L de água destilada em 50 g de BC e aquecimento em autoclave a 120 °C e 1 atm por 60 min.

O sólido hidrolisado foi lavado com água destilada e filtrado sucessivas vezes, até a água de lavagem não apresentar coloração amarelada e atingir um pH aproximado de 5,5.

Com fins comparativos, depois do ajuste de pH até 5,5, a amostra de BC pré-tratado foi também caracterizada e utilizada nas FES.

#### 3.4.2.5 Cálculos de rendimento

Todas as amostras derivadas dos pré-tratamentos foram secas em estufa a 50 °C durante aproximadamente 2 h até redução da umidade a valores inferiores de 10% .

Depois os BC pré-tratados e secos foram pesados para determinar o rendimento mássico de cada pré-tratamento segundo a Equação 3.1:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação (3.1)}$$

onde:

$m_{inicial}$  : massa inicial seca de material lignocelulósico (g);

$m_{final}$ : massa final seca de material lignocelulósico (g);

R : rendimento mássico da etapa.

Posteriormente a perda de cada componente macromolecular (celulose, hemicelulose e lignina) foi calculada pela Equação 3.2:

$$P = 100 \times \left( \frac{M_i \cdot y_i - M_i \cdot R \cdot y_f}{M_i \cdot y_i} \right) = 100 \times \left( 1 - R \frac{y_f}{y_i} \right) \quad \text{Equação (3.2)}$$

onde:

P: perda do componente macromolecular (%);

$M_i$ : massa inicial de material lignocelulósico;

$y_i$ : teor do componente macromolecular no BC inicial ou *in natura*;

$y_f$ : teor do componente macromolecular no BC pré-tratado;

R: rendimento mássico da etapa de pré-tratamento.

#### 3.4.3 Caracterização dos Materiais Lignocelulósicos

Tanto as amostras de BC *in natura* quanto os BC pré-tratados foram caracterizados em relação às concentrações de celulose, hemicelulose e lignina. A informação acerca das mudanças na morfologia decorrentes dos pré-tratamentos foram registradas mediante documentação fotográfica com lupa, assim também, foi realizada uma avaliação micromorfológica com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Mudanças estruturais nestes componentes foram derivadas de técnicas espectroscópicas como difração de raios X (DRX) e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A aplicação das técnicas usadas na caracterização é descrita nas seguintes seções.

#### **3.4.3.1 Análises de umidade e cinzas.**

A determinação da umidade de cada uma das amostras foi baseada no procedimento sugerido pelo NREL (National Renewable Laboratory dos EUA) - LAP 012 (Laboratory Analytical Procedure). Com esta finalidade, aproximadamente 3 g das diferentes polpas celulósicas foram pesadas em balança analítica (sensibilidade de 1 mg) e então submetidas à secagem à temperatura de 105°C por 24 horas. Após este período as amostras foram colocadas em dessecador até atingir temperatura ambiente e sua massa foi novamente registrada em balança analítica. A umidade foi calculada segundo a Equação 3.3 e descontada para obtenção dos valores nos cálculos de rendimento:

$$U\% = [1 - (m_f/m_i)] * 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde:

U%=umidade da amostra,

$m_f$  = massa final da amostra seca sem a tara,

$m_i$  =massa inicial da amostra sem a tara.

O teor de cinzas dos materiais foi determinado segundo o sugerido pelo NREL – LAP 010. Para isto, foram pesados aproximadamente 2 g de cada material em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Assim, as amostras foram inicialmente pré-calcinadas à temperatura de 400 °C por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, em seguida, a tampa foi removida e aumentou-se a temperatura até atingir 800 °C, por 2h. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e a massa de cinzas determinada.

#### **3.4.3.2 Análise de componentes do BC**

A eficiência dos pré-tratamentos em relação aos componentes do BC foi analisada pelos teores de lignina, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) determinados pelas metodologias descritas por Goering e Van Soest (1970), Silva (1998) e Van Soest (1963).

As concentrações relativas de %FDA e %FDN permitem calcular a quantidade de celulose e hemicelulose nas amostras segundo as seguintes relações:

$$\% \text{ Celulose} = \% \text{FDA} - \% \text{Lignina} \quad \text{Equação 3.4}$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \% \text{FDN} - \% \text{Lignina} - \% \text{Celulose} \quad \text{Equação 3.5}$$

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Todas as análises da composição, umidade, cinzas foram realizadas em duplicata. Os valores relatados correspondem a média dos valores obtidos.

#### **3.4.3.3. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Amostras do BC *in natura* e pré-tratadas com uma granulometria de < 40 mesh foram secas em estufa a 60°C. Fixaram-se as amostras em suporte de alumínio com fita de carbono, as mesmas foram submetidas ao recobrimento com tinta de prata e em seguida a um recobrimento de 10 nm de ouro em um metalizador Coating System (BAL-TEC MED, EUA) e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 20 kV (equipamento disponível no Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP).

#### **3.4.3.4 Análise por difração de raios X (DRX)**

Os espectros de difração de raios X (DRX) correspondentes às amostras pré-tratadas e *in natura* foram adquiridos com o propósito de avaliar a mudança na cristalinidade da celulose remanescente.

Com esta finalidade foi utilizado um difractômetro da marca RIGAKU ROTA FLEX (100 mA), tubo com ânodo de cobre, Goniômetro horizontal, radiação a 50kV (100 mA) e câmera multipropósito no laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos-IFSC-USP. Os espectros foram obtidos no modo de varredura contínua no intervalo de  $2\theta = 2-60^\circ$  e velocidade de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ .

Após ajuste da linha de base espectral, o índice de cristalinidade da celulose (IC%) foi calculado segundo metodologia sugerida por Segal et al. (1959) utilizando a Equação 3.6.

$$\% \text{IC} = [(I_{002} - I_{\text{am}})/I_{002}] \times 100 \quad (3.6)$$

Onde:

$I_{002}$  = intensidade no pico cristalino à aproximadamente  $2\theta$

$I_{\text{am}}$  = intensidade da parte representativa à região amorfa à aproximadamente  $18^\circ$ .

#### **3.4.3.5 Análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A identificação das estruturas químicas e grupos funcionais presentes nas amostras avaliadas foram realizadas utilizando a espectroscopia de FTIR. Com este objetivo foram preparadas pastilhas a partir de 150 mg de KBr e 1,5 mg de cada amostra de BC com granulometria <40 mesh. A mistura foi homogeneizada em almofarix para logo ser prensada sob vácuo por 2 min com uma pressão de 10 kgf.cm<sup>-2</sup> condizente a moldagem das pastilhas a analisar.

Os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> com resolução de 1 cm<sup>-1</sup> em um espectrofotômetro BOMEN, modelo MB 102 pertencente ao Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos. A linha de base foi corrigida entre 1810 e 790 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.4.3.6. Documentação fotomicrográfica**

Para documentação fotomicrográfica, amostras correspondentes a cada pré-tratamento foram colocadas em placas de petri e registradas por meio de imagens digitais. Foi utilizada uma câmera digital de 8.1 Megapixels da marca Sony Zeiss High Image quality – High Sensitivity 800 com touch panel de 3,0" acoplada a um estereoscópio da marca Carl Zeiss Stemi DV4 com zoom 4x.

O registro digital foi realizado no laboratório da Engenharia de Superfícies do Departamento da Engenharia de Materiais da EESC-USP.

#### **3.4.4 Avaliação da produção de celulases sobre o BC in natura e pré-tratado.**

A etapa final do processo consistiu na fermentação em estado sólido (FES) das amostras pré-tratadas de BC com uma linhagem de *A. niger* para a produção de celulases. Com esta finalidade, 5 g de cada um dos substratos foram colocados separadamente em erlenmeyers de 500 mL e umedecidos com 10 mL do meio de suplementação Mandels e Weber básico (MANDELS e WEBER, 1969) de acordo Couri e Farias (1995)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Os procedimentos envolvendo a conservação e manuseio do fungo *A. niger* seguiram metodologia proposta por Couri e Farias (1995) devidamente detalhada no Capítulo 4.

Após esterilização em autoclave por 20 min (120°C e 1<sup>2</sup> atm), os frascos foram inoculados com suspensão de esporos na concentração de 10<sup>8</sup> conídios.g<sup>-1</sup> de substrato seco e cultivados por 72 h<sup>3</sup> em estufa de cultura (FANEM, Brasil) a 32 °C.

A extração do complexo enzimático das amostras fermentadas foi realizada pela adição de 50 mL de solução tampão acetato 0,2 M, pH 4,5 e posterior homogenização em shaker por 1 hora a 120 rpm e 32 °C. A suspensão (substrato + solução de extração) foi então filtrada a vácuo utilizando papel de filtro e posteriormente centrifugada a 10000 rpm durante 15 minutos, a 10 °C. A solução enzimática bruta constituída pelo sobrenadante foi armazenada à -5°C até análises enzimática em relação às atividades de FPase, CMCase e xilanase<sup>4</sup>.

Tanto os experimentos de FES quanto as análises enzimáticas foram feitas em duplicata e os valores relatados são as meias de ambos os resultados.

### **3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados nesta seção apresentam a avaliação dos efeitos causados pelos pré-tratamentos (PTs): ácido, básico com Na(OH), básico com Ca(OH)<sub>2</sub>, combinado (ácido/básico) e hidrotérmico sob o bagaço de cana-de-açúcar (BC). O principal objetivo da aplicação dos PTs é o acondicionamento deste material lignocelulósico para ser utilizado como substrato na produção de celulases por fermentação em estado sólido (FES).

O desempenho da melhora nas propriedades do BC foi baseado na composição química e nas informações da microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de difração de raios X (DRX). Com isto, a caracterização comparativa foi discutida em relação a 6 amostras correspondentes ao BC *in natura* e a cada uma das amostras de BC pré-tratadas.

#### **3.5.1 Análise química e visual dos PTs**

As Figuras 3.6 (a-f) apresentam as fotos dos materiais caracterizados com o objetivo de ilustrar as mudanças na aparência física das fibras do BC decorrentes dos PTs. Essas mudanças são corroboradas com os dados na Tabela 3.3, na qual é apresentada a concentração dos componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina.

---

<sup>2</sup> Representa o valor pressão acima a atmosférica

<sup>3</sup> O tempo de FES foi definido após ensaio de cinética descrito no Capítulo 4

<sup>4</sup> As metodologias analíticas para determinação das atividades enzimáticas foram pormenorizadas no Capítulo 4.



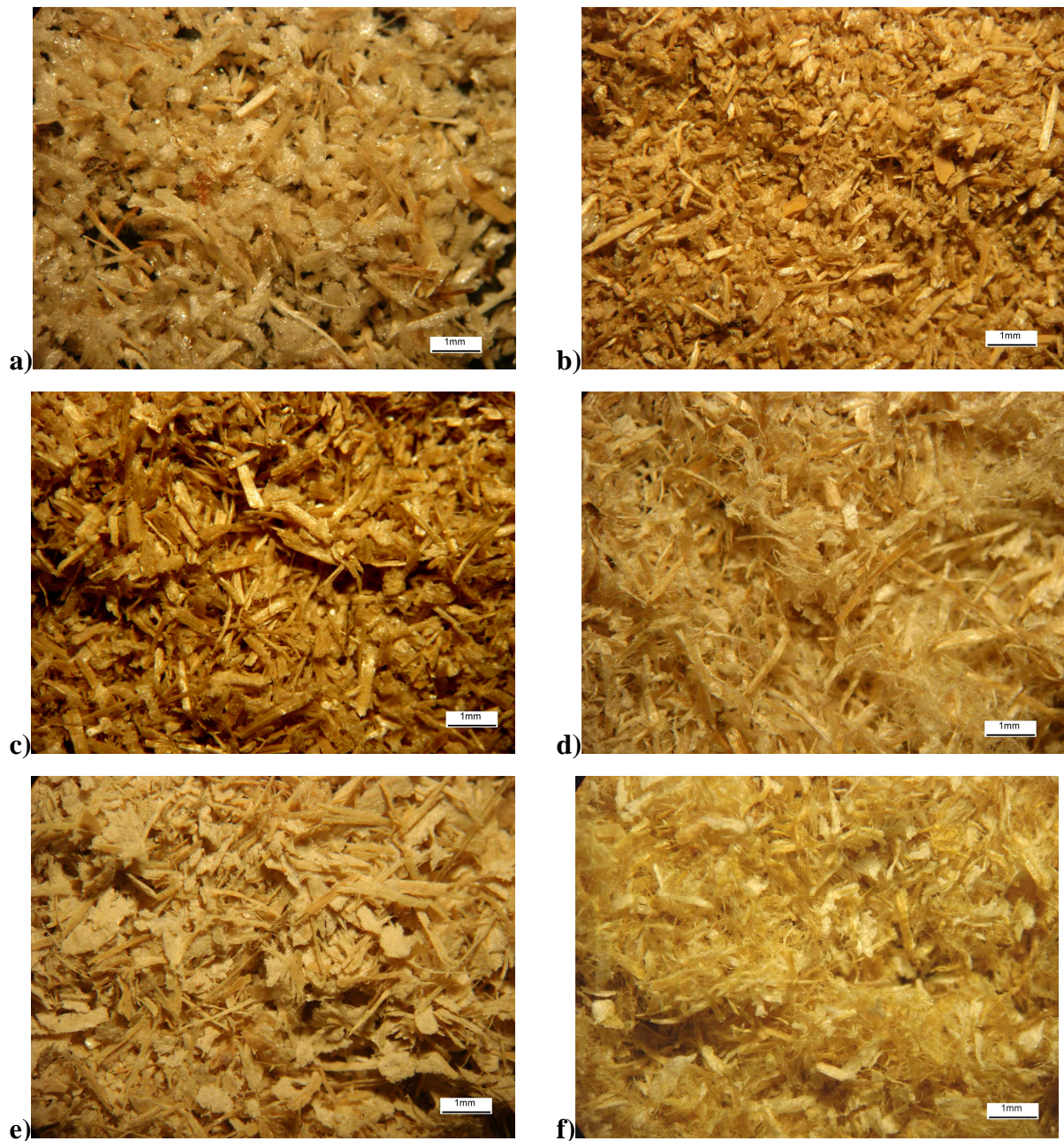


Figura 3.6 – Efeitos físicos nos pré-tratamentos registrados em estereoscopia e câmera digital para um aumento de 4 vezes a) BC “*in natura*” b) BC após pré-tratamento hidrotérmico, c) BC após pré-tratamento ácido, d) BC após pré-tratamento básico Na(OH), e) BC após pré-tratamento básico Ca(OH)<sub>2</sub>, f) BC após pré-tratamento combinado.

Todos os PTs produziram materiais com maior quantidade de celulose em relação ao BC *in natura*, indicando a solubilização parcial da hemicelulose e lignina em função do reagente utilizado. O maior incremento na concentração de celulose (87%) pode ser observado utilizando a combinação dos efeitos ácido/básico.

Tabela 3.3 Composição química do BC *in natura* e após os diferentes processos de PT.

| Componente (%)      | BC <i>in natura</i> | PT Hidrotm <sup>a</sup> | PT ácido <sup>b</sup> | PT soda <sup>c</sup> | PT cal <sup>d</sup> | PT combinado <sup>e</sup> |
|---------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| <b>Rendimento</b>   | 99,78               | 95,05                   | 54,12                 | 60,56                | 60,77               | 43,23                     |
| <b>Celulose</b>     | 46,62               | 52,34                   | 68,62                 | 66,44                | 65,08               | 86,67                     |
| <b>Hemicelulose</b> | 26,51               | 22,34                   | 2,29                  | 25,48                | 24,60               | 5,40                      |
| <b>Lignina</b>      | 21,7                | 21,91                   | 25,98                 | 4,42                 | 6,04                | 3,67                      |
| <b>Cinzas</b>       | 2,51                | 2,52                    | 1,22                  | 1,87                 | 2,43                | 1,99                      |
| <b>Extrativos</b>   | 2,44                | -                       | -                     | -                    | -                   | -                         |
| <b>Total</b>        | 99,78               | 99,11                   | 98,11                 | 98,21                | 98,15               | 97,73                     |

<sup>a</sup> PT hidrotérmico, <sup>b</sup> PT ácido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, <sup>c</sup> PT básico com Na(OH), <sup>d</sup> PT básico com Ca(OH)<sub>2</sub>, <sup>e</sup> PT combinado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Na(OH).

Conforme a Tabela 3.3, o tratamento hidrotérmico provocou uma reduzida perda mássica associada com a remoção dos extrativos e uma fração da hemicelulose, por autohidrólise. A remoção parcial da hemicelulose é explicada pela geração das condições ácidas após solubilização dos ácidos hexurônicos e funções orgânicas componentes das pentoses. Os efeitos físicos a nível macroscópico na Figura 3.6b foram caracterizados por uma aparente cominuição das partículas em relação à Figura 3.6a que mostra a foto representativa do BC *in natura*.

Com relação ao PT ácido, pode-se notar uma redução mássica de 46% devido à hidrólise e solubilização dos açúcares da hemicelulose em açúcares componentes (xilose, arabinose, etc.). O material pré-tratado (Figura 3.6c) apresentou um escurecimento que é relacionado com a catálise ácida das ligações do complexo lignina-carboidrato, bem como à formação de produtos de degradação dos carboidratos (CURRELI et al., 2002). Tanto a lignina solúvel quanto os compostos de degradação furfural e hidroximetilfurfural liberados apresentam cor marrom escura.

A lignina mostrou-se mais susceptível aos PTs básicos em especial ao Na(OH) e ao PT combinado conforme observado também por Castro (2006) e Öhgren et al. (2007). A remoção da lignina solúvel é inferida a partir do clareamento do material e a diminuição da estrutura fibrosa mostrado nas Figuras 3.6 d, 3.6 e e 3.6 f.

Na Tabela 3.4 são apresentados os valores de solubilização relativa a cada componente do BC calculados pela equação 3.2 (Material e Métodos) como resultado da aplicação dos PTs. Em geral os tratamentos químicos não foram totalmente seletivos em relação aos componentes do BC (celulose, hemicelulose e lignina), todos eles mostram maior ou menor grau de suscetibilidade dependendo do reagente e das condições utilizadas.

Tabela 3.4 Solubilização dos componentes do BC após PTs.

| <b>Componente</b>   | <b>PT Hidrotm<sup>a</sup></b> | <b>PT ácido<sup>b</sup></b> | <b>PT soda<sup>c</sup></b> | <b>PT cal<sup>d</sup></b> | <b>PT combinado<sup>e</sup></b> |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <b>Celulose</b>     | -                             | 20,34                       | 13,69                      | 15,17                     | 19,63                           |
| <b>Hemicelulose</b> | 19,90                         | 95,32                       | 41,80                      | 43,61                     | 91,19                           |
| <b>Lignina</b>      | 4,03                          | 35,22                       | 87,67                      | 83,09                     | 92,69                           |

<sup>a</sup> PT hidrotérmico, <sup>b</sup> PT ácido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, <sup>c</sup> PT básico com Na(OH), <sup>d</sup> PT básico com Ca(OH)<sub>2</sub>, <sup>e</sup> PT combinado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Na(OH).

Verificou-se uma solubilização relativa de 20% da fração hemicelulósica obtida pelo PT hidrotérmico. Devido à hemicelulose apresentar caráter relativamente amorfo, grande polidispersidade e grau de polimerização bastante inferior ao da celulose, esta fração apresenta-se muito mais susceptível à solubilização (FENGEL e WEGENER, 1989; PITARELO, 2007).

A celulose (componente de interesse no trabalho) foi solubilizada em todos os PTs e com maior intensidade no PT ácido, segundo o relatado por Saha et al. (2005) e Hodge et al. (2008), as soluções ácidas diluídas atingem também parte da celulose amorfa, tornando a fração celulósica remanescente mais susceptível à ação dos reagentes químicos e biológicos.

A diminuição da lignina, observada no PT ácido é explicado pela quebra das ligações ester e eter do complexo lignina-carboidrato e a posterior solubilização dos fragmentos de lignina de baixa massa molar (lignina solúvel em ácido). No entanto, processos subsequentes podem envolver a lenta repolimerização da lignina na presença de ácidos orgânicos liberados formando produtos de condensação insolúveis (FENGEL e WEGENER, 1989). Assim, a condensação dos fragmentos solubilizados da lignina através da formação de ligações intermoleculares entre eles pode causar a reprecipitação na superfície das fibras, não sendo eliminada por simples lavagem (SARKANEN et. al., 1991; McDONOUGH e THOMAS, 1995).

A deslignificação alcalina possibilitou a solubilização de aproximadamente 87% de lignina no PT com Na(OH) e 83% no PT com Ca(OH)<sub>2</sub>. Porém, os carboidratos da hemicelulose também foram hidrolisados e solubilizados, por isso são tratamentos usados na indústria de papel, quando são requeridas polpas celulósicas de alta pureza, porém mostram-se menos adequados quando se visa a separação e integridade dos outros componentes.

Conforme se registra nas Tabelas 3.3 e 3.4, após PT combinado obteve-se uma polpa bruta com alto teor de celulose (86%), devido a uma efetiva solubilização da camada protetora constituída por lignina e hemicelulose. Logo, visando sua aplicação na produção de enzimas

celulases, espera-se um melhor aproveitamento microbiano da celulose livre das barreiras naturais e, como consequência, uma melhora significativa na produção enzimática de celulases.

### 3.5.2 Análise morfológica dos BC *in natura* e após PTs por MEV

As mudanças morfológicas no BC causadas pelos PT foram avaliadas por MEV. Para todas as fotomicrografias (Figuras 3.7 - 3.11) evidencia-se a perda de camadas protetoras mais externas corroborando com a solubilização e remoção de componentes das análises químicas. Pode-se observar em alguns casos o favorecimento de uma estrutura microfibrilar mais exposta e em outros, uma agregação dos componentes.

As fotomicrografias 3.7 do BC *in natura* mostram um material heterogêneo e fraturado constituído por tecido fibroso e medular. Além de uma aparência regular e parcialmente porosa nas fibras (Fig. 3.7b), pode-se observar partes da fisiologia vegetal como parênquima (estrutura apontada com seta na Fig. 3.7a) decorrentes das operações de moagem e lavagem a que foi submetido o material na usina de procedência.

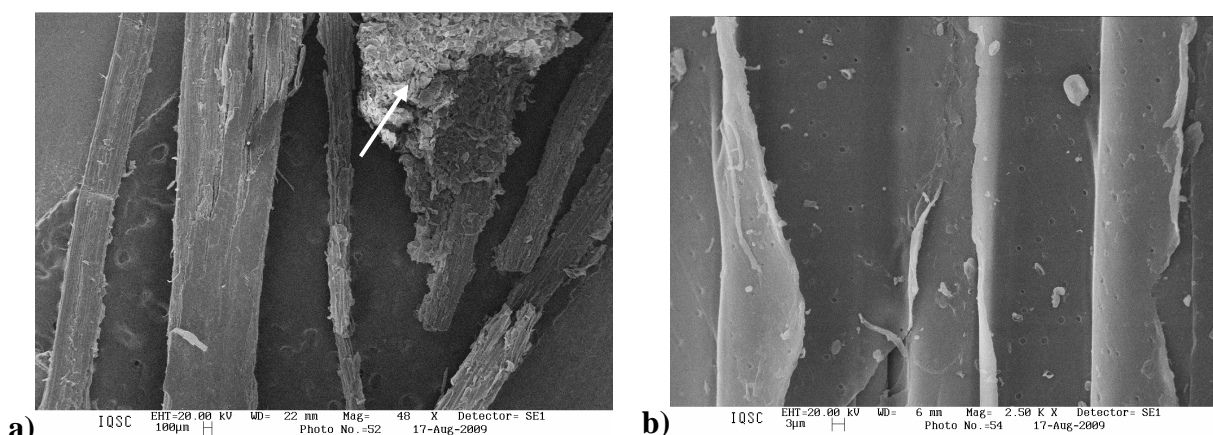


Figura 3.7 - Fotomicrografias do BC “*in natura*”. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura.

As fotomicrografias 3.8 correspondentes ao BC após PT hidrotérmico apresentam uma perda de uniformidade no feixe fibroso exposto no tecido vegetal (Fig. 3.8a). Na Figura 3.8b pode-se observar tecido vascular fraturado.

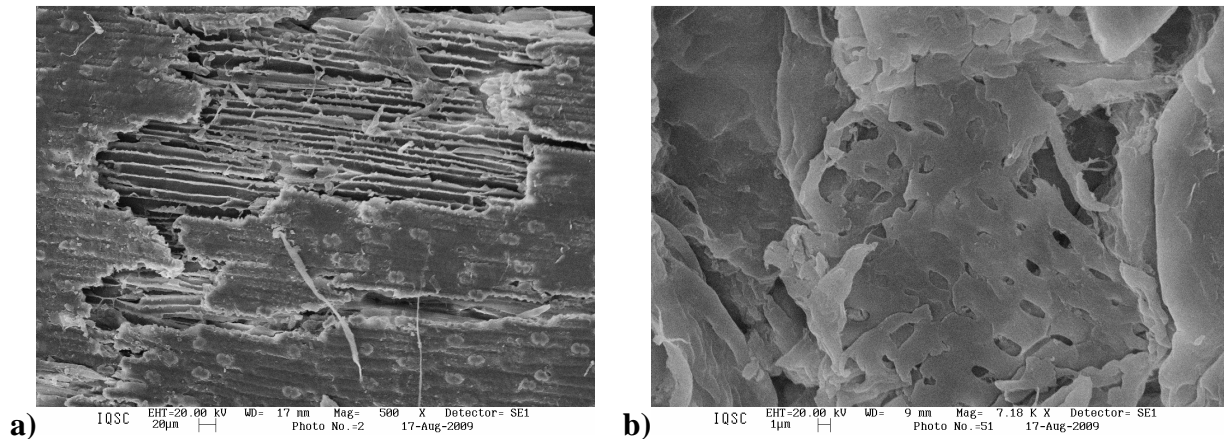


Figura 3.8 – Fotomicrografias do BC após o PT hidrotérmico. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura.

Nas Figuras 3.9 mostram-se as mudanças produzidas no BC quando submetido ao PT ácido. O efeito principal deste tratamento químico consiste na remoção de hemicelulose e a diminuição das ligações lignina-carboidrato catalisadas pelo ácido (HENDRIKS E ZEEMAN, 2009). A micrografia da Figura 3.9a evidencia tecido medular distorcido. A perda parcial da organização celular atingiu partes mais internas do tecido vegetal, a Figura 3.9b mostra uma aproximação da região transversal do tecido vascular fraturado indicado com uma seta branca.

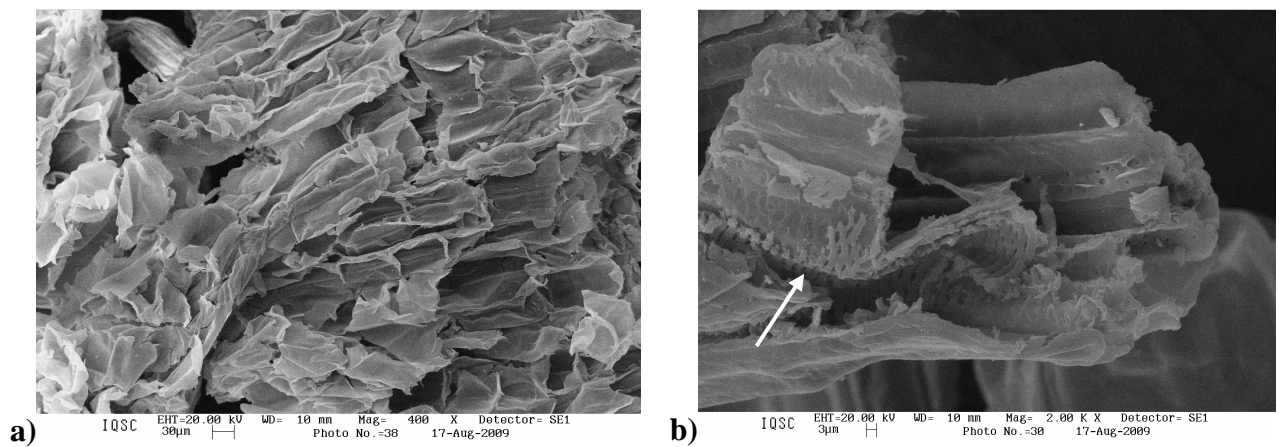


Figura 3.9 – Fotomicrografias do BC após o PT ácido com  $H_2SO_4$ . Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada figura.

Após PT alcalino caracterizado pelas Figuras 3.10 observa-se uma desagregação parcial das microfibrilas dando lugar ao aparecimento de feixes fibrilares de celulose (Fig 3.10a). A remoção parcial da lignina e da hemicelulose já foi associada por Triana et al. (1990) com a diminuição das propriedades mecânicas da celulose no BC. A Fig. 3.10b, representativa do PT com cal, revela partes mais internas de tecido vascular parcialmente distorcido, assim como alguns fragmentos vegetais desprendidos da estrutura inicial.

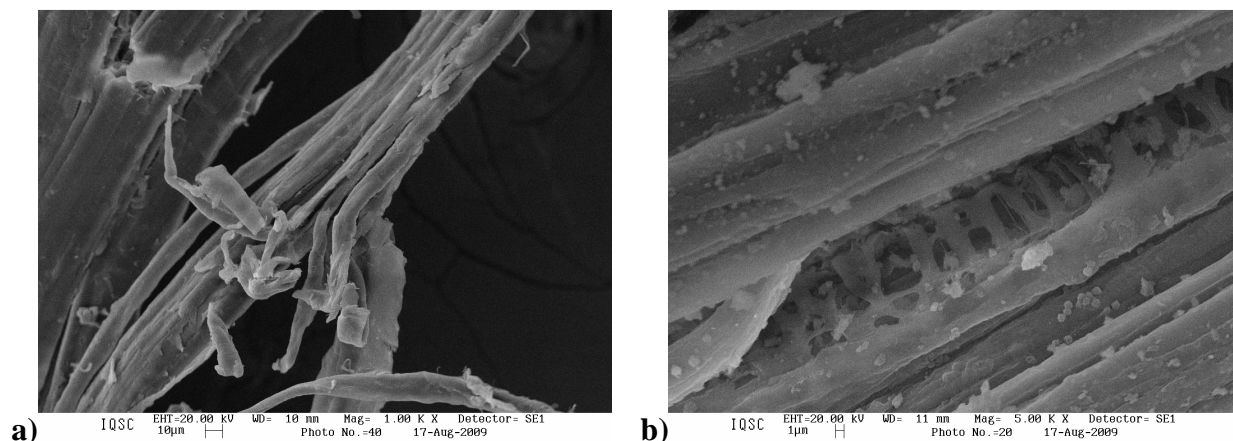


Figura 3.10 – Fotomicrografias do BC após o PT básico a) PT com Na(OH) e b) PT com Ca(OH)<sub>2</sub>. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada Figura.

Finalmente, as micrografias 3.11 ilustram o efeito significativo na microestrutura e morfologia original do BC devido à aplicação conjunta dos PTs ácido e básico. A polpa celulósica remanescente apresenta-se na forma de agregados amorfos corroborando a extensiva solubilização dos componentes que fornecem resistência e rigidez estrutural à biomassa vegetal.

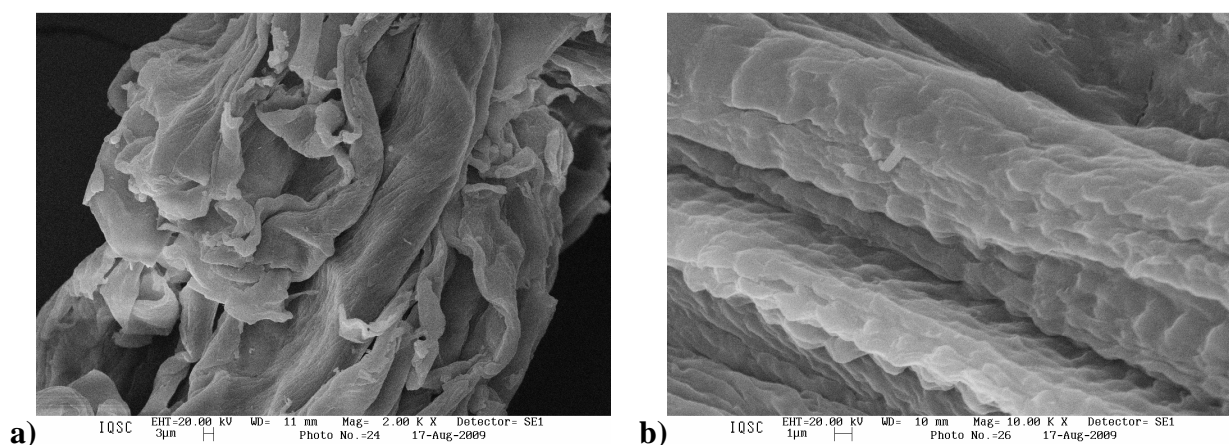


Figura 3.11 – Fotomicrografias do BC após PT combinado. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão apresentados em cada Figura.

No presente trabalho as informações obtidas por MEV foram relevantes em relação às mudanças fisiológicas e morfológicas no BC ocasionadas pelos PTs. Entretanto, a interpretação das fotomicrografias foi dificultada pela elevada heterogeneidade do material em estudo. Neste sentido, vale ressaltar que o conhecimento prévio dos fenômenos envolvidos assim como a correlação com a composição e verificação dos dados inferidos com o uso de outras técnicas são ferramentas relevantes na análise de MEV.

### 3.5.3 Análise da cristalinidade do BC *in natura* e após PTs por DRX

A Figura 3.12 mostra os espectros de DRX do BC *in natura* e após aplicação dos PTs visando o entendimento das mudanças específicas na celulose em nível macromolecular. O espectro inicial do BC *in natura* apresenta uma banda larga como resultado da íntima associação dos componentes celulose, hemicelulose e lignina.

Já os espectros característicos do BC após PTs mostram um deslocamento das bandas com relação ao espectro original do BC e a formação de ombros (ver setas pretas) registrados nos espectros dos PTs hidrotérmico e alcalino com Na(OH) e Ca(OH)<sub>2</sub> (aproximadamente aos 12° e aos 32°). Estas mudanças espectrais podem ser relacionadas com a solubilização de materiais amorfos (hemicelulose e lignina) e com a transformação da celulose em outras formas cristalinas (SAKAKI et al., 1998a,b).

Na espectroscopia de DRX, a macromolécula da celulose é o componente que confere a propriedade mensurável de cristalinidade às fibras lignocelulósicas. A característica espectral que distingue as formas polimórficas da celulose (região cristalina e amorfa) é a diferença nas difrações próximas aos ângulos Bragg (2θ), aproximadamente aos 18° e 22 ° (ver setas rosa nos espectros). Com isto a razão entre suas intensidades pode ser uma medida relativa do IC% como detalhado na seção de material e métodos na Eq. 3.6.

A Tabela 3.5 apresenta os resultados do cálculo para os IC% em cada material. Pode-se observar que o PT hidrotérmico diminuiu ligeiramente o IC% comparando com o restante dos PTs que provocaram um aumento na concentração da celulose cristalina após solubilização dos componentes amorfos (hemicelulose e lignina). Dado que o PT hidrotérmico também registrou remoção da hemicelulose conforme a Tabela 3.4, esta ligeira diminuição pode ser associada com erro de amostragem causado pela heterogeneidade do material. O máximo acréscimo no %IC (~ 15%) foi registrado no tratamento combinado, fato que condiz com as máximas solubilizações dos componentes amorfos na Tabela 3.4. A intensificação dos picos associados com a celulose cristalina no espectro azul da Figura 3.12 indica também que grande parte da celulose remanescente é de natureza cristalina.

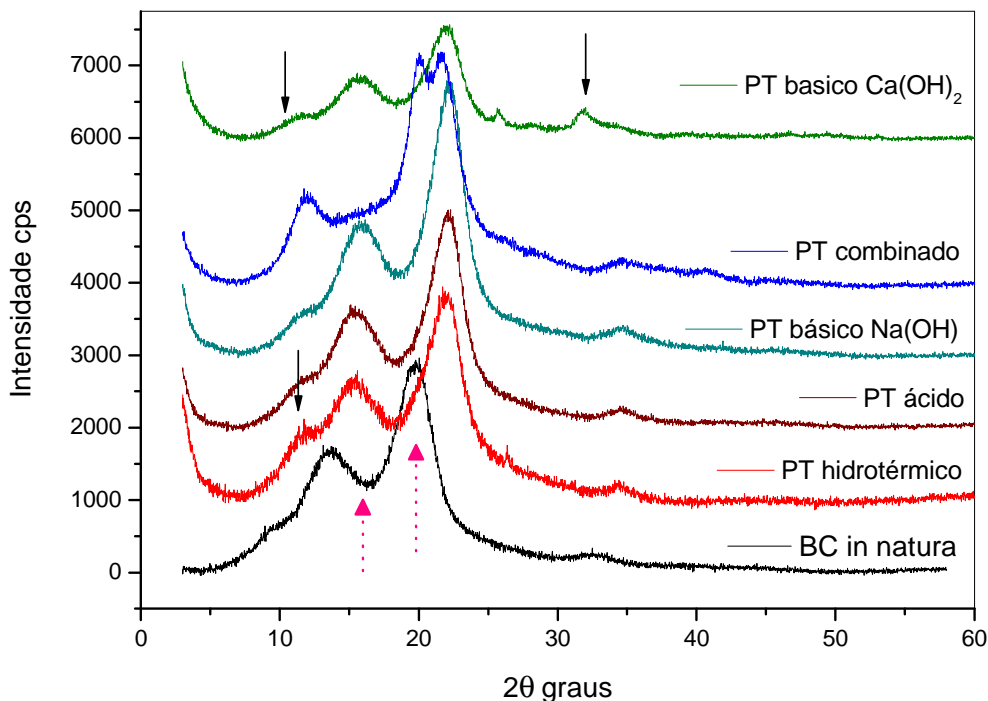

 Figura 3.12 - Difratogramas de raios X das amostras de BC *in natura* e após PTs.

 Tabela 3.5 IC% do BC *in natura* e após PTs.

| <b>Pré-tratamento</b>                   | <b>IC %</b> |
|---|-------------|
| <b>BC <i>in natura</i></b>              | 58,18       |
| <b>PT hidrotérmico</b>                  | 57,95       |
| <b>PT ácido</b>                         | 69,28       |
| <b>PT alcalino c/Na(OH)</b>             | 69,90       |
| <b>PT alcalino c/Ca(OH)<sub>2</sub></b> | 69,12       |
| <b>PT combinado</b>                     | 73,99       |

Embora por mecanismos diferentes tanto tratamentos com elevado pH com a solubilização da lignina quanto tratamentos ácidos com a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas da celulose e remoção da hemicelulose originam a concentração de celulose cristalina (CAO e TAN, 2002; ZHAO et al., 2008; ALVIRA et al., 2010). Além disso, vários autores explicam também o aumento no IC% pela transformação de celulose nativa tipo I em celuloses cristalinas dos tipos II-IV quando os materiais são submetidos a procedimentos de conversão termoquímica em altas temperaturas (ATALLA e VANDERHART, 1999). A forma triclinica é parcialmente convertida na forma monoclinica, mais estável e resistente à alterações durante vários processos de conversão (HORII, 2001). O IC% é estudado como parâmetro decisivo em processos de bioconversão e é inversamente relacionado com a susceptibilidade da celulose à degradação enzimática. Estes postulados serão elucidados quando os materiais pré-tratados forem utilizados como substratos na fermentação. No



entanto, acredita-se que o aproveitamento fúngico seja dificultado em situações de maior organização da celulose remanescente.

### 3.5.4 Análises de FTIR no BC in natura e após PTs

Informações estruturais sobre os grupos funcionais presentes na biomassa vegetal podem ser derivadas a partir da aplicação da espectroscopia de infravermelho. No entanto, os espectros resultantes do BC antes e após PTs apresentam bandas espectrais sobrepostas como pode-se observar na Figura 3.13, tornando difícil uma correlação individual de cada banda com um grupo funcional específico.

Contudo o conhecimento prévio da ocorrência de estruturas químicas tais como alquenos, ésteres, anéis aromáticos, cetonas e álcoois e seu deslocamento de absorção característico possibilitam a atribuição de diferentes regiões espectrais aos componentes majoritários da biomassa (KRISTENSEN et al., 2008). Assim, podem ser inferidas mudanças estruturais na celulose, hemicelulose e lignina do BC em estudo após PTs (Figura 3.13).

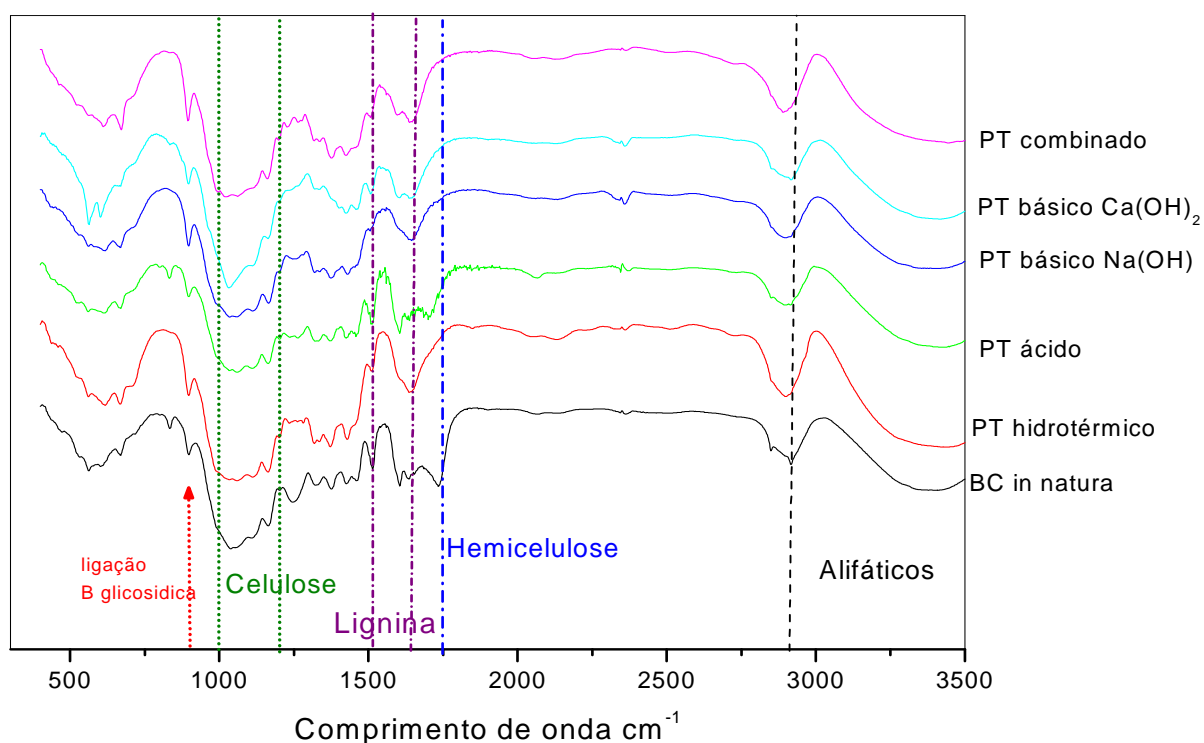


Figura 3.13 – Espectros do FTIR correspondentes ao BC *in natura* e após PTs. Com isto, a banda larga situada em torno de 3200 na região de estiramentos de OH pode ser correlacionada com a presença de álcoois e fenóis com ligação de H. A banda registrada entre 2850 e 2920  $\text{cm}^{-1}$  (estiramentos  $\text{CH}_2$ ) no espectro do BC *in natura*, foi-se atenuando quando comparado com os outros espectros. Esse fato pode ser relacionado com a redução nas

frações alifáticas simples constituídas pelos extrativos como resinas e ceras, componentes iniciais no material sem PT (ZHANG, 2008).

A região entre 1200 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  é correlacionada com os vários grupos funcionais dos carboidratos (celulose e hemicelulose). A sobreposição de bandas é atribuída a presença de estiramentos C–O–H de álcoois primários e secundários em 1064  $\text{cm}^{-1}$ , os estiramentos de ligações glicosídicas C–O–C são detectados a 1160  $\text{cm}^{-1}$  e as vibrações aromáticas C–O–C a 1100  $\text{cm}^{-1}$ .

Já a banda a 910  $\text{cm}^{-1}$ , dominada principalmente pelas ligações  $\beta$ -(1-4) glicosídicas, tornou-se mais aparente após tratamentos químicos, confirmando a concentração da celulose (ZHAO et al., 2008, HSU et al., 2010).

Os sinais registrados a 1725  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a estiramentos C=O, vibrações de ácidos carboxílicos e cetonas, nas poliooses. Seu desaparecimento após aplicação dos PTs é devido a sua maior susceptibilidade físico-química da hemicelulose (KUMAR et al., 2009).

Por outro lado, bandas representativas de compostos fenólicos entre 1610 e 1516  $\text{cm}^{-1}$ , foram reduzidas em maior proporção nos PTs alcalinos e combinado confirmando a solubilização parcial da lignina (ALVIRA et al., 2010). Isto é confirmado pelo fato de que sua recalcitrância pode ser derivada da presença de alguns compostos aromáticos secundários depositados no material pré-tratado (HENDRIX E ZEEMAN, 2009).

