

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Fernanda Marisa da Cunha

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO NÃO-CONVENCIONAL PARA  
PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* EM  
BIORREATOR PNEUMÁTICO NA PRESENÇA DE BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR**

São Carlos/SP - Julho de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO NÃO-CONVENCIONAL PARA  
PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* EM  
BIORREATOR PNEUMÁTICO NA PRESENÇA DE BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR**

**Fernanda Marisa da Cunha**

Aluna de pós-graduação

**Alberto Colli Badino Jr**

Orientador PPG-EQ/UFSCAR

**Cristiane Sanchez Farinas**

Co-orientadora EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO

Dissertação de Mestrado  
apresentada como parte dos  
requisitos necessários para a  
obtenção do título de **Mestre em  
Engenharia Química**, área de  
concentração em **Pesquisa e  
Desenvolvimento de Processos  
Químicos**.

São Carlos/SP – Julho de 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C972dp

Cunha, Fernanda Marisa da.

Desenvolvimento de processo não-convencional para produção de celulasas por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar / Fernanda Marisa da Cunha. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 101 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Engenharia bioquímica. 2. Enzimas. 3. Fermentação. 4. Bagaço de cana. 5. Biorreatores pneumáticos. I. Título.

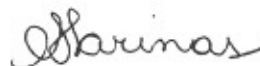
CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
FERNANDA MARISA DA CUNHA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 29 DE JULHO DE 2011.

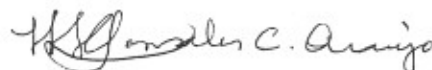
BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Junior  
Orientador, UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas  
Co-Orientadora, EMBRAPA



Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo  
UNESP



Teresa Cristina Zangiolami  
UFSCar



Rosineide Gomes da Silva  
UFSCar

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Edson e Silvana*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais por todo o amor e companheirismo em todos estes anos;

Aos tios Rê, Má e Dé por todo apoio, sem vocês eu não teria conseguido;

Aos meus orientadores Dr. Alberto Colli Badino Jr e Dra. Cristiane Sanchez Farinas por terem me orientado efetivamente, me ensinando e acompanhando todo este período de minha formação;

À professora Dra. Tereza Cristina Zangirolami, pelo convite e colaboração no desenvolvimento do projeto;

Aos colegas de laboratório que me auxiliaram nos cultivos, tanto do Laboratório de Fermentação (DEQ-UFSCar) quanto do Laboratório de Agroenergia (Embrapa Instrumentação);

Aos alunos de iniciação científica Ana Laura e Mateus cujas colaborações foram essenciais no desenvolvimento deste projeto;

Aos técnicos de laboratórios e funcionários da Embrapa Instrumentação e do DEQ, Joana, Silviane, Renê, Amadeus e Tiago pelos ensinamentos, dicas e ajuda nas diferentes etapas da realização deste projeto;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado;

À FAPESP e ao programa BIOEN pelo apoio financeiro;

Ao PPG-EQ e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro;

À EMBRAPA pelo apoio institucional e infraestrutura ao projeto;

Às amigas Camila e Úrsula, por Tudo;

Ao Rodrigo Rafael Mendonça dos Santos, pelas alegrias ao longo de todo o caminho.

## RESUMO

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar se destaca como sendo uma fonte de material lignocelulósico abundante e disponível nas usinas sucroalcooleiras, além de possuir características estruturais que o classificam como bom indutor para produção de celulases por microrganismos. Sendo o bagaço de cana um material promissor tanto como indutor das celulases quanto como substrato na cadeia de produção do etanol de 2<sup>a</sup> geração, o desenvolvimento de processos de fermentação inovadores para a produção de celulases em escala industrial é necessário a fim de viabilizar a hidrólise enzimática deste material. Para esta finalidade, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo não-convencional para produção de celulases utilizando uma cepa de *Aspergillus niger*. O processo consistiu na proposta de utilização do bagaço de cana como substrato para a produção de um inóculo com etapa inicial em fermentação no estado sólido (FES), além de sua utilização como indutor para a síntese de celulases por fermentação submersa (FS) na presença de sólidos, operando-se sistemas trifásicos. Para tal, avaliou-se em cultivos em frascos agitados o efeito da fonte de carbono utilizada, glicose (10 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup>) e lactose (10 g.L<sup>-1</sup>), e o tipo de preparo de inóculo (convencional ou inóculo com etapa inicial em FES). A maior produção de endoglucanase (CMCase) obtida em frascos agitados foi de 1052±34 U.L<sup>-1</sup>, obtida após 72 h nos cultivos preparados com o inóculo com fase inicial no estado sólido e em meios suplementados com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Tais resultados foram validados em biorreator pneumático de 5,0 L, em diferentes valores de pH (5,0 e 6,0). Os melhores resultados de produtividades obtidos foram de 57±13 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de endoglucanase, 327±17 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de xilanase e 10±1 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de celulases totais (FPase) em cultivos com pH 5,0 e inóculo não-convencional. Pode-se afirmar que a produção de celulases na presença de bagaço de cana de alta granulometria (1 a 2 mm) em biorreator pneumático do tipo coluna de bolhas é uma alternativa viável e promissora e que o inóculo não-convencional proposto como objeto de estudo, com etapa inicial em FES, foi superior ao inóculo convencional, uma vez que quando aplicado em sistemas fermentativos resultou na obtenção de produtividade enzimática de endoglucanase cerca de 3 vezes superior. Pode-se afirmar ainda que valores de pH que favoreçam a síntese de celulases em vez de proteases podem resultar em ganhos significativos de produtividade volumétrica.