Afinal, os conceitos acima discutidos são resultados de inferências, devido às poucas variações encontradas nos espectros do BC in natura e pré-tratados. Além do mais, a correlação com as mudanças nos constituintes foi apenas de caráter qualitativo.

Apresenta-se assim a grande necessidade de calibração da técnica através do desenvolvimento de modelos matemáticos preditivos visando correlações de caráter quantitativo. A viabilização no uso de técnicas espectroscópicas em substituição aos métodos convencionais de análise da biomassa lignocelulósica depende destes quesitos.

### 3.5 FES para produção de celulases

Como etapa final na avaliação dos efeitos dos PTs no BC, foram realizadas fermentações em estado sólido (FES) usando uma linhagem de *A. niger*, determinando desta maneira seu potencial como substrato para a efetiva indução enzimática de celulases.

A Figura 3.14 apresenta as atividades enzimáticas obtidas em cada material pré-tratado após 72 horas de fermentação. Pode-se observar que o *A. niger* consegue degradar as diferentes amostras de BC, usando este material como fonte de carbono para o crescimento e

síntese metabólica. No entanto, existem algumas diferenças quanto seu potencial indutivo evidenciadas na variabilidade da produção das enzimas componentes do complexo celulolítico (FPase, CMCase e xilanase).

Apesar de que os PTs têm sido extensivamente aplicados no BC com o intuito de melhorar a digestibilidade e facilitar o acesso ao ataque microbiano (AIELLO et al., 1996; KURAKAKE et al., 1991), as atividades resultantes nos BC pré-tratados não foram maiores que as observadas no BC *in natura*.

Uma das interpretações é que todos os PTs químicos envolveram a geração de substâncias tóxicas com conhecidos efeitos prejudiciais para o metabolismo fúngico. A sua presença por outro lado demonstra a resistência dos mesmos frente os tratamentos de lavagem tornando indispensáveis os procedimentos de detoxificação. Além disso, as maiores porosidades produzidas como consequência da remoção de componentes pode ter ocasionado fenômenos de absorção enzimática no substrato celulósico (SUTCLIFFE e SADDLER, 1986; CHERNOGLAZOV et al., 2008).

Conforme o observado, as melhores produções foram obtidas no BC submetido ao PT hidrotérmico indicando sua maior eficiência na indução e expressão de celulases pelo *A. niger*. A parcial solubilização da fração hemicelulósica observada na análise da composição favoreceu a redução da recalcitrância total da lignocelulose. Adicionalmente, as análises de MEV indicaram abertura de microporos e o fracionamento parcial das fibras celulósicas fornecendo assim um substrato com maior área superficial e características estruturais apropriadas para a aderência e penetração de hifas que são componentes fisiológicos dos fungos filamentosos como o *A. niger*.

No entanto, as atividades de CMCase (endoglucanases) produzidas em BC pré-tratado com ácido foram bastante próximas aos valores máximos. Segundo a análise química do BC após PT ácido houve uma grande solubilização da hemicelulose nos seus açúcares componentes (xiloses, arabinoses, etc); frações podem ter sido adsorvidas entre a estrutura fibrilar distorcida observada por MEV. Os fragmentos de xilana de baixa massa molar representam fontes de carbono de fácil utilização pelos microorganismos, conseguindo-se com isto a efetiva indução na biosíntese de endoglucanases e xilanases (SAHA e BOTHAST, 1999; KULKARNI et al., 1999).

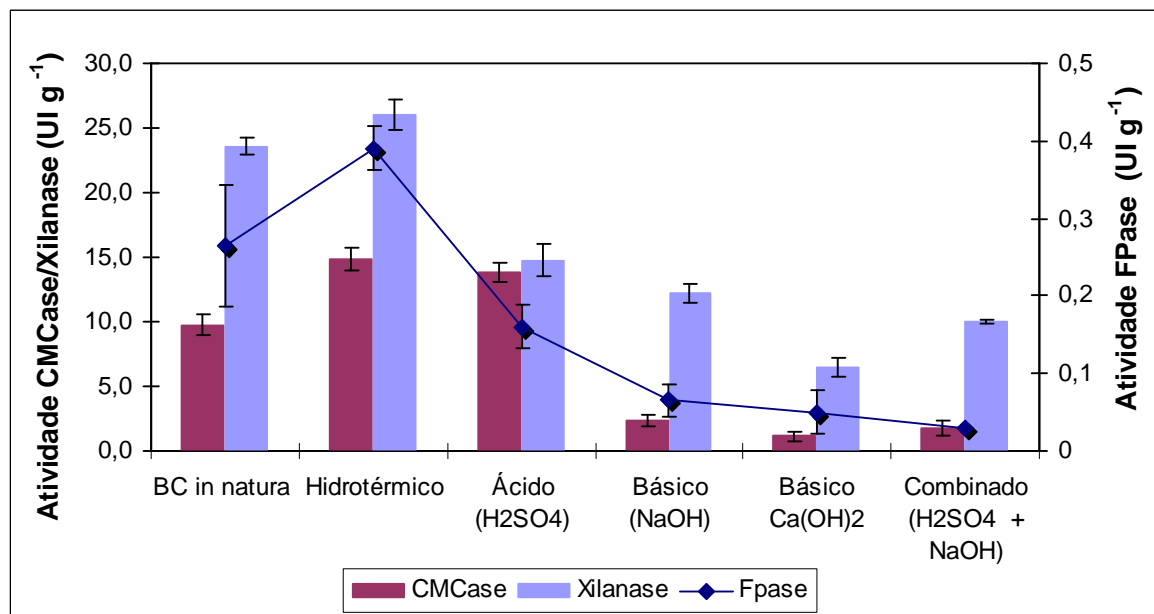


Figura 3.14 – Produtividades enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase após 72 h de FES com *A. niger*.

As menores atividades registradas nos substratos pré-tratados com alcalis sugerem que apesar da desestruturação das microfibras por MEV e a expressiva solubilização de lignina pelas análises químicas, o incremento no %IC da celulose remanescente diminuiu significativamente seu potencial como fonte de carbono microbiano. De forma complementar, Berggren et al. (2003); Knill e Kennedy (2003) observaram a ocorrência de reações de “peeling” após tratamento com Na(OH), as quais retiram unidades terminais de açúcares redutores das cadeias de polissacarídeos, eliminando desta maneira fontes indutoras de celulases. Além do mais, o PT combinado, que forneceu o substrato com a máxima concentração de celulose cristalina, produziu as menores atividades de FPase, dando relevância à cristalinidade como característica determinante no sucesso da FES.

Por outro lado conforme observado nas micrografias, o colapso da estrutura original e a promoção de uma estrutura aglomerada teria efeitos negativos na oxigenação microbiana, inibindo neste sentido a formação de hifas, organelos indispensáveis na colonização fúngica do substrato. Demonstra-se com isto, que processos excessivamente drásticos têm efeitos negativos no potencial de utilização do BC como substrato indutor do *A. niger* visando a síntese e expressão de celulases.

Por outro lado a Figura 3.14 também exhibe as xilanases como as enzimas com maiores produtividades no BC antes e após PTs. De acordo com Olsson et al. (2003) estas enzimas podem ser efetivamente induzidas na presença tanto de celulose quanto da xilana. Além do mais Erickson (1990); Kulkarni et. al. (1999) e Fasanella (2008) citaram o BC como indutor

natural de celulases e xilanases, como resultado da sinergia de várias vias metabólicas para degradação de lignina e celulose.

Finalmente os resultados obtidos na presente etapa nos levam a considerar a viabilidade do emprego de BC na sua forma íntegra, ou com um PT pouco severo, uma vez que as atividades enzimáticas são expressas razoavelmente no BC *in natura* ou com PT hidrotérmico. Esta possibilidade aponta para um grande potencial industrial devido à diminuição dos custos de produção, minimização de resíduos tóxicos e utilização de condições operacionais sustentáveis, não sendo necessário o uso de reagentes químicos nem condições operacionais severas que inviabilizam o processo final.

### **3.6 CONCLUSÕES**

- Entre os substratos avaliados como potenciais fontes de carbono e energia para o *A. niger*, o bagaço de cana-de-açúcar (BC) submetido à pré-tratamento hidrotérmico apresentou as maiores produtividades em relação à FPase, CMCase e xilanase (0,39 UI g<sup>-1</sup>; 14,87 UI g<sup>-1</sup> e 26,07 UI g<sup>-1</sup> respectivamente), demonstrando sua eficiência como substrato indutor de celulases. Além disso, desde o ponto de vista econômico e ambiental o processo mostra-se como uma alternativa viável para a efetiva redução dos custos globais da produção de enzimas celulolíticas.
- O tratamento hidrotérmico forneceu um substrato sem mudanças significativas na composição química em relação ao BC *in natura*, a celulose remanescente aumentou em 13% como consequência de uma solubilização de 19% da hemicelulose. No entanto, pode-se observar através da microscopia, um significativo aprimoramento das características estruturais com a maior exposição de porções fibrilares e a formação de regiões microporosas. As alterações produzidas beneficiam a digestibilidade do substrato influenciando positivamente a capilaridade, necessária tanto para uma efetiva absorção e hidratação com o meio de complementação quanto para uma adequada oxigenação e desenvolvimento microbiano.
- Por outro lado todos os pré-tratamentos ocasionaram, em maior ou menor grau, a solubilização da celulose, mostrando que os parâmetros escolhidos no estudo foram excessivamente intensivos para fins biotecnológicos. A significativa degradação da celulose produzida pelos pré-tratamentos foi conferida através do aumento no índice de cristalinidade por DRX e pelas menores produtividades enzimáticas obtidas na

fermentação. Assim, a variabilidade na produção enzimática pode sugerir também às diferentes proporções na geração de compostos tóxicos para o microorganismo produtor. Com isto, demonstra-se a importância das etapas de lavagem e detoxificação após pré-tratamento visando à completa remoção destes compostos inibitórios.

- O pré-processamento baseado no tratamento hidrotérmico do BC foi o escolhido para o *upstream* do processo de produção de celulases específicas por FES devido a seu elevado potencial de utilização determinado nesta etapa. Este potencial será desenvolvido nos capítulos subseqüentes, mediante o enriquecimento e otimização do meio de FES, dada à dependência direta entre a produção de celulases e as fontes de carbono e nitrogênio disponíveis.
- A caracterização dos efeitos produzidos pelos pré-tratamentos no BC *in natura* foi imprescindível no esclarecimento da sua influência no crescimento do *A. niger* e produção do complexo celulolítico. Características na composição química, como a presença de fragmentos de baixa massa molar, induziram a síntese enzimática, no entanto, efeitos antagônicos de inibição foram consequência da geração de substâncias tóxicas. Paralelamente, propriedades no BC como a natureza cristalina da celulose, disponibilidade da área superficial e porosidade apresentam-se como determinantes nos processos fermentativos em estado sólido.
- Os resultados alcançados através de ferramentas analíticas de caracterização mostram sua relevância no conhecimento das propriedades da lignocelulose como matéria-prima para diversos processos biotecnológicos. Neste contexto o aperfeiçoamento das técnicas espectroscópicas visando à análise quantitativa torna-se necessário para o entendimento destes processos de forma rápida e precisa. A apropriada quantificação espectroscópica permite também avaliações antecipadas de processos e operações, assim como a geração de bancos de dados confiáveis para a proposição de arranjos tecnológicos com máximas produtividades e menor geração de resíduos, eficientes e ambientalmente sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

- ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*. v. 57, p. 67-72, 2004.
- ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, v. 62; p. 6-10; 2005.
- AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline pretreatment at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 13-16, 1996.
- AKERHOLM, M.; HINTERSTOISSER, B.; SALMÉM, L. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, v. 339, 2004.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- ARIN, G.; DEMIRBAS, A. Mathematical modeling the relations of pyrolytic products from lignocellulosic materials. *Energy Sources*. v. 26:p. 1023–1032, 2004.
- ATALLA, R.H.; VANDERHART, D.L. The role of solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State NMR*, v.15, p. 1-19, 1999.
- BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. In: *Workshop Tecnológico sobre Hidrólise de Material Lignocelulósico. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas*. 3., 2006, Palestra... Campinas: UNICAMP, 2006.
- BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRÖN, M. Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength, *Carbohydrate Polymers*. v. 51, p. 255–264, 2003.
- BERLIN, A.; MAXIMENCO, V., GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 97, p. 287–296, 2007.
- (Adaptado de ALVIRA et al., 2010).
- BOUSSARSAR, H., ROGÉ, B., MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresources Technology* v.100, p. 6537-6542, 2009.
- CAMASSOLA, M., DILLON, A.J.P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops Production*. v. 29, p. 642–647, 2009.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*, v.337, p. 1291-1296, 2002.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 4754–4766, 2010.
- CASTELLAN, A.; GRELIER, S.; KESSAB, L.; NOURMAMODE, A.; HANNACHI, Y. Photophysics and photochemistry of a lignin model molecule containing a-carbonyl guaiacyl and 4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol moieties. *Journal of Chemical Society*, v. 2, p. 1131-38, 1996.
- CASTRO, M.A. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, 2006.

- Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2006. 212p.
- CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC, 2010. Características físicoquímicas do bagaço de cana-de-açúcar . Disponível em: <[http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com\\_content&view=article&id=370&Itemid=1325](http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=370&Itemid=1325)>. Acesso em: jul 2010.
- CHANDRA, R.P., BURRA, R., MABEE, W.E., BERLIN, A., PAN, X., SADDLER, J.N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. v. 108, p. 67–93. 2007.
- CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M. Fundamentals factors affecting biomass reactivity. *Applied Biochemistry and . Biotechnology*, v. 84–86, p. 5–37, 2000.
- CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recover process. *Biochemical Engineering Journal*. v. 38, p. 105–109, 2008.
- CHERNOGLAZOV, V. M.; ERNOLOVA, O. V ; KLYOSOV, A. A. Adsorption of high purity endo,1,4-fl-glucanases from *Trichoderma reesei* on components of lignocellulosic materials: cellulose, lignin and xylan. *Enzyme Microbial Technology*, v. 10, p. 503-507, 2008.
- COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.
- CUNHA, M.A.A.; SOLVA, S.S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J.C. Uso de células imobilizadas em gel PVA: uma nova estratégia para a produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Ciências Agrárias, Teresina*, v. 26, p. 61-70, 2005.
- CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 937-941, 2002.
- DIAS, M.O.S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSELL, C.E.V; WOLF MACIEL, M. R. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process, *Chemical Engineering Research and Design*, v. 87, p. 1206-1216, 2009.
- DEPARTMENT OF ENERGY U.S. – DOE, 2006. Breaking the biological barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda, DOE/SC-0095. US Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. Disponível em: <http://catalogue.nla.gov.au/Record/4612972>. Acesso em: jul de 2009.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia ambiental*, Jaguariúna: (CNPQ/EMBRAPA ED), 1997, p. 269-292.
- ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Endo-1,4-β-glicosidase of *Sporotrichum pulverulentum*. *Methods in Enzymology*, San Diego, v.160, p. 368-382, 1988.
- FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE Y.-H. In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*, Springer, Berlin, 1987.
- FARINAS, C.S.; MARTIN-NETO, L.; GIORDANO, R.C. Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol. In: *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. Editora Blucher, São Paulo, 2010.



- FASANELLA, C.C. Ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008. 80p: Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions, Walter de Gruyter, Berlin. 1989.
- GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, v. 74, p. 78–88, 2006.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analyses, apparatus, reagents, procedures and some applications. Washington, DC: USDA, 1970. 20 p. (USDA. Agricultural handbook, 379).
- HAMES, B.R.; THOMAS, S.R.; SLUITER, A.D.; ROTH, C.J.; TEMPLETON, D.W. Rapid Biomass Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 5-16, 2003.
- HATAKKA A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 13, p. 125-135, 1994.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.100, p.10–18, 2009.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A., TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresources Technology*, v. 100, p. 1238–1245, 2009.
- HESELTINE, C. W. Solid fermentation. *International Biodeterioration*, v.23, p. 79-89, 1987.
- HIMMEL, M.E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, v. 315, p. 804-807, 2007.
- HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8940-8948, 2008.
- HORII F. 2001. Structure of Cellulose: Recent Developments in its Characterization. In: HON D.N.-S. AND SHIRAIISHI N. (Eds.), *Wood and Cellulosic Chemistry*, Dekker, New York, p. 83 – 107.
- HSU, T.C; GUO, G.L.; CHEN, W.H. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4907-4913, 2010.
- INSTITUTO CUBANO DE LÃS INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR – ICIDCA, 1990. Manual de los Dervados de la caña de azúcar. México: CEPLACEA, 1990, 447p.
- KELLER, F.A.; HAMILTON, J.E.; NGUYEN, Q.A. Microbial pretreatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105–108, p. 27–41, 2003.
- KIRK, T.K., SCHULTZ, E., CONNORS, W.J., LORENZ, L.F., ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on linin metabolism by *Phanerochaete chysosporium*. *Archives of Microbiology*, v. 117, p. 277–285, 1978.
- KNILL, C.J.; KENNEDY, J.F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 51, p. 281–300, 2003.
- KRASSIG, H.A. Cellulose: structure, accessibility and reactivity. Yverdon, Switzerland: Gordon e Breach, 1993.

KRISTENSEN, J.; THYGESEN, L.; FELBY, C.; JORGENSEN, H.; ELDER, T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol Biofuels.*, v. 1, p. 1754-6834, 2008.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C.E. Physical and chemical characterization of corn stover and polar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3948–3962, 2009.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, L. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, p. 411-456, 1999

KURAKAKE, M.; OOSHIMA, H.; HARANO, Y. Pretreatment of bagasse by UCT-solvent for the enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.27, p. 11-121, 1991.

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

LI, X., KONDO, R., SAKAI, K. Biodegradation of sugarcane bagasse with marine fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Journal of Wood Science*, v. 48, p. 159–162, 2002.

LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.42, p.5409–5416, 2003.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*. v. 95, p. 391–414, 1969.

MARTÍN, C.; KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 40, p. 426–432, 2007.

MARTIN-NETO, L.; VAZ, C.M.P.; CRESTANA, S. (Eds) *Instrumentação avançada em ciência do solo*. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP, ISBN: 85-86463-14-0. 438 p. 2007.

MCDONOUGH, THOMAS J. Recent advances in bleached chemical pulp manufacturing technology Part 1: extended delignification, oxygen delignification, enzyme applications, and ECF and TCF bleaching. *Tappi journal*, v. 78, p. 55-62, 1995.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.96, p.673–686, 2005.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY - NREL. Laboratory Analytical Procedures – LAP 010 Standard Test Method for Determination of Ash in Biomass. Disponível em <<http://devafdc.nrel.gov/pdfs/9578.pdf>>. Acesso em 30 mar. 2008.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources, *Progress in Energy and Combustion Science*. in press doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY - NREL. Laboratory Analytical Procedures LAP - 012. Standard Test Method for Moisture, Total Solids, and Total Dissolved Solids in Biomass Slurry and Liquid Process Samples. Disponível em <<http://devafdc.nrel.gov/pdfs/9578.pdf>>. Acesso em 30 mar. 2008.

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

- OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T.M.I.E.; HANSEN, K.P.; PALMQVIST, E.A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 612-619, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PASQUINI, D.; PIMENTA, M.T.B.; FERREIRA, L.H.; CURVELO, A.A.S. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO<sub>2</sub> associated with co-solvent 1-butanol/water. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 125-131, 2005a.
- PASQUINI, D.; PIMENTA, M.T.B.; FERREIRA, L.H.; CURVELO, A.A.S. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, p. 31-39, 2005b.
- PENG, F.; REN, J.L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R.C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 6305-6317, 2009.
- PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. 2007. 142p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science*, v. 161 p. 144-166, 1996.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, p. 174-188, 1998.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, p.863-871, 2003.
- REZAYATI-CHARANI, P.; MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J.; HASHEMI, S.J.; KAZEMI-NAJAFI, S. Influence of dimethyl formamide pulping of bagasse on pulp properties. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2435-2442, 2006.
- RODRIGUEZ-CHONG, A.; RAMIREZ, J.A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 143-152, 2004.
- ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.47, p.54-63, 2008.
- RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, p. 841-845, 2008.
- SADDLER, J. N.; RAMOS, L. P.; BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. *Biotechnology Agricultural Series*, v. 9, p. 73-91, 1993.
- SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.76, p.65-77, 1999.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v.40, p. 3693-3700, 2005.
- SAKAKI, T.; SHIBATA, M.; MIKI, T.; YASUDA, S.; HIROSUE, H.; HAYASHI, N. Saccharification of cellulosic biomass with hot compressed water and alcohol fermentation. *Nippon Energy Gakkaishi*, v.77, p. 241-247, 1998a.
- SAKAKI, T.; SHIBATA, M.; MIKI, T.; HIROSUE, H. Oligosaccharification of cellulose using a hot-compressed-water flow type reactor and enzymatic hydrolysis of formed oligosaccharide. *Nippon Energy Gakkaishi*, v.77, p. 1111-1115, 1998b.

- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresources Technology*, v. 99, p. 5270–5295, 2008.
- SARKANEN, S.; RAZAL, R.A.; PICCARIELLO, T.; YAMAMOTO, E.; LEWIS, N.G. Lignin peroxidase: Toward a clarification of its role in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266 p. 3636-3643, 1991.
- SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E.; CONRAD, C.M.: An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*; v. 29, p. 786-794, 1959.
- SENDELIUS, J. Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production, Master of Science Thesis. Lund University, Sweden. 2005.
- SILVA, D. J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: Ed. UFV, 1998. 166p.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Química Nova*, v.32, p.661-671, 2009.
- STEVENSON, F. J. *Humus Chemistry: genesis, composition, reactions*, 2. ed. New York: John Wiley, p. 496, 1994.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1 – 11, 2002.
- SUN, J.X.; ZHAO, H.; SUN, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, v. 84, p. 331-339, 2004.
- SUTCLIFFE, R.; SADDLER, J. N. The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p. 749-762, 1986.
- TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G.; PEÑA, E. *Atlas del Bagaço de Caña de Azúcar*. Cuba. GEPLACEA/ICIDCA. México, 1990.
- TUCKER, M.P.; NGUYEN, Q.A.; EDDY, F.P.; KADAM, K.L.; GEDVILAS, L.M. WEBB, J.D. Fourier Transform Infrared Quantitative Analysis of Sugars and Lignin in Pretreated Softwood Solid Residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.51, p. 91–93, 2001.
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists*, v.46, p.829-835, 1963.
- VARGAS BETANCUR, G.J., 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, p. 1-9, 2010.
- VITTI, L.S.S. Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana. 1988. 108p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.
- WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, v. 7, p.1001-1013, 1995.
- YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, v.22, p. 46–60, 2008.
- ZAKIS, G.L. *Functional Analysis of Lignins and Their Derivatives*. Tappi Press, Atlanta, GA, 1994.
- ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, p. 797-824, 2004.
- ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.367–375, 2008.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, p.950-956, 2008.

ZHUANG, J.; MARCHANT, M.A; NOKES, S. E. STROBEL, H J. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*, v. 23, p. 679-687, 2007.

## **CAPITULO 4. CELULASES ESPECÍFICAS A PARTIR DE BAGAÇO DE-CANA-DE-AÇÚCAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO – DESENVOLVIMENTO DO BIOPROCESSO**

---

### **4.1 INTRODUÇÃO**

O bioetanol derivado da biomassa lignocelulósica pode contribuir para a solução da dependência mundial pelas fontes de energia fóssil. Neste sentido, os biocombustíveis de 2<sup>a</sup> geração se mostram como alternativas energéticas promissoras, pois utilizam fontes renováveis como matéria prima sem a competição pelo uso da terra com fins alimentares. A sua sustentabilidade é ainda validada com a diminuição da emissão dos gases do efeito estufa, pois quando presente em 10% na mistura com gasolina tem se relatado que o etanol reduz efetivamente de 3-6% à emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera (NOVOZYMES, 2010).

No mundo são produzidas anualmente cerca de 6,0 bilhões de toneladas de lignocelulose na forma de resíduos agroindustriais (FAOSTAT, 2010). No contexto nacional, somente a indústria de açúcar e álcool gera 195 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar por ano, parte do qual é queimado de forma ineficiente em usinas para cogeração de energia. Apesar disso, existe um excedente de 12-50% disponível para conversão em etanol celulósico. Com este objetivo, a rota enzimática tem se apresentado como uma tecnologia vantajosa visando à adequada e eficiente bioconversão da lignocelulose em seus componentes.

Entre os desafios para que a hidrólise enzimática seja comercializada, pode-se citar o alto custo das enzimas celulases. O desenvolvimento de processos eficientes e otimizados para a produção de enzimas em escala industrial é fundamental para garantir a viabilidade econômica e a concretização da produção de etanol de segunda geração (FARINAS et al., 2010).

Na produção de celulases microbianas, podem ser usados processos fermentativos como a fermentação submersa (FSm) ou a fermentação em estado sólido (FES). Grande parte dos avanços na produção de celulases microbianas foi desenvolvida para FSm, no entanto, o crescimento de fungos filamentosos produtores de celulases ocorre naturalmente em condições similares à FES (SINGHANIA et al., 2009). Existem outras vantagens inerentes aos processos em estado sólido como a maior produtividade nos extratos enzimáticos, menor

susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (SINGHANIA et al., 2010; RAIMBAULT, 1998). Sob o ponto de vista ambiental, são produzidos menores volumes de efluentes, além de que o processo é adequado para a utilização de resíduos agroindustriais (bagaço de cana, farelo de trigo, entre outros) como próprio substrato, servindo estes como fontes de carbono e energia.

Entretanto na FES, como em qualquer processo biotecnológico, tanto os parâmetros que afetam a síntese enzimática quanto a melhora na produtividade devem ser sempre investigados, pois variam e são específicos para cada ecossistema formado pelo microrganismo e o substrato usado (CASTRO, 2006). Assim, o presente capítulo apresenta um estudo das variáveis e condições adequadas para a produção enzimática de celulases por FES com o fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

O bioprocesso estudado tem o bagaço de cana-de-açúcar como substrato alvo do desenvolvimento visando à especificidade das enzimas na hidrólise do mesmo. Ferramentas de planejamento estatístico auxiliaram na busca dos fatores significativos e melhores condições de formulação do meio de suplementação de nutrientes para o substrato e sequencialmente foi aplicado em experimentos descritos no Capítulo 5, onde foram realizadas FES em biorreator instrumentado de colunas.

## **4.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.2.1. Enzimas do complexo lignocelulolítico**

As enzimas são moléculas protéicas que atuam como catalisadores biológicos capazes de diminuir a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto (ILLANES, 1994).

As celulases constituem-se como um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise, sendo assim classificadas como hidrolases. Essas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais, a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO E PEREIRA, 2010). As massas molares das celulases abrangem um amplo intervalo (34 a 250 kDa), pois podem ser sintetizadas como monômeros ou na forma de estruturas quaternárias constituídas por várias unidades peptídicas.

A estrutura das celulases é majoritariamente constituída por uma sequência complexa e específica de aminoácidos, que pode ser dividida em três regiões:

- O domínio catalítico (DC), a parte da molécula onde a catálise ocorre efetivamente, abrangendo cerca de 90% do número total de aminoácido da sequência peptídica;
- A região de ligação (RL), que contém uma pequena quantidade de aminoácidos altamente glicosilados, cuja função é ligar o domínio catalítico a uma terceira região constituída pelo módulo de ligação a carboidratos (MLC).
- Os MLCs são pequenos polipeptídeos estáveis que podem conter de quarenta a cento e vinte aminoácidos e são localizados, contiguamente, na cadeia de aminoácidos da enzima. As principais funções dos MLCs são: (1) manter a enzima próxima à superfície do substrato de forma a aumentar a taxa de degradação do polissacarídeo, (2) aumentar a especificidade da enzima na atuação de regiões seletivas da molécula do substrato e, (3) romper interações químicas da cadeia do substrato, especialmente se essa apresentar-se com elevada cristalinidade (LYND et al., 2002).

Outras enzimas componentes do complexo celulolítico são as xilanases, cuja presença é de elevada relevância, tendo em vista que sua principal função é a desestruturação das fortes ligações cruzadas entre a hemicelulose e as microfibrillas da celulose na parede vegetal através da hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose) (LYND et al., 2002). Além disso, sendo que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente, xilana), a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbiais específicas como as xilanases. (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993).

#### **4.2.2 Classificação e mecanismos de ação das celulases**

O mecanismo geral das celulases é realizado por meio da clivagem das ligações  $\beta$ -1-4 glicosídicas, mas dependendo do seu sítio de ação na celulose, elas têm sido divididas em três grandes grupos:

i) Endoglucanases (EGases): são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise, pois quebram randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica. A liberação de oligossacarídeos e a produção de novos terminais permitem a rápida



solubilização do polímero celulósico por meio da redução do grau de polimerização (SCHULEIN, 2000).

ii) Exoglucanases (ExGases): constituídas pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs), catalisam a hidrólise nos terminais da fibra celulósica e promovem a quebra de oligossacarídeos formados na celobiose (LYND et al., 2002). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo produto de hidrólise que é a celobiose (AWAFO, 1997).

iii)  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ Gases): As  $\beta$ -glicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002). Assim como as celobiohidrolases, também são relatadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997).

A Figura 4.1 apresenta esquematicamente a ação de cada uma delas sobre as cadeias de celulose. Cada enzima do complexo celulolítico é incapaz de hidrolisar individualmente a celulose de maneira eficiente, sendo necessária à ação complementar e sinérgica do complexo global. Quando atuam em conjunto, as celulases apresentam um melhor rendimento que a soma dos rendimentos individuais. Lynd et al., 2002 descrevem três formas de sinergia:

1. Sinergia EGases-ExGases. As endoglucanases, ao atuar nas regiões amorfas da fibra, disponibilizam terminais redutores e não redutores para atuação das CBHs;
2. Sinergia ExGases-ExGases. As CBHs atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação das endoglucanases;
3. Sinergias ExGases- $\beta$ Gases e EGases- $\beta$ Gases. As celobiohidrolases e endoglucanases liberam respectivamente celobiose e oligossacarídeos para serem substratos das  $\beta$ -glicosidases.

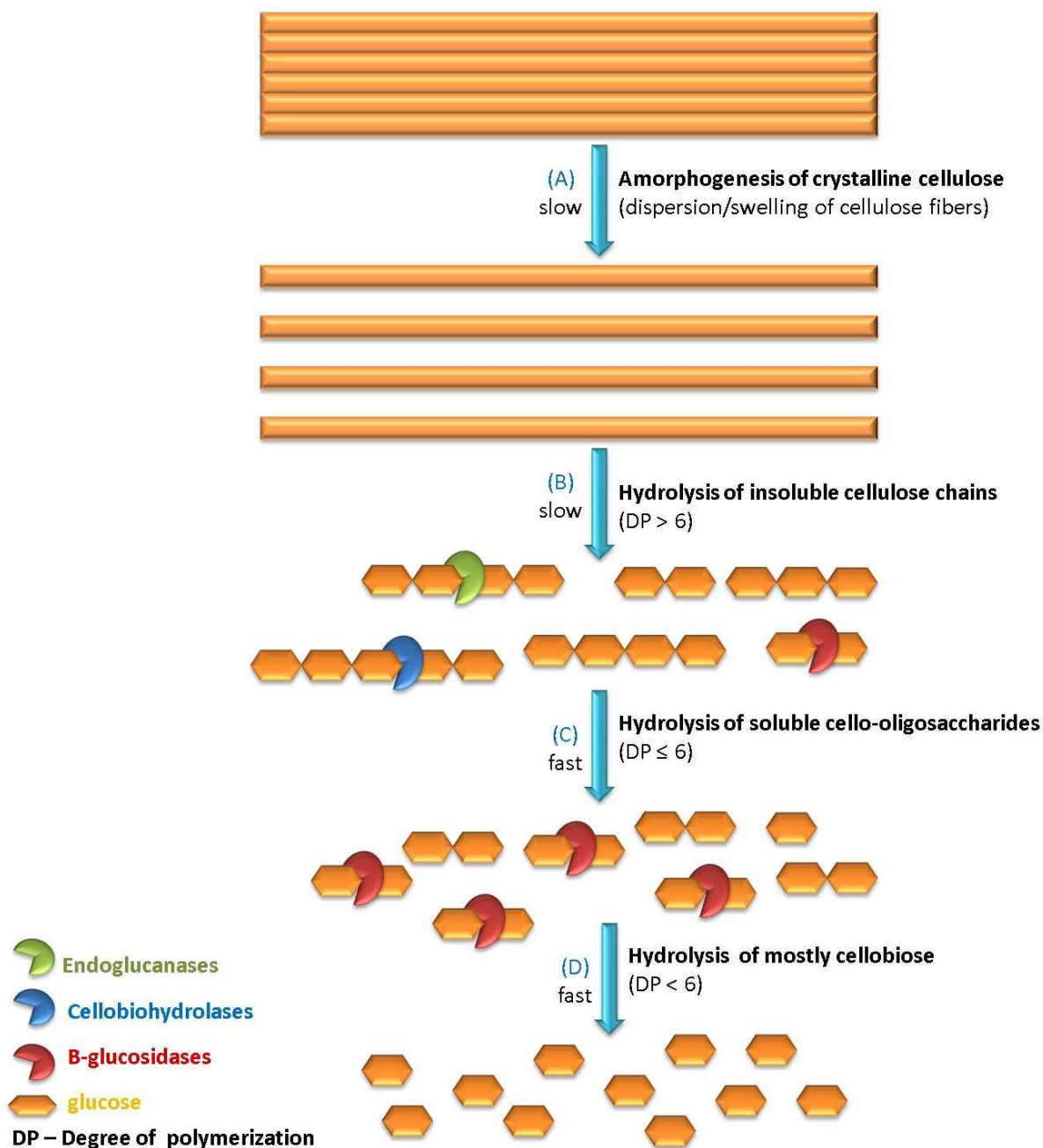


Figura 4.1 - Hidrólise enzimática da celulose. Fonte Arantes e Sadler (2010).

Contudo, a totalidade dos efeitos enzimáticos em relação à capacidade de decomposição da celulose não pode ser quantificada como atividade global do complexo. No entanto, para a caracterização indireta dos complexos brutos de celulases com relação à sua atividade de endoglucanases ou exoglucanases, são utilizados diferentes substratos, ressaltando-se, entretanto que a eficiência sinérgica entre os três tipos de enzima impede uma quantificação precisa (ZHANG et al., 2006).

Para a atividade de endoglucanase, utiliza-se um derivado de celulose substituída como substrato, a carboximetilcelulose (CMC), que é solúvel. A enzima ataca o polímero randomicamente, produzindo uma mudança rápida no grau de polimerização. Após a reação, é determinada a formação de açúcares redutores, sendo esta atividade conhecida como CMCase. Por outro lado, a medida da atividade enzimática utilizando como substrato o papel de filtro Whatman N°1 (FPase) é comumente utilizada como referência para a determinação da atividade celulósica global tanto em trabalhos acadêmicos quanto em preparações enzimáticas comerciais (GHOSE, 1987).

### 4.2.3 Fundamentos microbiológicos da produção de celulases

O complexo de celulases é produzido a partir de uma grande variedade de microrganismos (bactérias e fungos), mas são os fungos aeróbios os que ostentam as melhores taxas de crescimento e secreção. A maioria das celulases comerciais é produzida pelo gênero *Trichoderma spp.* e seu sistema celulolítico é um dos mais investigados (ZHANG e LYND, 2004). Juntamente com os gêneros *Penicillium e Aspergillus*, os fungos filamentosos são os mais utilizados industrialmente para produção de celulases (SAMUELS et al., 1996). Entretanto, as preparações enzimáticas provenientes do *Trichoderma* apresentam um desbalanceamento entre as atividades de endo e exoglicanases com relação à atividade de  $\beta$ -glicosidase, cuja produtividade é baixa. Estudos recentes sobre o genoma do *T. reesei* revelaram que apesar de ser o melhor produtor de celulases, o seu código genético contém menor variedade de celulases e hemicelulases em relação a outros fungos sequenciados (MARTINEZ et al., 2008). Estes fatos potencializam o desenvolvimento em relação ao gênero *Aspergillus* como produtor de celulases (MATHEW et al., 2008).

O *A. niger* (Figura 4.2), também fonte do complexo celulolítico, é apreciado no meio industrial por uma série de características que o tornam o microrganismo ideal. Entre elas, há grande capacidade de fermentação e elevados níveis de secreção de proteína, além da grande variedade de enzimas produzidas para diversas aplicações (XEN e CIA, 1999).



Figura 4.2 - Macro e micromorfologia do *A. niger*. Fonte: Joint Genome Institute (DOE, 2010).

O sistema celulolítico da maioria das linhagens produtoras de celulases precisa ser induzido pela presença do substrato, sendo também susceptível à repressão catabólica em presença de fontes de carbono de fácil metabolização como a glicose (SEIBOTH et al., 1997).

O mecanismo de produção celular das celulases é ainda desconhecido, mas foi explicado por vários pesquisadores como um processo de síntese constitutiva e excreção de enzimas através da parede celular. A produção de pequenos glícidos, pelas celulases constitutivas, promove à indução e a expressão das celulases, tornando o processo de excreção das celulases constitutivas a etapa limitante da taxa de indução da síntese das demais enzimas do complexo. Adicionalmente, sabe-se que a secreção é diretamente proporcional à concentração de indutor no meio ao qual o microrganismo está exposto (VRIES e VISSER, 2001; LYND et al., 2002).

Carle-Urioste et al. (1997) afirmaram que a presença de um bom indutor pode incrementar em torno de 1100 vezes a biossíntese de celulases em relação à expressão constitutiva. Entretanto, existe uma concentração limite, sendo que em processos em meio líquido, esta concentração é de aproximadamente  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Acima desta, os efeitos indutores passam a não ser mais observados e, muitas vezes, até revertidos (LYND et al., 2002).

Diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos (lactose, nigerose, lichenana, glucana de cevada e sofrorse) foram usados na literatura como substâncias indutoras de celulases (CARLE-URIOSTE et al., 1997). Mandels e Reese (1960) demonstraram que a sofrorse apresentou 2500 vezes maior poder indutor para o *Trichoderma reesei* quando comparado com a celobiose.

Por outro lado, na fermentação em estado sólido, a indução é realizada pelo próprio substrato atuando como fonte de carbono e energia para o microrganismo fermentador. Adicionalmente, a presença de açúcares e polissacarídeos de alta e baixa massa molar enriquecendo os substratos pode acarretar em diversos padrões de indução, repressão e inibição na regulação das celulases microbianas (RAIMBAULT, 1998).

Outros nutrientes também são necessários para o crescimento geral das espécies microbianas, entre eles, o nitrogênio, o fósforo e o enxofre, além de macro e micro minerais e várias vitaminas. Assim, a necessidade de inclusão de nutrientes adicionais ao substrato, como peptonas e extrato de levedura, são considerados, em algumas linhagens do meio de fermentação, como estimulantes do crescimento (SINGHANIA et al., 2009).

#### **4.2.4 Panorama mundial do mercado de celulases.**

Depois das proteases e amilases, as celulases são o terceiro produto de maior valor na indústria biotecnológica (SINGHANIA et al., 2009).

Sua versatilidade é observada na diversidade de aplicações como insumos industriais: na indústria do papel, as xilanases auxiliam no processo de polpação e branqueamento, intensificando a deslignificação e melhorando as propriedades do papel com economias energéticas de aproximadamente 30-38%. Na indústria panificadora, as xilanases são usadas para melhorar a textura, o volume e a validade do pão. Na indústria têxtil são adicionadas aos detergentes para retirar fibras danificadas e na bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim) substituindo o processo de lavagem química. Na alimentação animal podem ser usadas na extração de sucos de frutas e vegetais, dentre outros usos.

Com o crescimento da indústria biotecnológica mundial, espera-se para o ano de 2011, que a demanda mundial por enzimas atinja um crescimento de 7,6% até aproximadamente seis bilhões de dólares. (FREEDONIA, 2007). No cenário nacional, em 2008, apenas considerando-se importações e exportações brasileiras, as celulases movimentaram um montante de USD 1,35 milhão (ALICEWEB, 2010).

A Tabela 4.1 apresenta os principais produtores de celulases com os microrganismos produtores e as aplicações industriais.

No entanto, a maior perspectiva de aplicação das celulases é a hidrólise da biomassa celulósica para a produção de etanol renovável, cuja escala de produção ainda não atingiu a escala comercial devido, entre outros fatores, aos elevados custos das celulases.

Assim, no ano 2000, começaram investimentos consistentes para reduzir os preços das enzimas, quando o Departamento de Energia dos Estados Unidos assinou um acordo com o Laboratório Nacional de Energias Renováveis (National Renewable Energy Laboratory - NREL) e as duas empresas, Novozymes e Genencor, são as líderes mundiais em produção de enzimas. O investimento de USD 17,1 milhões visou à redução, em 10 vezes, do custo efetivo das celulases na produção de etanol. Em 2004, as empresas anunciaram uma redução de 12 vezes no custo das enzimas mediante adoção de tecnologias inovadoras. Entretanto, hoje são necessários preços da ordem de 1,30 USD/kg de biomassa para o investimento em escala comercial de plantas produtoras de etanol celulósico (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Tabela 4.1 Celulases comercializadas no mercado, origem e atividade relatada.

| Nome comercial         | Empresa comercializadora              | Microrganismo produtor        | Atividade FPase (UI mL <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--|
| Cellubrix (Celluclast) | Novozymes, Denmark                    | T. longibrachiatum /A niger   | 56                                     |
| Novozymes 188          | Novozymes                             | A. niger                      | <5                                     |
| Cellulase 2000L        | Rhodia-Danisco (France)               | T. longibrachiatum/ T. reesei | 10                                     |
| Rohament CL            | Rohm AB Enzyme (Rajamaki, Finland)    | T. longibrachiatum/ T. reesei | 50                                     |
| Viscostar 150L         | Dyadic (Jupiter, USA)                 | T. longibrachiatum/ T. reesei | 33                                     |
| Multifect CL           | Genencor Intl. (S. San Francisco, CA) | T. reesei                     | 64                                     |
| Cellulyve              | Lyven Colombelles, France)            | T. longibrachiatum/ T. reesei | 24                                     |
| Accelerase®1500        | Genencor                              | T. reesei                     | N.A                                    |
| Biocellulase TRI       | Quest Intl. (Sarasota, FL)            | A. niger                      | 68                                     |

Adaptado de Singhania et al. (2010).

No âmbito dos produtos atualmente comercializados pelas empresas líderes, a Genencor apresentou o complexo enzimático específico chamado Accelerase®1500, especificamente desenvolvido para o processamento da biomassa lignocelulósica. A Accelerase®1500 é produzida por uma linhagem mutante de *Trichoderma reesei* e lhe são atribuídas maiores eficiências que seu antecessor Accelerase®1000, devido à maior concentração em  $\beta$ -glicosidase garantindo, desta forma, uma completa conversão de celobiose em glicose (GENENCOR, 2010). Paralelamente, essa empresa anunciou outros produtos como

Accelerase® XY consistente num complexo acessório de xilanases e a Accelerase® BG, uma enzima complementar formulada com  $\beta$ -glicosidases.

A Novozymes apresenta, também, uma ampla variedade de preparados celulósicos disponível. A formulação depende da sua aplicação final, assim, a Cellusoft®AP e a Cellusoft®CR são usados para indústria têxtil, Carezyme® e Celluclean como aditivos para detergentes (NOVOZYMES, 2010). A Novozymes também lançou preparações celulásicas específicas para hidrólises da biomassa, no entanto, não se tem informação disponível sobre a fonte produtora.

#### **4.2.5 Celulases para biocombustíveis de 2ª geração**

Hoje, a maior aplicação potencial das enzimas do complexo celulolítico é na hidrólise da biomassa lignocelulósica. As matérias-primas de origem lignocelulósica, contêm de 20 a 60% de celulose que pode ser totalmente convertida em glicose, por ação enzimática. Em etapas seguintes, esse monossacarídeo pode ser utilizado para a obtenção de uma imensa gama de produtos, desde biocombustíveis até polímeros, sendo o etanol uma das moléculas de maior interesse (CASTRO e PEREIRA et al., 2010).

Em geral, o complexo celulásico ideal deve consistir em um coquetel constituído por uma mistura de enzimas contendo endo e exocelulases, xilanase,  $\beta$ -glicosidase, pectinases, etc. cujo balanço está em função da composição do substrato submetido à hidrólise (GUSAKOV et al., 2007). Entre as propriedades que determinam eficiência na hidrólise, pode-se mencionar: elevada especificidade e estabilidade, assim como a capacidade de completar o processo até a produção de glicose com alta tolerância ao fenômeno de inibição pelo produto.

Por outro lado, deve-se operar em pH em torno de 5 e a temperaturas de 50°, condições estabelecidas para a hidrólise enzimática além das propriedades de adsorção à celulose. Finalmente, todas estas características devem ser atingidas com custos de produção competitivos no mercado global (SINGHANIA et al., 2010).

A eficiência do complexo de celulases nos processos de conversão de biomassa depende em maior grau das características da biomassa a ser hidrolisada do que das atividades enzimáticas mensuráveis (SINGHANIA et al., 2010).

Por outro lado, apesar de que são desejáveis celulases com elevadas atividades FPase, CMCase,  $\beta$  glisidades, xilanases, essas análises da atividade não conseguem mensurar a eficiência na bioconversão, pois não existe uma clara relação entre as atividades obtidas nos substratos solúveis e a sinergia das celulases nos substratos insolúveis (NIEVES et al., 2009).

O sucesso dos projetos de etanol de 2<sup>a</sup> geração depende em grande parte do desenvolvimento das propriedades deste complexo enzimático. Neste contexto, várias abordagens vêm sendo estudadas, entre elas, a construção de coquetéis de celulases por meio da disposição e combinação de enzimas produzidas por vários microrganismos em um único complexo ou mediante o uso de técnicas genéticas para incrementar a expressão gênica de determinada enzima.

Outras vertentes de melhora estão relacionadas com a busca de processos alternativos para a redução nos custos de produção. Neste sentido, têm-se sugerido o uso de resíduos agroindustriais para serem usados como substratos e fontes de carbono assim como a simplificação de etapas sequenciais para concentração enzimática, tudo isso refletido no gasto energético total das operações (SUKUMARAN et al., 2005).

#### **4.2.6 Tecnologias para produção de celulases**

Como citado anteriormente, uma grande parte dos esforços para a redução nos preços das enzimas tem como foco principal a melhora dos bioprocessos tecnológicos. Tradicionalmente as celulases de aplicação comercial são produzidas por meio de processos de fermentação submersa (FSm), nos quais os microrganismos são cultivados em um meio aquoso homogêneo e rico em nutrientes. No entanto, a produção natural e espontânea de celulases com fungos filamentosos apresenta maior similaridade com a fermentação em estado sólido (FES).

A FES representa uma rota alternativa para produção de celulases. Esta tecnologia é definida como o processo de crescimento e produção microbiano sobre a superfície de substratos sólidos na ausência de líquido livre. A água, indispensável para o crescimento dos microrganismos, é adsorvida e complexada na matriz sólida do substrato (RAIMBAULT, 1998). Apesar de que seu uso é bastante difundido nos países orientais, o interesse ocidental na FES tem se renovado durante as últimas duas décadas pela possibilidade de integração a outros processos industriais, pois podem ser realizadas em condições semi-estéreis, além de que podem utilizar resíduos de outras cadeias industriais como substratos indutores de metabólitos com elevado valor agregado (ELISASHVILI et al., 2009). Todavia, vantagens como controle, e monitoramento eficientes e maior reprodutibilidade são ainda associadas com a FSm (MATHEW et al., 2008).



#### 4.2.6.1 Fermentação em estado sólido x Fermentação submersa

O uso da FES geralmente leva a uma comparação com a FSm. Hesseltine (1987) relata que a principal diferença entre a FSm e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As FSm são consideradas reações de mistura perfeita, onde cada parte do reator contém, ao mesmo tempo, uma quantidade igual de microrganismos, nutrientes e metabólitos, enquanto que os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de substrato. A comparação das vantagens entre as duas tecnologias é apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Aspectos positivos e negativos da FES.

| Vantagens   | Desvantagens   |
|---|--|
| Simplicidade do meio de cultivo e condições próximas aos meios naturais.                    | Menor gama de produtos obtidos e de microrganismos aptos a crescerem nessas condições  |
| Menor volume de efluentes líquidos  | Dependendo do substrato pode ser necessário um pré-tratamento no substrato com efeitos posteriores negativos para a biomassa microbiana. |
| Menor risco de contaminação pela baixa umidade e Aw   | Difícil controle e manutenção de parâmetros de cultivo (pH, umidade, temperatura)  |
| Em fermentações tradicionais, a microflora do suporte pode servir de inóculo.               | Alta taxa de inoculação. Difícil estimativa de uma quantidade precisa da biomassa produzida.   |
| Aeração favorecida pela porosidade do material.   | Difícil automação do processo  |
| Possibilidade de utilização imediata dos sólidos fermentados.                               | Menor disponibilidade de informações na literatura acerca dos fenômenos de transporte e cinéticas de crescimento.                        |
| Menor volume do reator<br>Maior produtividade com extratos de 3 a 4 vezes mais concentrados | Os extratos podem estar contaminados com componentes indesejáveis do substrato.  |

Adaptado de Singhanian et al. (2010), Castro e Pereira (2010) e Raimbault (1998).

Ademais, visando já a uma aplicação direta da FES na produção de celulases para bioenergia, a tecnologia mostra-se apropriada desde que a hidrólise da biomassa lignocelulósica não demande extratos enzimáticos com elevada pureza. Adicionalmente, as enzimas produzidas a partir da mesma biomassa a ser hidrolisada têm relatado maior eficiência e especificidade no processo (LYND et al., 2002).

Por outro lado, com o desenvolvimento de procedimentos adequados para o controle operacional e a melhoria no projeto dos biorreatores, a FES pode-se tornar uma tecnologia

competitiva para a produção de celulases e contribuir efetivamente na redução dos custos de produção.

## 4.2.7 Parâmetros operacionais na FES

A seguir são apresentados os parâmetros operacionais que determinam o rendimento e a produtividade na FES.

### 4.2.7.1 Tipo de substrato e suporte

Entre os fatores básicos para uma eficiente produção de celulases fúngicas destacam-se: a adequada escolha do substrato, a otimização da composição do meio de cultivo e a presença de substâncias indutoras (RAIMBAULT, 1998).

Como visto anteriormente, o substrato representa o melhor indutor de produção de enzimas. A produção de determinado metabólito pode ser direcionada com a escolha do substrato apropriado. Neste sentido, diversos subprodutos de origem agroindustrial como o bagaço de cana-de-açúcar, de mandioca e de maçã, palha de arroz, entre outros possuem características estruturais nutricionais adequadas para serem utilizadas como substratos na FES (ZHANG, 2006).

Entretanto, é importante mencionar o efeito indutor de espécies de menor massa molar e a sua inclusão no meio de suplementação de nutrientes favorece a adaptação das células em matérias primas insolúveis, conseguindo com isto taxas cinéticas mais rápidas de fermentação (SINGHANIA et al., 2010).

### 4.2.7.2 Umidade e atividade da água

A água possui diversas funções em um bioprocessos, tais como: a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos. A manutenção e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, assim como a estabilidade da estrutura lamelar e a permeabilidade da membrana plasmática são funções microbianas vitais que dependem da atividade da água.

O valor de atividade de água ( $A_w$ ) fornece informação sobre a água disponível para os microrganismos. Pode ser definida como  $A_w = P_s/P_0$  onde  $P_s$  é a pressão de vapor de equilíbrio da água dentro do substrato sólido e  $P_0$  é a pressão de vapor da água pura.

Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a carência de água pode causar a desnaturação enzimática ocasionando um desequilíbrio nas vias metabólicas com prejuízo nos

processos de germinação, esporulação e expressão de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de adaptação celular (RAIMBAULT, 1998).

O valor ótimo de umidade na FES varia entre 40 e 85%, o que corresponde a uma atividade de água no intervalo de 0,40-0,90, condição que mimetiza os processos naturais, permitindo até que os processos sejam conduzidos em meios semi-estéreis, visto que a contaminação é pouco provável (CEN e XIA, 1999).

Na FES, a quantidade limite máxima de água no meio é em função da capacidade de retenção do substrato. O aumento excessivo de água matricial está diretamente relacionado com aumento do risco de contaminação bacteriana e menores taxas nas trocas gasosas (PANDEY, 2003). Entretanto, durante o processo existem variações de umidade devido à evaporação e o consumo metabólico microbiano, variações que devem ser minimizadas em produção de larga escala com um adequado controle da aeração e umidade do ar.

#### **4.2.7.3 Temperatura e pH**

A temperatura ótima para a fermentação varia de acordo com o microrganismo. Para organismos mesofílicos, na maioria das vezes, o intervalo mais adequado varia entre 25 e 35°C. O metabolismo microbiano também gera calor em uma taxa aproximada de 673 Kcal (molCO<sub>2</sub>)<sup>-1</sup>, ocasionando gradientes térmicos e representando o principal problema da aplicação da FES em grande escala (CEN e XIA, 1999).

A determinação do pH na FES torna-se dificultosa devido à ausência de água livre, apesar disto, devido à complexidade química do substrato/suporte este apresenta inerente capacidade de tamponamento. Além disto, são adicionados alguns sais ou fontes nitrogenadas garantindo a manutenção do mesmo (CEN e XIA, 1999).

#### **4.2.7.4 Aeração**

O processo de FES deve proporcionar o livre acesso de oxigênio atmosférico para garantir as funções microbianas de oxigenação e dessorção de CO<sub>2</sub> auxiliando paralelamente no controle da temperatura e a manutenção do teor de umidade do substrato (MITCHELL, 2003).

### **4.2.8 FES para produção de celulases**

Sendo que a FES representa uma alternativa promissora para redução dos custos de produção das celulases e viabilização do etanol lignocelulósico, diversos trabalhos científicos vêm sendo desenvolvidos na atualidade. Neste sentido, a Tabela 4.3 apresenta o resumo de

alguns estudos publicados nos últimos anos em relação à produção de celulases por FES. Pode-se observar, em geral, que as pesquisas direcionam as estratégias experimentais nas seguintes vertentes:

- Melhora na capacidade fermentativa das linhagens produtoras através de manejo genético, fermentação utilizando cultivos de associação microbiana (co-culturas), novos isolados com maiores expressões enzimáticas, além da seleção de linhagens produtoras de celulases termoestáveis. Assim, as melhores atividades foram relatadas com o novo fungo isolado HML 0278, identificado como *Fusarium chlamydosporum*. Os autores (HE et al., 2010) ressaltaram, além das elevadas atividades (FPase: 95,2 eCMCase: 281,8 UI g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>), a estabilidade enzimática em amplos intervalos de pH 4-9 e a temperaturas menores a 70°C.
- Existe a tendência atual no uso de substratos alternativos como subprodutos agroindustriais e efluentes das cadeias produtivas representativas de cada região, pois se constituem como abundantes passivos ambientais. A FES tem sido proposta como uma alternativa sustentável para o manejo destes resíduos e efluentes líquidos. Por exemplo, a vinhaça foi utilizada por Acharya et al. (2010) como meio de suplementação devido a sua alta concentração de nutrientes. Paralelamente, continua-se utilizando misturas de substratos tradicionais como farelo de trigo, farelo de aveia, farelo de arroz, palha de trigo e bagaço de cana, na busca de relações C/N adequadas para a produção de enzimas com elevada especificidade frente ao material a ser hidrolizado. A escolha dos substratos também tem como premissa a integração global da FES para a produção de celulases com o processo industrial do etanol de 2ª geração.
- Sendo que a tecnologia de FES para produção de celulases representa um bioprocesso com necessidades relacionadas à otimização dos parâmetros operacionais, as ferramentas estatísticas, como o planejamento experimental, têm sido bastante difundidas como estratégia de seleção de parâmetros. Sua aplicação possibilita o estudo de diversas variáveis, identificação das interações e desenvolvimento de modelos preditivos. Os trabalhos de Soni et al. (2010); Acharya et al. (2010); Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani (2010); Long et al. (2009); Dogaris et al. (2009) são exemplos de otimização de parâmetros como pH inicial, umidade, temperatura de incubação, fonte de nitrogênio, razão de misturas, entre outros.

- Por outro lado, a maioria destes trabalhos é realizada a nível laboratorial, utilizando frascos de erlenmeyer, o registro de alguns estudos no que se refere ao uso de biorreatores em maiores escalas é relacionado com o controle de alguns parâmetros como a aeração e agitação visando um adequado controle da homogeneidade do processo. No entanto, ainda existe um gap tecnológico no desenvolvimento dos sistemas de controle e monitoramento do bioprocessos que garantam a difusão da FES em escalas comerciais.

Tabela 4.3 Tabela resumo de exemplos com trabalhos científicos usando FES para produção de celulases.

| <b>Microrganismo</b>                         | <b>Substrato</b>   | <b>Atividades enzimáticas<br/>(U g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>)</b> | <b>Estratégia utilizada</b>   | <b>Referência</b>                      |
|--|--|--|---|--|
| <b>Trichoderma reesei RUT-C30.</b>           | Resíduos de horticultura e cavacos de madeira                    | FPase: 15<br>CMCase: 90,5<br>β-glicosidase: 61,6                         | Otimização de parâmetros operacionais por planejamento estatístico.   | Xin. e Geng (2010)                     |
| <b>A. ellipticus</b>                         | Palha de trigo enriquecida com efluente de destilaria industrial | FPase: 13,38<br>β-glicosidase: 26,68<br>CMCase: 130,92                   | Otimização por planejamento experimental de parâmetros como a concentração do meio de suplementação, pH inicial, umidade, concentração do inóculo.    | Acharya et al. (2010).                 |
| <b>Trichoderma reesei</b>                    | Palha de trigo   | Não relatadas  | Produção de celulases específicas comprovada pela fermentação dos açúcares produzidos até etanol.   | Levera et al. (2010).                  |
| <b>Trichoderma reesei Rut C-30.</b>          | Bagaço de polpa cítrica e farelo trigo                           | FPase: 13,4<br>CMCase: 135   | Uso resíduo tradicional de países orientais – “Kinnow Pulp”.  | Oberoi et al. (2010).                  |
| <b>Chaetomium sp.</b><br><b>Fungo marino</b> | Resíduo de Semente de algodão em pH alcalino                     | Não relatadas  | Isolamento de 54 fungos de áreas arbóreas para produção de celulases alcalinas e termoestáveis visando à aplicação na indústria de papel e derivados. | Ravindran et al. (2010).               |
| <b>Fusarium chlamyosporum</b>                | Bagaço de cana   | FPase: 95,2<br>CMCase: 281,8<br>β-glucosidase: 135,2<br>Xilanase: 4 720  | Isolamento e identificação de fungo produtor de celulases termoestáveis até 70°C e em amplo intervalo de pH (4-9).                                    | He et al. (2010).                      |
| <b>Trichoderma reesei QM9414</b>             | Farelo de arroz  | FPase: 11,65<br>CMCase: 94,21  | Estratégia de planejamento estatístico com superfície de resposta para otimização.  | Rocky-salimi e hamidi-esfahani (2010). |
| <b>Penicillium janthinellum mutants</b>      | Bagaço de cana explodido e farelo de trigo                       | CMCase: 37,10<br>β-glicosidase: 155                                      | Celulases fúngicas produzidas por mutantes com fins de aplicação em meios de elevada força iônica como solventes.                                     | Adsul et al. (2009).                   |

|  |  |  |   |                          |
|--|--|--|---|--------------------------|
| <b>Penicillium decumbens L-06</b>                                    | Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo | FPase: 3,89  | Planejamento estatístico das variáveis: razão farelo/bagaço, umidade, temperatura, pH inicial e concentração de sulfato de amônia.  | Long et al. (2009).      |
| <b>Trichoderma harzianum T2008</b>                                   | Resíduo do fruto oleaginoso da palma       | FPase: 8,2, em frascos<br>FPase: 10,1 em biorreator.                                     | Estudo realizado em dois sistemas de FES, frascos e biorreator horizontal rotacional. Máximas atividades foram obtidas no 4º e no 2º dia de FES respectivamente.                                  | Alam et al. (2009).      |
| <b>Neurospora crassa</b>   | Mistura com farelo e palha de trigo        | CMCase: 492,8,<br>$\beta$ -glucosidase: 26,7<br>Xilanase: 297,8                          | Aplicação para produção de etanol a partir de Sorgo.  | Dogaris et al. (2009).   |
| <b>Co-cultura de Trichoderma reesei RUT C30 e A. niger MTCC 7956</b> | Farelo de trigo                            | Não relatadas.   | Complexo enzimático usado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e aguapé com carga enzimática de 50 FPU de celulases e 10 U de $\beta$ -glicosidase por g de biomassa.         | Sukumaram et al. (2009). |
| <b>Co-cultura de Trichoderma reesei (QM 9414 mutante) e A. niger</b> | Folhas de aguapé                           | Não relatadas  | Cabine de fermentação utilizada como reator. Meio de suplementação Toyoma Ogowa (40% de proteína e 0,15% de peptona). Incremento de atividades aproximadamente de 2-3 vezes em relação a frascos. | Deshpande et al. (2009). |
| <b>Trichoderma koningii AS3.4262</b>                                 | Resíduo de indústria vinícola              | Fracos,<br>FPase: 6,9<br>CMCase: 23,8<br><br>Biorreator:<br>FPase: 5,9<br>CMCase: 12,98. | Estudo comparativo das produtividades em frascos e reator em batelada com aeração forçada e otimização dos parâmetros: umidade, pH inicial e T°.  | Liu e Yang (2007).       |

#### 4.2.9 Considerações Finais

Uma das maiores áreas de pesquisa na atualidade, é representada pela biotecnologia das enzimas. Representam, com retomado interesse dada a potencial produção sustentável de combustíveis renováveis. Espera-se que, muitos avanços deverão ocorrer no sentido de viabilizar economicamente o uso de celulases na produção de etanol de 2<sup>a</sup> geração (SINGHANIA, et al., 2010).

Dentre as estratégias relevantes para a viabilização da hidrólise de materiais lignocelulósicos, pode-se mencionar a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais em relação às endoglucanases e  $\beta$ -glicosidades. O complexo celulolítico ideal pode ser obtido pelo co-cultivo de linhagens superprodutoras (WEN et al., 2005), pela produção em separado de celulases e posterior mistura dos extratos em proporções pré-otimizadas (SAHA et al., 2005) ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (KARLSSON et al., 2001; HAYASE et al., 2008).

Do ponto de vista do bioprocesso, a produção de celulases na própria planta a partir do substrato a ser hidrolisado (in situ), é uma necessidade uma vez que grandes quantidades de enzimas serão requeridas para a eficiente hidrólise dos abundantes materiais lignocelulósicos, visando à produção de etanol (CASTRO e PEREIRA, 2010).

Sendo assim, visando-se à utilização da FES na produção de celulases, existe uma grande demanda na implantação de sistemas de controle no processo. Essa é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de biorreatores em escala industrial, uma vez que a FES, apesar dos elevados rendimentos para a produção de enzimas, apresenta como principal fator limitante a dificuldade de controle nos gradientes das variáveis operacionais inerentes ao processo (FARINAS et al., 2010).

Contudo, mediante a superação das oportunidades na instrumentação na FES, esse processo pode ser considerado-se como a rota tecnológica preferencial para produção comercial de celulases considerando os menores custos de inversão e a capacidade de aproveitamento de fontes abundantes naturais e renováveis como substratos.



### **4.3. OBJETIVO**

- O objetivo geral desta etapa do trabalho é desenvolver um bioprocesso de fermentação em estado sólido para a produção de um complexo enzimático rico em celulases e xilanases específicas usando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em frascos erlenmeier.

Os objetivos específicos que descrevem cada etapa do desenvolvimento são:

- Avaliar os efeitos de fatores nutricionais (tipos de substratos e fontes indutoras de carbono) na produção celulásica do *A. niger*.
- Determinar as condições adequadas para a fermentação em frascos em relação à umidade, composição do substrato e formulação do meio de suplementação de nutrientes com a adição de fontes de nitrogênio.
- Utilizar metodologias sequenciais de planejamento experimental para a formulação do meio de suplementação ao bagaço de cana-de-açúcar que permita sua utilização nas fermentações nas etapas seguintes de desenvolvimento do bioprocessos. Como variáveis resposta para a seleção de todos os parâmetros mencionados foram determinadas as atividades enzimáticas FPase, CMCase e xilanase.

#### 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

A seleção das condições operacionais na fermentação em estado sólido (FES) usando o bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato seguiu a sequência experimental mostrada na Figura 4.3. Assim, foram estudados parâmetros como: umidade, fontes de carbono solúveis, fontes de nitrogênio e meio de suplementação visando à produção de celulases específicas com o microrganismo *A. niger*.

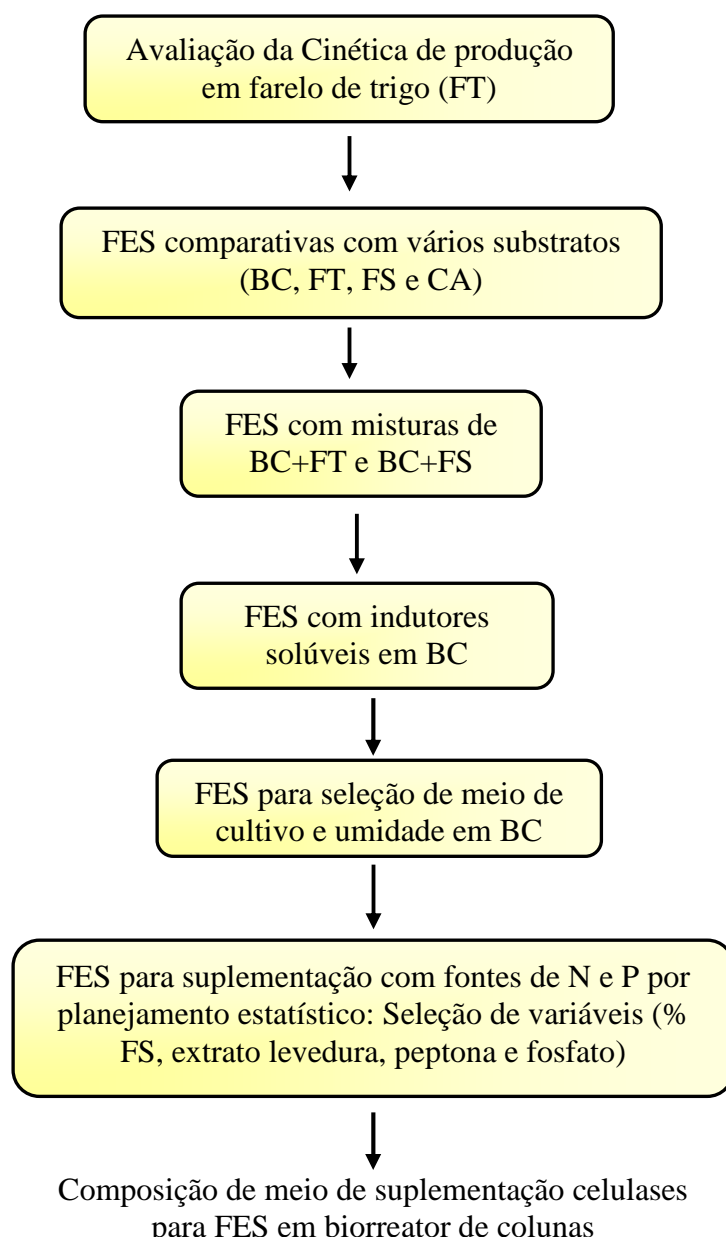


Figura 4.3 – Fluxograma para definição de parâmetros de FES e meio de suplementação para o substrato BC. FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; CA: casca de arroz.

Após a definição do tempo de maior produção em farelo de trigo (FT), substrato padrão de FES, foram realizados ensaios comparativos utilizando BC e outros resíduos agroindustriais como farelo de soja (FS) e casca de arroz (CA) buscando avaliar as diferenças em relação ao potencial do BC como indutor de celulases.

Por outro lado, foram testadas misturas do BC com substratos complementares (FT e FS) em intervalos composicionais entre 10 - 60% em massa. Posteriormente, avaliaram-se alguns indutores solúveis de celulases (carboximetilcelulose, avicel e celobiose) e diferentes meio de suplementação Mandels (MANDELS e WEBER 1969), Czapeck Dox (CHANDRA et al., 2007) e Sacarose (PINTO, 1998) em diferentes proporções.

Finalmente, a formulação do meio de suplementação foi definida após estratégia sequencial de planejamento experimental tendo como principal objetivo seu enriquecimento em função de diferentes fontes de nitrogênio. A padronização na composição do meio permitiu a realização dos experimentos de FES com condições controladas de vazão e umidade do ar em biorreator de colunas instrumentado, conforme o descrito no seguinte capítulo.

#### 4.4.1. Materiais usados na FES

##### 4.4.1.1. Substratos

Após a aquisição, os substratos foram armazenados em sacos plásticos a -18 °C até utilização. A caracterização físico-química foi realizada em relação à umidade, cinzas, teor de celulose, hemicelulose e lignina e proteínas totais. A granulometria usada nas FES foi de 1-4 mm em peneiras ASTM. A Tabela 4.4 apresenta algumas especificações dos substratos usados. O único material submetido ao acondicionamento foi o BC, como detalhado no Capítulo III.

Tabela 4.4 Especificações dos substratos utilizados na FES.

| Substrato            | Origem  | Tratamento prévio a FES  |
|----------------------|---|--|
| BC                   | Fornecimento empresa Edra Eco Sistemas Ltda. mistura de fibra e medula. | Lavagem e tratamento hidrotérmico (autoclave 120 °C, 60 min relação m/v: 1:10) |
| Farelo de soja (FS)  | Compra agropecuária Claro, São Carlos – SP.                             | Controle granulométrico (1- 4 mm)  |
| Farelo de Trigo (FT) |   |  |
| Casca de Arroz (CA)  |   |  |

#### 4.4.1.2. Microrganismo

Como agente de fermentação, foi utilizado a linhagem do fungo filamentosos *A. niger* spp. F-13 da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ), mantido em congelamento a -18 °C. Todos os procedimentos envolvendo o manuseio do fungo foram realizados em câmara de fluxo laminar (BUZZATOS, Brasil).

#### 4.4.1.3 Meios de cultivo para produção de celulasas

**A. Solução salina nutriente de sulfato de amônio 0,91%:** Foram dissolvidos 0,91 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 1 L de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Esta solução foi padronizada por Couri e Farias (1995) como fonte de nitrogênio padrão para o microrganismo *A. niger* nas FES com farelo de trigo.

**B. Meio Mandels e Weber modificado:** Dissolveram-se os reagentes nas quantidades listadas na Tabela 4.5 em 1 L de água destilada. Em seguida o pH foi ajustado a 6 com HCl 2 mol L<sup>-1</sup>. Nota-se que a modificação do meio de Mandels e Weber (1969) original é em relação à adição de celulose solúvel carboximetilcelulose (CMC).

Tabela 4.5 Composição dos meio Mandels e Weber modificado usado na FES por *A. niger*.

| Unidade            | Componente  | Concentração |
|--------------------|---|--------------|
| g L <sup>-1</sup>  | Carboximetilcelulose (SIGMA)                                    | 5,00         |
|                    | Uréia   | 0,30         |
|                    | Peptona (HIMEDIA)   | 0,75         |
|                    | Extrato de levedura (HIMEDIA)                                   | 0,25         |
|                    | Sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                  | 1,40         |
|                    | Fosfato monobásico de potássio $\text{KH}_2\text{PO}_4$         | 2,0          |
|                    | Sulfato de magnésio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ | 0,3          |
|                    | Cloreto de cálcio $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$   | 0,4          |
| mg L <sup>-1</sup> | Sulfato de zinco $(\text{ZnSO}_4)$                              | 1,4          |
|                    | Sulfato de ferro $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$    | 5,0          |
|                    | Cloreto de cobalto $(\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$  | 2,0          |
|                    | Sulfato de manganês $(\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ | 1,6          |

**C. Meio sacarose:** Este meio foi usado por Pinto (1998) para produzir enzimas hidrolíticas com *A. niger*. Os componentes usados e as concentrações podem ser observados na Tabela 4.6.

**D. Meio Czapeck Dox modificado** (CHANDRA et al, 2007; REMALEY, 1979): Os componentes usados e as concentrações estão especificados na Tabela 4.7.

Tabela 4.6 Composição do meio de sacarose usado na FES por *A. niger*.

| Unidade            | Componente  | Concentração (g L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---|-----------------------------------|
| g L <sup>-1</sup>  | Sacarose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>          | 20,0                              |
|                    | Sulfato de amônia (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3,5                               |
|                    | Fosfato monobásico de potássio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | 1,00                              |
|                    | Sulfato de magnésio MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O          | 0,50                              |
|                    | Cloreto de potássio KCl   | 0,1                               |
| mg L <sup>-1</sup> | Sulfato de zinco ZnSO <sub>4</sub>                                | 5,0                               |
|                    | Sulfato de ferro FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O             | 23,0                              |
|                    | Sulfato de cobre CuSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O             | 6,0                               |
| µg L <sup>-1</sup> | Sulfato de manganês MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O          | 20,0                              |

Tabela 4.7 Composição do meio Czapeck Dox modificado usado na FES por *A. niger*.

| Componente   | Concentração (g L <sup>-1</sup> ) |
|--|-----------------------------------|
| Carboximetilcelulose (CMC)                                   | 5,00                              |
| Sacarose C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>     | 30,00                             |
| Nitrato de sódio NaNO <sub>3</sub>                           | 3,00                              |
| Sulfato de magnésio MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O     | 0,50                              |
| Cloreto de potássio KCl                                      | 0,50                              |
| Sulfato de ferro FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O        | 0,01                              |
| Fosfato dibásico de potássio K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,00                              |

#### 4.4.1.4 Meios de cultivo para manutenção e ativação do *A. niger*

**A. Meio básico de ágar:** A Tabela 4.8 apresenta a composição do meio de ativação e manutenção do *A. niger* na primeira etapa. O preparo inicia-se com a solubilização da pectina em água destilada, após a qual, os sais foram adicionados. Antes da adição do ágar, o pH do meio foi ajustado em 4,5 com soluções de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O volume ajustado a 1,0 L foi submetido a banho-maria para solubilização do ágar e, em seguida, o meio foi vertido cuidadosamente em tubos de ensaio, os quais foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos foram imediatamente inclinados para a formação da superfície inclinada.

Tabela 4.8 Composição do meio básico.

| Reagentes  | Concentração (g L <sup>-1</sup> ) |
|--|-----------------------------------|
| Pectina cítrica  | 10,00                             |
| Nitrato de sódio NaNO <sub>3</sub>                             | 3,00                              |
| Sulfato de magnésio MgSO <sub>4</sub>                          | 0,50                              |
| Cloreto de potássio KCl  | 0,50                              |
| Sulfato de ferro FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O          | 0,01                              |
| Fosfato monobásico de potássio K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,00                              |
| Ágar-ágar  | 30,00                             |

**B. Meio de ativação no sabugo de milho:** O substrato usado na produção de esporos de *A. niger* para FES consistiu em 4,6 g de sabugo de milho (seco e triturado com granulometria < 4 mm) enriquecidos com 6 mL da solução C da Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Soluções para o preparo do meio de sabugo de milho.

| Solução   | Volume H <sub>2</sub> O destilada (mL) | Reagente   |
|-----------|--|--|
| Solução A | 100                                    | 20 g KHPO <sub>4</sub>   |
| Solução B | 100                                    | 3,96 g ZnSO <sub>4</sub><br>4,60 g FeSO <sub>4</sub><br>0,01 g MnSO <sub>4</sub><br>0,5 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95-97%) |
| Solução C | 50                                     | 2,80 g Peptona<br>1 gota HCl 2mol L <sup>-1</sup><br>0,19 mL Solução A<br>0,025 mL Solução B                                       |

Fonte: Couri e Farias, 1995.

#### 4.4.2 Procedimentos Gerais de Fermentação em Estado Sólido

A Figura 4.4 mostra a representação da sequência das etapas envolvidas em cada um dos experimentos de FES.

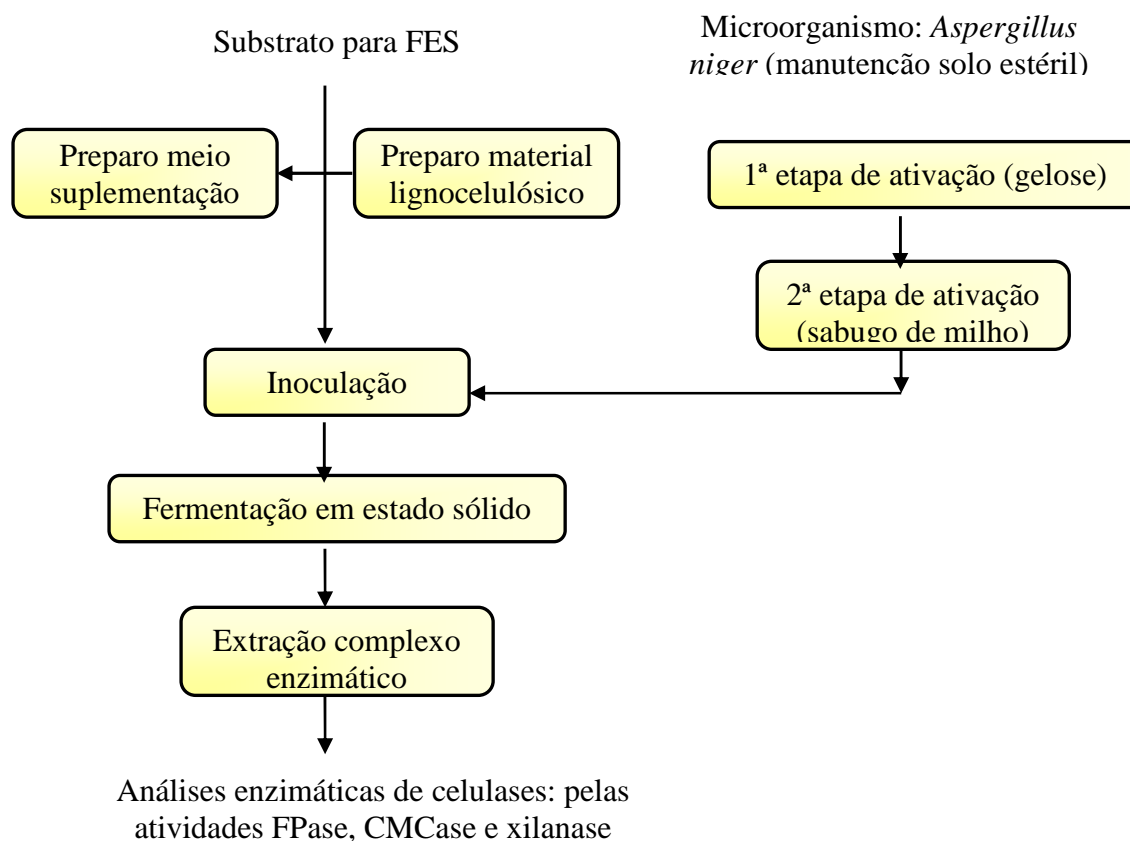


Figura 4.4 - Fluxograma das etapas sequencias nos experimentos de FES

#### **4.4.2.1 Manutenção do fungo e produção do inóculo**

Conídios do microrganismo armazenados em solo estéril e sob condições de congelamento (-18 °C) foram ativados segundo o sugerido em Couri (1993). No primeiro repique, os esporos foram transferidos dos tubos com solo para um meio básico de agar-agar, cuja composição é descrita na Tabela 4.8.

Os tubos de ensaio, contendo a gelose e os esporos do *A. niger* transferidos por meio de estrias, foram incubados em estufa de cultura (FANEM, Brasil) durante 7 dias a 32°C, visando o perfeito crescimento do fungo. Estes conídios foram utilizados para a inoculação do meio de sabugo de milho.

#### **4.4.2.2 Preparo do inóculo em sabugo de milho**

A segunda etapa de ativação fúngica teve como principal objetivo a produção de esporos para servir de inóculo na FES. Assim, os conídios devidamente crescidos e ativados na gelose inclinada foram suspensos mediante adição de 10 mL de uma solução estéril de Tween 80 surfactante (0,3% m/v).

Frascos erlenmeyer de 125 mL contendo o meio de sabugo de milho previamente esterilizados a 1 atm por 1 hora foram inoculados com 1 mL da suspensão de conídios. Após inoculação, os meios de sabugo de milho foram incubados em estufa de cultura (FANEM, Brasil) por 5 dias a 32°C, período no qual foram verificados aspectos como coloração, formação de micélio aéreo, esporulação e presença de contaminantes. Posteriormente, os frascos foram armazenados sob refrigeração a 4°C até utilização como inóculo para FES.

#### **4.4.2.3 Inoculação do meio de fermentação**

Em cada frasco contendo os esporos crescidos em sabugo de milho, foram adicionados 100 mL de solução surfactante estéril de Tween 80 0,3% p/v. Os conídios foram liberados mediante agitação manual com bastão de vidro. Em seguida, a suspensão dos esporos para contagem e inoculação foi separada das partículas de sabugo mediante filtração com gaze. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando atingir uma concentração final de  $10^7$  esporos  $g^{-1}$  de meio sólido. A concentração necessária para a inoculação foi determinada em microscópio usando Câmara de Neubauer. A distribuição dos quadrantes para contagem pode ser observada na Figura 4.5.

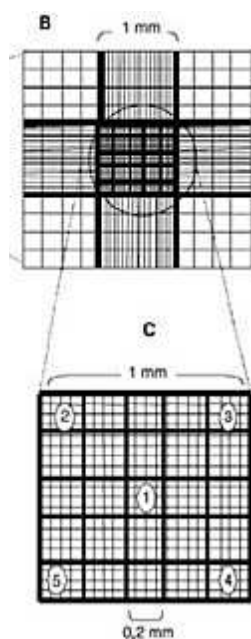


Figura 4.5 - Câmera de Neubauer usada para contagem de esporos.

O volume da suspensão de esporos (mL) foi calculado pela Equação 4.1

$$V_{\text{inóculo}} = m_{\text{substrato}} \times C_{\text{esporos}} \times (F \times V_{\text{cam}} \times M)^{-1} \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde:

$V_{\text{inóculo}}$  = volume inóculo a ser adicionado (mL)

$m_{\text{substrato}}$  = massa do substrato usado na FES (g)

$C_{\text{esporos}}$  = concentração inicial de esporos desejada na FES (esporos  $g^{-1}$ )

F = fator de diluição;

$V_{\text{cam}}$  = volume total da câmara  $25 \times 10^4$  mL

M = média da contagem de 5 quadrantes (n esporos  $mL^{-1}$ ).

#### 4.4.2.4. Fermentação em Estado Sólido

Nos experimentos apresentados neste capítulo, a produção de celulases foi realizada em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 5 g de substrato sólido suplementado com o meio de cultivo (pH 5), de acordo a metodologia sugerida em Couri e Farias (1995). Após esterilização por 20 min a  $120^{\circ}C$  e 1 atm, os frascos foram inoculados com a suspensão detalhada no item anterior. O volume de inóculo foi calculado buscando uma concentração final de  $10^7$  conídios  $g^{-1}$  de substrato seco. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.



A umidade inicial do substrato, a formulação do meio de suplementação e o tempo de FES, representam variáveis a serem determinadas no decorrer do desenvolvimento do bioprocessos conforme explicado na introdução da seção de material e métodos.

#### **4.4.2.5. Extração do complexo enzimático**

A extração do complexo enzimático das amostras fermentadas foi realizada utilizando uma solução tampão de acetato a 0,2 M e pH 4,5. A cada frasco com meio de FES, foram adicionados 50 mL do tampão acetato (relação 10:1 v/m). A homogeneização realizou-se em *shaker* por 1 hora a 120 rpm e 32 °C. O material foi então filtrado a vácuo utilizando-se papel Whatman nº1 e centrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos, a 10 °C. O sobrenadante da solução enzimática bruta a ser analisada foi armazenado à -5°C.

### **4.4.2 Métodos Analíticos**

#### **4.4.2.1 Determinação de umidade e cinzas dos resíduos agroindustriais**

Para a determinação de umidade inicial dos substratos, amostras de resíduos agroindustriais foram submetidas à pesagem em balança analítica e secagem sob temperatura de 100°C por um período de 24 horas, sendo posteriormente submetidas à nova pesagem. A umidade estabeleceu a razão entre a diferença dos valores final e inicial pelo valor inicial da amostra, multiplicando esta por 100, a fim de expressar um valor percentual da mesma.

Na determinação do teor de cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g de cada material (base seca) em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Assim, as amostras foram inicialmente pré-calcinadas à temperatura de 400 °C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados e, em seguida, a tampa foi removida e aumentou-se a temperatura até atingir 800 °C por 2h. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em um dessecador e a massa de cinzas foi determinada.

#### **4.4.2.2 Caracterização química dos resíduos utilizados**

Os substratos usados na FES foram analisados de acordo com as metodologias descritas por Goering e Van Soest (1970), Silva (1998) e Van Soest (1963) no Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. A metodologia está devidamente detalhada no Capítulo 3 da presente tese.

#### **4.4.2.3 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas**

No processo fermentativo, o microrganismo produz um extrato constituído por várias enzimas. Sendo que este trabalho visou a produção do complexo celulolítico, foram determinadas as atividades enzimáticas de FPase e CMCase e xilanase. Adicionalmente, os ensaios levaram em consideração a quantificação dos açúcares iniciais presentes no complexo enzimático, ensaios chamados de “branco reacional”. Na análise, foram usadas as mesmas soluções dos substratos, porém o reagente de DNS foi adicionado antes do extrato enzimático ter sido colocado em contato com a solução de substrato. Este branco passou apenas pela incubação a 100 °C. Todos os ensaios de atividade enzimática foram realizados em duplicata.

##### ***A. Atividade da FPase***

O substrato utilizado foi o papel de filtro Whatman nº 1 cortado em tiras (1 x 6 cm). O substrato foi colocado em tubos de ensaio e adicionado 2,0 mL de 0,05 mol L<sup>-1</sup> de tampão citrato e 1 mL do extrato enzimático (diluído quando necessário) e incubado em banho ultratermostático (SOLAB, EUA) a 50 °C por 60 minutos. A reação de formação de açúcares foi interrompida pela retirada de 1 mL da mistura e adicionada a tubos de ensaio contendo 1,0 mL de DNS. A determinação dos mesmos foi realizada segundo metodologia de Miller (1959) como especificado no item D.

Uma unidade de atividade em papel de filtro (UI) corresponde a 1 mol de açúcares redutores, expresso como glicose, liberados por minuto nas condições reacionais usadas.

##### ***B. Atividade enzimática CMCase (Endo-1,4-β-D-glicanase)***

Através deste ensaio, foi determinada a atividade celulolítica da endoglucanase (endo-1,4-β-D-glicanase) pelo método do carboximetilcelulose (CMC) de acordo com a metodologia de Ghose (1987).

Para isto, foram incubadas em banho-maria amostras (0,5 mL) dos complexos enzimáticos avaliados em tubos de ensaio a 50 °C por 5 minutos. A seguir foram acrescentados 0,5 mL de solução substrato 4 % CMC: (4 g de CMC, SIGMA, EUA em 100 mL tampão citrato de sódio, 0,05 mol pH 4.8). Os tubos com a mistura reacional foram colocados novamente em banho ultratermostático (SOLAB EUA a 50 °C) por 10 minutos. Após a incubação, 1,0 mL de DNS foi adicionado aos tubos para cessar a reação e realizar a determinação dos açúcares redutores como especificado no item D.

### ***C. Atividade da xilanase***

A atividade da xilanase foi estimada pela determinação da liberação da quantidade de açúcar redutor de uma solução a 1% xilana (SIGMA, EUA) preparada em solução tampão citrato de sódio (pH 5,0) a 50°C (BAILEY et al., 1992).

A mistura reacional consistiu de 2 mL de uma solução de xilana, aclimatada por 10 minutos na temperatura da reação e 1 mL do complexo enzimático, previamente diluído segundo a necessidade. A reação processou-se em tubos incubados a 50°C por 30 minutos em banho ultratermostático (SOLAB, Brasil). A reação foi interrompida pela retirada de 1 mL da mistura que foi adicionada aos tubos de ensaio contendo 1,0 mL de DNS, parando a reação enzimática. A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959). Uma unidade (UI) de atividade enzimática correspondeu a 1  $\mu\text{mol}$  de xilose liberada por minuto, medida por espectrofotometria (leitura A540 nm), como especificado no item D.

### ***D. Determinação de açúcares redutores por DNS***

As análises dos açúcares produzidos nos ensaios enzimáticos foram baseadas na metodologia de Miller (1959), que quantifica os açúcares redutores através de reação de oxidação com reagente 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) dissolvido em solução básica de NaOH 2 mol L<sup>-1</sup>.

Sendo assim, os tubos contendo DNS + mistura reacional contendo os açúcares produzidos por ação enzimática, foram fervidos por 5 minutos. A reação foi interrompida pelo choque térmico produzido ao serem colocados em banho de gelo, posteriormente foi realizada a diluição até 15 mL com água destilada. O método analítico colorimétrico utilizou a leitura da absorbância em 540 nm como medida indireta da concentração de açúcares presentes. O espectrofotômetro usado foi o Genesys 10 Uv scanning Thermo Scientific, Brasil. Como amostra do branco foi utilizado 1 mL de água destilada e 1 mL de DNS.

Para a construção da curva padrão de glicose x absorbância foram preparadas soluções de glicose nas concentrações de: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . A calibração foi realizada com os valores de absorbância obtidos após o procedimento experimental de reação com DNS.

O cálculo da concentração de glicose ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) foi realizado por interpolação na curva padrão.