## ABSTRACT

In Brazil, sugarcane bagasse stands out as an abundant and available source of lignocellulosic material in sugar mills. It has structural features that make it a possible inducer for cellulase production by microorganisms. Since sugarcane bagasse is a promising material both as an inducer of cellulases and as a feedstock for second generation ethanol, the development of innovative fermentation processes for the production of cellulases in industrial scale is necessary in order to increase the viability of the enzymatic hydrolysis of this material. In this way, the purpose of this study was the development of an unconventional process for cellulase production using an *Aspergillus niger* strain. The process has the purpose of sugarcane bagasse utilisation as substrate for the production of an inoculum with first step of preparation in solid-state fermentation (SSF), besides its use as an inducer for the synthesis of cellulases by submerged fermentation (SF) in the presence of solids, operating in triphasic systems. With this aim, the effect of carbon source used, glucose (10 g.L<sup>-1</sup> and 20 g.L<sup>-1</sup>) and lactose (10 g.L<sup>-1</sup>) and the type of inoculum preparation (conventional or inoculum first step in SSF) were evaluated in shaken flask cultures. The best production of endoglucanase (CMCase) obtained in shaken flasks was 1052 ± 34 IU L<sup>-1</sup>, after 72 h in cultures and prepared with the inoculum with solid state fermentation as first step with solid medium supplemented with 10 g.L<sup>-1</sup> of glucose. These results were validated in a pneumatic bioreactor of 5.0 L at different pH values (5.0 and 6.0). The best results obtained in terms of volumetric productivity were 57±13 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of endoglucanase, 327±17 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of xylanase and 10±1 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> of filter paper activity (Fpase) in cultures with pH 5.0 and unconventional inoculum. It can be stated that the production of cellulases in the presence of sugarcane bagasse with large particle size (1 to 2 mm) is a viable and promising alternative. The unconventional inoculum proposed as the object of study, with first step in SSF, was superior to conventional inoculum, since when applied to fermentation systems resulted in 3-fold superior enzymatic productivity of CMCase. It can be stated either that studies with pH values that favor cellulases synthesis instead of proteases can increase significantly the volumetric productivity.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	OBJETIVOS .....	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
3.1.	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	6
3.2.	ENZIMAS CELULÁSICAS .....	10
3.2.1.	Principais características das celulasas.....	11
3.2.2.	Tipos de celulasas e forma de atuação .....	13
3.3	ENZIMAS ACESSÓRIAS: XILANASES .....	15
3.4	PROTEASES .....	15
3.5.	MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS .....	17
3.5.1.	Fungos filamentosos.....	17
3.5.2.	<i>Aspergillus niger</i> .....	19
3.6.	CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE CELULASES .....	21
3.6.1.	Meio de cultivo .....	21
3.6.2.	Influência da fonte de carbono e de indução .....	23
3.6.3.	pH e Temperatura.....	26
3.6.4.	Produção do inóculo .....	27
3.7.	TIPOS DE PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES .....	29
3.7.1.	Fermentação no estado sólido.....	31
3.7.2.	Fermentação submersa .....	34
3.7.3.	Sistemas trifásicos .....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	46
4.1.	MATERIAL .....	46
4.1.1.	Substrato .....	46
4.1.2.	Microrganismo .....	46
4.1.3.	Meios de cultivo .....	46
4.1.4.	Biorreator .....	48
4.2.	MÉTODOS .....	48
4.2.1.	Procedimento experimental .....	48
4.2.2.	Ativação da linhagem e preparo do inóculo .....	49
4.2.3.	Preparo do inóculo convencional.....	50
4.2.4.	Preparo do inóculo não-convencional, com fase inicial em FES .....	52

4.2.5.	Preparação das amostras.....	54
4.3.	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	54
4.3.1.	Concentração de glicose.....	54
4.3.2	Atividade de CMCase.....	54
4.3.3	Atividade de Xilanase.....	55
4.3.4	Atividade de FPase.....	55
4.3.5	Atividade de Proteases.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5.1	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE CELULASES POR <i>A. niger</i> NA PRESENÇA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	57
5.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PREPARO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE CELULASES POR <i>A. niger</i> NA PRESENÇA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	60
5.3	ADAPTAÇÃO DE BIORRETORES PNEUMÁTICOS DE 5,0 L PARA CULTIVOS NA PRESENÇA DE SÓLIDOS.....	66
5.4	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PREPARAÇÃO DO INÓCULO EM BIORRETORES PNEUMÁTICOS – VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS.....	67
5.4.1	Produção de celulases em biorreator coluna de bolhas em pH 6,0 com inóculo não-convencional.....	67
5.4.2	Produção de celulases em biorreator coluna de bolhas em pH 5,0 com inóculos convencional e não-convencional.....	71
5.5	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TERMOS DE PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA (U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ).....	80
	CONCLUSÕES.....	85
	SUGESTÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias que viabilizem economicamente a produção do etanol de 2ª geração é uma prioridade não somente dos centros de pesquisa e universidades, como também de muitas empresas privadas e governos (CARDONA E SANCHEZ, 2007). No que diz respeito à rota enzimática de hidrólise do material lignocelulósico, muitos progressos vem sendo alcançados em muitas frentes, como no isolamento e mutação de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas, na purificação e caracterização dos extratos enzimáticos, no melhoramento genético de espécies de microrganismos, entre outros (CASTRO E PEREIRA JR, 2010).

Atualmente, a produção das celulasas e xilanasas ocorre através de processos fermentativos que diferem entre si devido a uma série de fatores, tais como escolha do substrato indutor do processo fermentativo, tipo de microrganismo celulolítico utilizado e condições de projeto e operacionais de cada estudo, fazendo com que existam muitas abordagens possíveis a fim de se desenvolver processos mais eficientes e de menores custos.

Uma abordagem para a redução de custos no processo de produção do etanol de 2ª geração é a utilização de materiais lignocelulósicos como substrato para a produção das enzimas e, portanto, o interesse nas fibras lignocelulósicas é crescente e alvo de muitos estudos. Estas fibras podem ocorrer de forma espontânea na natureza, podem ser originadas de cultivares ou até mesmo serem rejeitos de outras atividades agroindustriais, como o bagaço de cana, por exemplo (SILVA e colaboradores, 2009).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, segundo o Jornal Cana, foram processadas na safra 2010/2011 620 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Estes dados evidenciam a disponibilidade do bagaço de cana-de-açúcar como material lignocelulósico abundante nas usinas sucroalcooleiras. Além disso, o bagaço possui características estruturais que o classificam como bom indutor para produção de celulasas por microrganismos, como altos teores de celulose e hemicelulose.

O volume de cana-de-açúcar produzida, segundo estudos da Única, continuará crescendo para suprir a demanda do etanol combustível, mas a área de plantio deve se estabilizar após 2020. Isto se deverá a avanços tecnológicos como novas variedades de cana, maior ganho em produtividade e a chegada do etanol de 2ª geração, prevista para meados de 2015.