Assim, após as determinações analíticas anteriores, as concentrações enzimáticas (UI mL<sup>-1</sup>) foram calculadas segundo a Eq. 4.2:

$$[\text{enzima}] = \text{AR} \times V_{\text{mistura}} \times (t_{\text{reação}})^{-1} \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde:

AR = concentração de açúcar produzido (umol mL<sup>-1</sup>)

V = volume da mistura reacional (mL)

t<sub>reação</sub> = tempo de reação enzimática (min)

Com fins comparativos e de padronização, as atividades enzimáticas finais foram expressas em produção enzimática do substrato seco (UI g<sup>-1</sup>) de acordo com a Eq. 3:

$$\text{UI g}^{-1} = [\text{enzima}] \times V_{\text{tampão}} \times M^{-1} \quad \text{Equação 4.3}$$

Onde:

[enzima] = atividade enzimática (UI mL<sup>-1</sup>)

V<sub>tampão</sub> = volume do tampão na extração (mL<sup>-1</sup>)

M = massa do substrato seco (g)

### 4.4.3 Experimentos de FES

Todos os experimentos de FES no presente capítulo foram realizados em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo o meio de produção (substrato + solução nutriente), tampados com rolhas de algodão e previamente esterilizados a 120°C por 20 minutos.

A umidade nos experimentos de FES foi determinada segundo a Equação 4.4

$$U\% = (m_L) \times (m_L + m_S)^{-1} \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde

m<sub>L</sub> = massa de solução de suplementação de nutrientes (g)

m<sub>S</sub> = massa de substrato sólido (g)

#### 4.4.3.1 Cinética de Produção Enzimática

A cinética de produção enzimática foi verificada usando como substrato FT (seco) enriquecido com solução salina de sulfato de amônio na proporção de 6 mL de meio x g de FT (seco). Esta umidade é usada rotineiramente no laboratório de Processos Fermentativos da Embrapa Agroindústria de Alimentos e experimentalmente determinada por Couri e Farias (1995) por apresentar valores de atividade de água satisfatórios para o desenvolvimento do *A. niger*.

A cinética de FES foi acompanhada durante 96 h, após inoculação do fungo, com amostragens a cada 24 h. Após a etapa de extração, os complexos enzimáticos correspondentes a 24, 48, 72 e 96h foram avaliados em função da sua atividade enzimática de FPase, CMCase e xilanase.

#### **4.4.3.2 Ensaios de FES com diferentes substratos sólidos**

Os substratos avaliados nesta etapa incluem BC, CA, FT e FS. A granulometria de cada um dos substratos moídos foi padronizada em peneiras ASTM de 1-4 mm..

A umidade inicial da FES foi ajustada a 50% mediante adição do meio Czapek Dox modificado (CHANDRA et al., 2007). Os frascos esterilizados e inoculados foram incubados nas condições descritas no item 4.4.1. Após 72 horas de FES, procedeu-se a extração do complexo enzimático para posterior análise e comparação da produção enzimática.

#### **4.4.3.3 Ensaios de FES com mistura de substratos**

Tendo em vista a informação estabelecida nas fermentações anteriores, foram avaliadas misturas do substrato de interesse (BC) com outras fontes lignocelulósicas de carbono e nitrogênio (FT e FS). As proporções de trabalho na suplementação com os substratos citados foram de 10, 20, 40 e 60% (m/m). As FES foram conduzidas segundo o descrito no item anterior.

#### **4.4.3.4 Ensaios de FES para avaliação de indutores**

Dando sequência ao desenvolvimento do processo foi estudado o efeito de diferentes fontes sintéticas de carbono no meio de suplementação. Para isto foram selecionados os compostos de celulose comercial, por serem citados na literatura de FSm como indutores de celulases (VRIES e VISSER, 2001; SUTO E TOMITA, 2001; NOGAWA et al., 2001).

Com o principal objetivo de ativar e direcionar o metabolismo fúngico na produção de celulases, carboximetilcelulose (CMC), avicel e celobiose foram usados no meio de suplementação Mandels e Weber (1969) básico nas proporções de 4% e 2% (m/v). O meio resultante foi utilizado como meio de suplementação do substrato BC para FES. Os demais parâmetros fermentativos são especificados item 4.4.1.

#### **4.4.3.5 Ensaios de FES com diferentes umidades e meios de suplementação**

Os meios de Mandels básico, Mandels modificado, Czapek Dox modificado e Sacarose (MANDELS e WEBER, 1969; CHANDRA et al., 2007 e PINTO, 1998) foram adicionados em diferentes proporções ao substrato composto por 90% de BC e 10% de FS. As

composições podem ser observadas nas Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 do item 4.1.1. Os valores de umidade inicial avaliados foram 60%, 70% e 80% (base úmida), os mesmos que foram atingidos mediante a adição dos meios de suplementação como indicado pela Equação 4.4.

#### **4.4.4. Delineamentos Experimentais para a definição da composição da suplementação**

Tendo em vista os parâmetros avaliados e definidos nas fermentações preliminares, a presente etapa visa a uma seleção mais acurada do meio de FES, em relação a fontes nutricionais de carbono e nitrogênio.

É bem conhecido que essas variáveis influenciam diretamente no crescimento e na produção de metabólitos, enzimas e esporos e que cada variável pode interagir e influenciar no efeito de outras (RODRIGUES E IEMA, 2006). Neste sentido, se faz necessária a utilização de ferramentas estatísticas de planejamento experimental para determinar esses efeitos e interações, objetivando sempre a consecução dos valores ótimos na produção enzimática de celulases.

Contudo, a suplementação do meio em relação às fontes de nitrogênio e fósforo foi formulada em duas etapas:

A primeira avaliou os efeitos do acréscimo nas concentrações de peptona, extrato de levedura, FS e fosfato monobásico de potássio mediante planejamento fatorial completo.

A segunda visou à otimização dos parâmetros significativos resultantes da primeira etapa mediante delineamento composto central rotacional (DCCR). Cabe destacar que foi adicionado o tempo de armazenagem do inóculo como variável independente no delineamento estatístico após verificação de sua influência nos experimentos anteriores.

Os experimentos estatísticos e as análises foram conduzidos através do software STATISTICA® 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Este programa também foi usado para gerar as superfícies de resposta obtidas a partir da realização de DCCR. A adequacidade dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA).

##### **4.4.4.1 Planejamento Fatorial Completo**

Para avaliação dos efeitos de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo foi realizado um delineamento fatorial completo  $2^4$  (16 ensaios + 3 pontos centrais) totalizando 19 ensaios. O efeito da proporção de FS (m/m) e das concentrações de extrato de levedura, peptona e fosfato monobásico de potássio (variáveis independentes) foi avaliado sobre as atividades

enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase (variáveis resposta). Na Tabela 4.9 pode-se observar os níveis das variáveis independentes usadas na experimentação.

Tabela 4.10 Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial  $2^4$  para seleção do meio de suplementação.

| Variáveis                 |       | Níveis |    |    |
|---------------------------|-------|--------|----|----|
|                           |       | -1     | 0  | +1 |
| Farelo de Soja %          | $x_1$ | 10     | 17 | 25 |
| Extrato de levedura (g/L) | $x_2$ | 4      | 8  | 12 |
| Peptona (g/L)             | $x_3$ | 8      | 16 | 24 |
| KHPO <sub>4</sub> (g/L)   | $x_4$ | 2      | 4  | 6  |

Os ensaios de FES foram conduzidos durante 72 h em frascos erlenmeyers de 500 mL. Tanto o meio de suplementação quanto a umidade de trabalho foram resultado do desenvolvimento prévio na seção 4.4.3.5. A realização dos planejamentos fatoriais permitiu a seleção de variáveis estatisticamente significativas em relação à produção de celulases. Os experimentos foram realizados em triplicatas em tempo real.

#### 4.4.4.2. Delineamento Central Rotacional

Foi realizado um DCCR com as variáveis significativas resultantes da etapa anterior. O DCCR consistiu em um planejamento completo  $2^3$  com 6 pontos axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios, objetivando-se a otimização da produção celulásica através da metodologia de resposta. As variáveis estudadas foram: concentração do extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ), % de farelo de soja e idade do inóculo (d) sendo os níveis reais e codificados de cada variável apresentados na Tabela 4.11. As faixas estudadas foram definidas com base no planejamento completo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 4.11 Valores das variáveis independentes utilizadas no DCCR para três fatores.

| Variáveis                                 |       | Níveis |    |    |    |       |
|---|-------|--------|----|----|----|-------|
|   |       | -1,68  | -1 | 0  | +1 | +1,68 |
| Farelo de Soja %                          | $x_1$ | 8,2    | 15 | 7  | 35 | 41,8  |
| Extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ) | $x_2$ | 5,3    | 8  | 12 | 16 | 35    |
| Idade inóculo (d)                         | $x_3$ | 2      | 4  | 7  | 10 | 12    |

## 4.5. RESULTADOS

### 4.5.1. Cinética de Produção Enzimática

Com o objetivo de determinar o melhor tempo para a cinética de produção de celulases e xilanases pelo microrganismo *A niger*, avaliou-se a produção enzimática durante 96 h, cujos perfis resultantes são mostrados na Figura 4.6.

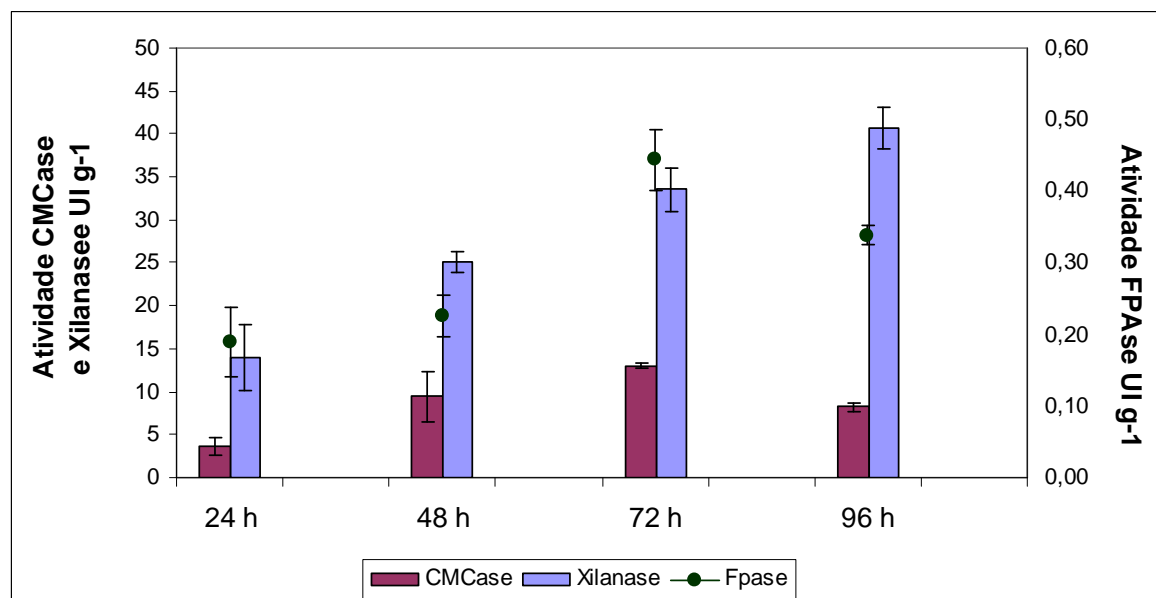


Figura 4.6 - Produção de FPase (eixo à direita), CMCase e xilanase (eixo à esquerda) em relação ao tempo (h) de FES pelo *A. niger* no FT.

A produção máxima de FPase e CMCase (0,4 e 13,0 UI.g<sup>-1</sup>, respectivamente) foi observada após 72 h de cultivo. A partir desses resultados, o tempo de 72 h de cultivo foi assumindo como tempo apropriado para extração e comparação da produtividade nas etapas seguintes do desenvolvimento.

O período de cultivo do fungo *A. niger* de 72 h se mostra bastante interessante para fins comerciais, uma vez que os tempos requeridos por outros microrganismos são significativamente maiores. Por exemplo, o *Thichoderma reesei* QMY-1 precisa de 14 dias de FSS para atingir atividades de 6-6,5 FPU g<sup>-1</sup> (CHAHAL, 1985). O *Penicilium decumbens* produziu atividades de 0,4 FPU g<sup>-1</sup> após 5 dias de FSS em farelo de trigo (SUN et al., 2008). Segundo Umikalsom et al. (1997) o *Chaetomium globosum* apresentou substancial quantidade de celulases após 10 dias de fermentação em fibra deslignificada do fruto de palma, com atividades de FPase e CMCas de 1,4 e 9,8 UI g<sup>-1</sup>, respectivamente. Com isto, as expressivas produtividades na FSS atingidas após 3 dias de processo representam uma vantagem comparativa em relação a outras espécies fúngicas celulolíticas possibilitando maiores produtividades no processo total.

Um outro indicativo qualitativo da maior produtividade no tempo escolhido é a produção de esporos observada após 72 h, a qual é correlacionada por Ahamed e Vermette (2008) com a fase produtiva de celulases. A colonização do substrato por meio da difusão de uma camada preta (esporulação) é a fase posterior ao aumento exponencial da massa



microbiana onde a fonte de carbono é utilizada para sintetizar células fúngicas (AHAMED E VERMETTE, 2008).

#### 4.5.2. Ensaios de FES comparando vários substratos

Com o objetivo de avaliar o potencial de utilização do bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato na FES, foi comparada a sua produção enzimática em relação a outros substratos lignocelulósicos. Tanto o farelo de trigo (FT) quanto o farelo de soja (FS) foram escolhidos por serem substratos tradicionalmente usados na FES, pois representam fontes ricas de nitrogênio orgânico. A casca de arroz (CA) é um resíduo agroindustrial abundante e tem um teor de lignina comparável ao BC.

A Tabela 4.12 mostra o resultado da caracterização química realizada nos substratos utilizados. Nota-se que todos os substratos são ricos em celulose e hemicelulose (fonte de carboidratos) e que o farelo de soja destaca-se entre eles como a maior fonte protéica.

Tabela 4.12 Composição dos substratos lignocelulósicos usados na FES.

| Material lignocelulósico | %<br>Celulose | %<br>Hemicelulose | %<br>Lignina | %<br>Proteína |
|--------------------------|---------------|-------------------|--------------|---------------|
| Bagaço de cana-de-açúcar | 46,62         | 26,51             | 21,7         | 1,52          |
| Casca de Arroz           | 37,81         | 22,89             | 18,72        | 2,35          |
| Farelo de Soja           | 34,59         | 18,13             | 9,78         | 43,22         |
| Farelo de Trigo          | 10,86         | 28,88             | 4,89         | 17,61         |

Após 72 h de FES, as produções enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase obtidas foram avaliadas e seus resultados são apresentados na Figura 4.7

Conforme o esperado, as maiores produções em relação às celulases foram obtidas nos substratos FS e FT, cujo uso é bastante difundido, pois além da sua composição rica em carboidratos e proteína apresentam propriedades físicas como textura e porosidade favoráveis em processos de FES.

A expressiva atividade de FPase no FS de até 6,65 FPU/g, representa 5 vezes a produções obtida no substrato padrão (FT), diferença que pode ser correlacionada com a disponibilidade de N orgânico para a síntese de biomassa e produção enzimática. Esta correlação linear pode ser observada na Figura 4.8

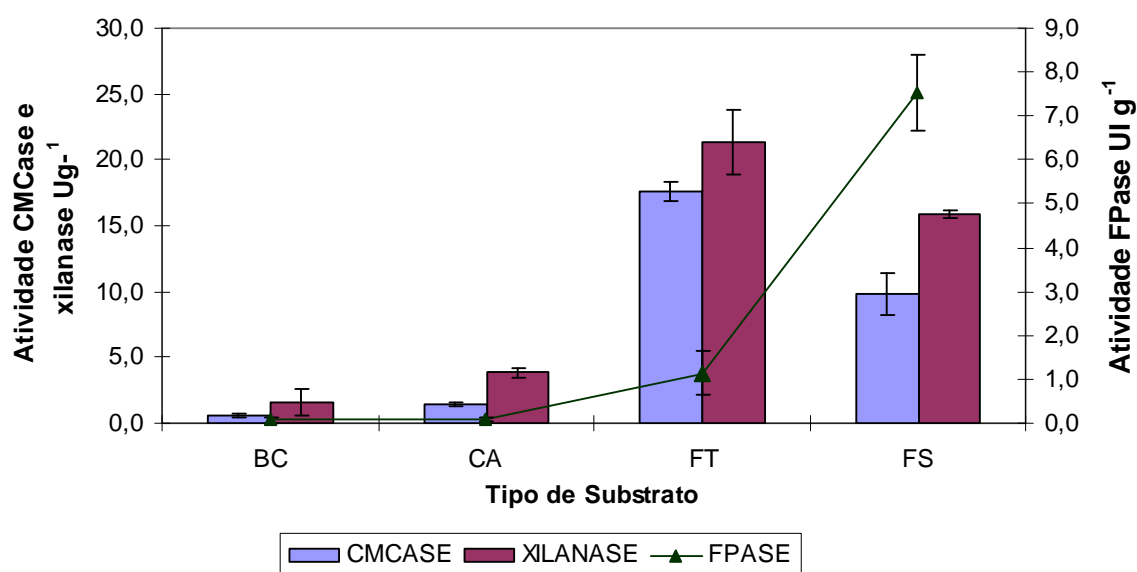


Figura 4.7 - Produção enzimática após 72 h de FES pelo *A. niger* em vários substratos lignocelulósicos. (Meio de suplementação: Czapeck modificado, umidade de 50% base úmida e [inóculo] =  $1 \times 10^7$  esporos g substrato<sup>-1</sup>).

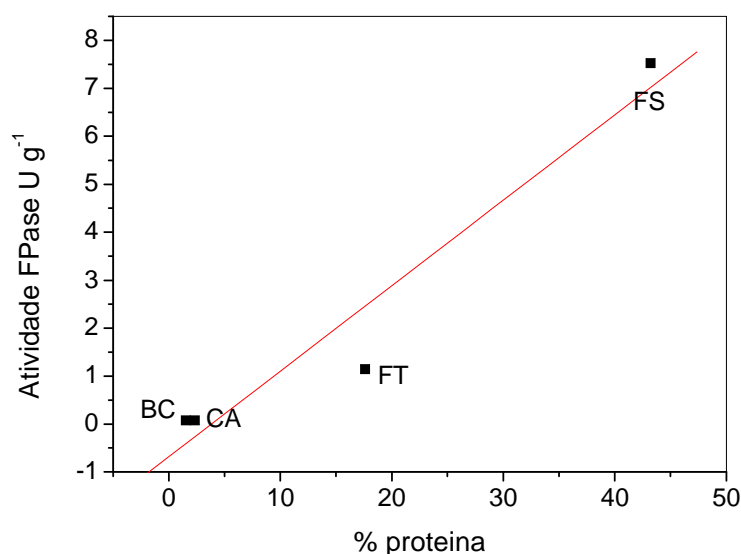


Figura 4.8 - Correlação entre a concentração de proteína e atividade FPase. Ajuste linear  $R^2=0,97$ .

Neste sentido, além da deficiência em nitrogênio orgânico em substratos como o BC e a CA, os elevados teores de lignina em ambos os substratos ( $<0,1$  FPU g<sup>-1</sup>) podem explicar as ínfimas atividades apresentadas no BC e na CA. É de conhecimento que a lignina é originada na síntese vegetal para atuar como barreira contra agentes químicos e microbianos.

Em relação à enzima CMCase, a melhor produção foi obtida quando se utilizou o FT com uma atividade enzimática de  $16,57 \text{ UI g}^{-1}$ . Os resultados com FS atingiram valores em torno de  $10 \text{ UI g}^{-1}$ . Seguindo a mesma tendência vista na produção de FPase, as atividades de CMCase no BC e na CA também foram bastante baixas.

Os resultados da produção de xilanase apresentaram uma grande variação nos substratos estudados. O FT com a maior produção ( $23 \text{ UI g}^{-1}$ ) tem sido utilizado amplamente na produção de xilanases (COURI et al., 2000, CHAPLA et al., 2010), apesar das menores atividades atingidas com o BC ( $1,6 \text{ UI g}^{-1}$ ) Ramos et al., (2001) e Solórzano, (2006), Membrillo, et al., (2008); entre outros demonstraram a efetiva indução de xilanases no BC após disponibilização da fonte de carbono na forma de carboidratos de menor massa molar.

Além da composição do substrato, pode-se ressaltar que o meio de suplementação Czapeck modificado (CHANDRA et al., 2007) não favoreceu as expressões enzimáticas nesta etapa. A principal diferença entre eles é a presença de sacarose numa concentração de  $20 \text{ gL}^{-1}$  no Czapeck. A habilidade deste dissacarídeo para favorecer a síntese enzimática de celulases depende e é específico para cada sistema regulador dos microrganismos. Assim pode ter causado um desvio metabólico prejudicial na secreção das proteínas de interesse.

Por outro lado, cabe destacar que o teor de umidade de 50%, não foi adequado para todos os substratos usados, pois as características texturais são diferentes tornando variável a sua capacidade de saturação. Por outro lado, sendo o BC o substrato em desenvolvimento, a etapa seguinte será a mistura deste com o FT (substrato com melhores qualidades texturais) e com o FS, destacado pelo elevado teor protéico refletido nas melhores atividades em FPase.

#### **4.5.3. Ensaio de FES com mistura de substratos**

Nestes experimentos, foi estudada a influência da composição do substrato quando composta por misturas de BC + FT e BC + FS em diferentes proporções. Os resultados da produção enzimática após 72 h de FES podem ser observados nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11 para as atividades FPase, CMCase e xilanase respectivamente.

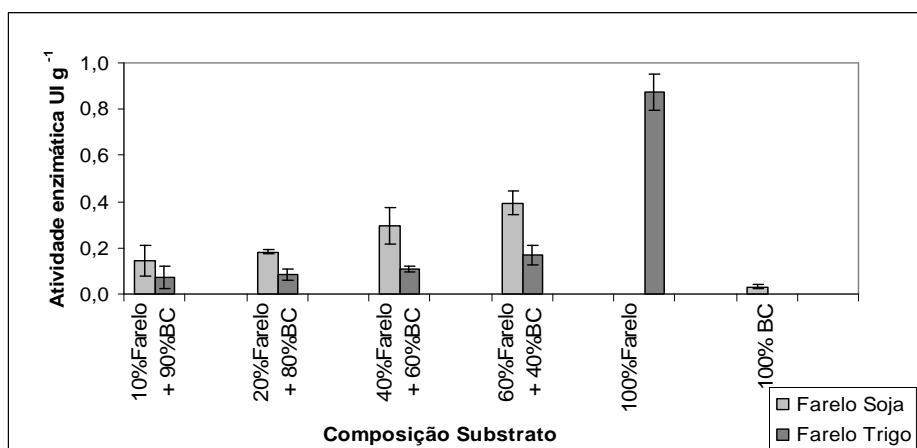


Figura 4.9 - Influência da proporção dos substratos: BC + FS e BC + FT na produção de FPase (Produção de 100% FS = 4,5 U g<sup>-1</sup> não considerada com fins comparativos)<sup>1</sup>.

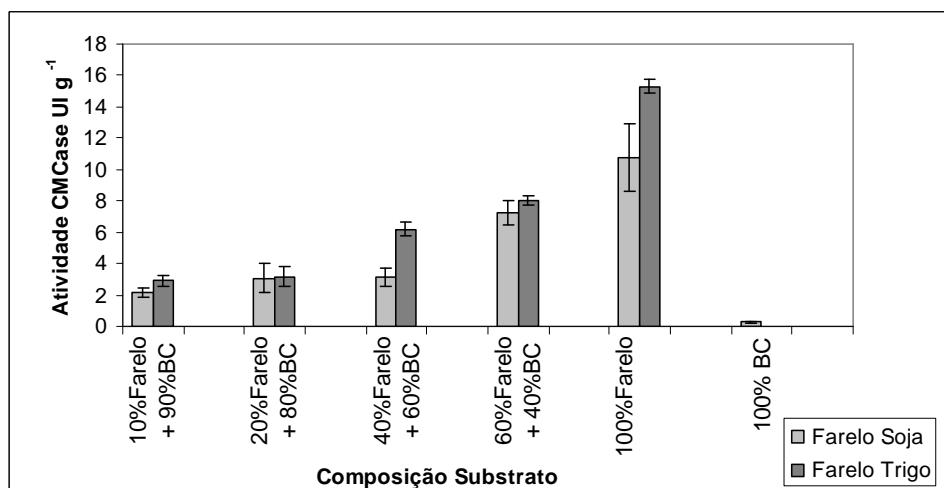


Figura 4.10 - Influência da proporção dos substratos: BC + FS e BC + FT na produção de CMCase<sup>1</sup>.

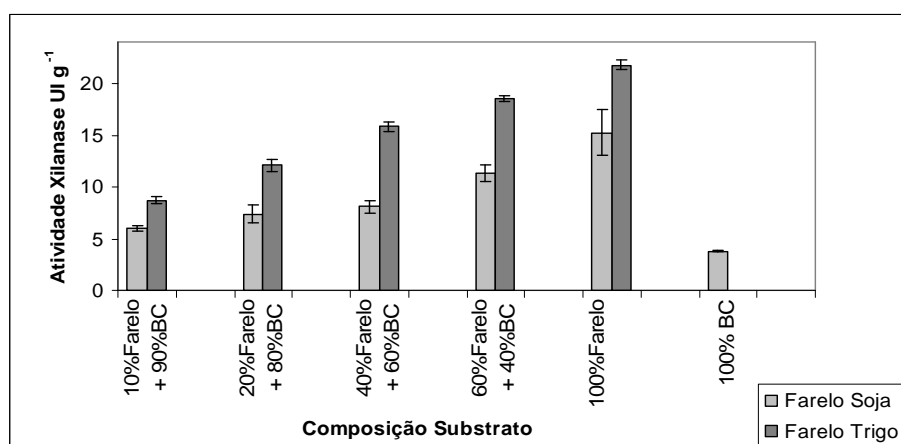


Figura 4.11 - Influência da proporção dos substratos: BC + FS e BC + FT na produção de xilanas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Meio de suplementação: Czapeck modificado, umidade de 50% base úmida e [inóculo] = 1 x 10<sup>7</sup> esporos g substrato<sup>-1</sup>.

Nota-se como tendência geral em todos os ensaios a correspondência direta entre a proporção do farelo e produção enzimática. O intervalo de trabalho escolhido (0-60% de FT/FS) visou o estabelecimento das máximas atividades com o mínimo de adição de substratos nobres, tendo em vista o BC como substrato base e principal fonte de carbono a ser usada pelo *A. niger* para a produção de celulases específicas.

Tomando-se como base as atividades obtidas em 100% de BC, os acréscimos de 10% de FS e FT, respectivamente, permitiram a intensificação da FPase em torno de 5 e 2 vezes (atingindo valores de 0,14 e 0,07 UIg<sup>-1</sup>). Para CMCase os acréscimos obtidos nesta mistura foram de 8,3 vezes no FS e 11 vezes no FT. Já os aumentos nas atividades de xilanase correspondem a 1,6 e 2 vezes na proporção avaliada.

Por outro lado, a escolha do farelo complementar ao BC pode ser suportada nos resultados de FPase (enzima representativa da atividade sinérgica das celulases) que favorecem o FS. A diferença no aumento da CMCase não foi suficientemente significativo para optar pelo FT, dado a influência negativa dos seus componentes amiláceos na síntese de celulases e xilanases relatada por Sun et al. (2008) quando estudaram a composição do FT em relação à produção de enzimas hidrolíticas.

Contudo, optou-se por continuar o desenvolvimento do processo usando uma mistura composta por 10% de FS e 90% de BC visando à seleção e formulação do meio de suplementação nas seguintes etapas. A escolha adequada e sequencial da composição do substrato (meio nutricional + indutor celulósico) visa além do fornecimento de um suporte com características ecológicas apropriados para o crescimento da morfologia fúngica, um teor nutricional e uma relação C/N que consigam direcionar o sistema metabólico para a síntese de celulases.

#### **4.5.4. Ensaios de FES para avaliação de indutores**

Ainda na tentativa do aprimoramento na qualidade do substrato, analisou-se o efeito da suplementação do meio Mandels e Weber (1969) com fontes de carbono indutoras (CMC, Avicel e celobiose) de celulases. Foram selecionados compostos de celulose comercial como a CMC e a Avicel por serem indutores de celulases na literatura de FSm (VRIES e VISSER, 2001; NOGAWA et al., 2001). A celobiose representa um açúcar de fácil metabolização e, portanto, precursor do crescimento da biomassa microbiana (COURI et al., 2000). Assim sendo, Vries e Visser, (2001) relataram que o mecanismo de indução da expressão celulásica

no *A. niger* é favorecido também pela diminuição da resistência na transferência de massa com fontes de carbono solúveis.

As figuras 4.12, 4.13 e 4.14 ilustram as atividades de FPase, CMCase e xilanase monitoradas em relação à concentração do indutor após 48 e 72 h de FES com o objetivo de conferir se o uso alterou o tempo de maior produtividade enzimática. Como parâmetro de comparação, destaca-se nas figuras os resultados obtidos com os ensaios usando meio de Mandels e Weber básico (sem adição de indutor).

Em geral o favorecimento da expressão celulásica mostrou diferentes tendências em função do indutor avaliado. A atividade enzimática FPase (Figura 4.12) foi efetivamente induzida com o acréscimo de Avicel na concentração de 0,2%. As melhores taxas de indução foram às 72 h de FES com atividades de 0,22 UI g<sup>-1</sup> que correspondem a 2,5 vezes das atividades obtidas nos testes controle.

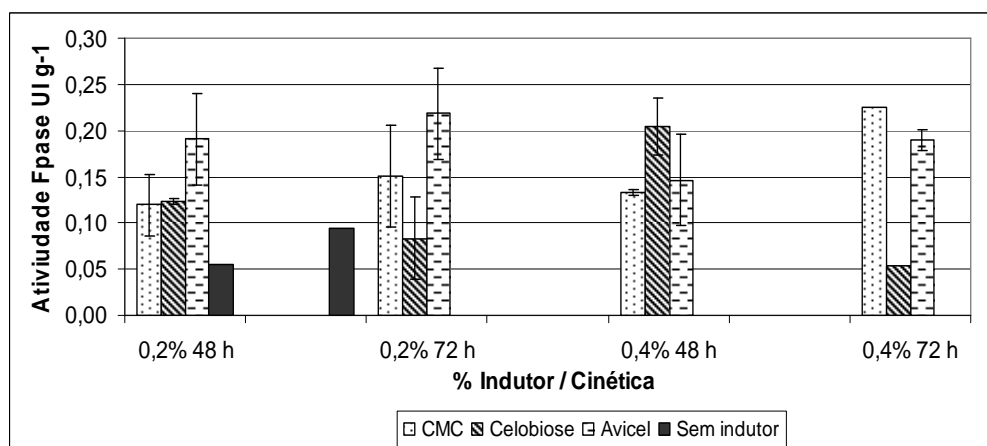


Figura 4.12 - Produções de FPase obtidas após 48 e 72 h de FES com o uso de diferentes indutores de celulasas (Meio de suplementação: Mandels e Weber básico, umidade de 50% base úmida e [inóculo] =  $1 \times 10^7$  esporos g substrato<sup>-1</sup>).

O indutor CMC mostrou uma melhor atuação à maior concentração (0,4%). Observa-se na Figura 4.13 que as atividades alcançadas em 72h (0,23 UI g<sup>-1</sup>) significaram acréscimos de 4 vezes. Por outro lado, o uso de indutores de menor massa molar como a celobiose mostrou-se mais efetivo em menores tempos de FES (48 h), após o qual se observa uma diminuição das atividades. A regulação da expressão de celulasas no *A. niger* é complexa e só parcialmente entendida. Apesar de a celulose não ser a única substância indutora de celulasas, a presença de determinados polissacarídeos no meio de suplementação pode acabar inibindo a síntese enzimática quando apresentados em concentrações específicas para cada linhagem de *A. niger* (VRIES e VISSER, 2001).

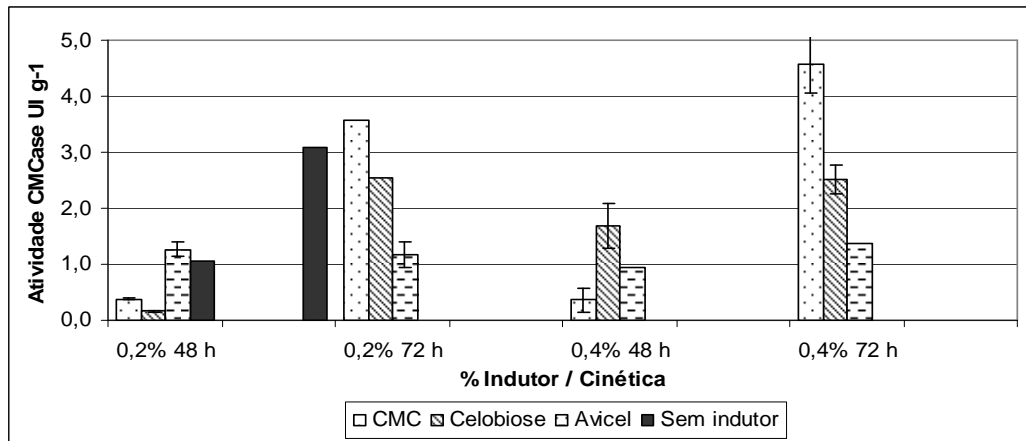


Figura 4.13 - Produções de CMCase obtidas após 48 e 72 h de FES com o uso de diferentes indutores de celulases (Meio de suplementação: Mandels e Weber básico, umidade de 50% base úmida e [inóculo] =  $1 \times 10^7$  esporos  $g \text{ substrato}^{-1}$ ).

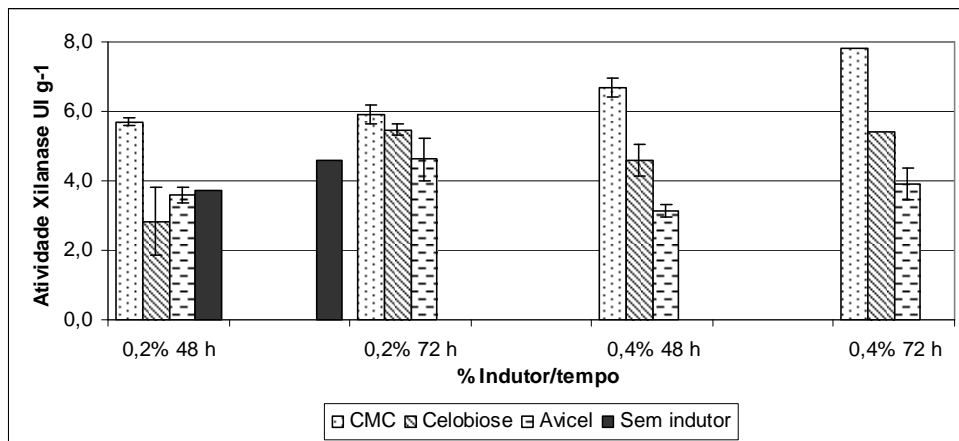


Figura 4.14 - Produções de xilanase obtidas após 48 e 72 h de FES com o uso de diferentes indutores de celulases (Meio de suplementação: Mandels e Weber básico, umidade de 50% base úmida e [inóculo] =  $1 \times 10^7$  esporos  $g \text{ substrato}^{-1}$ ).

O efeito repressor da celobiose é mais significativo para a CMCase (Figura 4.13), pois os resultados nas atividades foram menores que no substrato sem adição de indutor. Ainda neste contexto, Solis-Pereira et al. (1993) testaram o efeito dos açúcares de fácil degradação fúngica (como glicose, xilose, celobiose e lactose) na produção de xilanases e determinaram que as concentrações superiores a 1% no meio de FES podem causar repressão catabólica severa.

Tendo em vista que o produto é induzido pelo substrato, o efeito positivo do uso da CMC na indução das endoglucanases foi corroborado após 72 h de FES em ambas as concentrações de trabalho.

A superioridade relativa entre os valores obtidos para a xilanase na Figura 4.14 não foi tão significativo quando comparado com os efeitos observados nas produções de FPase e CMCase. As maiores atividades xilanásicas de aproximadamente 8 UI g<sup>-1</sup> também foram beneficiadas pela presença do indutor CMC à 0,4% após 72 h de FES.

Portanto, a fonte de carbono mais destacada como indutora das atividades FPase, CMCase e xilanase foi a celulose solúvel carboximetilcelulose (CMC) sendo assim selecionada para formulação do meio de suplementação como favorecedora do crescimento do *A. niger* e precursora efetiva de cadeias carbônicas para a síntese das estruturas enzimáticas.

#### 4.5.5. Ensaio de FES com diferentes umidades e meios de suplementação

Nesta etapa verificou-se o efeito da composição de 4 tipos de meios de suplementação os quais fornecem além de fontes de nitrogênio, sais essenciais para o crescimento fúngico. A seleção dos meios de Mandels e Weber básico e modificado (MANDELS E WEBER, 1969), Czapeck Dox modificado (CHANDRA et al., 2007) e de sacarose (PINTO, 1998) foi também baseada na literatura de fermentação para produção de celulases. A composição dos mesmos foi detalhada nas Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 na parte de material e métodos, entretanto a Tabela 4.13 mostra as principais diferenças em termos de elementos nutricionais entre eles.

Por outro lado também foi verificada a influência do teor de umidade atingida com os diferentes meios de suplementação na faixa de 60 - 80%. A produção de celulases e xilanases pelo *A. niger* foi avaliada em substrato constituído por misturas de 90% de BC e 10% de FS durante 72 h.

Tabela 4.13 Tabela comparativa com as principais diferenças entre os meios avaliados.

| Elemento                | Composição no meio de suplementação |               |         |          |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------|---------|----------|
|                         | Mandels básico                      | Mandels + CMC | Czapeck | Sacarose |
| Celulose indutora (CMC) | -                                   | ✓             | ✓       | -        |
| Açúcar (sacarose)       | -                                   | -             | ✓       | ✓        |
| Fontes de N orgânico    | ✓                                   | ✓             | -       | -        |
| Fontes de N inorgânico  | ✓                                   | ✓             | ✓       | ✓        |
| Oligoelementos (sais).  | ✓                                   | ✓             | ✓       | ✓        |

A impregnação apropriada do BC para atingir uma adequada hidratação durante as FES é um parâmetro operacional significativo visando a sua eficiência, assim verificou-se nos



testes anteriores que a umidade de 50% foi insuficiente para conseguir uma completa hidratação do substrato.

Dado que o BC possui elevada capacidade de absorção de líquidos, foram realizados testes de saturação para a seleção da faixa de umidades. Sendo que em mais de 80% de umidade (base úmida), os meios de cultivo tornam-se saturados com água visivelmente livre.

A Figura 4.15 apresenta os resultados da atividade FPase obtidos com os diferentes teores de umidade inicial para todos os tipos de meios utilizados. As atividades alcançadas no meio Mandels original e em sacarose foram pouco significativas, portanto seus valores não foram apresentados.

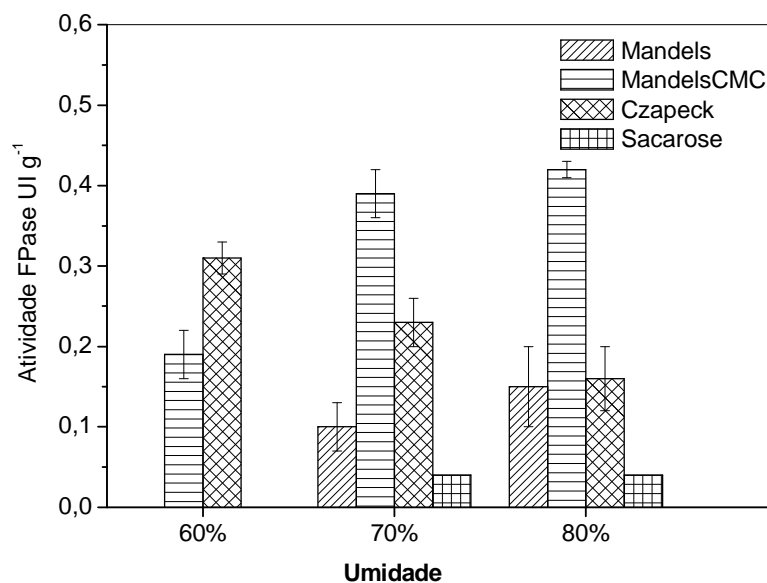


Figura 4.15 - Efeito da umidade na atividade enzimática em mistura 90%BC + 10%FS com diferentes meios de suplementação em FES com *A. niger* após 72 h.

Nota-se que o efeito positivo da umidade na produção de celulases foi mais notório com o uso dos meios de Mandels e Weber (básico e modificado), sendo que a concentração no substrato das substâncias componentes do meio é diretamente proporcional ao incremento de umidade. Além disso, torna-se destacada a importância de fontes orgânicas de nitrogênio inexistentes nos meios de Czapeck e sacarose, cujo efeito é mais evidente na Figura 4.16 onde as outras enzimas foram avaliadas nos meios contendo 80% de umidade.

Para todas as enzimas quantificadas, os melhores resultados foram obtidos utilizando o meio de Mandels e Weber modificado corroborando o efeito positivo da adição do indutor CMC, avaliado no item anterior. Atividades de FPase ( $0,39 \text{ U g}^{-1}$ ) superiores ao dobro, em relação ao meio Mandels e Weber básico, foram alcançadas após 72 horas de fermentação.

O efeito indutivo foi ainda mais expressivo nas atividades de endoglucanase e xilanase (20,99 e 24,97 UI g<sup>-1</sup>, respectivamente) cujos valores obtidos foram cerca de 3 e 4 vezes aos das atividades obtidas utilizando o meio básico (5,57 e 9,98 UI g<sup>-1</sup>, respectivamente).

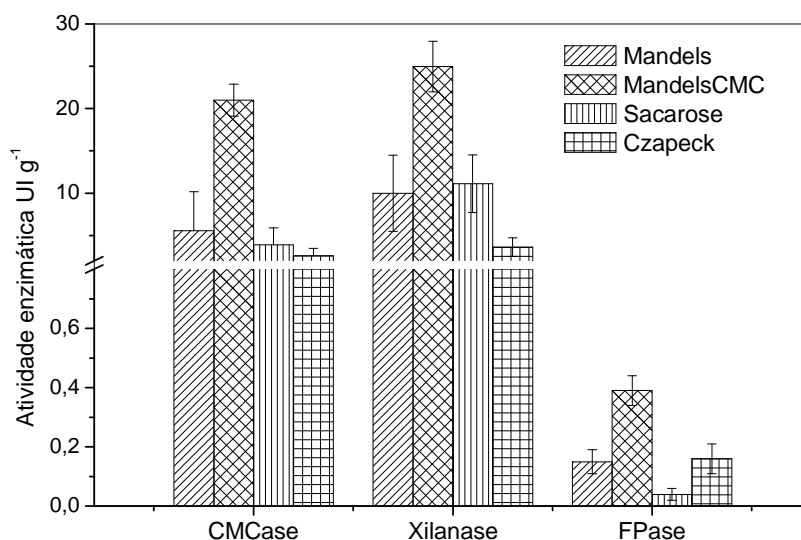


Figura 4.16 - Efeito do meio nutricional na atividade enzimática por *A.niger* em mistura 90%BC + 10%FS com 80% de umidade após 72 h de FES.

Os testes realizados com adição de sacarose, como fonte de carbono indutora (meios Czapeck-Dox e sacarose), foram baseados na literatura de Chen e Wyman (1991) e Chandra et al. (2007) relatando que esta substância promove o aumento inicial de massa celular, além de ativar a transcrição fúngica de celulasas. Na mesma tendência, Olsson et al. (2003) observaram significativos incrementos na síntese enzimática quando usaram uma combinação de celulose e polpa de beterraba pré-tratada como fonte de sacarose.

Entretanto, comparando os resultados obtidos, pode-se observar que a presença deste açúcar nas concentrações avaliadas não favoreceu a produção enzimática em concordância ao efeito negativo observado anteriormente com a celobiose.

No caso do meio Czapeck modificado contendo sacarose e CMC, sugere-se que a presença do indutor no meio foi insuficiente para compensar o efeito repressor apresentado pela sacarose na concentração de 30 g L<sup>-1</sup>, fato que foi agravado pela carência em fontes de nitrogênio orgânico. Assim, correlacionam-se a intensificação das atividades alcançadas com a presença de uréia, peptona e extrato de levedura no meio de Mandels e Weber. Khowala e Sengupta (1992) avaliaram a seletividade do *A. niger* por diversas fontes suplementares de

nitrogênio. Os resultados expressos em função do crescimento celular seguiram a seguinte sequência: Uréia>peptona>extrato de levedura>NaNO<sub>3</sub>.