No processo de produção do etanol de 2ª geração, a sacarificação da biomassa pode ser realizada através do método da hidrólise química ou da hidrólise enzimática. Por ocorrer em condições mais amenas e não gerar resíduos tóxicos, a rota enzimática apresenta potencial no que se refere a melhor custo e eficiência (SUKUMARAN e colaboradores, 2009). No entanto, esta rota requer a utilização de coquetéis enzimáticos altamente específicos para a sacarificação da biomassa e o alto custo de produção das celulasas somado a uma baixa atividade enzimática limita seu uso industrial (KOCHER e colaboradores, 2008).

No que se refere aos agentes fermentativos produtores de celulasas, sistemas celulolíticos completos são produzidos por vários microrganismos, como bactérias e fungos. A produção de celulasas por fungos é amplamente disseminada na natureza, incluindo uma grande variedade de espécies, tais como *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Vários trabalhos têm sido direcionados para a seleção ou desenvolvimento de microrganismos produtores de celulasas, incluindo programas baseados em seleção natural e mutagênese e também a produção de microrganismos geneticamente modificados (DILLON e colaboradores, 2006).

As tecnologias existentes para a produção de enzimas por microrganismos utilizam processos fermentativos que podem ser conduzidos tanto no estado líquido, chamado de fermentação submersa (FS), como também no estado sólido (FES) (CHINN e colaboradores, 2006), cada processo com suas vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação de interesse.

A FES se destaca frente à tecnologia submersa convencional por oferecer uma série de vantagens que a tornam uma tecnologia promissora para a produção de enzimas, sobretudo por possibilitar a utilização de substratos

mais baratos, como resíduos agroindustriais, o que favorece a economia do processo de produção das celulasas (DHARMAGADDA e colaboradores, 2010).

Sabe-se que em FES os fungos filamentosos crescem através do desenvolvimento de características fisiológicas específicas, que permitem sua adesão ao substrato sólido e facilitam a interação célula-indutor. No entanto, não há ainda relatos de estudos que tenham buscado aliar as vantagens dos cultivos em estado sólido e no estado submerso em um mesmo processo de produção enzimática pois, atualmente, as pesquisas para a produção de celulasas são conduzidas totalmente no estado sólido ou totalmente no estado submerso.

Em cultivos no estado submerso, há estudos que avaliam a adição de substratos indutores, tanto comerciais quanto materiais lignocelulósicos, tanto no meio de cultivo quanto já na produção do inóculo, a fim de se estimular a adaptação do microrganismo a este substrato (WASE e colaboradores, 1985; SIEDENBERG e colaboradores, 1997; MAEDA e colaboradores, 2009; RITTER e colaboradores, 2010).

Em sistemas submersos, diversos tipos de fermentadores tem sido empregados ao longo dos anos visando a produção de enzimas, sobretudo os biorreatores tipo tanque agitado e aerado, que vem sendo amplamente estudados. Recentemente, porém, o interesse em biorreatores não-convencionais do tipo pneumático vem crescendo, uma vez que estes possuem características que os tornam mais vantajosos, como a ausência de partes mecânicas móveis e baixo consumo de energia em relação aos biorreatores tipo tanque agitado e aerado (CERRI e colaboradores, 2008). No entanto, o uso desses reatores na produção de celulasas é ainda restrito.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista a necessidade do aumento de eficiência dos processos para a produção de celulases, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo não-convencional para a produção de celulases utilizando como substrato indutor o bagaço de cana e como microrganismo celulolítico uma cepa do fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

A abordagem foi estudar a aplicação do resíduo agroindustrial bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como substrato indutor da expressão enzimática desde a etapa de produção do inóculo, através de um processo de fermentação inovador, utilizando biorreatores pneumáticos.

A principal questão técnico-científica deste trabalho foi relacionada à viabilidade de se obter um processo eficiente para a produção das enzimas celulases em um processo de fermentação combinada, operando biorreatores pneumáticos em um sistema trifásico, visando contribuir para a viabilidade econômica da aplicação da rota enzimática na produção de etanol celulósico.

Uma vez que não existem relatos na literatura de um processo de fermentação combinada, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia de preparação de um inóculo que permitisse a transição da FES para a FS e a realização de cultivos que avaliassem o desempenho destes sistemas em comparação aos sistemas submersos convencionais.

A fim de atingir o objetivo geral do presente trabalho, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- i. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de celulases por *A. niger* na presença de bagaço de cana;
- ii. Avaliação da influência do preparo de inóculo na produção de celulases por *A. niger* na presença de bagaço de cana;
- iii. Adaptação de biorreatores pneumáticos para bioprocessos na presença de sólidos;

- iv. Validação dos resultados obtidos em frascos agitados de escala de 100 mL em biorreatores pneumáticos de 5,0 L de volume útil;
- v. Avaliação da influência do pH na produção de celulases por *A. niger* em biorreatores pneumáticos.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS**

Uma vez que a agroindústria gera inúmeras fontes de biomassa que não são satisfatoriamente e/ou adequadamente aproveitadas, transformando-as em rejeitos industriais, estes materiais têm sido vistos como matérias-primas promissoras em toda cadeia de produção de etanol celulósico. Os materiais lignocelulósicos podem ser utilizados não somente na etapa de hidrólise, como fonte de celulose para obtenção de glicose, como também na etapa de produção das enzimas, como substrato indutor para a produção de celulasas por microrganismos.

A substituição da celulose pura comumente utilizada como substrato indutor da síntese enzimática por substratos relativamente mais baratos como materiais lignocelulósicos tem se mostrado uma abordagem efetiva para a redução do custo de produção das celulasas (MUTHUKRISHNAN, 2007).

O setor de produção de biocombustíveis, como etanol e biodiesel está entre os segmentos da agroindústria que mais geram biomassa como rejeito (FAO, 2009). Para cada tonelada de cana-de-açúcar moída são gerados cerca de 270 a 280 kg de bagaço (SOCCOL e colaboradores, 2010), o que o projeta como um resíduo agroindustrial com potencial de uso como substrato para a produção enzimática, assim como o farelo de trigo, farelo de soja, casca de arroz e bagaço de laranja (Figura 3.1), sendo que cada um deles se destaca pela sua abundância em determinadas regiões e pelo baixo custo (FARINAS e colaboradores, 2008).





**Figura 3.1** Resíduos agroindustriais utilizados como substratos/indutores em sistemas fermentativos

Atualmente têm sido realizados vários estudos a fim de selecionar substratos lignocelulósicos indutores para a produção de celulases e avaliar as melhores condições de cultivo (ACHARYA e colaboradores (2008), CASTRO e colaboradores (2010b); SALES e colaboradores (2010), entre outros).