Contudo, as melhores condições do presente estudo permitiram atingir valores de 0,39 UI g<sup>-1</sup> de FPase; 25 UI g<sup>-1</sup> de xilanase e 22 UI g<sup>-1</sup> de endoglucanase para a FES do *A. niger* em mistura de 90% BC e 10% de FS no meio de Mandels e Weber com adição de 5% de CMC. Estes resultados serão futuramente aprimorados após planejamento experimental visando a uma adequada seleção dos tipos e concentrações das fontes suplementares de carbono, nitrogênio e fósforo, bem como da seleção das condições operacionais relevantes da FES.

#### 4.5.6 Considerações da avaliação preliminar dos parâmetros de FES

Os experimentos de FES descritos nos itens anteriores levaram a definir as seguintes condições para as fermentações da seguinte etapa neste capítulo:

- Substrato base: bagaço de cana-de-açúcar (fonte de carbono indutora de celulases específicas).
- Substrato complementar: farelo de soja (fonte de proteínas e indutor de atividade FPase).
- Meio de suplementação de nutrientes: Mandels e Weber modificado (com adição de 0,5% de CMC como fonte de celulose solúvel e indutora do complexo celulolítico)
- Umidade: 80% base úmida (atingida com adição do meio de suplementação).
- pH do meio ajustado a 5.
- Temperatura e tempo de incubação: 32°C e 72 horas.

Além da importância das fontes de carbono como indutoras ou repressoras na síntese de celulases, os resultados destacaram a importância da suplementação do substrato com fontes de nitrogênio orgânica, dada a carência na composição do BC.

A etapa seguinte teve como finalidade a suplementação do meio de suplementação com fontes protéicas solúveis e insolúveis procurando o aprimoramento do crescimento, da ativação metabólica e a produção enzimática de celulases específicas pelo *A. niger*.

#### **4.5.7 Delineamentos Experimentais para definição de composição da suplementação**

Dada a correlação direta entre as fontes de nitrogênio e a atividade enzimática observada nas FES com diferentes substratos lignocelulósicos (seção 4.5.3) avaliou-se o incremento da proporção de FS e das concentrações de peptona, extrato de levedura, fosfato no meio de suplementação de nutrientes no substrato de fermentação.

O FS é um subproduto da cadeia produtiva do óleo vegetal e é usado como suplemento proteico para ração animal por apresentar de 40% a 48% de proteínas. O incremento máximo de 25% do FS como coadjuvante do substrato principal (BC) visou a sua utilização como fonte natural de nitrogênio de baixo custo.

Fontes ricas de nitrogênio de uso industrial, como o extrato de levedura e a peptona, foram utilizadas para acrescentar o teor protéico do meio suplementar. O extrato de levedura é obtido pelo processamento de leveduras oriundas de processos de fermentação alcoólica (*Saccharomyces cerevesiae*). Ele é amplamente usado nos cultivos para o crescimento de microrganismos em escala industrial devido ao alto teor de proteína e aminoácidos livres e por ser uma fonte rica em vitaminas do complexo B, minerais-traço e baixa quantidade de carboidratos.

A peptona de carne representa também um meio de cultura composto por peptídeos resultantes da hidrólise de proteínas de tecidos conjuntivos de animais bovinos. As composições detalhadas tanto do extrato quanto da peptona são descritas no Anexo I.

Entre as funções do fosfato monobásico de potássio no meio de Mandels e Weber está o tamponamento do meio e o fornecimento do fósforo essencial para o crescimento microbiano, portanto espera-se que seu incremento favoreça a manutenção de um pH apropriado no substrato para a produção de celulases.

##### **4.5.7.1 Seleção de variáveis significativas - Planejamento Fatorial Completo**

A partir das 4 variáveis independentes: concentração de peptona, concentração de extrato de levedura, concentração de fosfato de potássio e proporção de FS (m/m) foi possível realizar um delineamento fatorial para uma avaliação prévia das variáveis e direcionar os intervalos dos níveis a serem escolhidos no próximo planejamento. Utilizou-se um planejamento fatorial completo  $2^4$ , adicionando-se 3 repetições no ponto central (19 ensaios) como detalhado na Tabela 4.10 na seção de material e métodos.

Os valores das variáveis independentes (codificados e decodificados ou reais) e as respostas para as atividades enzimáticas FPase, CMCCase e xilanase são apresentados na Tabela 4.14. Para fins comparativos, foram adicionados 2 ensaios padrão tendo como substrato de FES 100% de BC suplementado com 80% de umidade do meio Mandels e Weber modificado e sem acréscimo de fontes de nitrogênio além das concentrações originais do meio de suplementação. Os resultados destes ensaios denominados de “controle” foram comparados com os obtidos nos ensaios do planejamento, verificando assim a influência das variáveis estudadas no aprimoramento das variáveis respostas.

Tabela 4.14 Matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>(valores reais e codificados) com as respostas de atividades enzimáticas FPase, CMCCase e xilanase após 72 de FES com *A. niger*.

| Ensaio | X <sub>1</sub> <sup>a</sup> | X <sub>2</sub> <sup>b</sup> | X <sub>3</sub> <sup>c</sup> | X <sub>4</sub> <sup>d</sup> | FPase <sup>e</sup> | CMCase <sup>e</sup> | Xilanase <sup>e</sup> |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1      | -1(8)                       | -1(4)                       | -1(2)                       | -1(10)                      | 0,26               | 9,78                | 51,53                 |
| 2      | +1(24)                      | -1(4)                       | -1(2)                       | -1(10)                      | 0,24               | 7,95                | 51,43                 |
| 3      | -1(8)                       | +1(12)                      | -1(2)                       | -1(10)                      | 0,29               | 10,29               | 63,77                 |
| 4      | +1(24)                      | +1(12)                      | -1(2)                       | -1(10)                      | 0,26               | 8,09                | 58,06                 |
| 5      | -1(8)                       | -1(4)                       | +1(6)                       | -1(10)                      | 0,27               | 13,38               | 142,48                |
| 6      | +1(24)                      | -1(4)                       | +1(6)                       | -1(10)                      | 0,19               | 10,56               | 133,08                |
| 7      | -1(8)                       | +1(12)                      | +1(6)                       | -1(10)                      | 0,30               | 13,09               | 92,53                 |
| 8      | +1(24)                      | +1(12)                      | +1(6)                       | -1(10)                      | 0,27               | 11,30               | 60,46                 |
| 9      | -1(8)                       | -1(4)                       | -1(2)                       | +1(25)                      | 0,33               | 12,75               | 60,83                 |
| 10     | +1(24)                      | -1(4)                       | -1(2)                       | +1(25)                      | 0,27               | 10,31               | 49,77                 |
| 11     | -1(8)                       | +1(12)                      | -1(2)                       | +1(25)                      | 0,32               | 16,36               | 68,20                 |
| 12     | +1(24)                      | +1(12)                      | -1(2)                       | +1(25)                      | 0,31               | 14,41               | 68,75                 |
| 13     | -1(8)                       | -1(4)                       | +1(6)                       | +1(25)                      | 0,36               | 13,00               | 86,26                 |
| 14     | +1(24)                      | -1(4)                       | +1(6)                       | +1(25)                      | 0,28               | 10,90               | 87,55                 |
| 15     | -1(8)                       | +1(12)                      | +1(6)                       | +1(25)                      | 0,33               | 17,55               | 134,92                |
| 16     | +1(24)                      | +1(12)                      | +1(6)                       | +1(25)                      | 0,31               | 14,36               | 114,28                |
| 17     | 0(16)                       | 0(8)                        | 0(4)                        | 0(15)                       | 0,29               | 12,16               | 66,23                 |
| 18     | 0(16)                       | 0(8)                        | 0(4)                        | 0(15)                       | 0,30               | 12,70               | 66,97                 |
| 19     | 0(16)                       | 0(8)                        | 0(4)                        | 0(15)                       | 0,29               | 13,24               | 68,20                 |
| 20     | Controle <sup>f</sup>       |                             |                             |                             | 0,11               | 6,74                | 74,10                 |
| 21     | Controle <sup>f</sup>       |                             |                             |                             | 0,08               | 5,58                | 88,35                 |

<sup>a</sup> concentração de peptona de carne no meio de suplementação (g L<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> concentração de extrato de levedura no meio de suplementação (g L<sup>-1</sup>); <sup>c</sup> concentração de fosfato de potássio no meio de suplementação (g L<sup>-1</sup>); <sup>d</sup> composição de FS (m/m); <sup>e</sup> atividade enzimática UI g<sup>-1</sup> - os resultados representam a média de FES em triplicata em tempo real . <sup>f</sup> Amostra com substrato controle.

Na análise preliminar das variáveis respostas, pode-se notar que os melhores valores da atividade de FPase e CMCCase foram 0,33 e 17,55 UI g<sup>-1</sup>, triplicando os resultados obtidos no meio controle (0,11 e 6,16 UI g<sup>-1</sup>, respectivamente). Estes valores foram atingidos no ensaio

15 para ambas as enzimas com as menores concentrações de peptona e os maiores valores das outras variáveis (%FS, extrato de levedura e fosfato de potássio). Por outro lado, a maior atividade de xilanase ( $142 \text{ UI g}^{-1}$  vs  $88 \text{ UI g}^{-1}$  no meio controle) foi obtida nas condições do ensaio 5: peptona  $8 \text{ g L}^{-1}$ , extrato  $4 \text{ g L}^{-1}$ , fosfato  $6 \text{ g L}^{-1}$  e 10% FS, mostrando uma tendência diferente à observada para a celulases em relação às fontes de nitrogênio.

Os dados anteriores foram analisados no programa Statistica® para o cálculo dos efeitos das variáveis independentes nas três respostas de interesse, como apresentado na Tabela 4.15. O planejamento fatorial permite a avaliação da influência das variáveis do processo e a tendência a seguir no próximo planejamento visando sua otimização.

Tabela 4.15 Efeito dos fatores estudados no planejamento completo  $2^4$  sobre as atividades enzimática FPase, CMCase e xilanase.

| Fatores    | Análise de efeitos: resposta FPase |             |       |           | Análise de efeitos: resposta CMCase |             |        |           | Análise dos efeitos: resposta xilanase |             |       |           |
|------------|------------------------------------|-------------|-------|-----------|-------------------------------------|-------------|--------|-----------|--|-------------|-------|-----------|
|            | Efeito <sup>a</sup>                | Erro Padrão | t(8)  | p - valor | Efeito <sup>a</sup>                 | Erro Padrão | t(8)   | p - valor | Efeito <sup>a</sup>                    | Erro Padrão | T(8)  | p - valor |
| Média      | 0,29                               | 0,00        | 93,94 | 0,00*     | 12,22                               | 0,12        | 104,48 | 0,00*     | 103,32                                 | 1,57        | 65,66 | 0,00*     |
| (1)Peptona | -0,04                              | 0,01        | -5,84 | 0,00*     | -2,29                               | 0,25        | -8,99  | 0,00*     | -9,51                                  | 3,43        | -2,77 | 0,02*     |
| (2)Extrato | 0,02                               | 0,01        | 3,56  | 0,01*     | 2,10                                | 0,25        | 8,25   | 0,00*     | 13,51                                  | 3,43        | 3,94  | 0,00*     |
| (3)Fosfato | 0,01                               | 0,01        | 0,89  | 0,40      | 1,78                                | 0,25        | 6,97   | 0,00*     | 9,85                                   | 3,43        | 2,87  | 0,02*     |
| (4)Farelo  | 0,05                               | 0,01        | 7,81  | 0,00*     | 3,15                                | 0,25        | 12,36  | 0,00*     | 26,31                                  | 3,43        | 7,67  | 0,00*     |
| 1 by 2     | 0,02                               | 0,01        | 2,67  | 0,03*     | 0,01                                | 0,25        | 0,03   | 0,97      | 0,24                                   | 3,43        | 0,07  | 0,94      |
| 1 by 3     | -0,01                              | 0,01        | -1,38 | 0,20      | -0,19                               | 0,25        | -0,73  | 0,48      | -1,46                                  | 3,43        | -0,43 | 0,68      |
| 1 by 4     | 0,00                               | 0,01        | -0,20 | 0,85      | -0,13                               | 0,25        | -0,50  | 0,63      | -2,12                                  | 3,43        | -0,62 | 0,55      |
| 2 by 3     | 0,01                               | 0,01        | 0,89  | 0,40      | 0,01                                | 0,25        | 0,05   | 0,96      | -9,07                                  | 3,43        | -2,64 | 0,03*     |
| 2 by 4     | -0,01                              | 0,01        | -2,08 | 0,07      | 1,83                                | 0,25        | 7,17   | 0,00*     | 3,51                                   | 3,43        | 1,02  | 0,34      |
| 3 by 4     | 0,01                               | 0,01        | 1,78  | 0,11      | -1,28                               | 0,25        | -5,02  | 0,00*     | 8,07                                   | 3,43        | 2,35  | 0,05      |

<sup>a</sup> Os efeitos são apresentados em UI g<sup>-1</sup>. As variáveis que apresentaram influência estatística significativa (a 95% de confiança) sobre concentração das enzimas avaliadas estão marcadas com estrela, \* p≤0,05.

Em relação aos efeitos na análise de FPase, pode-se verificar que, com exceção do fosfato, as demais variáveis influenciaram significativamente. A peptona apresentou efeito negativo dentro da faixa estudada ( $8\text{-}24\text{ g L}^{-1}$ ) indicando que as maiores atividades enzimáticas são atingidas com as menores concentrações deste componente. Este comportamento pode estar relacionado às diferentes respostas fisiológicas do fungo, quando submetido a diferentes condições nutricionais podendo haver um desvio metabólico levando ao acúmulo de biomassa microbiana promovida pelas proteínas da peptona em detrimento da produção de celulases. Além disso, o excesso de massa microbiana pode levar ao aumento de produção de protease no meio, devido à lise celular, e conseqüentemente à queda nas atividades enzimáticas, conforme já observado por Couri et al. (2000). Sendo que a peptona é considerada necessária para o crescimento fúngico, a sua concentração não foi diminuída, mas mantida no limite inferior de  $8\text{ g L}^{-1}$  na seguinte etapa de formulação do meio de cultivo.

A variável extrato de levedura apresentou efeito positivo sobre todas as respostas dado ao alto teor de aminoácidos simples e vitaminas necessários para a síntese enzimática. Neste planejamento, a faixa estudada foi de  $4\text{ a }12\text{ g L}^{-1}$ , enquanto que no planejamento de otimização abordou-se a faixa em  $5\text{ a }18\text{ g L}^{-1}$  (ampliação da faixa). O favorecimento da produção enzimática através do incremento do extrato de levedura concorda com os resultados obtidos por Ahamed et al. (2005) e Ahamed e Vermette (2008), indicando que fontes de nitrogênio de natureza simples (aminoácidos) são preferencialmente metabolizadas pelo *A. niger* e contribuem para uma morfologia filamentosa necessária para secreção de enzimas. Fontes de natureza complexa como a peptona, induzem a formação de protease derivada da lise celular.

Por outro lado, Panagiotou et al. (2003) e Kachlishvili et al. (2006) estudaram os efeitos de fontes nitrogenadas na produção de celulases resultando em geral no uso preferencial das fontes de nitrogênio orgânico. No presente estudo, observa-se a seletividade metabólica do *A. niger* pelo extrato de levedura, quando comparada à peptona, cuja composição se baseia em peptídeos complexos.

O FS foi a variável que apresentou maior efeito sobre todas as produções de enzima, sendo isso positivo. Vale lembrar que a suplementação deste componente no substrato principal (BC) não serve como fonte principal de carbono, mas pode ser usado como indutor do crescimento de uma biomassa capaz de degradar a celulose no BC e produzir celulases



específicas. Assim, a proporção proposta no seguinte planejamento terá como limite máximo 40% e como mínimo 5% (m/m) (ampliação da faixa inicial de 10-25%).

A concentração de fosfato influenciou positivamente na síntese enzimática de CMCase e xilanase o que indica que as concentrações de 2 a 6 g L<sup>-1</sup> no fosfato no meio de suplementação foram efetivas para a adequada manutenção do pH e no fornecimento de oligoelementos, fatos que favoreceram um balanço metabólico positivo do microrganismo favorável à produção enzimática.

No entanto, uma análise global do comportamento do bioprocessamento nesse estágio indica a relevância da seletividade microbiana frente à fonte de nitrogênio, e a tendência na suplementação do substrato com FS. Com isso, o valor do fosfato foi fixado no seu nível superior para a nova composição do meio de suplementação para FES.

Cabe destacar que os valores das atividades verificadas nas triplicatas em tempo real do planejamento fatorial (Anexo 3) permitiram verificar a variabilidade na produção enzimática em função do tempo de armazenagem do meio de ativação fúngico. As atividades enzimáticas produzidas mostraram valores menores no decorrer do tempo de armazenagem em geladeira.

Este fenômeno é explicado pela diminuição da umidade no sabugo de milho durante o tempo de estocagem, fator que associado com a diminuição da temperatura na armazenagem, exerce ação sinérgica na sobrevivência e conservação da atividade dos esporos de fungos (CHAPMAN et al., 2007).

Com isto, a idade dos esporos no sabugo de milho foi adicionada como variável independente.

#### **4.5.7.2 Delineamento Central Rotacional**

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial, desenvolveu-se um novo planejamento de experimentos baseados no DCCR. A finalidade do DCCR foi avaliar o efeito das variáveis: proporção de FS %, concentração de extrato de levedura e a idade do inóculo otimizando a produção de celulases em função das condições operacionais selecionadas.

Este planejamento DCCR com pontos axiais foi constituído por 8 ensaios em dois níveis (-1 e +1), 6 ensaios nos pontos axiais (-1,68 e +1,68) e 6 ensaios no ponto central, totalizando 20 ensaios em duplicata em tempo real.

A matriz dos ensaios com os valores reais citados acima e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para as atividades enzimáticas FPase, CMCase e xilanase estão apresentados nas Tabelas 4.16, 4.17 e 4.18. Para efeito de comparação,

novamente foram realizados 2 ensaios denominados como “Controle” com 100% de BC como substrato e 80% de umidade atingida com suplementação do meio Mandels e Weber modificado sem acréscimo de fontes de nitrogênio além das concentrações originais do meio de suplementação.

Tabela 4.16 Matriz do DCCR com níveis reais e codificados da variável resposta: atividade enzimática FPase, valores preditos pelo modelo e desvios relativos.

| Ensaio | X <sub>1</sub> <sup>a</sup> | X <sub>2</sub> <sup>b</sup> | X <sub>3</sub> <sup>c</sup> | Fpase <sup>d</sup> | Fpase predita <sup>e</sup> | Desvio relativo (%) <sup>f</sup> |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 1      | -1 (15)                     | -1 (8)                      | -1 (4)                      | 0,26               | 0,25                       | 4,31                             |
| 2      | +1 (35)                     | -1 (8)                      | -1 (4)                      | 0,26               | 0,25                       | 7,06                             |
| 3      | -1 (15)                     | +1 (16)                     | -1 (4)                      | 0,30               | 0,27                       | 7,16                             |
| 4      | +1 (35)                     | +1 (16)                     | -1 (4)                      | 0,28               | 0,27                       | 3,68                             |
| 5      | -1 (15)                     | -1 (8)                      | + 1 (10)                    | 0,17               | 0,20                       | -16,48                           |
| 6      | +1 (35)                     | -1 (8)                      | + 1 (10)                    | 0,19               | 0,20                       | -4,56                            |
| 7      | -1 (15)                     | +1 (16)                     | + 1 (10)                    | 0,21               | 0,23                       | -7,99                            |
| 8      | +1 (35)                     | +1 (16)                     | + 1 (10)                    | 0,24               | 0,23                       | 6,09                             |
| 9      | -1,6(8,2)                   | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,25               | 0,36                       | -46,86                           |
| 10     | +1,6(41,8)                  | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,25               | 0,36                       | -46,86                           |
| 11     | 0 (25)                      | -1,6 (5,3)                  | 0 (7)                       | 0,25               | 0,15                       | 41,29                            |
| 12     | 0 (25)                      | +1,6 (18,7)                 | 0 (7)                       | 0,28               | 0,19                       | 29,72                            |
| 13     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | -1,6 (2)                    | 0,16               | 0,21                       | -33,38                           |
| 14     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 1,6(12)                     | 0,14               | 0,13                       | 7,94                             |
| 15     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,16               | 0,17                       | -7,45                            |
| 16     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,17               | 0,17                       | -0,68                            |
| 17     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,17               | 0,17                       | -1,59                            |
| 18     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,18               | 0,17                       | 6,09                             |
| 19     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,19               | 0,17                       | 9,15                             |
| 20     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 0,19               | 0,17                       | 9,15                             |
| 21     | Controle <sup>g</sup>       |                             |                             | 0,09               |                            |                                  |
| 22     | Controle <sup>g</sup>       |                             |                             | 0,13               |                            |                                  |

<sup>a</sup> composição de farelo de soja (m/m); <sup>b</sup> concentração de extrato de levedura no meio de suplementação (g L<sup>-1</sup>); <sup>c</sup> idade do inóculo (d); <sup>d</sup> atividade enzimática UI g<sup>-1</sup> - os resultados representam a média de 2 determinações; <sup>e</sup> atividade enzimática UI g<sup>-1</sup> preditos pelo modelo obtido após análise estatística no programa Statistic; <sup>f</sup> Desvio Relativo= (resposta experimental - resposta prevista pelo modelo/ resposta experimental)\*100. <sup>g</sup> Amostra com substrato controle.

Observa-se na Tabela 4.16 que as atividades em FPase variaram de 0,14 a 0,30 UI g<sup>-1</sup> (ensaios 14 e 3). Os melhores resultados foram alcançados nos 4 primeiros ensaios indicando que os maiores tempos de armazenagem do meio de ativação fúngica têm um efeito negativo na variável resposta. Coincidentemente o ensaio com a menor produção (0,14 UI g<sup>-1</sup>) corresponde ao maior tempo de estocagem.

Tabela 4.17 Matriz do DCCR com níveis reais e codificados da variável resposta: atividade enzimática CMCase, valores preditos pelo modelo e desvios relativos.

| Ensaio | X <sub>1</sub> <sup>a</sup> | X <sub>2</sub> <sup>b</sup> | X <sub>3</sub> <sup>c</sup> | CMCase <sup>d</sup> | CMCase predita <sup>e</sup> | Desvio Relativo(%) <sup>f</sup> |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 1      | -1 (15)                     | -1 (8)                      | -1 (4)                      | 14,36               | 13,24                       | 7,80                            |
| 2      | +1 (35)                     | -1 (8)                      | -1 (4)                      | 18,01               | 15,72                       | 12,72                           |
| 3      | -1 (15)                     | +1 (16)                     | -1 (4)                      | 15,59               | 13,24                       | 15,09                           |
| 4      | +1 (35)                     | +1 (16)                     | -1 (4)                      | 18,92               | 15,72                       | 16,93                           |
| 5      | -1 (15)                     | -1 (8)                      | + 1 (10)                    | 11,80               | 10,96                       | 7,16                            |
| 6      | +1 (35)                     | -1 (8)                      | + 1 (10)                    | 13,74               | 13,44                       | 2,16                            |
| 7      | -1 (15)                     | +1 (16)                     | + 1 (10)                    | 12,14               | 10,96                       | 9,72                            |
| 8      | +1 (35)                     | +1 (16)                     | + 1 (10)                    | 13,51               | 13,44                       | 0,51                            |
| 9      | -1,6(8,2)                   | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 4,99                | 9,49                        | -90,13                          |
| 10     | 1,6(41,8)                   | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 8,91                | 13,65                       | -53,16                          |
| 11     | 0 (25)                      | -1,6 (5,3)                  | 0 (7)                       | 13,01               | 16,57                       | -27,36                          |
| 12     | 0 (25)                      | + 1,6 (18,7)                | 0 (7)                       | 13,28               | 16,57                       | -24,74                          |
| 13     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | -1,6 (2)                    | 7,42                | 13,49                       | -81,65                          |
| 14     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 1,6 (12)                    | 7,48                | 9,65                        | -29,00                          |
| 15     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 11,82               | 11,57                       | 2,12                            |
| 16     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 10,80               | 11,57                       | -7,12                           |
| 17     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 12,31               | 11,57                       | 5,99                            |
| 18     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 12,08               | 11,57                       | 4,21                            |
| 19     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 11,84               | 11,57                       | 2,24                            |
| 20     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 11,71               | 11,57                       | 1,23                            |
| 21     | Controle <sup>g</sup>       |                             | 5 d                         | 7,70                |                             |                                 |
| 22     | Controle <sup>g</sup>       |                             | 5 d                         | 6,07                |                             |                                 |

<sup>a</sup> composição de farelo de soja (m/m); <sup>b</sup> concentração de extrato de levedura no meio de suplementação (g L<sup>-1</sup>); <sup>c</sup> idade do inóculo (d); <sup>d</sup> atividade enzimática (UI g<sup>-1</sup>) - os resultados representam a média de 2 determinações; <sup>e</sup> Atividade enzimática UI g<sup>-1</sup> preditos pelo modelo obtido após análise estatística no programa Statistic; <sup>f</sup> Desvio Relativo= (resposta experimental - resposta prevista pelo modelo/ resposta experimental)\*100. <sup>g</sup> Amostra com substrato controle.

Na mesma tendência da FPase, a matriz de respostas para CMCase registra as maiores atividades nos primeiros ensaios com idades de inóculo de 4 dias (Tabela 4.17). A influência prejudicial da idade dos esporos pode estar relacionada com diminuição da umidade no substrato nutriente de ativação. Observou-se ressecamento no sabugo de milho, suporte e nutriente dos esporos, após 4 dias de armazenagem na geladeira, com isto atividades de água insuficiente no meio de manutenção fúngica prejudicam a morfologia e crescimento microbiano (CHAPMAN et al., 2007).

Nota-se que a menor atividade 4,99 UI g<sup>-1</sup> foi obtida no ensaio 9 (8% de FS, 12 g L<sup>-1</sup> de extrato e 7 dias de armazenagem) inferindo que além do tempo de estocagem, a proporção de FS foi determinante na produção de CMCase.

Tabela 4.18 Matriz do DCCR com níveis reais e codificados da variável resposta: atividade enzimática xilanase, valores preditos pelo modelo e desvios relativos.

| Ensaio | X <sub>1</sub> <sup>a</sup> | X <sub>2</sub> <sup>b</sup> | X <sub>3</sub> <sup>c</sup> | Xilanase <sup>d</sup> | Xilanase predita <sup>e</sup> | Desvio Relativo(%) <sup>f</sup> |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1      | -1 (15)                     | -1 (8)                      | -1 (4)                      | 85,43                 | 93,24                         | -9,14                           |
| 2      | +1 (35)                     | -1 (8)                      | -1 (4)                      | 79,71                 | 93,24                         | -16,97                          |
| 3      | -1 (15)                     | +1 (16)                     | -1 (4)                      | 120,67                | 111,50                        | 7,60                            |
| 4      | +1 (35)                     | +1 (16)                     | -1 (4)                      | 96,20                 | 111,50                        | -15,90                          |
| 5      | -1 (15)                     | -1 (8)                      | +1 (10)                     | 89,21                 | 93,24                         | -4,52                           |
| 6      | +1 (35)                     | -1 (8)                      | +1 (10)                     | 88,66                 | 93,24                         | -5,17                           |
| 7      | -1 (15)                     | +1 (16)                     | +1 (10)                     | 92,43                 | 111,50                        | -20,63                          |
| 8      | +1 (35)                     | +1 (16)                     | +1 (10)                     | 94,93                 | 111,50                        | -17,46                          |
| 9      | -1,6 (8,2)                  | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 125,47                | 123,30                        | 1,73                            |
| 10     | +1,6(41,8)                  | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 146,41                | 123,30                        | 15,78                           |
| 11     | 0 (25)                      | -1,6(5,3)                   | 0 (7)                       | 86,71                 | 77,65                         | 10,45                           |
| 12     | 0 (25)                      | +1,6(18,7)                  | 0 (7)                       | 124,44                | 108,32                        | 12,95                           |
| 13     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | -1,6(2)                     | 100,16                | 97,59                         | 2,57                            |
| 14     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | +1,6(12)                    | 120,18                | 97,59                         | 18,80                           |
| 15     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 141,78                | 140,43                        | 0,95                            |
| 16     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 144,88                | 140,43                        | 3,07                            |
| 17     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 145,92                | 140,43                        | 3,76                            |
| 18     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 136,49                | 140,43                        | -2,89                           |
| 19     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 137,22                | 140,43                        | -2,34                           |
| 20     | 0 (25)                      | 0 (12)                      | 0 (7)                       | 137,22                | 140,43                        | -2,34                           |
| 21     | Controle <sup>g</sup>       |                             | 5 (d)                       | 81,50                 |                               |                                 |
| 22     | Controle <sup>g</sup>       |                             | 5 (d)                       | 78,45                 |                               |                                 |

<sup>a</sup> composição de farelo de soja (m/m); <sup>b</sup> concentração de extrato de levedura no meio de suplementação (g L<sup>-1</sup>); <sup>c</sup> idade do inóculo (d); <sup>d</sup> atividade enzimática (UI g<sup>-1</sup>) - os resultados representam a média de 2 determinações; <sup>e</sup> Atividade enzimática UI g<sup>-1</sup> preditos pelo modelo obtido após análise estatística no programa Statistic; <sup>f</sup> Desvio Relativo= (resposta experimental - resposta prevista pelo modelo/resposta experimental)\*100. <sup>g</sup> Amostra com substrato controle.

Por outro lado, a matriz dos resultados para xilanase (Tabela 4.18) registra atividades superiores nos ensaios do ponto central (15-20), sugerindo que o adequado balanço nutricional em relação às fontes protéicas foi suficientemente significativo e beneficiou as atividades enzimáticas. Além do mais, esses ensaios apresentaram os menores desvios relativos (desvios <10%), indicando boa repetibilidade do processo.

Em relação ao primeiro planejamento, cuja melhor condição forneceu  $134,92 \text{ UI g}^{-1}$ , houve um ligeiro acréscimo, porém a faixa de variabilidade foi menor ( $79 - 146 \text{ UI g}^{-1}$ ) frente à ( $51 - 142 \text{ UI g}^{-1}$ ), indicando uma faixa de trabalho mais próxima ao ótimo.

Analogamente ao planejamento fatorial precedente (seção 4.5.7.1), realizou-se a avaliação dos resultados nesta etapa com o programa Statistica® possibilitando o cálculo dos coeficientes de regressão e os modelos matemáticos que descrevem a influência das condições experimentais sobre as variáveis respostas (FPase, CMCCase e xilanase). Esses coeficientes permitem determinar a significância estatística das variáveis avaliadas e constituem os termos lineares e quadráticos do modelo empírico formulado.

A análise estatística para cada variável resposta (FPase, CMCCase e xilanase), é apresentada na Tabela 4.19. Podem ser observados os efeitos significativos, coeficientes de regressão e os valores de p para avaliação da sua significância estatística a 90%.

Na construção do modelo da FPase (Eq. 4.5), os parâmetros considerados como significativos ( $p < 0,1$ ) foram: o componente quadrático do %FS, os componentes linear e quadrático da concentração do extrato de levedura e o componente linear da idade do inóculo. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4.20.

Os coeficientes lineares positivos indicam a direta relação entre o incremento da atividade FPase com o incremento da variável avaliada enquanto que os negativos sugerem a relação inversa. A construção dos modelos empíricos para as outras respostas nas condições deste planejamento segue procedimento similar ao descrito para a FPase.

A análise para CMCCase, mostra o termo quadrático do extrato de levedura como único fator significativo. No entanto, para formulação do modelo descritivo (Eq. 4.6) foram consideradas a idade do inóculo, em concordância ao verificado na matriz das respostas em atividades enzimáticas (Tabela 4.17), quanto à proporção de FS, pois seu efeito foi determinante no primeiro planejamento (Seção 4.5.7.1).

Para a xilanase, os termos quadrático de % FS, linear e quadrático do extrato de levedura e o quadrático da idade de inóculo, mostraram-se significativos na faixa de estudo permitindo a construção do modelo (Eq. 4.7).

Tabela 4.19 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valores t e p valor provenientes do DCCR para otimização do meio de suplementação.

| Fatores                               | FPase           |             |       |           | CMCase          |             |       |           | Xilanase        |             |       |           |
|---------------------------------------|-----------------|-------------|-------|-----------|-----------------|-------------|-------|-----------|-----------------|-------------|-------|-----------|
|                                       | Coef. regressão | Erro Padrão | t(10) | p-valor   | Coef. regressão | Erro Padrão | t(10) | p-valor   | Coef. regressão | Erro Padrão | t(10) | p-valor   |
| Média                                 | 0,17            | 0,01        | 17,11 | <0,0001 * | 11,57           | 1,41        | 8,21  | <0,0001 * | 140,43          | 6,30        | 22,28 | <0,0001 * |
| (x <sub>1</sub> )Farelo soja (L)      | 0,00            | 0,01        | 0,55  | 0,5975    | 1,24            | 0,94        | 1,32  | 0,2157 ** | 0,51            | 4,18        | 0,12  | 0,9053    |
| Farelo soja (Q)                       | 0,03            | 0,01        | 4,90  | 0,0006 *  | -0,49           | 0,91        | -0,54 | 0,6036    | -6,07           | 4,07        | -1,49 | 0,1669 *  |
| (x <sub>2</sub> )Extrato levedura (L) | 0,01            | 0,01        | 2,16  | 0,0563 *  | 0,20            | 0,94        | 0,21  | 0,8361    | 9,13            | 4,18        | 2,18  | 0,0540 *  |
| Extrato levedura Q                    | 0,04            | 0,01        | 5,78  | 0,0002 *  | 1,77            | 0,91        | 1,87  | 0,0913 *  | -16,81          | 4,07        | -4,13 | 0,0021 *  |
| (x <sub>3</sub> )Idade inóculo (L)    | -0,02           | 0,01        | -3,30 | 0,0080 *  | -1,14           | 0,94        | -1,22 | 0,2501 ** | 1,24            | 4,18        | 0,30  | 0,7737    |
| Idade inóculo (Q)                     | 0,00            | 0,01        | -0,47 | 0,6484    | -0,31           | 0,91        | -0,34 | 0,7401    | -15,18          | 4,07        | -3,73 | 0,0039 *  |
| 1L * 2L                               | 0,00            | 0,01        | -0,09 | 0,9308    | -0,11           | 1,22        | -0,09 | 0,9299    | -1,96           | 5,46        | -0,36 | 0,7270    |
| 1L * 3L                               | 0,01            | 0,01        | 0,80  | 0,4415    | -0,46           | 1,22        | -0,38 | 0,7144    | 4,02            | 5,46        | 0,73  | 0,4793    |
| 2L * 3L                               | 0,00            | 0,01        | 0,49  | 0,6348    | -0,25           | 1,22        | -0,21 | 0,8390    | -5,28           | 5,46        | -0,97 | 0,3569    |

\*fatores estatisticamente significativos a  $p \leq 0,1$ ; (90% de nível de confiança). \*\*fatores incluídos no modelo pelo autor. L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

$$F_{pase} \text{ (UI g}^{-1}\text{)}^1 = 0,17 + 0,031 X_1^2 + 0,014 X_2 + 0,037 X_2^2 - 0,022 X_3 \quad \text{(Equação 4.5)}$$

$$CMCase \text{ (UI g}^{-1}\text{)}^1 = 11,57 + 1,24 X_1 + 1,77 X_2^2 - 1,14 X_3 \quad \text{(Equação 4.6)}$$

$$Xilanasase \text{ (UI g}^{-1}\text{)}^1 = 140,43 - 6,07 X_1^2 + 9,13 X_2 - 16,81 X_2^2 - 15,18 X_3^2 \quad \text{(Equação 4.7)}$$

Onde:

$X_1$ : % Farelo de soja na composição do substrato.

$X_2$ : Concentração do extrato de levedura no meio de suplementação ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$X_3$ : Idade do inóculo (d).

Cada um dos modelos codificados (Eq. 4.5), (Eq. 4.6) e (Eq. 4.7) foi submetido ao processo de validação pela ANOVA para o cálculo do valor F (Teste Fisher), e cujos resultados são apresentados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 ANOVA do modelo quadrático para predição das atividades enzimáticas representativas das enzimas celulolíticas ( $\text{UI g}^{-1}$ ).

| Fonte de Variação | Fpase           |                 |                 |                  | CMCase          |                 |                 |                  | Xilanasase      |                 |                 |                  |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
|                   | SQ <sup>a</sup> | Gl <sup>b</sup> | QM <sup>c</sup> | F <sub>cal</sub> | SQ <sup>a</sup> | Gl <sup>b</sup> | QM <sup>c</sup> | F <sub>cal</sub> | SQ <sup>a</sup> | Gl <sup>b</sup> | QM <sup>c</sup> | F <sub>cal</sub> |
| Regressão         | 0,0435          | 4               | 0,0109          | 24,5             | 84,82           | 3               | 28,27           | 3,6              | 9060            | 4               | 2265            | 12               |
| Resíduo           | 0,0067          | 15              | 0,0004          |                  | 126,76          | 16              | 7,92            |                  | 2796            | 15              | 186             |                  |
| Total             | 0,0502          |                 |                 |                  | 211,58          |                 |                 |                  | 11856           |                 |                 |                  |

<sup>a</sup> soma de quadrados; <sup>b</sup> graus de liberdade; <sup>c</sup> quadrados médios.

De forma complementar a Tabela 4.21 mostra os parâmetros decisórios da validação dos modelos propostos. Assim mediante verificação da superioridade nos valores de F calculados frente aos do F tabelados pode-se dizer que todos os modelos foram válidos (90% de confiança) e representam os dados experimentais na região estudada. Os valores dos coeficientes de determinação advertem a porcentagem de variabilidade explicada por cada um dos modelos. O baixo  $R^2$  mostrado para a CMCase sugere a elevada heterogeneidade dos resultados e é produto da inclusão “arbitrária” dos termos lineares de FS e idade do inóculo, incapacitando o modelo para representar os dados obtidos no presente estudo.

Tabela 4.21 Parâmetros de verificação para validação dos modelos.

| Parâmetros validação                 | Fpase | CMCase | Xilanasase |
|--------------------------------------|-------|--------|------------|
| % variação explicada $R^2$           | 86    | 45     | 74         |
| F tabelado, 0,1 *                    | 2,36  | 2,46   | 2,36       |
| F <sub>calc</sub> / F <sub>tab</sub> | 10    | 1,45   | 5,15       |
| Modelo significativo                 | √     |        | √          |

\* Valores extraídos da Tabela estatística F

<sup>1</sup> A construção do modelo no programa Statistica é realizada mediante o ajuste dos dados experimentais a uma função polinomial pelo método dos mínimos quadrados.

Validados os modelos (4.5) e (4.7), estes podem ser utilizados na construção das superfícies de resposta no programa Statistica®. Estas superfícies representativas para FPase e xilanase respectivamente, são apresentadas nas Figuras 4.17 e 4.18.

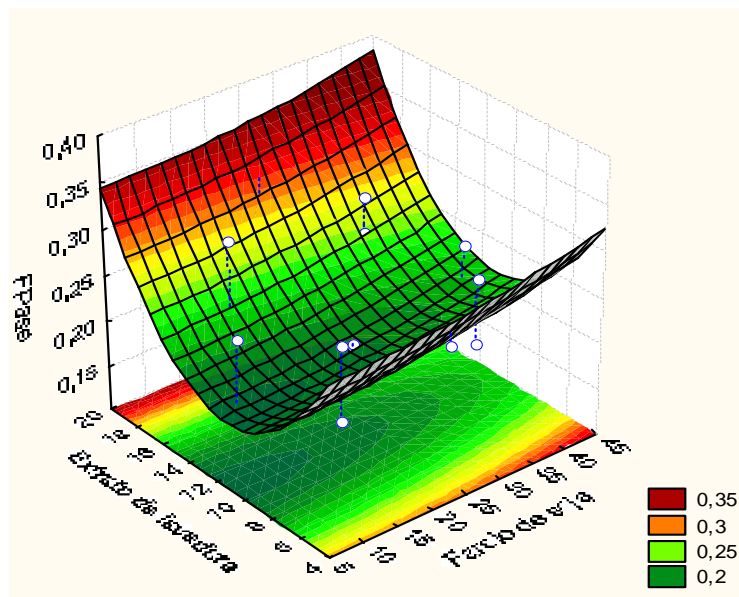


Figura 4.17 - Superfície de resposta para a FPase (UI g<sup>-1</sup>) em função da concentração de extrato de levedura e a proporção de FS .

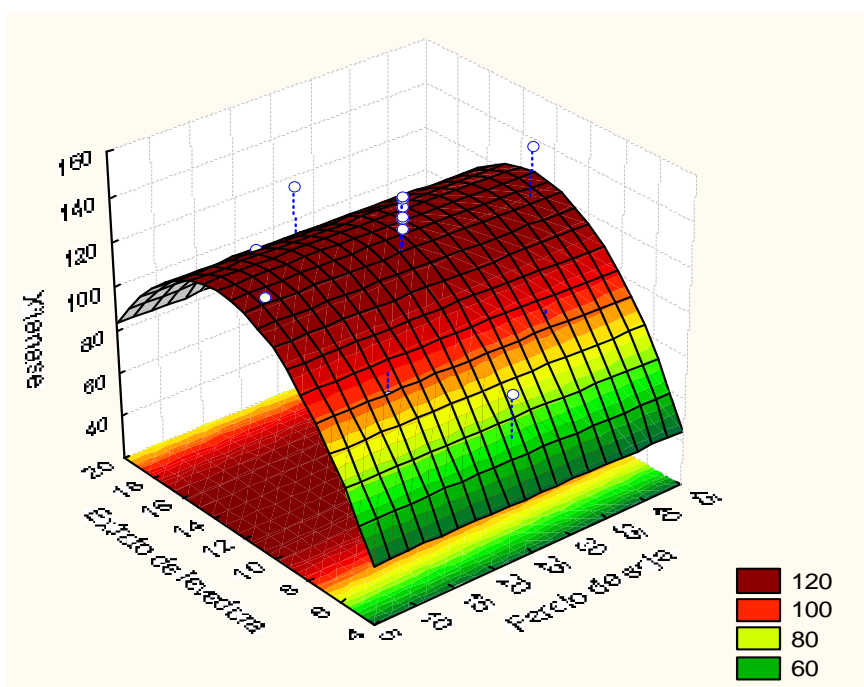


Figura 4.18 - Superfície de resposta para a xilanase (UI g<sup>-1</sup>) em função da concentração de extrato de levedura e a proporção de FS.

Da Figura 4.17 pode-se mencionar que existe um decréscimo inicial na produção de FPase em função do incremento da concentração do extrato na faixa de 4- 12 g L<sup>-1</sup>, após a qual houve um significativo aumento na resposta em função direta com a concentração do



extrato de levedura. Embora não se ter atingido a região ótima para produção enzimática, os melhores resultados obtidos na concentração de 20 g L<sup>-1</sup> com 45 % de FS indicam a tendência ao favorecimento do processo com o acréscimo destes componentes no meio.

Na superfície de resposta da xilanase (Figura 4.18), observa-se que as combinações dos parâmetros avaliados nos níveis máximos ou mínimos influenciam fortemente o resultado da função reposta, ou seja, o deslocamento nas direções de máximo ascendente ou mínimo descendente provoca um decréscimo na atividade enzimática. Esse comportamento, derivado da significância dos termos quadráticos negativos no modelo, indica a existência de limites máximos na concentração das variáveis independentes após os quais apresentam efeito inibitório.

Portanto, a melhor condição para a produção de xilanase é atingida com 12 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura num intervalo de 5-45% de FS. De acordo com Rodrigues e Iemma (2005), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos e mantendo-se ainda o processo na condição otimizada.

Cabe mencionar que a tendência sinérgica de suplementação com extrato de levedura e FS resulta favorável para a atividade de FPase e pode tornar-se prejudicial na atividade de xilanase. No entanto, a avaliação dos efeitos na CMCase permitirá fundamentar as decisões para a formulação do meio a ser utilizada no *upstream* do bioprocesso em desenvolvimento.

Dado o baixo coeficiente de determinação do modelo para CMCase, que impossibilitou a construção do modelo, a Figura 4.19 apresenta o diagrama de Pareto, o qual permite analisar o efeito das variáveis estatisticamente significativas na produção desta enzima.

O efeito quadrático do extrato de levedura considerado como significativo indica o aumento exponencial da produção em função do aumento deste componente, embora não significativo o termo linear da % FS sugere o efeito positivo do mesmo, mas o efeito quadrático negativo indica também um limite máximo. E como mostrado tanto para FPase quanto para xilanase, a idade do inóculo apresenta efeito negativo na resposta enzimática.