Sridevi e colaboradores (2009) estudaram a produção de celulases por *A. niger* em cultivos submersos em meio Czapek-Dox utilizando como indutores 0,5% (m/v) de substratos lignocelulósicos como palha de arroz, farelo de trigo, bagaço de cana e serragem. Após 7 dias de cultivo, foram obtidas com bagaço de cana *in natura* atividades enzimáticas de 2,0 U.mL<sup>-1</sup> de FPase, 2,5 U.mL<sup>-1</sup> de CMCase e 0,71 U.mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glicosidase. Tais resultados de FPase e CMCase foram superiores aos obtidos em cultivo controle com 0,5% (m/v) de celulose em vez de lignocelulose (1,5 U.mL<sup>-1</sup> e 0,7 U.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). O estudo mostrou que os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como indutores e têm potencial para aplicações industriais.

## Estrutura dos materiais lignocelulósicos

A parede celular das plantas tem sua estrutura representada pelas interações físico-químicas da celulose, hemicelulose e lignina (Figura 3.2). O teor de cada uma destas frações nos materiais lignocelulósicos e a interação entre cada uma delas na estrutura dos materiais é que determinam a recalcitrância e a resistência dos mesmos a ataques químicos e físicos (MOSIER e colaboradores, 2004).

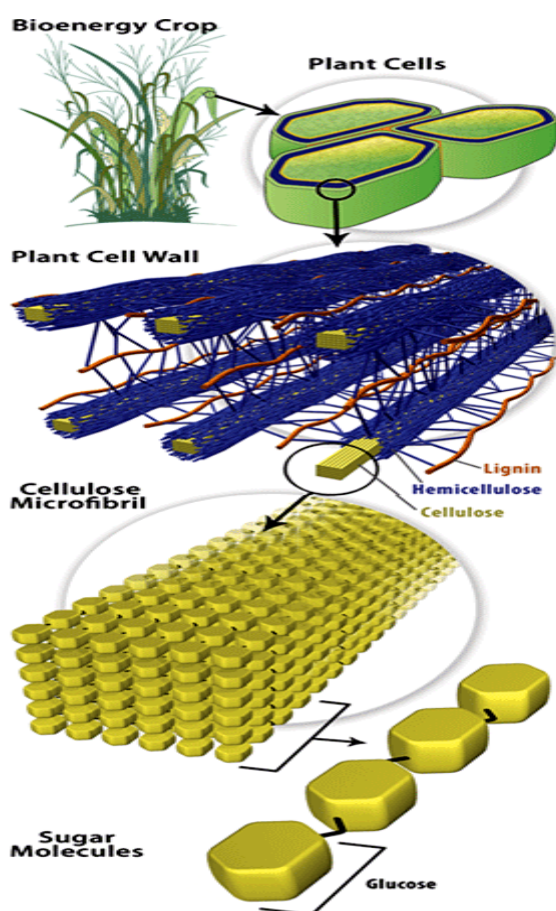


Figura 3.2 Estrutura do material lignocelulósico (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2011)

A celulose, o principal componente da parede celular, é o polímero de alto peso molecular formado por suas cadeias constituídas por

unidades de anidroglicose, unidas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Devido ao grande número de ligações de hidrogênio, estas cadeias se compactam na parede celular, resultando em regiões altamente ordenadas, denominadas regiões cristalinas (MARABEZI, 2009). Durante a síntese da celulose, estas regiões mais ordenadas, se alternam com regiões menos ordenadas - ou amorfas - conferindo diferentes graus de cristalinidade e reatividade à fibra da celulose (KLEMM e colaboradores, 2005; ROCHA, 2010).

A lignina, também um dos principais componentes da parede celular, é um polímero aromático heterogêneo, formado por ligações éter biologicamente estáveis (CASTRO e PEREIRA JR, 2010). Seu papel na parede celular é referente à realização do transporte de água, nutrientes e metabólitos e sua recalcitrância é responsável pela resistência dos tecidos a ataques microbianos e pela resistência mecânica dos vegetais (FENGEL E WEGENER, 1984; MARABEZI 2009).

As hemiceluloses são heteropolímeros de xilose, manose, galactose, arabinose, glicose e vários tipos de ácidos urônicos e, dependendo do tipo de açúcar que predomina, as hemiceluloses são chamadas de xilanas, mananas ou galactanas (ANDREAU e colaboradores, 2008 citado por GOTTSCHALK e colaboradores, 2010). Nas paredes das plantas, a xilana é o polissacarídeo mais comum, consistindo de resíduos de xilose unidos por ligações beta-1,4-glicosídicas (ALVES PRADO e colaboradores, 2010).

Uma vez que a hemicelulose é a fração responsável pela ponte entre a celulose e a lignina, sua remoção promove a acessibilidade das enzimas à celulose e a melhoria de toda degradação de lignocelulose (SINGH, 2009). Além disso, a conversão microbiana da hemicelulose é essencial para o aumento dos rendimentos no etanol combustível a partir de materiais lignocelulósicos (GÍRIO e colaboradores, 2010).

### **Bagaço de cana**

O bagaço industrial é um material bastante heterogêneo, composto fisicamente por aproximadamente 50% de umidade, 45% de

estruturas fibrilares e 5% de extrativos e componentes inorgânicos (ICIDCA, 1990 citado por MARABEZI, 2009).

Quimicamente, o bagaço de cana apresenta pequenas diferenças em sua composição de acordo com a variedade de cana utilizada e da região em que a mesma é plantada. Como todo material lignocelulósico, o bagaço apresenta como principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina, presentes aproximadamente nas proporções de 32-44%, 27-32% e 19-24%, respectivamente, além de 4,5-9,0% de cinzas e o restante de minerais, gorduras e outros componentes (SOCCOL e colaboradores, 2010).

### **3.2. ENZIMAS CELULÁSICAS**

As enzimas celulásicas possuem massas moleculares relativamente elevadas e em geral se apresentam na forma glicosilada, com um teor de carboidratos que pode variar de entre 1 a 50% da massa total da enzima (SHEPERD e colaboradores, 1981; COUGHLAN e MCHALE, 1988; MIETTINEN-OINONEN, 2004).