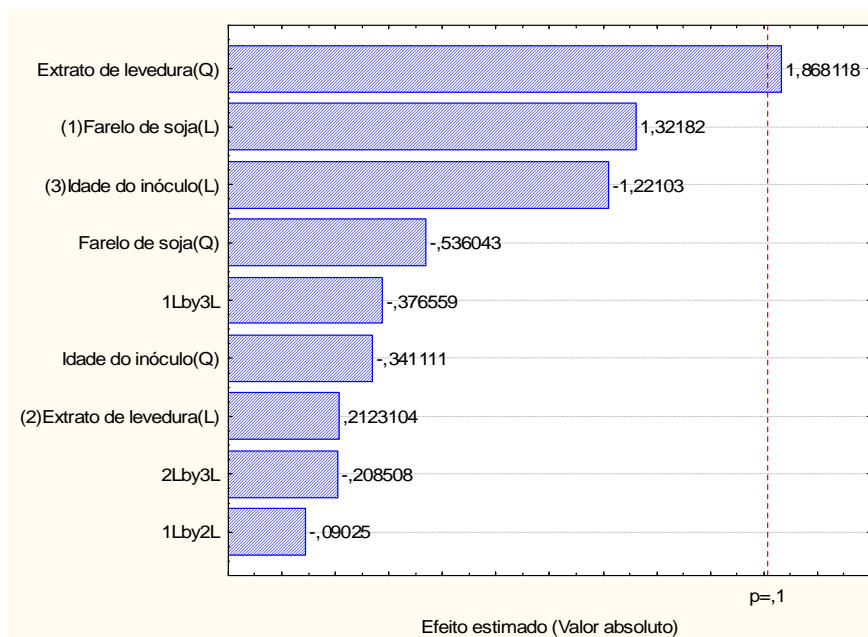


Figura 4.19 - Diagrama de Pareto com o efeito das variáveis % de FS, concentração de extrato de levedura e idade do inóculo (d) sobre a atividade de CMCase.

Todavia, os argumentos anteriores permitem direcionar e selecionar as seguintes condições na consecução de desenvolvimento do bioprocesso:

- foi estabelecido um limite de 4 dias como tempo máximo de armazenamento do meio de ativação fúngica em geladeira,
- em consideração ao substrato, a suplementação do BC com a FS terá como limite superior 35%, pois além de desvirtuar sua função como indutor, as proporções excessivas podem derivar na produção de proteases, e
- a concentração do extrato de levedura no meio também será determinada em 18 g L<sup>-1</sup>, dado que esta é a condição mais favorável na produção de FPase sem detrimento da produção de xilanase como verificado nas Figuras 4.17 e 4.18.

Finalmente, dentro das condições usadas neste estágio de desenvolvimento, os melhores resultados foram comparados com alguns artigos mais recentes na literatura, que utilizaram o gênero *Aspergillus* como agente de FES. Assim na Tabela 4.22 as atividades enzimáticas foram expressas em UI mL<sup>-1</sup> de extrato enzimático.

No presente estágio, os valores obtidos na Tabela 4.22 foram resultados da avaliação da seletividade do *A. niger* pelas fontes de carbono e nitrogênio visando a biossíntese e secreção de celulases e xilanases. Entretanto, sabe-se que a eficiência global dos bioprocessos depende

de vários outros parâmetros como a aeração, disponibilidade de oxigênio e o tipo de reator utilizado, além do seu controle e monitoramento.

Assim, a seguinte etapa do trabalho consistiu na seleção das melhores condições da FES em biorreatores de coluna com umidade e fluxo de ar controlados. Tanto o substrato quanto o meio de suplementação selecionados no presente capítulo serviram como ponto de partida nos experimentos seguintes buscando a melhora contínua na produção de enzimas celulolíticas específicas.

Tabela 4.22 Dados relativos à produção de celulases e xilanases com *Aspergillus* por FES.

| Microrganismo                           | Substrato                       | Atividade (UI mL <sup>-1</sup> )                   | Referência                 |
|---|---------------------------------|--|----------------------------|
| <i>A. niger</i>                         | 35% de FS e 65% de BC           | FPase : 0,03<br>CMCase 2, 00 e<br>xilanase: 15,12. | Este trabalho              |
| <i>A. awamori</i>                       | 100% farelo de trigo            | CMCase 0,42 e<br>xilanase 4,9.                     | Gottschalk et al. (2010).  |
| <i>A. niger</i> MS 82                   | 100 % BC                        | CMCase: 0,35                                       | Sohail et al. (2009).      |
| <i>A. niger</i> MTCC                    | 100% farelo de trigo            | FPase 0.22<br>CMCase 6.77.                         | Sukumaram et al. (2009).   |
| <i>A. fumigatus</i><br><i>fresenius</i> | 100 % BC                        | FPase: 0,14<br>CMCase: 2,92<br>Xilanase: 296, 67   | Soni et al. (2010)         |
| <i>A. tamaraii</i>                      | Resíduo de indústria de algodão | FPase: 0,12<br>CMCase: 0,06<br>Xilanase: 1,47      | De Siqueira et al. (2010)  |
| <i>A. terreus</i>                       | Resíduo de indústria de algodão | FPase: 0,06<br>CMCase: 0,21<br>Xilanase: 2,47      | De Siqueira et al. (2010). |

## 4.6 CONCLUSÕES

- Os resultados indicaram que a partir da suplementação das carências nutricionais do bagaço de cana-de-açúcar (BC), este resíduo lignocelulósico pode ser usado como substrato na síntese de enzimas celulases e xilanases com uma linhagem *A. niger* por fermentação em estado sólido. Devido à fonte de carbono a partir das quais foram sintetizadas as celulases produzidas, estas apresentam elevado potencial de especificidade para a hidrólise dos resíduos da cadeia de etanol, contribuindo para redução nos custos de produção do etanol de 2<sup>a</sup> geração.
- O desenvolvimento do processo de produção de enzimas celulolíticas resultou em várias etapas consecutivas para definição de variáveis como: tempo de fermentação,

composição do substrato e formulação do meio de suplementação. Os resultados experimentais atingidos em cada etapa são listados a seguir:

1. O tempo de maior produção enzimática foi de 72 h, padronizando-se ao longo dos experimentos neste trabalho.
  2. O farelo de soja foi selecionado como substrato complementar ao BC devido ao seu alto teor protéico e sua capacidade de indução para FPase.
  3. O meio de suplementação Mandels e Weber modificado foi definido como meio de suplementação padrão e sua formulação permitiu o acréscimo da concentração e variedade de fontes protéicas essenciais para crescimento microbiano.
  4. A adição de CMCase a 5% no meio Mandels e Weber como fonte de celulose solúvel contribuiu no direcionamento do sistema regulatório do fungo *A. niger* para produção de enzimas celulolíticas.
  5. A umidade inicial de 80% foi estabelecida como condição ótima neste estudo.
- Por outro lado, a adequada formulação do meio de cultura após incremento de substâncias nitrogenadas orgânicas e inorgânicas favorecedoras na produção de celulases foi abordada por estratégia sequencial do planejamento experimental.
  - Como resultado da aplicação do planejamento fatorial completo e delineamento composto central rotacional constatou-se que:
    1. A fonte de nitrogênio solúvel mais adequada para o metabolismo do *A. niger* foi o extrato de levedura.
    2. A adição de  $6 \text{ gL}^{-1}$  de fosfato de potássio, como tamponante do meio e fonte de fósforo aumentou a produção da enzima.
    3. O tempo de armazenagem do meio de ativação fúngico mostrou-se relevante na produção enzimática, sendo estabelecido seu uso com no máximo 4 dias após produção dos esporos.
  - O efeito dos vários parâmetros usados no planejamento estatístico de otimização foi diferente e particular para cada atividade enzimática avaliada. No entanto, a seleção das melhores condições e valores das variáveis experimentais foi baseada na maximização da produção tendo como critério a confiabilidade da análise estatística dos conjuntos de dados analisados.
  - Com isto, o substrato a ser usado nas FES em biorreator de colunas para síntese de celulases e xilanases pela linhagem *A. niger*, consistiu em BC complementado com 35%

de farelo de soja e umidificado a 80% com meio de Mandels e Weber enriquecido com 0,5% de CMC, 8 g L<sup>-1</sup> de peptona, 6 g L<sup>-1</sup> de fosfato e 18 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, B.K.; MOHANA, S.; JOG, R.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Utilization of anaerobically treated distillery spent wash for production of cellulases under solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, v. 91, p. 2019-2027, 2010.
- ADSUL, M.G.; TERWADKAR, A.P.; VARMA, A.J.; GOKHALE, D.V. Cellulases from *penicillium janthinellum* mutants: Solid-state production and their stability in ionic liquids *BioResources*, v. 4, p. 1670-1681, 2009.
- AHAMED, A.; SINGH, A.; WARD, O.P. Culture-based strategies for reduction of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger* NRRL-3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1577-1583, 2005.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 399-407, 2008.
- ALAM, MD.Z.; MAMUN, A.A.; QUDSIEH, I.Y.; MUYIBI, S.A.; SALLEH, H.M.; OMAR, N.M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 61-64, 2009.
- ALICEWEB. Disponível em: <aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: jul. 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010 Article in press. doi:10.1186/1754-6834-3-4
- AWAFO, V.A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. 1997. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Quebec, Canadá. 1997, 255p.
- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 257-270, 1992.
- CARLE-URIESTE, J.; ESCOBAR-VERA, J.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F.; TORIGOI, E.; CRIVELLARO, O.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CARVALHO, F.C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. *Informações Econômicas*, v. 22, n. 12, p. 31-46. 1992.
- CASTRO, M.A. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, 2006. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2006. 212p.
- CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CEN, P.; XIA, L. Production of cellulase by solid-state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 65, p. 70-92, 1999.
- CHANDRA, M.S.; VISWANATH, B.; REDDY, B.R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*, v.47, p. 323-328, 2007.

CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D.; SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 361-369, 2010.

CHAPMAN, B.; WINLEY, E.; FONG, A.S.W.; HOCKING, A.D.; STEWART, C.M.; BUCKLE, K.A. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.8, p.531-534, 2007.

COUGHLAN, M.P.; HAZIEWOOD, G.P.  $\beta$ -1,4- xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 17, p. 259–289, 1993.

COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. 1993. Tese de Doutorado - Escola de Química, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

COURI, S.; FARIAS, A.X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, v.26, n.4, p.314-317, 1995.

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

DE SIQUEIRA, F.G.; DE SIQUEIRA, E.G.; JARAMILLO, P.M.D.; SILVEIRA, M.H.L.; ANDREAS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R.; FILHO, E.X.F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 64, p. 20-26, 2010.

DEPARTMENT OF ENERGY US – DOE, 2010 – Joint Genome Institute. Disponível em: <<http://www.jgi.doe.gov/>> Acesso em: ago. 2010.

DESHPANDE, S.K., BHOTMANGE, M.G., CHAKRABARTI, T., SHASTRI, P.N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant) and *Aspergillus niger* in mixed culture by solid state fermentation of f water hyacinth. *Indian Journal of Chemical Technology*, v. 15, p. 449-456, 2008.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 404-411 2009.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S.N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbial Botany*, v. 25, p. 331-339, 2009.

FAOSTAT. Disponível em: <[www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)>. Acesso em: maio 2008.

FARINAS, C.S.; MARTIN-NETO, L.; GIORDANO, R.C. Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol. In: *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. Editora Blucher, São Paulo, 2010.

FREEDONIA – The Freedonia Group Incorporated, 2007. *World Enzymes Industry Study with Forecasts for 2011 and 2016-Sample Text*. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/pdf/1949smwe.pdf>. Acesso em: set. 2008.

GENENCOR website. Disponível em: [http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor/products\\_and\\_services/business\\_development/biorefineries/products/accelerace\\_product\\_line\\_en.html](http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor/products_and_services/business_development/biorefineries/products/accelerace_product_line_en.html). Acesso em: jul. 2008.

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

- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. (1970). Forage fiber analyses, apparatus, reagents, procedures and some applications. Washington, DC: USDA. (USDA Agricultural handbook, 379), 1970, 20 p.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases, -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemistry Engineering Journal*, 2010, doi:10.1016/j.bej.2010.05.003.
- GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology Bioengineering*, v. 97, p. 1028–1038, 2007.
- HAYASE, M., MAEKAWA, A., YUBISUI, T., MINAMI, Y. Properties, intracellular localization, and stage-specific expression of membrane-bound  $\beta$ -glucosidase, BglM1, from *Physarum polycephalum*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.40, p. 2141-2150, 2008.
- HE, Y., LI, H., LING, M., LIANG, Z. Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 1, p. 1-7, 2010.
- HESSELTINE, C. W. Solid State Fermentation. *International Biodeterioration*, v.23, p. 79-89, 1987.
- ILLANES, A. Situación industrial en producción y utilización de enzimas. In: *Biotecnología de enzimas*. Monografía no 35, Ediciones Universitarias de Valparaíso. (1994). Universidad Católica de Valparaíso, p. 195-224, 1994.
- KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M.J.; TSIKLARI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 22, p. 391–397, 2006.
- KARLSSON, J.; SALOHEIMO, M.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; PENTTILÄ, M.; TJERNELD, F. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 6498-6507, 2001.
- KHOWALA, S.; SENGUPTA, S. Secretion of 6- $\beta$ -glucosidase by *Termitomyces clypeatus*: Regulation by carbon catabolic products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 144-149, 1992.
- LEVERA, M.; HOA, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7083-7087, 2010.
- LIU, J.; YANG, J. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, p. 420-425, 2007
- LONG, C.; OU, Y.; GUO, P.; LIU, Y.; CUI, J.; LONG, M.; HU, Z. Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06. *Annals of Microbiology*, v. 59, p. 517-523, 2009.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN, Z.Y.L.; PRETORIUS I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Review*, v. 66, p. 506-577, 2002.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, v. 79, p. 816-826, 1960.
- MARTINEZ, D.; BERKA, R.M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S.E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P.M.; CULLEN, D.; DANCHIN, E.G.J.; GRIGORIEV, I.V.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, C.P.; HAN, C.S.; HO, I.; LARRONDO, L.F.; LOPEZ DE LEON, A.; MAGNUSON, J.K.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.;

- PUTNAM, N.; ROBBERTSE, B.; SALAMOV, A.A.; SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, C.L.; YAO, J.; BARBOTE, R.; NELSON, M.A.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, C.R.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, D.S.; LUCAS, S.M.; RUBIN, E.M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M.E.; BRETTIN, T.S. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*), *Nature Biotechnology*, v. 26, p. 553-560, 2008.
- MATHEW, G.M.; SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; ASHOK, P. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation, *Journal of Science Industrial Resources*, v. 67, p. 898-907, 2008.
- MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7842-7847, 2008.
- MILLER, G.L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 137-147, 2003.
- NIEVES, R.A.; EHRMAN, C.I.; ADNEY, W.S.; ELANDER, R.T.; HIMMEL, M.E. Technical Communication: Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 14, p. 301-304, 2009.
- NOVOZYMES Disponível em: <http://www.bioenergy.novozymes.com/cellulosic-biofuel/> Acesso em: janeiro 2010
- NOGAWA, M.; GOTO, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. L-sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Current Genetics*, v. 38, p. 329-334, 2001.
- OBEROI, H.S.; CHAVAN, Y.; BANSAL, S.; DHILLON, G.S. Production of Cellulases through Solid State Fermentation Using Kinnow Pulp as a Major Substrate. *Journal Food and Bioprocess Technology*. v. 3, p. 528-536, 2010.
- OLSSON, L.; CHRISTENSEN TOVE, M. I. E.; HANSEN KIM, P.; PALMQUIST EVA, A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 612-619, 2003.
- PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops Production*, v. 18, p. 37-45, 2003.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL C.R., NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PINTO, G. A. S. Produção de uma mistura hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa. Tese Mestrado, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 1998.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, p. 174-188, 1998.
- RAMOS, J.; GONZALEZ, M.; RAMREZ, F.; YOUNG, R., ZIGA, V. Biomechanical and Biochemical Pulping of Sugarcane Bagasse with *Ceriporiopsis subvermispota* Fungal and Xylanase Pretreatments. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 49, p. 1180-1186, 2001.



- RAVINDRAN, C.; NAVEENAN, T.; VARATHARAJAN, G.R. Optimization of alkaline cellulase production by the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. using agricultural and industrial wastes as substrates. *Botanica Marina*, v. 53, p. 275-282, 2010.
- REMALEY, R.F. Molecular biology of extracellular enzymes. In: *Advances in Applied Microbiology*. (Perman, D. Ed.). New York: Academic Press. 1979.
- ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food and Bioprocesses Processing*, v. 88, p. 61-66, 2010.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3693-3700, 2005.
- SAMUELS, G. J.; LIECFELDT, E.; NIREMBERG, H. I. Description of *T. asperperellum* sp. Nov and comparison to *T. viride*. *Sydowia*, v. 51, p. 71-88, 1996.
- SCHÜLEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology*, v. 57, p. 71-81. 1997.
- SEIBOTH, B.; HAKOLA, S.; MACH, R.L.; SUOMINEN, P.; KUBICEK, C.P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 17, p. 5318-5320. 1997.
- SILVA, D. J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: Ed. UFV, 1998. 166p.
- SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged Fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY A. Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemistry Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.
- SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, v. 25, p. 437-441, 2009.
- SOLIS-PEREIRA, S.; E. FAVELA-TORRES, G.; VINIEGRA-GONZALEZ, A.; GUTIERREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 39, p. 36-41, 1993.
- SOLÓRZANO, J.L. Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar. Serie Tecnológica da Embrapa. ISBN 85-7227-234-8 CETEM / MCT, 2006.
- SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA, B.S. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*, v. 31, p. 277-283, 2010.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Microbial cellulases-Production, applications and challenges. *Journal Sciences of Industrial Resources*, v. 64, p. 832-844, 2005.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421-424, 2009.
- 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*. v. 146, p. 119-128, 2008.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolic repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p.305-311, 2001.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, v.121, p. 93-104, 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, p. 797-824, 2004.

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

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists*, v.46, p.829-835, 1963.

VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 497–522, 2001.

XIN, F.; GENG A. Horticultural Waste as the Substrate for Cellulase and Hemicellulase Production by *Trichoderma reesei* Under Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 295-306, 2010.

## **CAPITULO 5: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM REATOR DE COLUNAS INSTRUMENTADO**

---

### **5.1. INTRODUÇÃO**

A competitividade da produção do etanol de 2<sup>a</sup> geração em escala industrial é limitada atualmente pelo custo proibitivo das celulases, enzimas usadas na hidrólise do material lignocelulósico (SUKUMARAM et al., 2009; DE SIQUEIRA et al., 2010). Uma significativa redução nestes custos pode ser alcançada abordando vários aspectos da sua produção que vão desde o uso de resíduos como matéria-prima até o melhoramento genético das linhagens produtoras e o aumento da especificidade enzimática (MEYER et al., 2009). Além disso, a utilização de tecnologias como a fermentação em estado sólido (FES) vem sendo amplamente discutida como estratégia para diminuição dos preços das celulases (SINGHANIA et al., 2009; DE SIQUEIRA et al., 2010).

Os processos de FES podem ser definidos como o crescimento de microorganismos em substratos sólidos em ausência de água livre (RAHARDJO et al., 2006). Aproximadamente 90% dos preparados enzimáticos industriais são realizados por processos de fermentação submersa e, na maioria das vezes, com microorganismos geneticamente modificados (HOLKER et al., 2004). Contudo a FES mostra-se particularmente vantajosa pelo fato de simular o hábitat natural de microorganismos fúngicos selvagens. Pode-se destacar ainda outras vantagens como a possibilidade do uso de resíduos agro-industriais sólidos, *e.g.*, bagaço de cana-de-açúcar, farelos, cascas de cereais, entre outros; economia no uso de água nos processos industriais, e maior rendimento e menor custo na produção de metabólitos por quantidade produzida (SARGANTANIS et al., 1993). Além disso, as enzimas produzidas são menos susceptíveis a inibição devido a sua maior estabilidade térmica e iônica (HOLKER et al., 2004).

Apesar dessas vantagens, a FES ainda não é aplicada largamente em escala industrial devido à dificuldade do controle e monitoramento das variáveis do processo. Os sistemas de FES são altamente heterogêneos, com gradientes de umidade e temperatura que influenciam negativamente a produção enzimática. A ausência de água livre no processo, a baixa condutividade térmica dos substratos sólidos e a baixa capacidade térmica do ar, dificultam a manutenção da temperatura devido à geração de calor durante o crescimento microbiano

(HOLKER e LENZ, 2005). Portanto, é no mecanismo de remoção de calor com o adequado controle das variáveis umidade e temperatura que reside o sucesso do escalonamento da FES em escala industrial.

Existem poucas informações sobre instrumentação e automação aplicadas a estes processos devido à dificuldade do monitoramento dos parâmetros da FES. Alguns estudos utilizam medidas indiretas (sensores) para o controle da aeração, temperatura e umidade e a quantidade de água no meio de FES (SARGANTANIS et al., 1993, NAGEL et al., 2001; PEÑA y LILLO et al., 2001; KHANAHMADI et al., 2006). No Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, foi desenvolvido um sistema fermentativo baseado em biorreator de colunas instrumentado com controle das variáveis temperatura, vazão e umidade do ar (Bertucci et al., 2009). Este sistema foi utilizado na etapa final do desenvolvimento do processo de produção de celulases visando a seleção das melhores condições operacionais em processos dinâmicos e automatizados.

Desta maneira, a fim de otimizar o sistema FES, o processo de produção enzimática foi avaliado utilizando-se a metodologia de planejamento experimental estatístico. Nesta análise foram escolhidas três variáveis: umidade inicial do substrato, umidade e vazão do ar de circulação nas colunas do biorreator. Adicionalmente, após a seleção das melhores condições da FES em colunas, os complexos enzimáticos produzidos com *Aspergillus niger* a partir de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja foram testados em condições reais de hidrólise e comparados com resultados obtidos com preparados comerciais, avaliando-se sua eficiência e especificidade.

## **5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **5.2.1 Avanços e necessidades da tecnologia de Fermentação em Estado Sólido**

O processo de fermentação em estado sólido (FES) apresenta várias vantagens em relação à fermentação submersa (FSm). Entre elas, pode-se mencionar a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais sólidos como matéria-prima, maiores produtividades em termos de produto por volume e menores custos operacionais devido à redução de etapas posteriores (SARGANTANIS et al., 1993; PENA e LILLO et al., 2001). Devido a estas vantagens, a FES tem recebido crescente atenção no mundo científico e industrial devido ao

desenvolvimento de múltiplas aplicações em processos de bioremediação e biodegradação de compostos perigosos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação de vegetais para enriquecimento nutricional, biopolpação e produção de metabólitos como fatores de crescimento vegetal, ácidos orgânicos, biocidas, biosurfactantes, pigmentos, aromas e em especial as enzimas (PANDEY et al., 2001; SINGHANIA et al., 2010).

Entre as enzimas de interesse industrial as fitases, amilases, inulinases, celulases, proteases, galactosidades, lípase e laccase representam importantes insumos intermediários nas indústrias químicas, alimentares, têxteis, entre outras (SINGHANIA et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2004; RAMACHANDRAN et al., 2005; RODRÍGUEZ-COUTO, 2004).

Ainda mais, contextos de biorrefinarias de biomassa vegetal favorecem a inclusão da FES nos processos e têm renovado o interesse para aplicação como alternativa industrial com projeções energéticas (SUKUMARAM et al., 2005; SINGHANIA et al., 2010). A produção de celulases por FES usando resíduos agroindustriais é uma grande demanda na indústria dos biocombustíveis e o emprego de várias configurações de reatores em escala piloto como leito empacotado, leito fluidizado têm demonstrado a extensa aplicabilidade da FES na produção de hidrogênio, ácidos orgânicos, etanol e biodiesel (HAMA et al., 2007; WU et al., 2007; LEITE et al., 2008).

No entanto, para sua efetiva difusão em ambientes industriais, a FES precisa superar alguns desafios próprios da sua configuração tecnológica como:

- Adequado monitoramento on-line das variáveis chaves como teor de umidade e biomassa microbiana;
- Entendimento aprofundado dos processos envolvidos nas quatro fases coexistentes na FES (biomassa, substrato sólido, líquido e gás).
- Desenvolvimento de mecanismos eficazes de remoção do calor metabólico produzido que eliminem gradientes internos de temperatura prejudiciais para o crescimento microbiano e
- Redução de barreiras de transferência de massa para o transporte de oxigênio e nutrientes através de sistemas de mistura eficientes.

Visando o escalonamento do processo, vários avanços têm sido registrados em relação a estudos cinéticos através da quantificação indireta da biomassa. Métodos de análises por espectroscopia no infravermelho e processamento de imagens em microscopia mostraram-se

vantajosos frente às análises gravimétricas como as análises por glucosamina, ergosterol, proteína e DNA (AURIA et al., 1993; COURI et al., 2006). Na atualidade, o monitoramento dos gases produzidos pela respiração microbiana ( $O_2$  e  $CO_2$ ) é considerado o método de maior precisão na quantificação do crescimento microbiano (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; BHARGAV et al., 2008).

Neste sentido a modelagem e simulação de processos têm um papel relevante na avaliação da viabilidade técnica econômica da FES em relação ao destino final do produto e sua inserção no mercado comercial (CASTILHO et al., 2000; PRESEÈKI et al., 2006). A modelagem tem sido abordada para solucionar os desafios tecnológicos próprios da FES, como as limitações na transferência de massa e calor, assim como novos projetos de biorreatores e a previsão do crescimento e a produtividade microbiana (SAHIR, et al., 2007; HARDIN, et al., 2002). Hamidi-Esfahani et al. (2004) têm aplicado a modelagem estatística para otimização da produtividade do *A. niger* em relação aos efeitos simultâneos da temperatura e umidade. Uma revisão crítica dos principais modelos e as novas tendências nesta área é registrada por Rahardjo et al. (2006) os quais ressaltaram que o uso da FES em escala competitiva com processos de FSm poderá ser concretizado através do desenvolvimento de modelos atrelado ao projeto de novos biorreatores.

### 5.2.2 Aspectos bioquímicos na FES

Atividade de água e umidade, temperatura e transferência de calor, aeração e transferência de oxigênio, assim como a escolha adequada do microorganismo e do substrato são os principais fatores que determinam a eficiência em bioprocessos de FES e a qualidade do produto obtido.

Os parâmetros fundamentais para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas são a atividade de água ( $A_w$ ) e a umidade dos substratos sólidos (PANDEY et al., 2001). A natureza do material, o tipo de produto desejado e as necessidades do microrganismo determinam o nível de umidade adequado do substrato sólido (LONSANE et al., 1985). O excesso de líquido no interior da matriz sólida leva a redução da porosidade do leito, diminuindo a difusão do oxigênio, ao mesmo tempo em que, propicia um ambiente favorável à contaminação bacteriana. Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato prejudicam o crescimento microbiano, pois comprometem a difusão de nutrientes e de oxigênio, podendo levar a falta de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios do microorganismmo (GREVAIS e MOLIN, 2003).

O controle deste parâmetro pode ser usado para modificar a produção metabólica e sua excreção. Grevais e Molin (2003) estudaram o efeito positivo da água do substrato sólido na fisiologia fúngica e nos mecanismos celulares (taxa de crescimento radial e orientação do *T. viride*).

Por outro lado, durante a FES são geradas consideráveis quantidades de calor, produto das atividades metabólicas do fungo, influenciando diretamente o crescimento e a produção de metabólitos. Os substratos usados nestes processos apresentam baixas condutividades térmicas que favorecem a acumulação de calor e gradientes de temperatura (BHARGAV et al., 2008). A formação de zonas de alta temperatura e baixa concentração de oxigênio afeta negativamente a germinação dos esporos, o crescimento celular e a conseqüente formação de produtos, ao passo que o extremo oposto apresenta também efeitos negativos ao crescimento microbiano (NAGEL et al., 2001).

Portanto, a remoção do calor metabólico é peça chave na efetividade do processo de FES. A transferência de calor está fortemente ligada ao sistema de aeração utilizado. Sangsurasak e Mitchell (1998) propuseram que a evaporação por resfriamento pode retirar aproximadamente 78% do calor do leito do substrato durante a máxima elevação da temperatura, ainda em sistemas arejados com ar saturado. O controle acoplado da temperatura e umidade é também um fator importante e objeto de estudos nas atuais pesquisas. A ausência de água livre e a baixa condutividade térmica do sistema dificultam a sua implementação, tornando se necessários dispositivos de mistura para garantir homogeneidade no substrato e maior efetividade na transferência de calor e massa (RAGHAVARAO et al., 2003). A transferência de massa na FES envolve fenômenos em macro e microescala. Na microescala o crescimento da biomassa fúngica é influenciado pela difusão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> intra e interpartícula. Fatores dependentes por sua vez da largura e área da camada formada pela umidade e o oxigênio dissolvido, ambiente efetivo de consumo e produção microbiano. Além da difusão dos gases, a transferência de massa em microescala inclui o transporte de enzimas, nutrientes, e metabólitos secundários (NAGEL et al., 2001).

O nível macro inclui fatores como a taxa de aeração; o tipo e a granulometria do substrato; o sistema e a velocidade da mistura; a temperatura e o tipo do biorreator (RAGHAVARAO et al., 2003; BHARGAV et al., 2008).

Neste sentido, visando o estabelecimento das relações e funções entre as diferentes variáveis nas micro e macroescalas, a modelagem auxilia na caracterização e seleção de

alternativas tecnológicas de FES. Modelos matemáticos cinéticos e de transporte são base da avaliação e escalonamento, assim como também auxiliam no desenho de biorreatores e na criação de estratégias para seu controle (PRESEÈKI et al., 2006; MITCHELL et al., 2004).

### 5.2.3 Biorreatores para FES

Em processos de fermentação, o projeto do biorreator busca fornecer um ambiente adequado para o crescimento e o cultivo dos microorganismos. As tentativas na etapa de escalonamento têm promovido o desenho de vários tipos de biorreatores de forma simultânea aos avanços em engenharia bioquímica objetivando aprimoramentos na transferência de calor e massa assim como o controle e monitoramento on-line do processo. A literatura classifica as diferentes configurações de um biorreator em 4 categorias segundo o tipo de aeração e o sistema de mistura utilizado:

- Reatores de bandeja, consistente em bandejas onde o substrato é disseminado na forma de uma fina camada de poucos centímetros. O reator é mantido em câmara isotérmica com circulação de ar umidificado. A principal desvantagem deste modelo é que requer muito espaço quando aplicados em escala industrial (PANDEY et al., 2001).
- Reatores de leito fixo são usualmente compostos por uma coluna de vidro ou plástico com base porosa contendo o substrato sólido. O mecanismo de aeração é por injeção de ar através do substrato. O controle de temperatura é feito através da circulação externa de água em sistemas encamisados ou em banho termostático (RAIMBAULT, 1998; DURAND, 2003; RODRÍGUEZ-COUTO e SAN ROMAN, 2006). Esta configuração é empregada na produção industrial de Koji, mas são encontradas dificuldades operacionais em relação à amostragem e heterogeneidades no substrato.
- Reatores de tambor rotativo, este sistema reúne a aeração e a mistura do substrato, enquanto limita os danos causados ao microorganismo ou ao produto. A mistura é realizada por rotação total do reator ou através de vários dispositivos de aeração como defletores ou placas (NAGEL et al., 2001; DURAND, 2003). A principal limitação é o volume útil do reator, acima de 30% apresenta dificuldades na mistura e controle dos mecanismos de transferência de massa (RODRÍGUEZ-COUTO e SAN ROMAN, 2006).



- Reatores de leite fluidizado, visando à desagregação e separação das partículas do substrato, este desenho utiliza a aeração forçada (pneumática) como mecanismo de agitação e mistura. Apesar das melhoras na transferência de calor podem ocorrer danos na fisiologia do fungo devido a forças de cisalhamento (RODRÍGUEZ-COUTO e SAN ROMAN, 2006).

A Tabela 5.1 apresenta alguns exemplos de aplicação dos diferentes tipos de reatores registrados na literatura biotecnológica de FES:

Tabela 5.1 Algumas aplicações de biorreatores em FES

| Microorganismo                       | Susbrato  | Produto             | Biorreator           | Referencia                 |
|--------------------------------------|---|---------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>A. niger</i>                      | Bagaço de mandioca                                | Acido cítrico       | Colunas              | Di Luccio et al. (2004)    |
| <i>Bacillus subtilis</i>             | Farelo de arroz                                   | Iturina A           | Bandejas             | John et al. (2006)         |
| <i>Penicillium simplicissimum</i>    | Torta de soja                                     | Lipase              | Frascos              | Ramachandran et al. (2005) |
| <i>Penicillium simplicissimum</i>    | Torta de oliva + bagaço de cana (1:1, m/m)        | Lípase              | Reator de leite fixo | Anisha et al. (2008)       |
| <i>Thermoascus auranticus</i>        | Palha de trigo                                    | Celulases           | Tambor rotatório     | Xiong et al. (2007)        |
| <i>Trichoderma reesei</i>            | Farelo de trigo                                   | Celulases           | Frascos              | Gangadharan et al. (2005)  |
| Esgoto                               | Suporte elastomérico enriquecido com carboidratos | Hidrogênio e etanol | Reator de leite fixo | Singhania et al. (2007)    |
| <i>Lactobacillus sp.</i>             | Pó de semente de tamarindo                        | Tanase              | Frascos              | Sabu et al.(2006)          |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i> JM1 | Espuma de poliuretano enriquecida com glicose     | Hidrogênio          | Reator de leite fixo | Wu et al. (2007)           |

Fonte: Modificado de Singhania et al. (2009).

#### 5.2.4 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos

No processo enzimático para produção de etanol de 2ª geração, a hidrólise da celulose componente é catalisada por enzimas específicas denominadas de enzimas celulolíticas ou celulases.

Enzimas como catalisadores biológicos são extremamente eficientes, podendo acelerar em média de  $10^9$  até  $10^{12}$  vezes a velocidade da reação. Essa velocidade é função da

concentração de substrato e geralmente seguem o modelo cinético de Michaelis-Menten, onde a velocidade da reação é função hiperbólica da concentração de substrato. Dessa forma, torna-se importante medir a atividade da enzima sob condições padrão, ou seja, mesmo pH, temperatura, força iônica e concentração de substrato de modo a permitir a análise comparativa de resultados (BON et al., 2008; MEYER et al., 2009).

A reação catalisada pela enzima ocorre no sítio ativo do substrato, formando o complexo enzima-substrato, característica esta que fornece o alto grau de especificidade da enzima. O complexo de enzimas hidrolíticas classificadas como celulasas e xilanasas pode catalisar essa hidrólise em condições suaves de reação, sem geração de subprodutos. Durante a hidrólise enzimática da celulose, as enzimas de degradação específicas são as celulasas que produzem açúcares redutores (AR) fermentescíveis para produção de etanol (SUN e CHENG, 2002).

Diante da heterogeneidade da estrutura da cadeia celulósica, a qual apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, a sacarificação enzimática da biomassa depende de uma multiplicidade de atividades específicas complementares cujo sinergismo é essencial para que todo carboidrato nela disponível seja hidrolisado (PITARELO, 2007). Pelo menos três grupos principais de celulasas estão envolvidos no processo de hidrólise da celulose (Figura 5.1). A descrição dos seus mecanismos e sinergia foram detalhados no Capítulo 4 na seção 4.2.2 Classificação e mecanismos de ação.

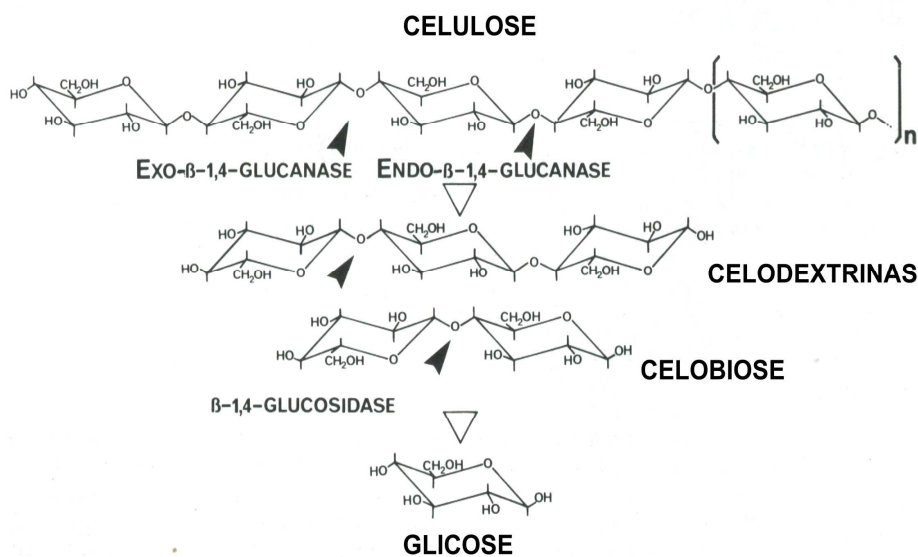


Figura 5.1 - Hidrólise enzimática da celulose. Fonte Pereira Jr. (2008).

A maioria dos preparados celulásicos comercializados são produzidos pelo microorganismo *Trichoderma reesei* que apresenta deficiência na expressão da enzima  $\beta$ -glicosidase. A falta desta enzima restringe a conversão de celobiose em glicose proporcionando inibição da atividade das celulases pelo acúmulo de celobiose. Por tanto, para sua efetiva aplicação a suplementação com  $\beta$ -glicosidase se faz necessária encarecendo o processo de hidrólise (CEN e XIA, 2004; SUKUMARAM et al., 2009; GOTTSCHALK et al, 2010).

### **5.3 OBJETIVOS**

O presente capítulo é focado em dois objetivos globais. O primeiro busca determinar as melhores condições operacionais do reator de coluna instrumentado para produção de enzimas celulolíticas pelo microorganismo *A. niger* por fermentação em estado sólido (FES). Com esta finalidade foram delineadas algumas metas:

- Avaliar a influência dos parâmetros de operação: vazão e umidade do ar e umidade inicial do substrato na produtividade de FPase, CMCase e xilanase.
- Utilizar metodologias sequenciais de planejamento experimental para seleção das melhores condições nos intervalos de operação escolhidos visando a maximização das produtividades enzimáticas.
- Monitorar o perfil de produção de CO<sub>2</sub> do *A. niger* como medida indireta do seu crescimento durante a FES em condições selecionadas pelo planejamento experimental.

O segundo objetivo visa determinar o desempenho real do complexo celulolítico produzido nas melhores condições de FES. Com esta finalidade, estas enzimas foram aplicadas na hidrólise enzimática do bagaço de cana explodido, sendo monitorados fatores como concentração de açúcares redutores formados e concentração de glicose durante 72 h de sacarificação.

### **5.4 MATERIAL E MÉTODOS**

Para a seleção das melhores condições operacionais na fermentação em estado sólido (FES) visando à produção de enzimas celulolíticas em biorreator de colunas com aeração forçada. Foram delineadas as etapas experimentais apresentadas no fluxograma da Figura 5.2.

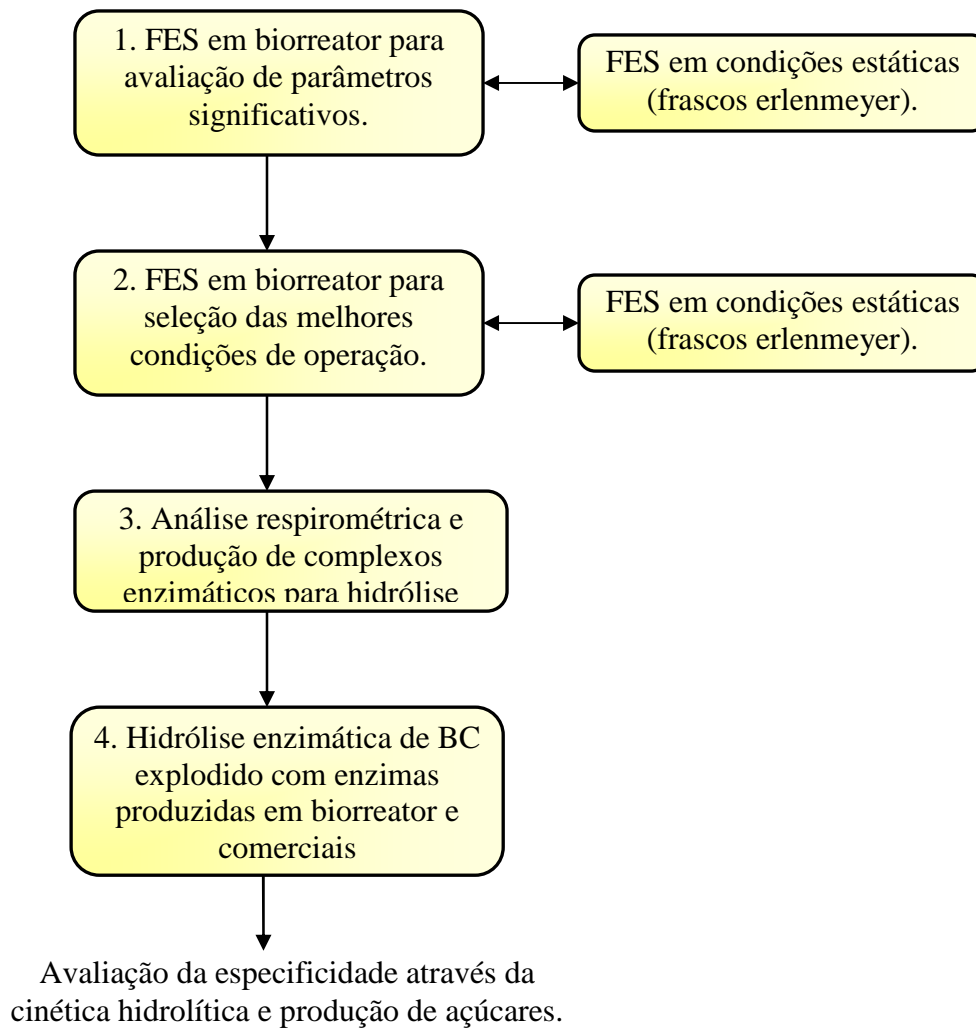


Figura 5.2 - Fluxograma experimental das etapas seguidas experimentais

As etapas 1,2 e 3 constituídas por experimentos de FES em biorreator de colunas (condições dinâmicas) foram mensuradas pela produção enzimática em relação às atividades FPase, CMCase e xilanase. Paralelamente foram realizados experimentos em condições estáticas (frascos) visando avaliar os efeitos da aeração forçada e o controle operacional atingidos com a operação do reator. A produção microbiana de CO<sub>2</sub> e da enzima CMCase foi monitorada durante 72 horas de FES na 3ª etapa. Esta fermentação foi conduzida a partir das condições selecionadas nas etapas preliminares para produção do complexo enzimático a ser utilizado na sequência no processo de hidrólise.

Na 4ª etapa, foi avaliada a especificidade do coquetel enzimático produzido nas melhores condições experimentais das etapas precedentes. Para isto, foram realizados experimentos de hidrólise enzimática de bagaço de cana (BC) previamente explodido, sendo

monitorados açúcares redutores (AR) produzidos para determinação da eficiência enzimática do complexo celulásico.

### 5.4.1 Material usado na FES

#### 5.4.1.1 Biorreator

A seleção das melhores condições de operação na FES foi realizada em biorreator do tipo colunas com aeração forçada, em escala laboratorial, o qual é apresentado na Figura 5.3. Este modelo foi adaptado de Raimbault e Germon (1976) (dados citados por Durand, 2003).

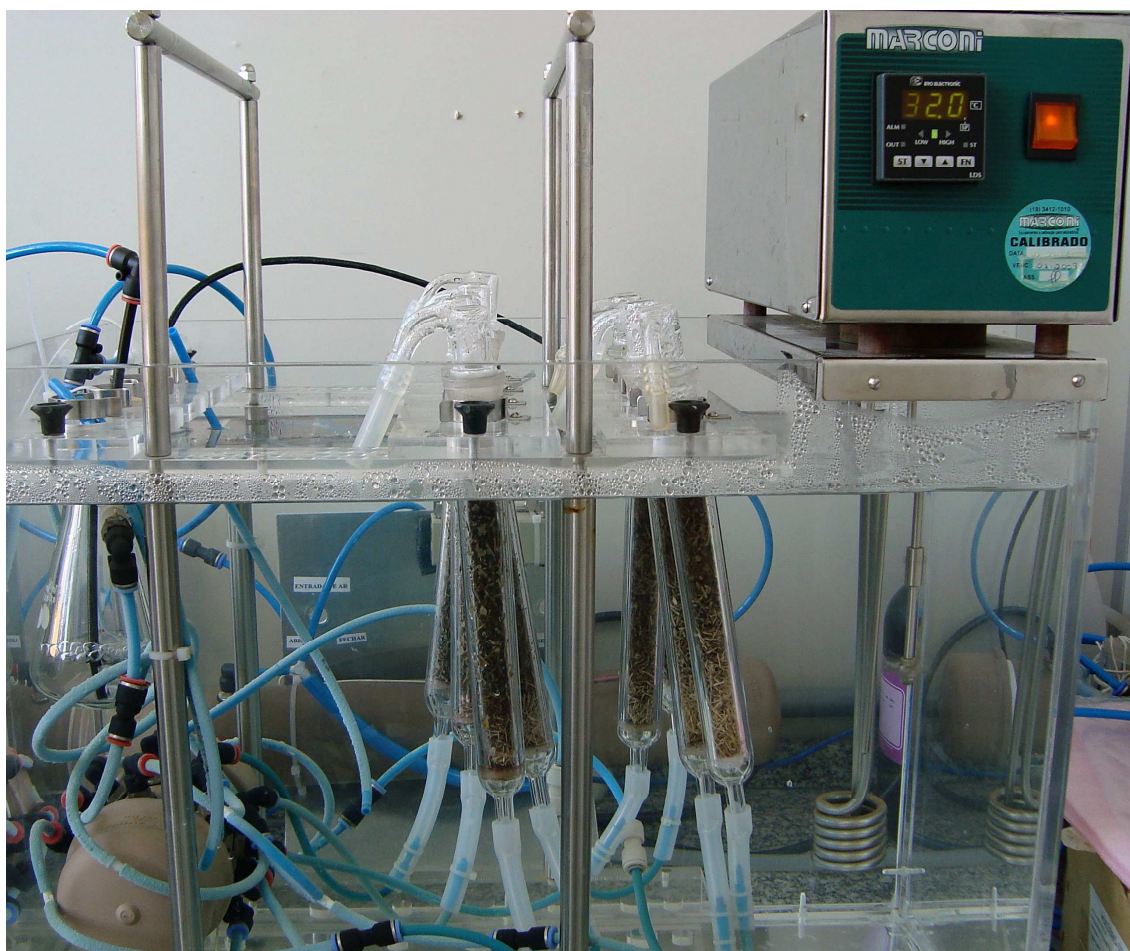


Figura 5.3 - Foto ilustrativa do biorreator de colunas utilizado nas FES deste trabalho.