As diversas aplicações das celulases estão na indústria de madeira, na preparação de tecidos industriais e no processo de produção de papel. Além disso, as celulases são indispensáveis na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (MUTHUKRISHNAN, 2007).

O maior obstáculo para a utilização das celulases em processos industriais está relacionado ao seu alto custo de produção. Isto inclui uma série de fatores que influenciam negativamente a produção econômica das celulases como, por exemplo, o tipo e fonte da celulose empregada para sua produção, a complexidade da estrutura da celulose e também baixas quantidades de celulases produzidas por microrganismos celulolíticos devido à repressão catabólica (SRIDEVI e colaboradores, 2009).

### 3.2.1. Principais características das celulases

A maioria das celulases estudadas apresenta dentre suas principais características físicas e químicas similaridades no pH, solubilidade e composição aminoácida. As preparações celulásicas são efetivas em pH entre 3 e 7, estando o pH ótimo geralmente em torno de 4 e 5. Em relação à temperatura, a faixa ótima se encontra entre 40 e 50°C. No entanto, a estabilidade térmica pode variar de um extrato enzimático para outro, também como a especificidade aos substratos (MUTHUKRISHNAN, 2007).

A heterogeneidade do substrato causa variações na taxa de hidrólise enzimática de acordo com a região de ataque da enzima ao substrato, pois a reação depende do contato enzima-substrato e da interação entre as reações enzima-substrato no decorrer das etapas intermediárias da hidrólise, as quais já vão liberando intermediários antes do produto final. De um modo geral, inicialmente a região amorfa é atacada e depois a região cristalina, cuja etapa é mais lenta (ANDRIĆ e colaboradores, 2010).

Devido ao fato de que o complexo celulásico é composto por diferentes classes de celulases e, sendo as celulases enzimas altamente específicas, diferentes coquetéis enzimáticos apresentam diferentes proporções entre cada enzima em sua composição, conferindo maior ou menor especificidade a cada substrato, resultando assim em desempenhos distintos de hidrólise. Andrade e colaboradores (2009) realizaram um estudo comparativo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando diferentes coquetéis enzimáticos. Ficou demonstrado neste estudo que a atividade declarada de uma enzima não deve ser utilizada como único parâmetro de seleção do catalisador. Isto se deve ao fato de um coquetel com atividade 147,5 vezes maior que outro coquetel estudado apresentar resultados inferiores quando ambos foram aplicados na hidrólise de bagaço de cana, na mesma FPU.

Singh e colaboradores (2009) estudaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana explodido e celuloses comerciais por um coquetel enzimático

comercial (Accellerase 1000, da Genencor) e um coquetel enzimático produzido por *Penicillium*. Foi constatado que para a hidrólise do bagaço explodido e da celulose comercial tratada, ambos coquetéis apresentaram resultados aproximados; no entanto, na hidrólise da celulose microcristalina e da celulose não-tratada, o coquetel enzimático produzido pelo *Penicillium* mostrou-se muito superior.

Maeda e colaboradores (2011) estudaram a hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por coquetéis enzimáticos produzidos por *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma harzianum* e compararam seus desempenhos com o do coquetel enzimático comercial Multifect CX 10L (Genencor). As enzimas foram produzidas em cultivos utilizando Avicel e celulignina parcialmente deslignificada como fontes de carbono para o *T. harzianum* e *P. funiculosum*, respectivamente. O melhor desempenho de hidrólise foi obtido com preparado celulásico contendo iguais proporções em FPU do coquetel comercial e do coquetel produzido pelo *P. funiculosum*. Comparando-se os desempenhos isolados, o coquetel enzimático produzido por *P. funiculosum* mostrou maior desempenho na hidrólise da celulignina do bagaço de cana que o complexo comercial. Tais resultados mostram que a utilização do bagaço de cana como substrato indutor da produção das celulases direciona as características do coquetel enzimático para a hidrólise do mesmo.

Castro e colaboradores (2010a) compararam as propriedades e desempenho de hidrólise entre um coquetel celulásico produzido por *P. funiculosum* na presença de bagaço de cana pré-tratado como fonte de carbono e os coquetéis comerciais Celluclast (Novozymes), Spezyme CP e GC 220 (Genencor). O coquetel enzimático produzido pelo *P. funiculosum* apresentou proporção melhor balanceada entre  $\beta$ -glicosidade e endo- e exoglucanase, resultando em melhor desempenho na presença de material lignocelulósico do que quando comparado aos preparados comerciais.

### 3.2.2. Tipos de celulases e forma de atuação

O complexo celulásico consiste de três tipos de enzimas: endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EG ou CMCase), exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH ou Avicelase) e  $\beta$ -glicosidase (celobiase). Estas enzimas ocorrem em múltiplas formas em preparados enzimáticos e agem sinergicamente na sacarificação da celulose (OBEROI e colaboradores, 2008).

O mecanismo de sinergismo é comprovado na atuação das enzimas do complexo celulásico, pois quando estas agem conjuntamente apresentam melhor rendimento que a soma dos rendimentos individuais (CASTRO, 2006), como aparece na Figura 3.3:

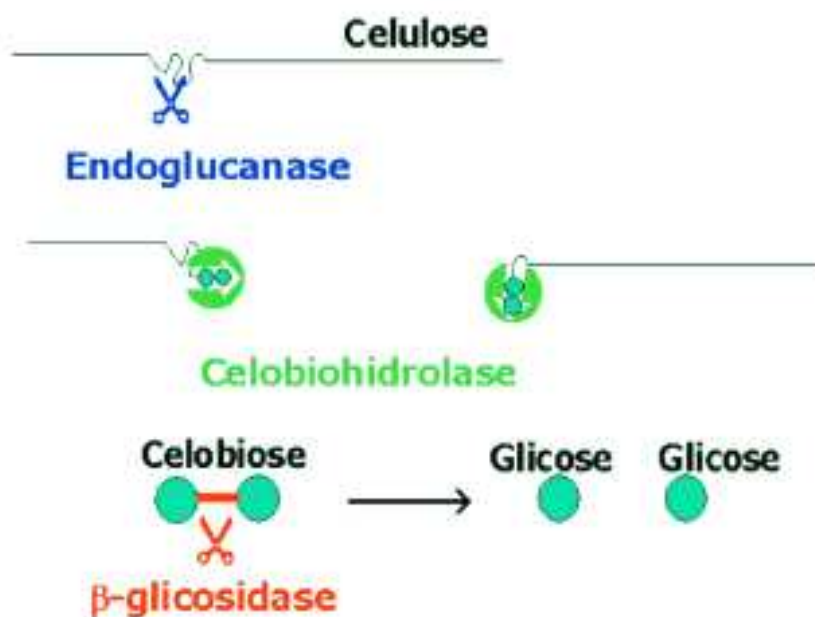


Figura 3.3 Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose (Ogeda e Petri, 2010).

### **Endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4, CMCase ou EG)**

A CMCase é responsável por iniciar a hidrólise, apresentando ação randômica e resultando em mudança rápida no grau de polimerização através da hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose (CASTRO e colaboradores, 2010b). Como se pode observar pela Figura 3.3, a endoglucanase atua na região amorfa da celulose, liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização e criando novos terminais livres, um redutor e um não-redutor.

### **Exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, Avicelase ou EC 3.2.1.74)**

A exoglucanase é ativa sobre a celulose cristalina. Na Figura 3.3 se observa a atuação desta enzima sobre os terminais redutores e não-redutores da cadeia da celulose. Como produto desta reação são liberadas unidades de celobiose e glicose e, portanto, estas enzimas são geralmente inibidas por seus produtos (ZHANG e colaboradores, 2006).

### **$\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.91 ou celobiase)**

A  $\beta$ -glicosidase hidrolisa ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose, como se observa na Figura 3.3 (ZHANG e colaboradores, 2006). A presença de  $\beta$ -glicosidade nos coquetéis enzimáticos é importante para evitar que o acúmulo de celobiose resulte em inibição das exo- e endo-glucanases (SINGHANIA e colaboradores, 2010).



### 3.3 ENZIMAS ACESSÓRIAS: XILANASES

Hemicelulases também são componentes essenciais em misturas enzimáticas aplicadas à hidrólise de carboidratos de materiais lignocelulósicos (BAILEY e POUTANEN, 1989). Estas enzimas desestruturam o entrelaçamento da hemicelulose no tecido vegetal através de hidrólise, facilitando o acesso das enzimas ao interior da fibra lignocelulósica.

A xilanase (1,4- $\beta$ -xilanahidrolase) e a xilosidase ( $\beta$ -d-xilohidrolase) são as principais constituintes do sistema enzimático xilanolítico microbiano. Elas têm sido extensivamente estudadas e empregadas em vários processos biotecnológicos, podendo ser produzidas tanto em fermentação no estado sólido quanto em fermentação submersa (HECK, 2005).

Diversos microrganismos são capazes de produzir xilanases, dentre eles estão espécies de fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários, crustáceos, insetos, etc., mas a principal fonte comercial são os fungos filamentosos (BAJPAI, 2009).

### 3.4 PROTEASES

As proteases são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise das proteínas através da quebra das ligações peptídicas. Por razões biotecnológicas, a facilidade de manipulação genética dos microrganismos faz com que as proteases microbianas sejam preferidas às proteases de origem animal e vegetal (RAO, 1998 citado por ROCHA, 2010).

*Aspergillus* ssp podem produzir uma grande variedade de proteases, as quais são predominantemente ácidas uma vez que a acidificação do meio de cultivo ocorre normalmente durante o cultivo (ROSE e van ZYL, 2008). As proteases produzidas por *A. niger* apresentam a temperatura ótima em torno de 45°C (LI e colaboradores, 2008). No entanto, o pH ótimo de

atuação das proteases varia de acordo com as condições empregadas em cada estudo.

As proteases produzidas em fermentações por um determinado microrganismo podem afetar a ação de outras enzimas, como as celulases, por exemplo, uma vez que as proteases podem causar a modificação e a degradação de muitas proteínas heterólogas (AHAMED e colaboradores, 2005).

O'Donnel e colaboradores (2001) estudaram a melhoria da produção de proteínas heterólogas por *A. niger* recombinante através da abordagem de controle do pH para controle da atividade de protease extracelular, sendo observada formação de proteases somente após o esgotamento da fonte de carbono.

Padrões similares foram encontrados por Li e colaboradores (2008) quando investigaram as proteases de *A. niger* geneticamente modificado em cultivos em batelada. As atividades de protease extracelular somente foram detectadas após a fonte de carbono ser completamente utilizada.

Ahamed e Vermette (2008) estudaram estratégias para a redução de protease em caldos de *A. niger* recombinante e sugeriram que, de modo geral, a atividade proteolítica está relacionada à lise celular, pois a maior atividade proteolítica foi observada somente após se observar a máxima concentração celular e seu declínio devido à lise celular.

Além do controle do pH como estratégia de diminuir a expressão de proteases, são também estudados métodos de imobilização celular e a adição de inibidores de proteases nos meios de cultivo (LI e colaboradores, 2008).

Li e colaboradores (2008) estudaram os efeitos de parâmetros de bioprocessos em proteases extracelulares produzidas em cultivos com uma espécie recombinante de *Aspergillus niger*. Os autores testaram amostras do caldo de cultivo em inibidores proteases PMSF, PEP A, E64 e EDTA (inibidores de serino-, aspártico-, cisteíno- e metalo-proteases, respectivamente), para que

fosse possível identificar quais proteases se encontravam presentes no cultivo e foi indicada a presença de todos estes tipos de proteases.

### **3.5. MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS**

Há uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (RUEGGER e TORNISIELO, 2004).

Estes microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, termofílicos ou mesofílicos, fungos ou bactérias. Enquanto as celulasas são produzidas constitutivamente por bactérias (JAYANT e colaboradores, 2011), o nível de transcrição das celulasas por fungos ocorre geralmente em três diferentes estados: pequenas quantidades de expressão constitutiva, secreção expressiva de celulasas induzida pela presença de indutores e, por último, repressão catabólica (SUTO e TOMITA, 2001).

Devido ao fato de culturas de fungos apresentarem alta produção de diversas enzimas e pela facilidade de crescimento em ambientes aeróbios, inclusive em substratos lignocelulósicos, a maioria das pesquisas voltadas para a produção comercial de celulasas é focada em culturas destes microrganismos (SUN e CHENG, 2002).