O biorreator conta com 12 colunas (2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) regularmente dispostas em banho termostático e equipadas com sistema de controle on-line de vazão e umidade relativa do ar. O princípio de funcionamento do sistema é manter uma razão entre fluxo de ar seco com outro de ar saturado com água de forma a obter um fluxo de ar constante com umidade também constante, conforme a necessidade do operador. Cada uma dessas linhas de entrada possui um controlador de fluxo de massa que apresenta medida de

fluxo na saída entre 0 e 1000 mL min<sup>-1</sup>. Um conjunto de sensores faz as medidas de umidade relativa e da temperatura do ar resultante da mistura (ar seco e ar saturado). O sensor de umidade usado também possui um resistor de platina para medida de temperatura. A seqüência de medidas, armazenamento de dados, desenhos de gráficos em tempo real, e acionamento dos controladores de fluxo de massa é feita com auxílio de um pacote de programação por interface gráfica, chamado LabView, da National Instruments (NATIONAL INSTRUMENTS, EUA) (BERTUCCI e COURI, 1996; BERTUCCI et al., 2009). Um módulo de medida da quantidade total de CO<sub>2</sub> (VAISALA, Finland) é conectado com a saída do ar de circulação de duas colunas para monitoramento da produção de CO<sub>2</sub> em função do tempo de FES. Esta tecnologia foi desenvolvida no Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação sob coordenação dos Drs. Victor Bertucci e Cristiane Farinas.

#### **5.4.1.2 Microorganismo**

O microrganismo empregado foi uma linhagem do fungo filamentosso *A. niger*, pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ. Os esporos foram preservados em tubos de ensaio com tampas rosqueadas contendo solo estéril e estocados a -18 °C. O microrganismo foi ativado em duas etapas de transferência: no primeiro repique, os esporos foram transferidos dos tubos com solo para um meio básico composto por ágar e incubados por 7 dias em estufa a 30 °C.

Na etapa de ativação, os esporos deste repique foram inoculados em meio de sabugo de milho enriquecido com solução salina de peptona (COURI e FARIAS, 1995). Após a inoculação, os frascos foram incubados por 5 dias a 32°C e posteriormente armazenados sob refrigeração a 4°C, por um período de 4 dias para utilização como inóculo para FES. Todos os procedimentos envolvendo manuseio do fungo e material previamente esterilizado foram realizados em câmara de fluxo laminar (BUZZATOS, Brasil).

#### **5.4.1.3 Substrato**

Tanto o substrato sólido quando o meio de suplementação para FES foram definidos no Capítulo 4. Assim o substrato sólido utilizado foi uma mistura de 65% de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e 35% de farelo de soja (FS) com granulometria controlada entre 1-4 mm em peneiras ASTM. O BC foi cedido pela empresa Edra Eco Sistemas Ltda. e o FS adquirido em agropecuária Claro. Após aquisição os substratos foram armazenados em sacos plásticos a -18 °C até utilização.

O acondicionamento do BC visando seu uso na FES foi realizado através da lavagem com água corrente e pré-tratamento hidrotérmico em autoclave a 120 °C por 60 min com relação m/v: 1:10 (definido no Capítulo 3). Após separação da fração solúvel por filtração o BC foi seco em estufa a 50°C até redução da umidade a valores inferiores de 10%. O FS foi utilizado sem tratamento prévio.

#### **5.4.1.4 Meio de cultivo para produção de celulases**

O meio líquido de suplementação para os experimentos de FES em colunas baseou-se na composição sugerida por Mandels e Weber (1969). A alteração da composição do mesmo visou seu enriquecimento em fontes protéicas e foi estudada no capítulo 4 da tese. A formulação resultante consistiu em (g L<sup>-1</sup>): carboximetilcelulose 5,00; uréia, 0,30; peptona, 8,00; extrato de levedura, 18,00; sulfato de amônia, 1,40; fosfato monobásico de potássio, 6,00; sulfato de magnésio, 0,3; cloreto de cálcio, 0,4; sulfato de zinco, 0,0014; sulfato de ferro, 0,005; cloreto de cobalto, 0,002 e sulfato de manganês, 0,0016.

### **5.4.2 Material usado na hidrólise**

#### **5.4.2.1 Enzimas**

Foi utilizada uma solução enzimática bruta obtida após 72 de FES no biorreator nas melhores condições experimentais encontradas no planejamento estatístico. Estas enzimas foram devidamente caracterizadas em relação às suas atividades FPase, CMCase, xilanase. A atividade de β-glicosidade foi também dosada no complexo celulolítico final.

#### **5.4.2.2 Substrato para hidrólise**

O material lignocelulósico submetido à hidrólise enzimática foi o BC previamente explodido. A explosão com vapor sob pressão foi realizada na usina de procedência à temperatura de 200°C e pressão de 15-16 Kg cm<sup>-2</sup> durante 7 minutos. Este substrato foi gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). O substrato foi lavado com água corrente até atingir transparência na cor da água de lavagem.

#### **5.4.2.3 Sistema de Hidrólise**

O sistema de hidrólise consistiu basicamente em reatores de vidro de 250 mL encamisados com controle de temperatura e agitação mecânica. A montagem experimental utilizada pode ser observada na Figura 5.4

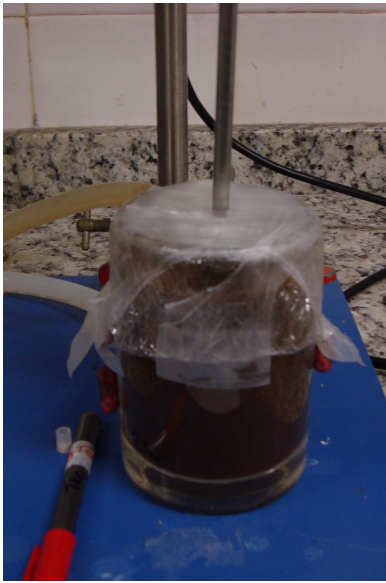


Figura 5.4 - Equipamentos utilizados na hidrólise do BC explodido com enzimas produzidas no biorreator de colunas instrumentado.

### 5.4.3 Metodologia para FES em biorreator de colunas instrumentado

Os experimentos de FES para produção de enzimas celulolíticas em biorreator instrumentado foram conduzidos em colunas cilíndricas de vidro contendo aproximadamente 10 g de meio de fermentação previamente esterilizado e inoculado. A temperatura foi mantida a 32°C pela imersão das colunas em banho termostático com circulação. A unidade de fermentação utilizada para realização do processo permite o controle e variação da umidade e vazão do ar. Estes parâmetros assim com a umidade inicial do substrato representaram as variáveis estudadas neste capítulo por metodologias de planejamento experimental.

Visando a comparação entre condições dinâmicas (biorreator) e estáticas foram realizadas FES em erlenmeyer de 500 mL contendo 5 g de substrato sólido suplementado com o meio de cultivo em condições de umidade inicial similares aos experimentos em biorreator. A umidade inicial dos substratos foi determinada segundo a Equação 5.1

$$U\% = (m_L) \times (m_L + m_S)^{-1} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde

$m_L$  = massa de solução de suplementação de nutrientes (g)

$m_S$  = massa de substrato sólido (g)

A esterilização foi realizada em autoclave por 20 min a 120°C e 1 atm, a exceção das colunas, cuja esterilização foi feita em estufa de secagem a 200°C durante 2 h.



A inoculação do meio de fermentação foi realizada em câmara de fluxo laminar (BUZZATOS, Brasil). Para liberação dos conídeos de *A. niger* crescidos em sabugo de milho foram adicionados 100 mL de solução surfactante estéril de Tween 80 0,3% m/v, a mistura foi agitada manualmente com bastão de vidro. A concentração dos esporos nesta suspensão foi determinada em microscópio usando Câmara de Neubauer. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando uma concentração final de  $10^7$  esporos  $g^{-1}$  de meio sólido.

Após 72 horas de FES, a extração das enzimas produzidas foi realizada com a transferência do meio fermentado das colunas para frascos erlenmeyers e adição de solução de tampão acetato 0,2 M, pH 4,5 na relação 10:1 v/m. A homogeneização da mistura realizou-se em *shaker* por 1 hora a 120 rpm e 32 °C. O material foi então filtrado à vácuo utilizando-se papel de filtro e centrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos, a 10 °C. O sobrenadante consistido da solução enzimática bruta foi armazenado à -5°C até análise em relação às atividades FPase, CMCCase e xilanase.

#### **5.4.3.1 Análise respirométrica**

No presente estudo, monitorou-se o consumo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) utilizando um sensor de CO<sub>2</sub> (VAISALA, Finland). O módulo para medida foi conectado à linha de gás em 2 colunas selecionadas e a medida foi realizada durante 72 horas de FES. A quantidade total de CO<sub>2</sub> produzida foi estimada usando parâmetros como a área total da curva da produção gasosa, tempo de cultivo e a vazão do ar utilizada na equação ideal dos gases.

#### **5.4.4 Delineamentos Experimentais para definição de condições operacionais em biorreator**

Para seleção das melhores condições operacionais na FES em biorreator de colunas instrumentado, aplicou-se metodologia de planejamento experimental em duas etapas:

Na primeira etapa avaliou-se os efeitos da vazão e umidade do ar de circulação nas colunas e a umidade inicial do substrato através de experimentos delineados por planejamento fatorial completo.

A segunda etapa visou à otimização dos parâmetros significativos resultantes da primeira etapa mediante delineamento composto central rotacional (DCCR).

As análises estatísticas foram conduzidas através do software Statistica® 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Este programa também foi usado para gerar as superfícies de resposta

obtidas a partir da realização de DCCR. A adequacidade dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA).

#### 5.4.4.1 Planejamento Fatorial Completo

Para avaliação dos efeitos de umidade e vazão do ar de circulação e umidade inicial do substrato nas FES em biorreator foi realizado um delineamento fatorial completo  $2^3$  (8 ensaios + 3 pontos centrais) totalizando 11 ensaios. O efeito destas variáveis independentes foi mensurado pelas atividades enzimáticas de FPase, CMCase e xilanase (variáveis resposta). Na Tabela 5.2 podem se observar os níveis das variáveis estudadas nos experimentos feitos em duplicata em tempo real.

Os valores das variáveis foram escolhidos segundo experimentos prévios com farelo de trigo (dados submetidos para publicação). A realização dos planejamentos fatoriais permitiu a seleção de variáveis estatisticamente significativas em relação à produção de enzimas celulolíticas.

Tabela 5.2 Valores das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial  $2^3$  para seleção de meio de suplementação.

| Variáveis   | Níveis |    |    |    |
|---|--------|----|----|----|
|   |        | -1 | 0  | +1 |
| Umidade do ar (%)                                 | $x_1$  | 60 | 70 | 80 |
| Vazão do ar ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | $x_2$  | 12 | 24 | 36 |
| Umidade do substrato (%)                          | $x_3$  | 50 | 60 | 70 |

#### 5.4.4.2 Delineamento Central Rotacional

Foi realizado um DCCR com as variáveis significativas resultantes do planejamento fatorial completo. O DCCR consistiu em um planejamento completo  $2^2$  com 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, objetivando-se a otimização da produtividade celulolítica através da metodologia de superfície de resposta. As variáveis estudadas foram: umidade do substrato e vazão do ar sendo os níveis reais e codificados de cada variável apresentados na Tabela 5.3. As faixas estudadas foram definidas em base no planejamento completo. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 5.3 Valores das variáveis independentes utilizadas no DCCR para dois fatores.

| Variáveis   | Níveis |       |    |    |    |       |
|---|--------|-------|----|----|----|-------|
|   |        | -1,41 | -1 | 0  | +1 | +1,41 |
| Vazão do ar ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | $x_1$  | 15    | 20 | 30 | 40 | 45    |
| Umidade do substrato (%)                          | $x_2$  | 45    | 50 | 60 | 70 | 75    |

### 5.4.5 Experimentos de Hidrólise do BC explodido

Nesta etapa, avaliou-se a capacidade da solução enzimática de sacarificar o BC previamente explodido. Para isto, foi utilizado o complexo enzimático produzido experimentalmente nas melhores condições operacionais da FES no biorreator, previamente selecionadas.

As condições de reação empregadas foram: agitação de 100 rpm em reator encamisado de 250 mL a 45 °C por 72 h e relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) e pH 4,8. O tampão de hidrólise foi composto de citrato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup>. A carga enzimática utilizada foi de 5 FPU g<sup>-1</sup> de material lignocelulósico seco. Adicionalmente foi realizada uma hidrólise controle, nas mesmas condições descritas acima sem adição de enzima, visando a avaliação da formação de açúcares por solubilização.

A hidrólise foi monitorada nos seguintes tempos de operação (h): 0, 2, 4, 6, 8, 10, 22, 34, 48, 58 e 72. Cada amostra do monitoramento (~4 mL) foi fervida por 5 min para inativação enzimática. Parte deste volume foi analisada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) para quantificação dos açúcares redutores (AR)<sup>1</sup> e outra por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de glicose e xilose ao longo do tempo.

A conversão da hidrólise em relação aos açúcares redutores foi calculada segundo Martins (2007) de acordo com a Equação 5.2:

$$X\% = C_{AR} \times V_R \times (0,521 \times M_b)^{-1} \times 100 \quad (\text{Equação 5.2})$$

Onde,

X% = conversão celulose em glicose;

C<sub>AR</sub> = concentração de AR (g L<sup>-1</sup>);

V<sub>R</sub> = volume reacional (L);

0,521 = fator de conversão;

M<sub>b</sub> = massa do BC (g).

Todos os experimentos de hidrólise enzimática, assim como as análises dos AR e monossacarídeos produzidos foram realizados no Laboratório de Engenharia dos Processos Enzimáticos, coordenado pela Profa. Raquel Giordano, no Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

---

<sup>1</sup> A metodologia analítica para determinação dos açúcares redutores foi realizada segundo Miller (1959), conforme descrição na seção 4.4.2.3 de Material e Método do Capítulo 4.

### 5.4.6 Métodos Analíticos

A determinação das atividades FPase, CMCase e xilanase foi detalhada na seção 4.4.2.3 de Material e Método, no Capítulo 4.

#### *5.4.6.1 Análises dos açúcares produzidos por cromatografia líquida*

Os hidrolisados obtidos pela hidrólise enzimática foram analisados por CLAE, segundo metodologia desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009). Empregou-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, BIO-RAD, EUA) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol L<sup>-1</sup> com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, a 45 °C.

Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-10, sendo os compostos fenólicos presentes nas amostras removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C18 (WATERS, EUA).

Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e ácidos orgânicos analisados, sendo a quantificação feita por curvas de calibração de cada composto.

## **5.5 RESULTADOS**

Nesta seção são apresentados experimentos de FES em biorreator de colunas instrumentado para produção de enzimas celulolíticas e a avaliação da sua capacidade hidrolítica em material lignocelulósico. O controle da umidade e vazão do ar nas colunas permitiu avaliar a introdução de condições dinâmicas no biprocessos. Assim também foram utilizadas metodologias de delineamento estatístico experimental devido interação operacional entre estes parâmetros, visando as melhores condições de FES para produção celulolítica.

A seleção dos parâmetros inerentes ao substrato de interesse, bagaço de cana-de-açúcar (BC) e ao meio de suplementação foi objeto de estudo no Capítulo 4. O desenvolvimento dessa etapa foi realizado em condições estáticas (FES em frascos) e permitiu a definição da composição do substrato.

## 5.5.1 Delineamentos experimentais para definição das melhores condições de FES em biorreator de colunas

### 5.5.1.1 Seleção de variáveis significativas - Planejamento Fatorial Completo

No estudo das variáveis operacionais do reator foi empregado um planejamento fatorial completo. Avaliou-se o efeito e a significância de 3 variáveis independentes: umidade do substrato (%), umidade e vazão do ar ( $\text{g L}^{-1}$ ) através de um delineamento  $2^3$ , com 3 repetições no ponto central (11 ensaios). Os níveis e os valores das variáveis foram apresentados na Tabela 5.2 na secção de Material e Métodos. Os valores das variáveis independentes (codificados e decodificados ou reais) e as respostas para as atividades enzimáticas FPase, CMCCase e xilanase são apresentados na Tabela 5.4.

Com fins comparativos, foram realizadas também FES em frascos erlenmeyer visando avaliar a influencia das condições dinâmicas do reator no desempenho microbiano para produção enzimática.

Tabela 5.4 Matriz de planejamento fatorial completo  $2^3$  das variáveis estudadas com os valores reais entre parênteses e as respostas das atividades enzimáticas FPase, CMCCase e xilanase, após 72 h de FES com *A. niger*.

| Ensaio | $X_1^a$                          | $X_2^b$ | $X_3^c$ | FPase <sup>d</sup> | CMCase <sup>d</sup> | Xilanase <sup>d</sup> |
|--------|----------------------------------|---------|---------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1      | -1(60)                           | -1(12)  | -1(50)  | 0,19               | 9,56                | 112,79                |
| 2      | +1(80)                           | -1(12)  | -1(50)  | 0,27               | 14,67               | 138,58                |
| 3      | -1(60)                           | +1(36)  | -1(50)  | 0,21               | 14,15               | 133,44                |
| 4      | +1(80)                           | +1(36)  | -1(50)  | 0,56               | 17,46               | 155,89                |
| 5      | -1(60)                           | -1(12)  | +1(70)  | 0,47               | 18,26               | 146,43                |
| 6      | +1(80)                           | -1(12)  | +1(70)  | 0,33               | 11,94               | 134,20                |
| 7      | -1(60)                           | +1(36)  | +1(70)  | 0,28               | 17,53               | 147,23                |
| 8      | +1(80)                           | +1(36)  | +1(70)  | 0,40               | 17,60               | 157,55                |
| 9      | 0(70)                            | 0(24)   | 0(60)   | 0,43               | 14,56               | 142,08                |
| 10     | 0(70)                            | 0(24)   | 0(60)   | 0,37               | 14,46               | 139,86                |
| 11     | 0(70)                            | 0(24)   | 0(60)   | 0,48               | 16,50               | 147,06                |
| 12     |                                  |         | 50      | 0,37               | 18,19               | 147,02                |
| 13     | Condições estáticas <sup>e</sup> |         | 60      | 0,43               | 19,02               | 150,08                |
| 14     |                                  |         | 70      | 0,52               | 20,47               | 156,07                |

<sup>a</sup> umidade relativa do ar (%); <sup>b</sup> vazão do ar ( $\text{mL min}^{-1}$ ); <sup>c</sup> umidade do substrato (%); <sup>d</sup> atividade enzimática UI  $\text{g}^{-1}$  - os resultados representam a média de FES em duplicata em tempo real. <sup>e</sup> Ensaios de FES em erlenmeyers.

Neste sentido pode-se observar na Tabela 5.4 que nas condições de estudo não houve diferenças significativas entre as atividades enzimáticas obtidas em ambos os processos (estático e dinâmico). No entanto, constatou-se que o efeito quase linear da umidade do substrato em condições estáticas, não é reproduzido no biorreator. O efeito e interações das variáveis dinâmicas (umidade e vazão do ar) resultaram em uma maior variabilidade de produtividades enzimáticas.

Cada enzima mostrou comportamento diferente em relação à melhor condição de operação. A maior atividade da FPase ( $0,56 \text{ UI g}^{-1}$ ) foi registrada no ensaio 4, com os maiores níveis de vazão e umidade do ar de circulação apesar do menor nível de umidade do substrato. A CMCase registrou como melhor atividade  $18,26 \text{ UI g}^{-1}$  com 60% de umidade do ar,  $12 \text{ mL.min}^{-1}$  de vazão e 70% de umidade do substrato. A enzima xilanase, apresenta tendência semelhante à FPase pois o ensaio 8 com os níveis mais altos de umidade e vazão do ar atingiu a melhor produção de  $157,55 \text{ UI g}^{-1}$ .

Os dados da Tabela 5.4 foram analisados no programa Statistica® para o cálculo dos efeitos das variáveis independentes nas três respostas de interesse como apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Efeito dos fatores estudados no planejamento completo  $2^3$  sobre as atividades enzimática FPase, CMCase e xilanase.

| Fatores                | Análise de efeitos: FPase |             |       |           | Análise de efeitos: CMCase |             |       |           | Análise dos efeitos: xilanase |             |       |           |
|------------------------|---------------------------|-------------|-------|-----------|----------------------------|-------------|-------|-----------|-------------------------------|-------------|-------|-----------|
|                        | Efeito <sup>a</sup>       | Erro Padrão | t(4)  | p - valor | Efeito <sup>a</sup>        | Erro Padrão | t(4)  | p - valor | Efeito <sup>a</sup>           | Erro Padrão | t(4)  | p - valor |
| Média                  | 0,36                      | 0,02        | 16,22 | 0,00      | 15,15                      | 0,41        | 36,85 | 0,00      | 141,37                        | 1,66        | 84,92 | 0,00      |
| (1) U ar <sup>b</sup>  | 0,11                      | 0,05        | 2,00  | 0,12      | 0,54                       | 0,96        | 0,56  | 0,60      | 11,58                         | 3,90        | 2,97  | 0,04*     |
| (2) V ar <sup>c</sup>  | 0,05                      | 0,05        | 0,94  | 0,40      | 3,57                       | 0,96        | 3,71  | 0,02*     | 15,53                         | 3,90        | 3,98  | 0,02*     |
| (3) U sub <sup>d</sup> | 0,06                      | 0,05        | 1,18  | 0,30      | 2,38                       | 0,96        | 2,46  | 0,07*     | 11,18                         | 3,90        | 2,86  | 0,05*     |
| 1 by 2                 | 0,13                      | 0,05        | 2,50  | 0,07*     | 0,65                       | 0,96        | 0,67  | 0,54      | 4,80                          | 3,90        | 1,23  | 0,29      |
| 1 by 3                 | -0,11                     | 0,05        | -2,13 | 0,10*     | -3,67                      | 0,96        | -3,80 | 0,02*     | -12,54                        | 3,90        | -3,21 | 0,03*     |
| 2 by 3                 | -0,11                     | 0,05        | -2,01 | 0,11      | -0,11                      | 0,96        | -0,11 | 0,91      | -3,45                         | 3,90        | -0,88 | 0,43      |

<sup>a</sup> Os efeitos são apresentados em UI g<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> umidade relativa do ar (%); <sup>c</sup> vazão do ar (mL min<sup>-1</sup>); <sup>d</sup> umidade do substrato (%) As variáveis que apresentaram influência estatística significativa (a 90% de confiança) sobre concentração das enzimas avaliadas estão marcadas com estrela, \* p≤0,1. Se os valores de p-valor forem menores que o nível de significância escolhido, no caso 10% ou 0,1, há diferença significativa em relação ao fator estudado, e quanto menor o valor p, maior a influência desse fator em relação aos demais.

O planejamento fatorial permitiu a ponderação da influência das variáveis do processo e a avaliação da tendência a seguir no próximo planejamento visando-se otimização.

Como se pode observar na Tabela 5.5, o efeito positivo dos fatores indica que o aumento nos seus valores favorece a variável resposta (produção enzimática) e a significância da interação sugere que seu efeito não é proporcional a soma dos efeitos individuais. Assim, o efeito positivo da interação da U% do ar e a U% do substrato se mostrou significativo para todas as enzimas e determina que o acréscimo conjunto de U% do ar e U% do substrato elevaria a produção enzimática.

Em relação à enzima FPase, a interação positiva da U% e vazão do ar é considerada também significativa, com isto o incremento nos seus valores teria que ocorrer de maneira simultânea para garantir o adequado balanço de umidade do processo de FES. Apesar de que nenhuma das variáveis individuais mostrou significância estatística para FPase, seu efeito pode ter sido relativamente atenuado quando comparado com a significância estatística das interações, pois sabe-se que a influência dos fatores dinâmicos é decisiva na produção enzimática (PANDEY et al., 2001; DURAND, 2003).

Para CMCase, a vazão do ar e a U% do substrato, assim como a interação entre a U% do ar e U% do substrato mostraram significância estatística. Já para xilanase, os efeitos das três variáveis U% do substrato e U% e vazão do ar foram consideradas significativas.

A vazão do ar, responsável pelo mecanismo dinâmico do biorreator de colunas teve efeito positivo na produção de celulasas devido a promoção da estabilidade da umidade no substrato e à melhora na transferência de oxigênio. Por outro lado, a remoção mais eficiente do calor gerado pelo crescimento microbiano, favoreceu também a manutenção da temperatura apropriada do processo (LATIFIAN et al., 2007).

Com base nos resultados estatísticos para as variáveis analisadas, delineou-se um novo planejamento fatorial a fim de implementar a otimização das mesmas variáveis. Desta forma propôs-se ampliar a faixa de estudo da vazão do ar de 12-36 mL min<sup>-1</sup> para 15-45 mL min<sup>-1</sup> visto que pela análise estatística maiores valores de X<sub>2</sub> favoreceu positivamente a produção enzimática. Da mesma forma, a faixa de estudo da umidade inicial do substrato foi ampliada para 45-75%. Tendo em consideração que o limite de saturação do substrato foi determinado em 80% (Capítulo 4). Quanto à variável U% do ar optou-se fixá-la no maior nível (80%) visando à estabilidade nos fenômenos de transferência de massa mas com a premissa estatística que variável não mostrou efeito significativo no rendimento das enzimas.



### 5.5.1.2 Delineamento Central Rotacional

O novo planejamento de experimentos foi baseado no DCCR com o intuito de avaliar o efeito das variáveis vazão do ar e U% do substrato e otimizar a produção enzimática no intervalo das condições operacionais selecionadas.

O DCCR foi constituído por 4 ensaios em dois níveis (-1 e +1), 4 ensaios nos pontos axiais (-1,41 e +1,41) e 3 ensaios no ponto central, totalizando 11 ensaios em duplicata em tempo real. A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para as atividades enzimáticas FPase, CMCase e xilanase estão apresentados nas Tabelas 5.6. Para efeito de comparação, novamente foram realizados os ensaios em condições estáticas com variação da U% inicial do substrato.

Tabela 5.6 Matriz do DCCR das variáveis em estudo com valores reais entre parênteses e as respostas em atividades das enzimas FPase, CMCase e xilanase.

| Ensaio | X <sub>1</sub> <sup>a</sup>         | X <sub>2</sub> <sup>b</sup> | Fpase <sup>c</sup> | CMCase <sup>c</sup> | Xilanase <sup>c</sup> |
|--------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 1      | -1 (20)                             | -1 (50)                     | 0,21               | 13,78               | 103,75                |
| 2      | -1(20)                              | +1 (70)                     | 0,65               | 18,70               | 132,51                |
| 3      | +1 (40)                             | -1 (50)                     | 0,49               | 13,06               | 122,52                |
| 4      | +1 (40)                             | +1 (70)                     | 0,65               | 18,35               | 124,39                |
| 5      | 0 (30)                              | -1,41(45)                   | 0,81               | 14,67               | 132,50                |
| 6      | 0 (30)                              | +1,41(75)                   | 0,89               | 19,11               | 143,03                |
| 7      | -1,41(15)                           | 0 (60)                      | 0,41               | 17,21               | 117,48                |
| 8      | +1,41(45)                           | 0 (60)                      | 0,45               | 19,25               | 96,47                 |
| 9      | 0 (30)                              | 0 (60)                      | 0,50               | 18,99               | 111,15                |
| 10     | 0 (30)                              | 0 (60)                      | 0,49               | 23,32               | 114,56                |
| 11     | 0 (30)                              | 0 (60)                      | 0,50               | 21,15               | 112,85                |
| 11     |                                     | 45                          | 0,24               | 6,64                | 130,29                |
| 12     |                                     | 50                          | 0,34               | 13,81               | 130,23                |
| 13     | Condições<br>estáticas <sup>e</sup> | 60                          | 0,40               | 16,48               | 154,29                |
| 14     |                                     | 70                          | 0,42               | 17,99               | 149,43                |
| 15     |                                     | 75                          | 0,42               | 19,89               | 177,47                |

<sup>a</sup> vazão do ar (mL min<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> umidade inicial do substrato (%); <sup>c</sup> atividade enzimática (UI g<sup>-1</sup>) - os resultados representam a média de 2 determinações. <sup>e</sup> Ensaios de FES em erlenmeyer.

Observa-se que na Tabela 5.6 as atividades da FPase em condições dinâmicas (ensaio 6) atingiram valores de atividades 2 vezes maiores que as condições estáticas (0,89 frente a 0,42 UI g<sup>-1</sup>). As melhores condições para CMCase registram-se no ponto central com valores

intermediários de vazão e U% do substrato, indicando a região ótima de produção. Além do controle dos parâmetros operacionais, o processo dinâmico favorece a manutenção da temperatura e dissipação de CO<sub>2</sub>, através do mecanismo de aeração forçada. Em condições estáticas, a remoção do calor produzido durante o crescimento microbiano é prejudicada pela baixa condutividade térmica do substrato sólido e a carência de superfícies trocadoras de calor (RAGHAVARÃO et al., 2003). Ademais, a melhor circulação de ar proporciona uma melhor taxa de transferência de oxigênio interparticular. Contudo, o nível ótimo da mesma depende da área superficial de transferência (líquido-gas) e a densidade da camada fúngica parâmetros microscópicos não mensurados no presente trabalho (OOSTRA et al., 2001).

Em relação à literatura, Domínguez et al. (2001) verificaram que a produção enzimática triplicou ao se utilizar o maior nível de aeração, na produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* em cultivo em estado sólido. Latifian et al. (2007) incrementaram as atividades de FPase e o crescimento microbiano de *T. reesei*, resultados similares aos apresentados por Deschamps et al. (2004) e Zhang et al. (2003) que determinaram também o efeito positivo do incremento de areação na produção de *T. harzianum* e *P. decumbens* respectivamente. Contudo, Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani (2010) observaram maiores atividades da FPase com o decréscimo de areação (<60 mL min<sup>-1</sup>) juntamente com o tamanho de partícula do substrato farelo de arroz com reatores encamisados. Pode-se dizer, portanto, que a taxa de areação ideal e seus efeitos na secagem do substrato e na fisiologia do fungo são específicos para cada sistema ecológico formado (ROCKY-SALIMI e HAMIDI-ESFAHANI, 2010).

Por outro lado, a enzima xilanase mostrou comportamento oposto, com a melhor produtividade de 177 UI g<sup>-1</sup> alcançada em condições estáticas (75% de U% do substrato) frente a 143 UI g<sup>-1</sup> em condições dinâmicas (30 mL min<sup>-1</sup> de vazão do ar de circulação). Estas observações sugerem que há diferença na morfologia microbiana relacionada com a expressão enzimática das xilanases. Neste sentido, Viniegra-Gonzalez e Favela-Torres (2006) ressaltaram a importância da formação e morfologia de hifas (organelos de respiração fúngica) como mecanismo modulador da indução ou repressão de proteínas específicas.

Em relação ao primeiro planejamento, cujos melhores resultados foram 0,56; 17,60 e 157,55 UI g<sup>-1</sup> respectivamente para FPase, CMCCase e xilanase, houve um acréscimo de 58% e 32,5% respectivamente para FPase e CMCCase, ao passo que para xilanase houve um

decréscimo de 9% mostrando que as condições escolhidas favoreceram em diferentes proporções as sínteses enzimáticas.

Analogamente ao planejamento fatorial precedente, realizou-se a avaliação dos resultados nesta etapa com o programa Statistica® possibilitando o cálculo dos efeitos e sua significância estatística das variáveis avaliadas. Da análise estatística, para cada variável resposta (FPase, CMCase e xilanase), obtiveram-se os efeitos significativos, erro padrão e os valores de  $p$  para avaliação da sua significância estatística a 90% (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 Resultados dos efeitos, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para otimização das condições operacionais no biorreator.

| Fatores                                  | FPase               |             |       |         | CMCase              |             |       |         | Xilanase            |             |       |         |
|--|---------------------|-------------|-------|---------|---------------------|-------------|-------|---------|---------------------|-------------|-------|---------|
|  | Efeito <sup>c</sup> | Erro Padrão | t(5)  | p-valor | Efeito <sup>c</sup> | Erro Padrão | t(5)  | p-valor | Efeito <sup>c</sup> | Erro Padrão | t(5)  | p-valor |
| Média                                    | 0,50                | 0,07        | 7,07  | 0,00    | 21,15               | 1,10        | 19,18 | 0,00    | 112,85              | 4,04        | 27,90 | 0,00    |
| (x <sub>1</sub> )V ar <sup>a</sup> (L)   | 0,08                | 0,09        | 0,98  | 0,37    | 0,45                | 1,35        | 0,33  | 0,75    | -4,77               | 4,95        | -0,96 | 0,38    |
| V ar <sup>a</sup> (Q)                    | -0,14               | 0,10        | -1,34 | 0,24    | -3,72               | 1,61        | -2,31 | 0,07*   | -6,66               | 5,90        | -1,13 | 0,31    |
| (x <sub>2</sub> )U% sub <sup>b</sup> (L) | 0,18                | 0,09        | 2,09  | 0,09*   | 4,12                | 1,35        | 3,05  | 0,03*   | 11,38               | 4,95        | 2,30  | 0,07*   |
| U% sub <sup>b</sup> (Q)                  | 0,29                | 0,10        | 2,80  | 0,04*   | -5,06               | 1,61        | -3,15 | 0,03*   | 24,12               | 5,90        | 4,09  | 0,01*   |
| 1L* 2L                                   | -0,14               | 0,12        | -1,13 | 0,31    | 0,19                | 1,91        | 0,10  | 0,93    | -13,45              | 7,00        | -1,92 | 0,11    |

<sup>a</sup> vazão do ar (mL min<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> umidade do substrato (%), <sup>c</sup> os efeitos são apresentados em UI g<sup>-1</sup>, \* p≤0,1, fatores estatisticamente significativos a p ≤0,1 (90% de nível de confiança). L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Após exclusão dos efeitos não significativos realizou-se novamente a análises de regressão para determinar os coeficientes dos modelos de ajuste dos dados experimentais. Os resultados dos conjuntos de dados, para cada atividade podem ser observados nas Tabelas 5.8, 5.9 e 5.10.

Tabela 5.8 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para FPase com exclusão de variáveis não significativas.

| FPase                              |             |             |      |         |
|------------------------------------|-------------|-------------|------|---------|
| Fatores                            | Coeficiente | Erro Padrão | t(5) | p-valor |
| Média                              | 0,43        | 0,05        | 7,95 | 0,00    |
| (x <sub>2</sub> ) U% substrato (L) | 0,09        | 0,05        | 1,97 | 0,08    |
| U% substrato (Q)                   | 0,16        | 0,05        | 3,15 | 0,01    |

Tabela 5.9 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para CMCase com exclusão de variáveis não significativas.

| CMCase                             |             |             |       |         |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------|---------|
| Fatores                            | Coeficiente | Erro Padrão | t(7)  | p-valor |
| Média                              | 21,15       | 0,94        | 22,42 | 0,00    |
| (x <sub>1</sub> ) Vazão ar (Q)     | -1,86       | 0,69        | -2,70 | 0,03    |
| (x <sub>2</sub> ) U% substrato (L) | 2,06        | 0,58        | 3,57  | 0,01    |
| U% substrato (Q)                   | -2,53       | 0,69        | -3,68 | 0,01    |

Tabela 5.10 Resultados dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t e p valor provenientes do DCCR para xilanase com exclusão de variáveis não significativas.

| Xilanase                           |             |             |       |         |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------|---------|
| Fatores                            | Coeficiente | Erro Padrão | t(8)  | p-valor |
| Média                              | 109,72      | 3,43        | 31,96 | 0,00    |
| (x <sub>2</sub> ) U% substrato (L) | 5,69        | 2,89        | 1,97  | 0,08    |
| U% substrato (Q)                   | 13,04       | 3,29        | 3,97  | 0,00    |

As Equações 5.3, 5.4 e 5.5 representam os modelos codificados das funções respostas (Y) FPase, CMCase e xilanase respectivamente

$$FPase \quad Y=0,43 + 0,09X_2 + 0,16X_2^2 \quad (\text{Equação 5.3})$$

$$CMCase \quad Y=21,77 - 1,86 X_1^2 + 2,06 X_2 - 2,53 X_2^2 \quad (\text{Equação 5.4})$$

$$Xilanase \quad Y=109,72 + 5,69 X_2 + 13,04 X_2^2 \quad (\text{Equação 5.5})$$

Onde:

$$X_1 = \text{Vazão (mL min}^{-1}\text{)}$$

$$X_2 = \text{Umidade do substrato (\%)}$$

Na validação estatística dos modelos aplicou-se análise de variância (ANOVA) para cálculo do valor F (Teste Fisher), os resultados são apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 Parâmetros de verificação para validação dos modelos pela ANOVA.

| Parâmetros validação              | Fpase | CMCase | Xilanase |
|-----------------------------------|-------|--------|----------|
| $F_{\text{calculado}}$            | 6,88  | 11,19  | 9,81     |
| $F_{\text{tabelado, 0,1}}$ *      | 3,11  | 3,07   | 3,11     |
| $F_{\text{calc}}/ F_{\text{tab}}$ | 2,21  | 3,65   | 3,15     |
| % variação explicada $R^2$        | 63,24 | 80,63  | 71,03    |

\* Valores extraídos da Tabela estatística F.

A verificação dos resultados da Tabela 5.11 mostra a superioridade nos valores de F calculados frente aos do F tabelados, fato que valida todos os modelos (90% de confiança) na região estudada. Os valores dos coeficientes de determinação  $R^2$  advertem a porcentagem de variabilidade explicada por cada um dos modelos. As superfícies de resposta resultantes dos modelos (Equações 5.3, 5.4 e 5.5) para FPase, CMCase e xilanase são apresentadas nas Figuras 5.5 , 5.6 e 5.7.

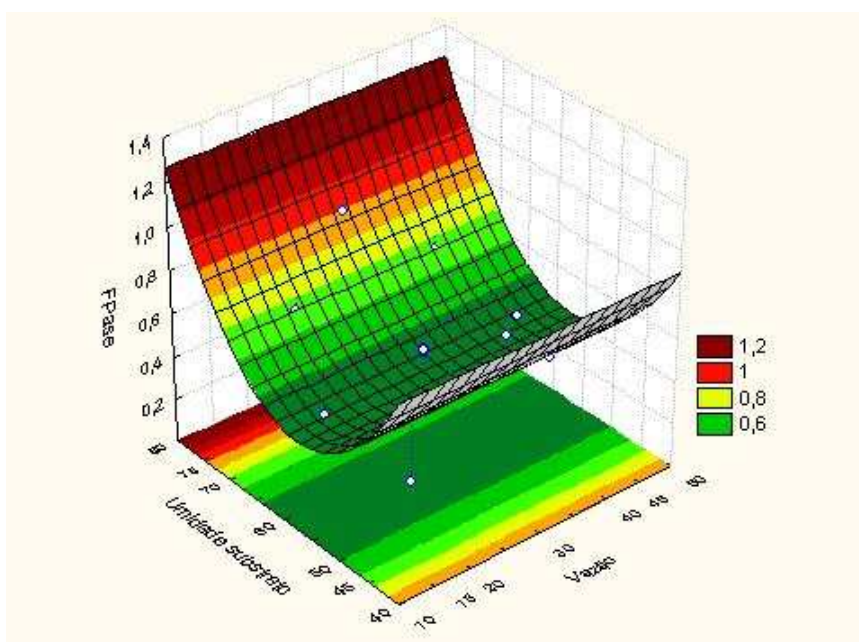


Figura 5.5 - Superfície de resposta para a FPase ( $UI\ g^{-1}$ ) em função da U% do substrato e vazão do ar de circulação ( $mL\ min^{-1}$ ).

A Figura 5.5 indica um decréscimo inicial na produtividade de FPase em função ao incremento da U% do substrato na faixa de 45-60%, após a qual houve um aumento linear na resposta em função do acréscimo desta variável. Os melhores resultados obtidos de FPase ( $0,89\ UI\ g^{-1}$ ) foram atingidos em níveis de 75 de U% inicial, verificando o favorecimento na solubilização e difusão de nutrientes e a efetiva troca de gases no meio (TARAGANO e

PILOSOF, 1999). Como relatado por Acuña-Arguelles et al. (1994), Raghavarao et al. (2003), os baixos teores de umidade inicial reduzem a produção enzimática, pois, causam alterações morfológicas na membrana do fungo limitando o transporte por difusão e osmose, afetando com isto o metabolismo microbiano. Portanto, ressalta-se o a manutenção de um equilíbrio adequado entre a disponibilidade de água, as propriedades físicas do substrato e os efeitos de difusão do oxigênio. Visto que o ar utilizado para aeração do meio foi previamente umidificado, dificuldades no sentido de secagem no substrato foram prevenidas neste sistema.

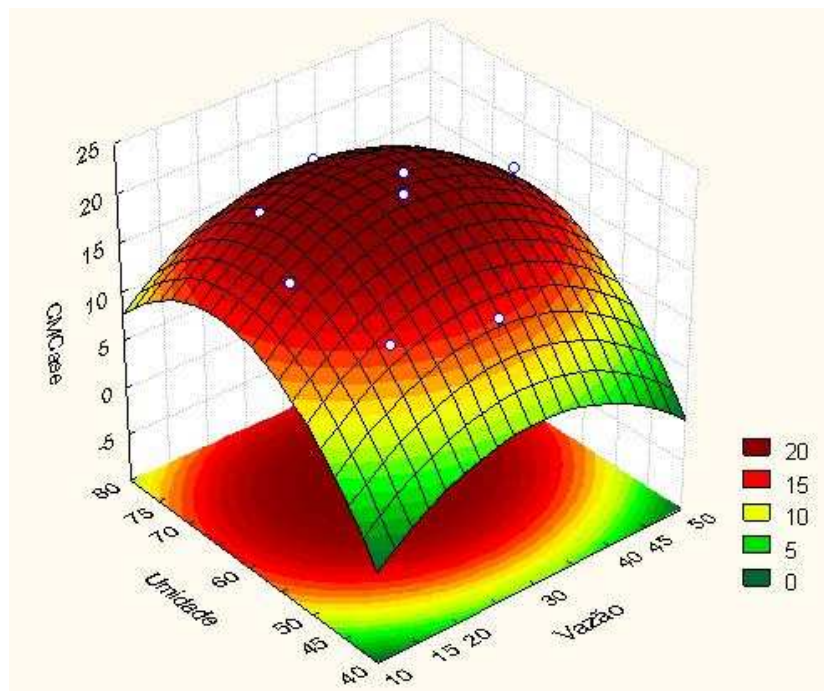


Figura 5.6 - Superfície de resposta para a CMCCase ( $UI\ g^{-1}$ ) em função da U% do substrato e vazão do ar de circulação ( $mL\ min^{-1}$ ).

A Figura 5.6 mostra o efeito da U% do substrato e a vazão do ar de circulação sobre a atividade CMCCase. A partir do modelo ajustado foi possível determinar as condições ótimas de U% do substrato (60%) e vazão do ar ( $30\ mL\ min^{-1}$ ) para atingir produtividades previstas pelo modelo de  $21,77\ U\ g^{-1}$ . As atividades enzimáticas previstas pelos modelos codificados e os desvios padrão em cada ensaio aparecem como informação complementar no Anexo 4.

Finalmente a análise estatística para a xilanase resultou na Figura 5.7, onde observa-se que a produção mais eficiente é atingida com 75% de U% inicial de substrato, independentemente dos valores de vazão utilizados ( $15 - 45\ mL\ min^{-1}$ ). A mesma tendência foi observada na produção de FPase, verificando que o balanço da umidade foi o fator mais significativo para ambas as enzimas nas condições de estudo.

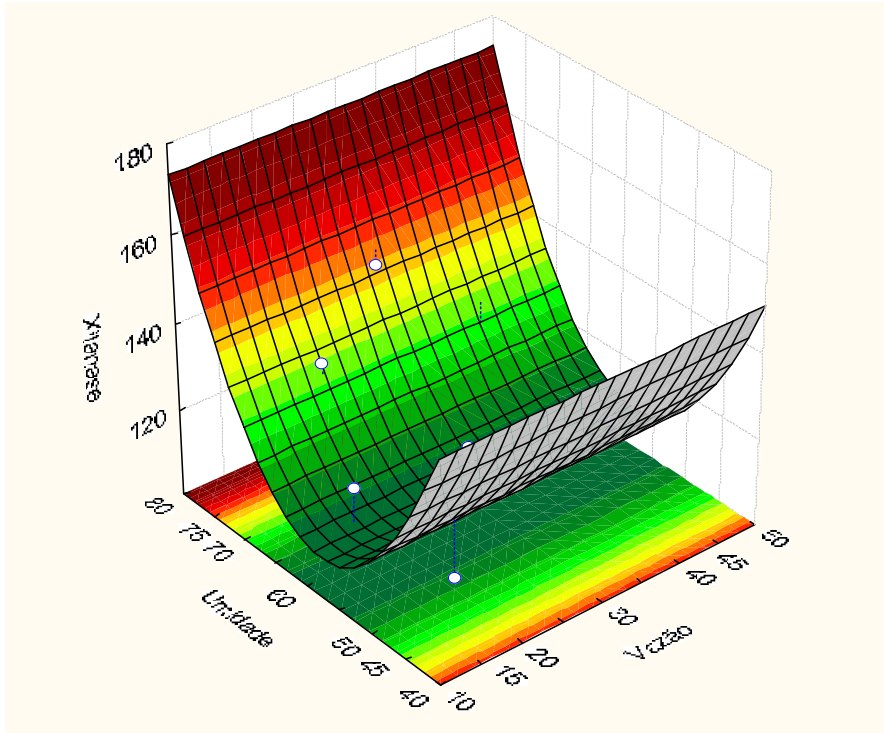


Figura 5.7 - Superfície de resposta para a xilanase ( $\text{UI g}^{-1}$ ) em função da U% do substrato e vazão do ar de circulação ( $\text{mL min}^{-1}$ ).

Mesmo utilizando valores elevados de U% do BC, o risco de saturação do substrato é atenuada em condições dinâmicas, pois quando a U% inicial do substrato é próxima a saturação, a água livre pode ser equilibrada pela circulação de ar.

Cabe mencionar que o favorecimento da produtividade de CMCCase, observada nos valores médios de U% do substrato (60%), pode-se tornar prejudicial para a FPase e xilanase; portanto selecionou-se o valor de 80% de U% do substrato, na etapa seguinte de avaliação respirométrica. No entanto, a vazão do ar de  $30 \text{ mL min}^{-1}$ , selecionada como ótima para a CMCCase poderá ser também aplicada para a produção de FPase e xilanase sem detrimento das suas atividades.

### 5.5.2 Evolução da produção da CMCCase e produção de $\text{CO}_2$

A produção enzimática neste experimento foi realizada nas condições previamente estabelecidas no DCCR. Um dos maiores desafios no desenvolvimento de tecnologias de FES é a estimativa da quantidade biomassa devido à impossibilidade de aplicação dos métodos utilizados em sistemas homogêneos como a FSM. A adesão do microrganismo ao suporte/substrato inviabiliza tal estimativa. A respirometria baseada no monitoramento da produção de  $\text{CO}_2$  e consumo de  $\text{O}_2$  tem sido utilizada por vários autores (SOCCOL e



VANDENBERGHE, 2003; CARVALHO et al., 2006 e SPIER et al., 2007) como medida indireta do crescimento microbiano e sua relação à produção de biomoléculas.

A Figura 5.8 apresenta os resultados da evolução do CO<sub>2</sub> e da produção de CMCCase cada 24 horas. Observa-se que o CO<sub>2</sub> começa a ser detectado após 8 horas de fermentação, atingindo o percentual máximo de fluxo (1,0%) após 12 horas. A partir deste pico, há um decréscimo da quantidade de CO<sub>2</sub> liberado até 48 horas onde permanece constante (~0,1%) até o final da fermentação mostrando que o microrganismo permanece respirando.

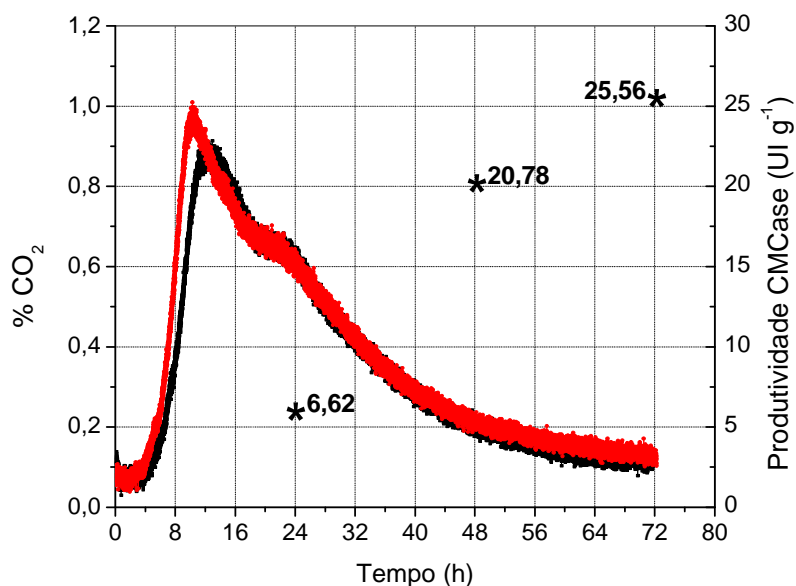


Figura 5.8 - Evolução de CO<sub>2</sub> (curvas) e atividade de CMCCase (\*) durante a FES com *A. niger* em BC (65%) e FS (35%) com 80% de U%, aeração de 30 mL min<sup>-1</sup> e U% relativa do ar de 80%.

A produção de CMCCase (\* na Figura 5.8) se inicia a partir de 24 horas de fermentação (6,62 UI g<sup>-1</sup>), atingindo o ponto máximo (25,56 UI g<sup>-1</sup>) em 72 horas que corresponde a uma geração total de CO<sub>2</sub> de 0,83 g. Tal fato sugere que a expressão da enzima começa após a máxima síntese da biomassa microbiana, uma vez que o *A. niger* precisa de um período de adaptação e assimilação da fonte de carbono para uma adequada atividade metabólica e produção enzimática (KRISHNA e NOKES, 2001; SPIER et al., 2007).

Como produto desta FES, após 72 h também obtiveram-se os extratos enzimáticos utilizados na hidrólise de BC explodido da seguinte seção. Assim os valores resultantes da produção de FPase, CMCCase, xilanase e β-glicosidade (UI mL<sup>-1</sup>) são mostradas na Tabela 5.12 em comparação com as atividades quantificadas para a enzima comercial utilizada Celluclast 1.5L.

Tabela 5.12 Comparação das atividades celulásicas alcançadas neste trabalho e atividades encontradas em preparado comercial.

| Atividade enzimática (UI. mL <sup>-1</sup> ) | FPase | CMCase | xilanase | β-glicosidade |
|--|-------|--------|----------|---------------|
| Neste trabalho                               | 0,045 | 1,10   | 9,17     | 0,33          |
| Celluclast 1.5L                              | 37,2  | 24,90  | ND       | ND            |

Cabe destacar que o complexo celulásico produzido neste trabalho apresenta já na sua composição uma concentração considerável das enzimas β-glicosidade e xilanase, Vantagens em relação à adaptação das fibras celulásicas para o ataque da CMCase (xilanase) e a menor possibilidade de inibição enzimática pela celobiose produzida durante a hidrólise (β-glicosidade).

Por outro lado é interessante notar que a produção comercial de celulases foi por fermentação submersa, processo associado a uma série de etapas *downstream* após extração. Onerosas operações de concentração e purificação enzimática são necessárias para atingir os valores quantificados nesta tabela. No caso do complexo enzimático produzido neste trabalho, sua aplicação na hidrólise enzimática foi diretamente após extração, representando uma alternativa concreta de redução das etapas e com isto dos custos do processo para produção de celulases.

### 5.5.3 Hidrólise Enzimática

Foram realizados ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar (BC) previamente explodido com o objetivo de se avaliar a efetividade real do complexo enzimático produzido nas melhores condições testadas no trabalho.

A seleção do BC explodido como substrato de hidrólise foi baseada na sua ampla difusão no ambiente industrial além do seu potencial de compatibilidade com o conceito de biorrefinarias. Neste sentido, Ramos (2003) atribui ao processo de explosão a vapor a geração de uma grande variedade de precursores e de insumos químicos a partir do BC.

Os resultados apresentados na Figura 5.9 mostram o perfil de conversão dos AR em função do tempo de hidrólise de 72 horas. Nota-se a estabilização em aproximadamente 22 horas de processo com 13% de conversão, sendo que após 72 h de hidrólise a conversão final foi de 14%. Os ensaios de hidrólise enzimática foram comparados com os resultados obtidos por Adriano et al. (2008), para hidrólise de BC explodido com celulases comerciais (Celluclast 1.5 L) nas mesmas condições deste trabalho. O monitoramento durante 8 dias do processo pode-se observar na Figura 5.10.

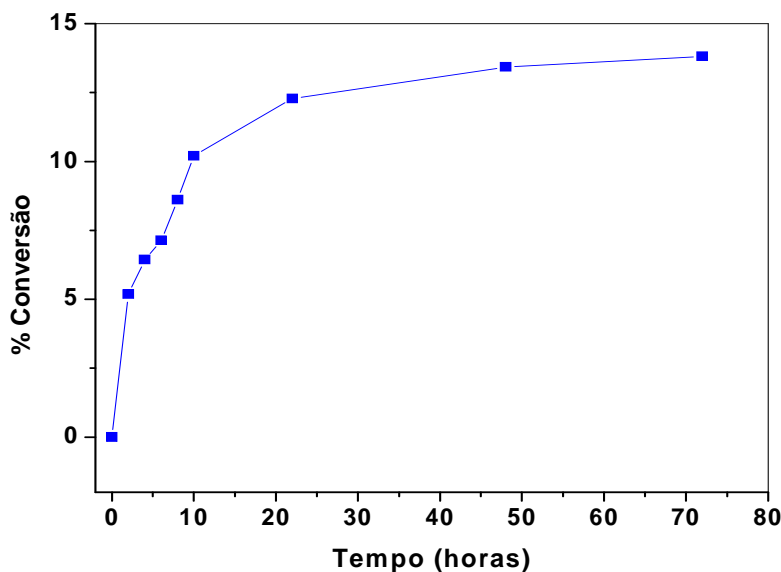


Figura 5.9 - Conversão do BC explodido com celulases específicas (Carga enzimática: 5 FPU  $\text{g}^{-1}$  BC explodido; 50 °C e pH 4,8; 72 horas). Atividade enzimática ( $\text{UI mL}^{-1}$ ): FPase 0,05; CMCase 1,10; xilanase 9,17 e  $\beta$ -glicosidade 0,33.

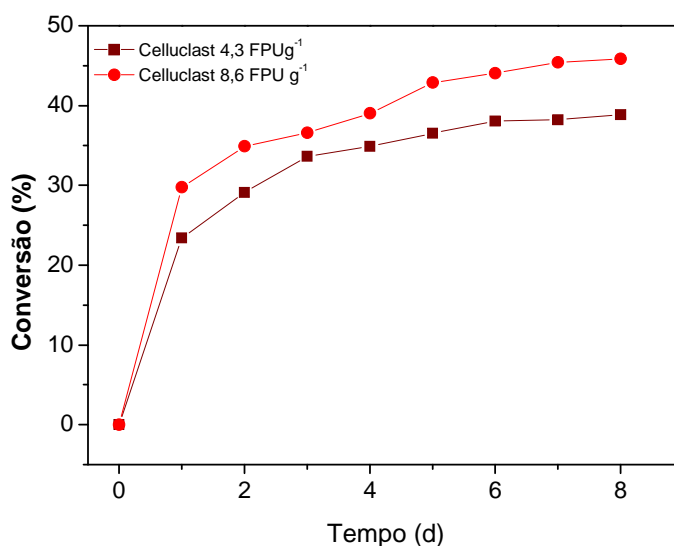


Figura 5.10 - Conversão do BC explodido com Celluclast 1,5L à diferentes concentrações (50 °C e pH 4,8; 8 dias). Atividade enzimática ( $\text{UI mL}^{-1}$ ): FPase, 37,2 e CMCase, 24,9. Fonte. Adriano et al. (2008).

A conversão atingida após 72 h foi de 33% e 36% com cargas enzimáticas de 4,3 e 8,6 FPU  $\text{g}^{-1}$  de BC explodido. Apesar da similaridade na concentração de FPU  $\text{g}^{-1}$  de BC aplicada o menor rendimento mostrado pelo extrato de celulases bruto (produzido neste trabalho) sugere o estudo da efetiva participação de cada uma das enzimas constituintes das celulases. Neste sentido, para uma hidrólise eficiente além da CMCase sintetizadas em concentrações significativas quando comparada com a enzima comercial, é necessária a ação das

exoglucanases ou celobiohidrolases (não quantificadas no presente estudo). As celobiohidrolases atuam sobre os terminais redutores e não redutores formados pela ação da CMCase (endoglucanase) para formar celobiose e posteriormente glicose através da ação da  $\beta$ -glicosidade (LYND et al., 2002). A menor quantidade de AR formados após aplicação do extrato bruto pode-se dever à baixa concentração de celobiohidrolases ou um balanço desfavorável das atividades celulásicas presentes.

Por outro lado, visando à comparação dos valores de AR obtidos neste trabalho com complexos celulolíticos produzidos por FES na literatura, a Tabela 5.13 mostra as condições de hidrólise e os resultados atingidos por Sukumaram et al. (2009).

Tabela 5.13 Comparação do rendimento em AR na hidrólise enzimática de BC com diferentes pré-tratamentos.

| Substrato                              | Concentração de AR<br>( $\mu\text{mol mL}$ ) | Carga enzimática ( $\text{U g}^{-1}$ BC) |        |          |                      |
|--|--|--|--------|----------|----------------------|
|  |  | FPase                                    | CMCase | xilanase | $\beta$ -glicosidade |
| BC explodido <sup>a</sup>              | 18,49  | 5  | 137    | 1146     | 41,25                |
| BC pré-tratado com ácido <sup>b</sup>  | 15,82  | 50                                       | 10     | NR       | 5                    |
| BC pré-tratado com alkali <sup>b</sup> | 17,79  | 50                                       | 10     | NR       | 5                    |

<sup>a</sup> Condições de hidrólise enzimática utilizadas no trabalho (2 g de BC em volume reacional de 200 mL e tempo de 72 horas a 50°C); <sup>b</sup> Condições usadas em Sukumaram et al. (2009): 1 g de BC em 50 mL, tempo de hidrólise de 48 horas a 45°C.

Pode-se observar na tabela 5.13 que apesar dos maiores tempos e a menor concentração enzimática de FPU usados neste trabalho, o efeito sinérgico da xilanase e  $\beta$ -glicosidade permitiu atingir valores similares aos relatados por Sukumaram et al. (2009), que utilizaram blendas celulásicas produzidas por FES com *T. reesei* Rut C30 e *A. niger* em farelo de trigo. Enzimas auxiliares como as xilanases foram recentemente incluídas na hidrólise de BC (KUMAR e WYMAN, 2009, MEYE et al., 2009), pois clivam as ligações xilana-celulose influenciando positivamente na acessibilidade da cadeia celulósica. Este processo prévio à efetiva hidrólise da celulose pode sugerir os maiores tempos exibidos no presente trabalho.

As amostras da solução de hidrólises foram também analisadas por cromatografia em função aos açúcares produzidos (glicose, xilose e arabinose) como se observa na Figura 5.11.

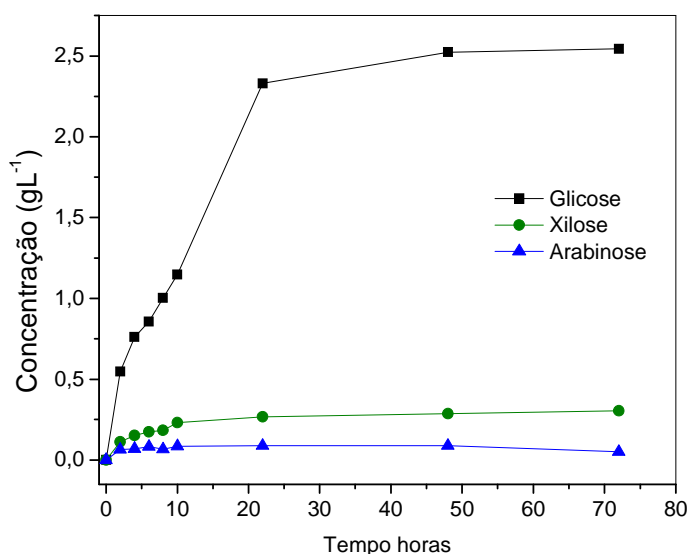


Figura 5.11 - Concentração de açúcares produzida na hidrólise de BC explodido com celulasas específicas. Carga enzimática: 5 FPU g<sup>-1</sup> de BC durante 72 h.

Estes dados podem ser também comparados com alguns relatados na literatura, por exemplo, Gottschalk et al. (2010) quantificaram também a glicose resultante de hidrólise enzimática utilizando complexos celulolíticos contendo FPase e  $\beta$ -glicosidade em diferentes proporções, como é apresentado na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 Comparação do rendimento em glicose (g L<sup>-1</sup>) na hidrólise enzimática de BC com complexos celulolíticos da literatura.

| Microorganismo produtor/enzima | Concentração de glicose | Carga enzimática (U g <sup>-1</sup> BC explodido) |        |          |                      |
|--------------------------------|-------------------------|---|--------|----------|----------------------|
|                                |                         | FPase   | CMCase | xilanase | $\beta$ -glicosidade |
| <i>T. reesei</i>               | 6,0                     | 10  | 118    | 74       | 2                    |
| <i>A. awamori</i>              | 3,0                     | 10  | 117    | 1883     | 1086                 |
| Mistura 75:25                  | 7,5                     | 10  | 122    | 249      | 50                   |

<sup>a</sup> Condições de hidrólise enzimática utilizadas 2 g de BC explodido em volume reacional de 100 mL, tempo de 72 horas a 50°C e 200 rpm.

As enzimas utilizadas no trabalho de Gottschalk et al. (2010) foram produzidas por fermentação submersa e passaram por etapas de concentração antes da sua aplicação. Apesar disso, as concentrações de glicose obtidas neste trabalho (2,54 g L<sup>-1</sup>) são comparáveis às atingidas com o dobro de carga enzimática de complexos produzidos pelo *A. awamori*. Fato que sugere que esta efetividade pode ter sido favorecida pela especificidade enzimática derivada do uso do substrato de fermentação.

Por outro lado, a Figura 5.11 mostra baixas concentrações de xilose no hidrolisado (aproximadamente 0,30 g L<sup>-1</sup>) apesar da elevada carga de xilanase aplicada com o extrato

enzimático. Como mencionado as xilanases são responsáveis pela conversão enzimática da xilana, no entanto, a produção de xilose requer a participação sinérgica de vários tipos de xilanases, as endoxilanases agem aleatoriamente na cadeia principal para formar xilooligosacarídeos, que na sequência formaram xilose pela atividade da  $\beta$ -xilosidase (FERREIRA FILHO, 2004). Neste sentido observações prévias de Lemos et al. (2000) e Sunna e Antranikian (1997) demonstraram que o gênero *Aspergillus* produz níveis consideráveis de xilanases com deficiência em  $\beta$ -xilosidases, confirmando o fenômeno observado na Figura 5.11.

Contudo, apesar de que a hidrólise atingida com as enzimas produzidas neste trabalho é relativamente menor do que aquela alcançada com a enzima comercial, a comparação com artigos da literatura indica rendimentos similares utilizando-se blendas de celulasas produzidas por diferentes microorganismos (*A. niger* e *T. reesei*). No entanto, ressalta-se a necessidade da caracterização do extrato enzimático produzido em relação a todas as enzimas do complexo celulásico.

## 5.6. CONCLUSÕES

- Os efeitos da umidade inicial do substrato e umidade e vazão do ar de circulação foram avaliados na produção de celulasas e xilanases pelo fungo *A. niger* em biorreator de colunas instrumentado por fermentação em estado sólido. Assim, visando aumentos na produção enzimática, a variável umidade do substrato mostrou maior significância estatística. Contudo o efeito positivo nas atividades de celulasas apresentou um limite na saturação inicial do substrato de 80% dependente da capacidade de absorção do suporte/substrato, composto pelo bagaço de cana e farelo de soja.
- Em relação à seleção da melhor condição na vazão do ar nas colunas de fermentação, esta variável não mostrou significância estatística no intervalo avaliado de 15-45 mL min<sup>-1</sup>. No entanto, sua relevância foi inferida através do controle da umidade do ar de circulação em 80%. As condições dinâmicas promoveram incrementos na produção enzimática indicando que a circulação de ar favorece o equilíbrio hídrico-térmico do sistema como demonstrado pelas maiores atividades de FPase e CMCase.

- O uso do biorreator de colunas instrumentado garantiu o controle, monitoramento e a maior estabilidade do processo permitindo a seleção das melhores condições dinâmicas nas variáveis estudadas neste trabalho. Adicionalmente, o registro automatizado de CO<sub>2</sub> produzido pelo *A. niger* e o consequente monitoramento respirométrico mostrou-se uma ferramenta potencial para avaliação do crescimento fúngico na FES condizente à sua correlação com a síntese enzimática.
- O produto final do desenvolvimento do bioprocessamento para obtenção de celulases específicas a partir do bagaço de cana consistiu em um extrato enzimático celulolítico com as seguintes atividades de (UI mL<sup>-1</sup>) FPase: 0,045; CMCase: 1,10; xilanase: 9,17 e β-glicosidase:0,33. Estas atividades permitiram conversões de 15% após 22 horas quando utilizados na hidrólise de bagaço de cana explodido demonstrando a direta aplicabilidade e especificidade do coquetel enzimático produzido.

## REFERÊNCIAS

- ADRIANO, W. S.; MARTINS, R.; RODRIGUES, D.S.; GORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Cellulignin hydrolysis using immobilized cellulases. In : 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. New Orleans. Anais of 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2008.
- ACUÑA-ARGUELLES, M.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 in solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, v.16, p.23-28, 1994.
- ANISHA, G.S.; ROJAN, P.J.; NICEMOL, J.; NILADEVI, K.N.; PREMA, P. Production and characterization of partially purified thermostable β-galactosidases from *Streptomyces griseoalbus* for food industrial applications. *Food Chemistry*, v. 111, p. 631–635, 2008.
- AURIA, R., MORALES, M., VILLEGAS, E., REVAH, S. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, p. 1007-1013, 1993.
- BERTUCCI, N.; COURI, S. Instrumentação para automação de processo de fermentação semi-sólida, Comunicado técnico, EMBRAPA BOLETIM DE P&D, N 7, p.1-4, 1996.
- BERTUCCI-NETO, V.; FONSECA, R. F.; FARINAS, C. S.; COURI, S. Automação de reatores de fermentação sólida para produção de enzimas. Embrapa Boletim de P&D, 2009. Embrapa Instrumentação Agropecuária Ed., São Carlos. 2009.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M. JAVED. S. Solid-state fermentation: an overview. *Chemical and Biochemical Engineering*, v. 22, p. 49–70, 2008.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506p.

CARVALHO, J.C., PANDEY, A., OISHI, B.O., BRAND, D., RODRIGUEZ-LEON, J.A., SOCCOL, C.R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 29, p. 262-269, 2006.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANTANNA, JR., G. L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 239-247, 2000.

CEN, P.; XIA, L. Production of cellulase by solid-state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 65, p. 70-92, 1999.

COURI, S.; FARIAS, A.X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, v.26, n.4, p.314-317, 1995.

COURI, S.; MERCES, E.P.; NEVES, B.C.V.; SENNA, L.F. Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *Journal of Microscopy*, v. 224, p. 290–297, 2006.

DE SIQUEIRA, F.G.; DE SIQUEIRA, L.G.; JARAMILLO, P.D. SILVEIRA, M.L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F.A.; BATISTA, L.R. FERREIRA FILHO, E.X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 64, p. 20–26, 2010.

DESCHAMPS, F., GIULIANO, C., ASTHER, M., HUET, M.C. AND ROUSSOS, S. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnology Bioengineering*, v. 27, p. 1385–1388, 2004.

DI LUCCIO, M. CAPRA, F. RIBEIRO, N.P. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v. 113, p. 173–180, 2004.

DOMÍNGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO, S. R. ; SANROMÁN, M.A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on a inert support. *Process Biochemistry*, v.37, p.549-554, 2001.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 113–125, 2003.

FERREIRA FILHO, E.X. In SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. (Eds), 2004. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto, Leggis Summa, p. 139, 2004.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 273–278, 2007.

HAMIDI-ESFAHANI, Z. SHOJAOSADATI, S.A. RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, v. 21, p. 265–272, 2004.

HARDIN, M.T.; HOWES, T.; MITCHELL, D.A. Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors. *Journal of Biotechnology*, v. 97, p. 89–101, 2002.

HOLKER, U.; HÖFER, M., LENZ, J.. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 175-186, 2004.

HOLKER, U., LENZ J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 301-306, 2005.



- GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, p. 269–274, 2005.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases, -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 51, p. 72-78, 2010.
- GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana de açúcar. *Química Nova*, v. 32, p. 1500-1503, 2009.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 85-101, 2003.
- JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for l-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 759–763, 2006.
- KHANAHMADI M., ROOSTAAZAD, R., MITCHELL, D.A., MIRANZADEH, M., BOZORGMEHRI, R., SAFEKORDI, A. Bed moisture by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 5654-5663, 2006.
- KRISHNA, C.; NOKES, S.E. Influence of inoculum size on phytase production and growth in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*. *Transactions of the ASABE*, v. 44, p. 1031–1036, 2001.
- KUMAR, R.; WYMAN, C. Effect of supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4203-4213, 2009.
- LATIFIAN, M., HAMIDI-ESFAHANI, Z., BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3634–3637, 2007.
- LEITE, A.J.; FERNANDES, S.B.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 579–586, 2008.
- LEMOS J.L.S.; BON, E.P.S.; SANTANA, M.F.P.; PEREIRA JR. N. Thermal Stability Of Xylanases Produced By *Aspergillus Awamori* *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 206-211, 2000.
- LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 7, p. 258-265, 1985.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 506–524, 2002.
- MANDELS, M. E WEBER, J. The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MARTINS, R. E. Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, 2007, 2007. 97 p.
- MEYER, S.A.; ROSGAARD, L.; SØRENSEN, H.R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, v. 50, p. 337–344, 2009.
- MILLER, G.L. 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- MITCHELL, D. A., VON MEIEN, O. F., KRIEGER, N., DALSENTER, F. D. H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, p. 15, 2004.

- NAGEL, F.-J. J.I., TRAMPER, J., BAKKER, M.S.N., RINZEMA, A. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72, p. 219-230, 2001.
- OOSTRA, J.; LE COMTE, E.P.; VAN DEN HEUVEL, J.C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 75, p. 13–24, 2001.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LEO, J.A.R.; NIGAM, P. (Ed.). *Solid-state Fermentation in Biotechnology*, Asia tech Publishers, Inc., New Delhi, 2001, 221p.
- PEÑA Y LILLO, M., PÉREZ-CORREA, R., AGOSIN, E., LATRILLE, E. Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 76, p. 44-51, 2001.
- PEREIRA Jr, N. *Biomassas Residuais de Composição Lignocelulósica para a Produção de Etanol e o Contexto de Biorrefinaria*. Palestra Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.forumclima.org.br/arquivos/NeiPereiraJr.ppt>>. Acesso em: 10/08/10.
- PITARELO, A. P. Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar à Bioconversão via Pré-Tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Sub-área de Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, PR. 2007. 125 p.
- PRESEÈKI, A.V.; FINDRIK, Z.; ZELIC, B. Modeling of the Biotransformation Processes. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 20, p. 227, 2006.
- RAGHAVARAO, K.S.M.S., RANGANATHAN, T.V., KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 127-135, 2003.
- RAHARDJO, S.P.Y.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, v. 24, 161–179, 2006.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, 1998. Disponível em <<http://www.ejb.org>>. Acesso em: 20/08/2010.
- RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Coconut oil cake—a potential raw material for the production of  $\alpha$ -amylase. *Bioresource Technology*, v. 93, p. 169–174, 2004.
- RAMOS, L.P. THE CHEMISTRY INVOLVED IN THE STEAM TREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS. *Química. Nova*, v. 26, p. 863-871, 2003.
- RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus spp.* using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1749–1754, 2005.
- ROCKY-SALIMI, K., HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food Bioprocesses*, v. 88, p. 61–66, 2010.
- ROCHA G.J.M.; SILVA, F.T.; CURVELO, A.A.S.; ARAÚJO, G. T. 5th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Paraná, Brasil, 1997.
- RODRÍGUEZ COUTO, S.; ROSALES, E.; GUNDÍN, M.; SANROMÁN, M.A. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes sp.* *Journal of Food Engineering*, v. 64, p. 423–428, 2004.
- RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, v. 76 p. 291–302, 2006.

- SABU, A. AUGUR, C. SWATI, C. PANDEY, A. Tannase production by *Lactobacillus sp.* ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 575–580, 2006.
- SAHIR, A.H.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Modelling of a packed bed solid-state fermentation bioreactor using the N-tanks in series approach, *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 20–28, 2007.
- SANGSURASAK, P. MITCHELL, D.A. Validation of a model describing two dimensional dynamic heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, p. 739–749, 1998.
- SARGANTANIS, J., KARIM, M. N., MURPHY, V.G., RYOO, D., TENGEDY, R.P. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnology Bioengineering*, v. 42, p. 149-158, 1993.
- SINGHANIA, R.R.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrates for solid-state fermentation processes (2007). In: Pandey, A.; Soccol, C.R.; Larroche C. Eds. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Springer Science Asiatech Publishers, Inc., New York, USA and New Delhi, India, pp. 412–442, 2007.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R. e PANDEY A. Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.
- SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., PATEL, A.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged Fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.
- SPIER, M.R.; GREINER, U.K.; GREINER, R.; CARVALHO, J.C.; RODRIGUEZ-LÉON, J.A.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R. Relation between respirometric data and amyolytic enzyme production by SSF in column-type bioreactor. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, v. 5, p. 1-10, 2007.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A.R.K. Microbial cellulases—production, applications and challenges. *Journal Science of Industrial Resources*, v. 64, p. 832–844, 2005.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421- 424, 2009.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Material for Ethanol Production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews of Biotechnology*, v. 17, p. 39-67, 1997.
- TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbiol Technology*, v.25, p.411-419, 1999.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Why Solid State Fermentation seems to be resistance to catabolite repression. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, p. 397–406, 2006.
- WU, K.J.; CHANG, C.F.; CHANG, J.S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1165–1171, 2007.

XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 179–184, 2007.

ZHANG, X.; MO, H.; ZHANG, J.; LI, Z. A solid state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 417–420, 2003B.

## CONCLUSÕES GERAIS

---

Visto o acelerado avanço na pesquisa e as crescentes iniciativas visando a viabilidade comercial da hidrólise enzimática, o presente estudo foi focado em um dos principais desafios tecnológicos deste processo. A redução dos custos de produção e o aumento na especificidade das enzimas celulases foram abordados através de estratégias como a utilização da Fermentação em Estado Sólido, alternativa tecnológica com menores custos de implementação/instalação, incluindo o uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a especificidade no extrato enzimático.

O desenvolvimento do bioprocesso foi organizado em uma série de etapas experimentais visando à superação de limitações tecnológicas e a seleção de sub-alternativas cujos resultados compõem a seguinte proposta de processamento:

- Para acondicionar o bagaço de cana visando seu uso como substrato microbiano, optou-se pelo pré-tratamento hidrotérmico, rota baseada em uma apropriada caracterização convencional e espectroscópica, chave para o esclarecimento científico dos fenômenos envolvidos no pré-tratamento.
- Como substrato no processo de fermentação em estado sólido selecionou-se uma mistura de 65% de bagaço de cana, fonte de carbono indutora e 35% de farelo de soja, como fonte protéica suplementar. Além disso, a adição de um meio de cultura até atingir 80% de umidade foi especialmente formulado com ajuda de ferramentas estatísticas.
- Na etapa de escalonamento operacional, a circulação forçada de ar úmido foi o parâmetro relevante para alcançar maiores atividades enzimáticas e um adequado balanço hídrico e térmico da fermentação em bioreatores de coluna instrumentados.

Como resultado global do processo, foi demonstrada a direta aplicabilidade do complexo de celulases específicas na hidrólise enzimática do bagaço de cana explodido, comprovando assim sua efetividade como estratégia na viabilização do etanol de 2<sup>a</sup> geração em escala laboratorial.

A proposta desenvolvida apresenta como vantagens mais relevantes as seguintes: i) na etapa de pré-tratamento não são gerados resíduos tóxicos, uma vez que não são necessários reagentes químicos no processo nem são utilizadas condições operacionais severas, ii) a fermentação em estado sólido ostenta menores custos de inversão e gera menor volume de

efluentes líquidos, sendo que o produto foi diretamente aplicado na etapa seguinte de hidrólise, iii) não são necessários elevados gastos energéticos no reator de fermentação, pois a temperatura de operação é de 32°, iv) o microrganismo de trabalho, *Aspergillus niger*, não apresenta risco biológico nem é patogênico a saúde humana, v) não foram identificados riscos quanto a efluentes gasosos, vi) a possibilidade de operação em condições semi-estéreis fornecem uma elevada capacidade de integração operacional no ambiente industrial de uma usina de etanol convencional.

Todos estes benefícios comprovam o aporte do trabalho apresentado em relação ao seu potencial de integração a um processo de hidrólise enzimática real projetado como unidade anexa de uma usina convencional de etanol de 1ª geração. Por tanto, tal tecnologia otimiza a utilização dos recursos da cadeia de produção e minimiza a geração de resíduos possibilitando um crescimento sustentável da indústria brasileira de etanol e a inclusão dos combustíveis de 2ª geração na matriz energética mundial. Por outro lado, o presente estudo contribui também com a etapa de prospecção das alternativas tecnológicas disponíveis para a produção do etanol celulósico, fornecendo informações técnicas que poderiam ser usadas como ferramentas decisórias em futuras avaliações estratégicas da sustentabilidade da cadeia produtiva em questão.

## PROPOSTAS FUTURAS

---

Existe uma série de trabalhos de pesquisa que precisam ser implementados para a aplicação do bioprocesso de produção enzimática de celulases a partir do bagaço de cana, podendo se citar as seguintes como as próximas etapas e oportunidades de desenvolvimento:

- Acompanhamento do crescimento do fungo pela determinação da glicosamina para determinação da cinética de crescimento.
- Análise enzimática da protease nos extratos enzimáticos produzidos devido ao acréscimo de fontes protéicas no meio de fermentação.
- Otimização das condições para aplicação do extrato enzimático no bagaço de cana explodido e teste de outros pré-tratamentos.
- Seleção de um pós-processamento do extrato enzimático visando um melhor rendimento da hidrólise. Como proposta de estudo sugere-se também a caracterização e purificação do extrato para identificar a concentração e proporção de cada uma das enzimas sintetizadas.
- Análise da rentabilidade total e o impacto na tecnologia de produção do etanol de 2<sup>a</sup> geração por hidrólise enzimática.
- Projeção da geometria mais adequada para o reator de produção enzimática e definição das melhores condições operacionais para um rendimento ótimo.
- Em relação, às duas últimas etapas, recomenda-se a utilização de ferramentas de modelagem e simulação a serem executadas a partir de linhas de base geradas com dados do presente estudo.





## ANEXO 1.

### **Lista das principais empresas internacionais de etanol de 2a geração e endereços eletrônicos**

Abengoa Bioenergy Corporation – [www.abengoa.com](http://www.abengoa.com)

BP – [www.bp.com](http://www.bp.com)

Cargill – <http://www.cargill.com/>

Codexis, Inc – [www.codexis.com](http://www.codexis.com)

DuPont – <http://www.dupont.com/>

Dyadic International, Inc – [www.dyadic-group.com](http://www.dyadic-group.com)

Genencor International – [www.genencor.com](http://www.genencor.com)

Iogen Corporation – [www.iogen.ca](http://www.iogen.ca)

Lignol – <http://www.lignol.ca/>

Mascoma Corporation – [www.mascoma.com](http://www.mascoma.com).

NatureWorks, LLC – [www.natureworkslc.com](http://www.natureworkslc.com).

Nippon Oil Corporation - [www.eneos.co.jp/english/press/e71\\_enpr\\_090209.html](http://www.eneos.co.jp/english/press/e71_enpr_090209.html)

Novozymes – <http://www.novozymes.com/en>

Poet – [www.poetenergy.com](http://www.poetenergy.com)

Praj Industries, India - [www.praj.net](http://www.praj.net)

Sebak - <[www.sekab.com](http://www.sekab.com)>

SunOpta – <http://www.sunopta.com/>

Tate & Lyle – [www.tate-lyle.co.uk](http://www.tate-lyle.co.uk)

Verenium – <http://www.verenium.com/>

## **ANEXO 2.**

### **Composição do extrato de levedura e de peptona fornecida pelos fabricantes.**

#### **PEPTONA DE CARNE, (HIMEDIA, Brasil) 500 GRAMAS**

##### COMPOSIÇÃO:

- Nitrogênio Total: mínimo 11.5%
- Nitrogênio a-Amino: mínimo 3.0%
- Umidade: máximo 5.0%
- Cinzas: máximo 15.0%
- Cloreto de Sódio: máximo 6.0%
- pH (solução 1%):  $6.5 \pm 0.5$

#### **EXTRATO DE LEVEDURA EM PÓ, (HIMEDIA, Brasil)**

##### ESPECIFICAÇÕES:

Nitrogênio total: 11.5%

Nitrogênio  $\alpha$ -amino: 4%

Cinzas: 13.0%

Cloreto de sódio: 3.0%

Perda na secagem: 4.0 %

Triptofano: presente

Conteúdo de vitamina:

Tiamina (B1): 21 mcg/g

Riboflavina (B2): 50 mcg/g

Piridoxina (B6): 24 mcg/g

Niacina: 300 mcg/g

Ácido Pantotênico: 90 mcg/g

Ácido Fólico: 20 mcg/g

Biotina: 1 mcg/g

**ANEXO 3.****Tabela com Resultados de FES para formulação de meio em Triplicatas.**

| Exp | Variável Codificada |    |    |    | CMCase |       |       | Xilanase |        |        | Fpase |       |       |
|-----|---------------------|----|----|----|--------|-------|-------|----------|--------|--------|-------|-------|-------|
|     | X1                  | X2 | X3 | X4 | FSS1   | FSS2  | FSS3  | FSS1     | FSS2   | FSS3   | FSS1  | FSS2  | FSS3  |
| 1   | -1                  | -1 | -1 | -1 | 11,18  | 8,38  | 13,79 | 69,23    | 104,85 | 51,53  | 0,285 | 0,243 | 0,267 |
| 2   | 1                   | -1 | -1 | -1 | 8,19   | 7,72  | 13,11 | 56,13    | 97,46  | 51,43  | 0,248 | 0,238 | 0,264 |
| 3   | -1                  | 1  | -1 | -1 | 8,03   | 12,55 | 11,89 | 87,31    | 106,33 | 63,77  | 0,307 | 0,270 | 0,349 |
| 4   | 1                   | 1  | -1 | -1 | 7,08   | 9,09  | 6,60  | 84,67    | 98,62  | 58,06  | 0,280 | 0,238 | 0,346 |
| 5   | -1                  | -1 | 1  | -1 | 10,70  | 16,07 | 8,93  | 81,28    | 98,83  | 142,48 | 0,254 | 0,280 | 0,227 |
| 6   | 1                   | -1 | 1  | -1 | 7,56   | 13,56 | 6,71  | 73,46    | 90,48  | 133,08 | 0,111 | 0,275 | 0,230 |
| 7   | -1                  | 1  | 1  | -1 | 10,78  | 15,41 | 19,77 | 89,11    | 104,33 | 92,53  | 0,296 | 0,301 | 0,069 |
| 8   | 1                   | 1  | 1  | -1 | 7,37   | 15,22 | 17,97 | 82,87    | 98,51  | 60,46  | 0,285 | 0,259 | 0,061 |
| 9   | -1                  | -1 | -1 | 1  | 11,18  | 14,32 | 4,86  | 73,46    | 116,80 | 60,83  | 0,317 | 0,333 | 0,320 |
| 10  | 1                   | -1 | -1 | 1  | 9,17   | 11,44 | 5,07  | 63,84    | 105,49 | 49,77  | 0,238 | 0,296 | 0,402 |
| 11  | -1                  | 1  | -1 | 1  | 12,79  | 19,92 | 8,72  | 122,51   | 129,27 | 68,20  | 0,312 | 0,322 | 0,386 |
| 12  | 1                   | 1  | -1 | 1  | 10,97  | 17,86 | 1,96  | 112,99   | 126,21 | 68,75  | 0,307 | 0,307 | 0,145 |
| 13  | -1                  | -1 | 1  | 1  | 11,57  | 14,43 | 7,66  | 106,23   | 151,26 | 86,26  | 0,333 | 0,381 | 0,180 |
| 14  | 1                   | -1 | 1  | 1  | 9,28   | 12,53 | 6,66  | 104,11   | 132,97 | 87,55  | 0,248 | 0,317 | 0,124 |
| 15  | -1                  | 1  | 1  | 1  | 18,58  | 16,52 | 13,27 | 119,86   | 149,35 | 134,92 | 0,338 | 0,328 | 0,159 |
| 16  | 1                   | 1  | 1  | 1  | 13,05  | 15,67 | 12,10 | 108,13   | 121,98 | 114,28 | 0,312 | 0,317 | 0,153 |
| 17  | 0                   | 0  | 0  | 0  | 8,03   | 16,28 | 12,79 | 105,70   | 114,79 | 66,23  | 0,280 | 0,301 | 0,196 |
| 18  | 0                   | 0  | 0  | 0  | 9,67   | 15,72 | 11,68 | 104,64   | 112,25 | 66,97  | 0,270 | 0,328 | 0,174 |
| 19  | 0                   | 0  | 0  | 0  | 9,72   | 16,75 | 11,31 | 107,92   | 112,89 | 68,20  | 0,275 | 0,312 | 0,185 |

## ANEXO 4.

**Matriz do DCCR do Capítulo 5 com atividades enzimáticas (FPase, CMCCase e xilanase) preditas pelos modelos codificados e os desvios padrão e desvios relativos.**

| Ensaio | X <sub>1</sub> <sup>a</sup> | X <sub>2</sub> <sup>b</sup> | FPase predita <sup>c</sup> | Desvio Relat (%) <sup>d</sup> | CMCase predita <sup>c</sup> | Desvio Relat (%) <sup>d</sup> | Xilanase predita <sup>c</sup> | Desvio Relat (%) <sup>d</sup> |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1      | -1 (20)                     | -1 (50)                     | 0,5                        | -134,44                       | 15,32                       | -11,16                        | 117,07                        | -12,84                        |
| 2      | -1(20)                      | +1 (70)                     | 0,68                       | -4,62                         | 19,44                       | -3,97                         | 128,45                        | 3,07                          |
| 3      | +1 (40)                     | -1 (50)                     | 0,5                        | -2,57                         | 15,32                       | -17,30                        | 117,07                        | 4,45                          |
| 4      | +1 (40)                     | +1 (70)                     | 0,68                       | -4,62                         | 19,44                       | -5,93                         | 128,45                        | -3,26                         |
| 5      | 0 (30)                      | -1,41(45)                   | 0,62                       | 23,12                         | 13,80                       | 5,92                          | 127,75                        | 3,58                          |
| 6      | 0 (30)                      | +1,41(75)                   | 0,88                       | 1,84                          | 19,62                       | -2,67                         | 143,85                        | -0,57                         |
| 7      | -1,41(15)                   | 0 (60)                      | 0,43                       | -5,85                         | 18,05                       | -4,86                         | 109,72                        | 6,61                          |
| 8      | +1,41(45)                   | 0 (60)                      | 0,43                       | 4,44                          | 18,05                       | 6,21                          | 109,72                        | -13,73                        |
| 9      | 0 (30)                      | 0 (60)                      | 0,43                       | 14,64                         | 21,77                       | -14,63                        | 109,72                        | 1,28                          |
| 10     | 0 (30)                      | 0 (60)                      | 0,43                       | 11,79                         | 21,77                       | 6,64                          | 109,72                        | 4,22                          |
| 11     | 0 (30)                      | 0 (60)                      | 0,43                       | 13,24                         | 21,77                       | -2,91                         | 109,72                        | 2,78                          |

<sup>a</sup> vazão do ar (mL min<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> umidade inicial do substrato (%); <sup>c</sup> Atividade enzimática UI g<sup>-1</sup> preditos pelos modelos obtido das análises estatísticas. <sup>d</sup> Desvio Relativo (%)= (resposta experimental - resposta prevista pelo modelo/ resposta experimental)\*100.