#### **3.5.1. Fungos filamentosos**

Enzimas hidrolíticas como celulasas, xilanases e pectinases são produzidas por culturas de fungos desde que as enzimas em questão sejam utilizadas por estes fungos na natureza para seu crescimento. Em geral, os

fungos que decompõem substâncias lignocelulolósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutriente (PANDEY, 1999).

Fungos são organismos heterotróficos (decompositores de matéria orgânica ou parasitas) que crescem rapidamente e formam filamentos celulares microscópicos denominados hifas, cujo conjunto constitui uma espécie de tecido próprio dos fungos, o micélio, responsável por todas as funções vegetativas do organismo. No caso dos fungos lignolíticos, o micélio secreta enzimas especiais que atuam sobre as substâncias, ocorrendo liquefação (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; FASANELLA, 2009).

Desde 1976 uma coleção expressiva de mais de 14.000 fungos que degradam a celulose e outras fibras insolúveis está sendo formada (MANDELS E STERNBERG, 1976; HOWARD e colaboradores, 2003). A seleção de uma linhagem adequada para um determinado propósito depende de uma série de fatores, em particular da natureza do substrato e das condições ambientais.

Os fungos da espécie *Trichoderma* e seus mutantes vêm sendo os mais estudados e empregados na produção comercial de hemicelulases e celulasas, principalmente por ter sido um dos primeiros fungos isolados na década de 1950 e por produzir altas concentrações do complexo enzimático hidrolítico (HOWARD e colaboradores, 2003). No entanto, a quantidade de  $\beta$ -glicosidase contida no complexo é relativamente baixa e insuficiente para a completa sacarificação prática da celulose, acarretando em inibição enzimática pela presença de celobiose, uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação (GARCÍA-KIRCHNER e colaboradores, 2005).

As espécies de *Aspergillus*, por outro lado, são reconhecidas por serem boas produtoras de  $\beta$ -glicosidase, sendo o *Aspergillus niger* o mais eficiente produtor (GARCÍA-KIRCHNER e colaboradores, 2005). Sua utilização, portanto, tem sido apontada como alternativa para superar esta desvantagem do *Trichoderma*, podendo ser avaliada em cultivos no estado sólido quanto em sistemas submersos, com culturas simples ou também em co-culturas, buscando-se aumento nas produtividades enzimáticas por sinergismo entre

espécies (GUTIERREZ-CORREA e TENGEDY,1997; HU e colaboradores, 2010).

### 3.5.2. *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* (Figura 3.4) é um grupo de fungos filamentosos que teve sua primeira classificação em 1926. Alguns dos 14 grupos distintos de *Aspergillus* são patogênicos, como o *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. parasiticus*. Porém, as aplicações industriais mais importantes são do grupo dos *Aspergillus* pretos, como por exemplo o *A. niger* e o *A. tubingensis*, pois estes apresentam boa capacidade de fermentar e altos níveis de produção de enzimas, sendo que os produtos de várias destas espécies obtiveram o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (DE VRIES e VISSER, 2001).



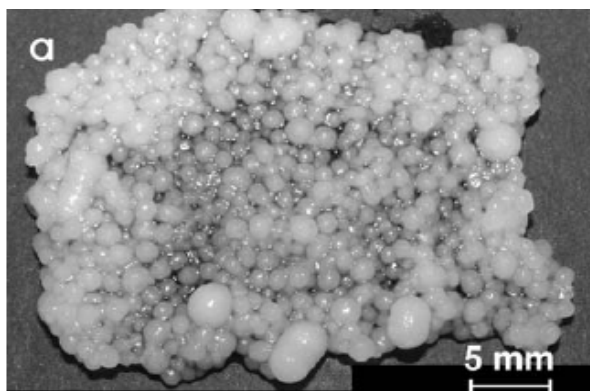
**Figura 3.4** Macro e micro morfologia do *Aspergillus niger*. Fonte: Joint Genome Institute

As principais características do *Aspergillus niger* são:

- Microrganismo aeróbio;
- Heterotrófico;

- Capacidade de produção de enzimas e biomoléculas (alta capacidade de produção de enzimas celulolíticas);
- Capacidade de crescer na ausência de água livre;
- Facilidade de manipulação e adaptação;
- Forma de reprodução através de esporos;
- Crescimento através de filamentos celulares – hifas.

Os fungos filamentosos como o *Aspergillus niger*, quando cultivados em meio submerso, podem crescer de diferentes formas. Alguns deles podem crescer na forma de pellets (Figura 3.5), com diferentes distribuições de tamanho e formas ao longo do processo fermentativo (JURASCIK e colaboradores, 2006).



**Figura 3.5 – Faixas de tamanho e forma dos pellets de *Aspergillus niger* em cultivo submerso. Fonte: Adaptada de Jurascik e colaboradores, 2006**

O crescimento dos micélios na forma dispersa favorece a transferência de massa e oxigênio. No entanto, o aumento na viscosidade do meio pode favorecer a coalescência de bolhas e dificultar as trocas gasosas. Estudos comprovam que tanto o tamanho quanto a frequência de coalescência de bolhas de ar em sistemas trifásicos aumentam em decorrência do aumento da concentração celular (KLEIN e colaboradores, 2002).

O crescimento na forma de pellets geralmente não tem influência significativa na viscosidade do caldo de fermentação e facilita as etapas de

separação. No entanto, a transferência de massa pode ser comprometida no interior dos *pellets* causando gradientes de concentração de nutrientes e oxigênio entre o meio líquido e o interior dos *pellets* (EL-ENSHASY e colaboradores, 2006).

A morfologia de crescimento do microrganismo depende da linhagem utilizada, mas também de fatores ambientais como composição do meio de cultivo, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, do tamanho e do tipo de inóculo, tipo de biorreator, da escala e da potência aplicada (EL-ENSHASY e colaboradores, 2006).

Em FS, a inoculação de esporos diretamente no biorreator é menos freqüente que em FES, pois este procedimento pode levar à formação de *pellets* e estruturas complexas. A etapa inicial de germinação dos esporos é determinante na morfologia de crescimento do microrganismo e afeta profundamente os padrões de produtividade das linhagens de fungos filamentosos (BIZUKOJC e LEDAKOWICZ, 2006). De um modo geral, um inóculo com alta concentração de esporos favorece o crescimento do fungo na forma filamentosa enquanto um inóculo de menor tamanho, com baixa concentração de esporos, favorece o crescimento na forma de *pellets* (FOSTER, 1949 citado por PAMBOUKIAN, 1997).

### **3.6. CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE CELULASES**

#### **3.6.1. Meio de cultivo**

Uma vez que as condições externas como meio nutricional, pH e temperatura afetam diretamente o crescimento e o metabolismo dos fungos filamentosos, há a necessidade de se estudar a capacidade do microrganismo

de assimilar cada uma das fontes de macro e micronutrientes disponíveis e as demais condições de crescimento para cada aplicação desejada.

Sendo os fungos organismos heterotróficos, os mesmos necessitam de componentes orgânicos como fontes de carbono e energia. Os diferentes tipos de nutrientes utilizados e suas diferentes quantidades resultam em diferentes formas de assimilação e metabolismo pelos microrganismos (PAPAGIANNI, 2004).

Os nutrientes necessários em maior quantidade são o carbono e o nitrogênio. Em FES, geralmente as fontes de C mais utilizadas são substratos lignocelulósicos; já em FS, as fontes de C mais utilizadas são a glicose e outras fontes de C que têm também a função de indutores da produção de celulases, como a carboximetilcelulose (CMC) e a lactose.

A limitação de nitrogênio pode comprometer as funções metabólicas do fungo além de favorecer a formação de *pellets*. Para suprir esta demanda, podem ser utilizados sais de nitritos, nitratos e amônia, ou fontes orgânicas como aminoácidos, uréia, extrato de levedura ou peptona. A peptona é uma fonte de carbono e de nitrogênio de fácil assimilação e o extrato de levedura é uma boa fonte de ocorrência natural de vitaminas do complexo B (DOMINGUES e colaboradores, 2000; PUTZKE E PUTZKE, 2002; PAPAGIANNI, 2004; SANTOS, 2010).

Outros nutrientes são importantes, como o fósforo (geralmente utilizado na forma de fosfatos), enxofre e cálcio; além de metais e outros íons em mínimas quantidades, como sódio, magnésio, zinco, manganês, cobre e ferro (PAPAGIANNI, 2004).

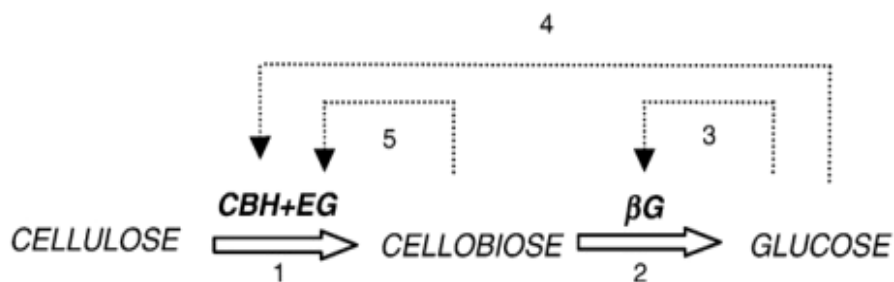
A influência da adição de polímeros, partículas e substâncias surfactantes no meio de cultivo e seu efeito na morfologia de crescimento dos fungos filamentosos, inibindo a formação de *pellets*, tem sido também estudada. Este efeito, porém, varia para cada espécie de fungo (METZ E KOSSEN, 1997; DOMINGUES, 2000).



### 3.6.2. Influência da fonte de carbono e de indução

A glicose é a fonte de carbono geralmente utilizada em cultivos submersos para crescimento de fungos filamentosos para a produção de celulases. Sua adição nos meios de cultivos em concentrações adequadas pode favorecer a produção enzimática. No entanto, quando adicionada em excesso pode causar repressão catabólica (BOTELLA e colaboradores, 2007; SALES e colaboradores, 2011).

A presença de glicose inibe diretamente a  $\beta$ -glicosidase, o que pode gerar acúmulo de celobiose. Tanto a glicose quanto a celobiose, além de serem substratos, são também reconhecidas por serem possíveis inibidoras das endoglucanases e celobiohidrolases e também da  $\beta$ -glicosidase. (ANDRIĆ e colaboradores, 2010).



**Figura 3.6 - Inibição das celulases: (a) principais reações (1,2), (b) inibição por glicose (3,4) (Adaptado de ANDRIĆ e colaboradores, 2010)**

Uma vez que a glicose é uma boa fonte de carbono para o crescimento celular, mas não induz a síntese de celulases, os meios de cultivos para a produção de celulases são suplementados com indutores como CMC, celulose em flocos, sofrorse, algodão, papel de filtro, resíduos agroindustriais e lactose (RITTER e colaboradores, 2010; AHAMED E VERMETTE, 2010; CASTRO e colaboradores, 2010b; SALES e colaboradores, 2011).

Em FES, são raros os trabalhos que relatam os efeitos de repressão das celulases na suplementação de substratos lignocelulósicos com outras fontes de carbono (ANDRIĆ e colaboradores, 2010). Botella e

colaboradores (2007) avaliaram a produção de celulases e xilanases por nove linhagens de *Aspergillus* em FES. A adição de glicose como fonte de carbono suplementar ao substrato lignocelulósico (bagaço de uva) em concentrações de glicose de até 6% m.m<sup>-1</sup> favoreceu a atividade xilanásica, mas a suplementação com 8% m.m<sup>-1</sup> de glicose resultou em atividades menores devido à repressão catabólica.

Em FS, altas concentrações de glicose de 20 e 40 g.L<sup>-1</sup> foram utilizadas com sucesso por Domingues e colaboradores (2001) em biorreator tanque agitado de 2,5 L de volume útil para avaliação do efeito da concentração de glicose no meio de produção enzimática em cultivos com 15 g.L<sup>-1</sup> de lactose como indutor. Foi constatado que uma vez que as celulases são metabólitos primários do *T. reesei*, uma maior concentração de glicose favoreceu o crescimento celular e conseqüentemente resultou em maior produção de celulases totais (1,8 FPU. mL<sup>-1</sup> em 20 g.L<sup>-1</sup> e 3,5 FPU.mL<sup>-1</sup> em 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose).

A respeito da utilização de lactose como indutora da síntese de celulases, Kubicek e colaboradores (2009) estudaram as estratégias de engenharia metabólica para o aumento da produção de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei*. Foi relatado que a lactose é capaz de induzir a expressão de celulases, porém o seu metabolismo é lento. Este mecanismo ainda não é totalmente compreendido, uma vez que a lactose não faz parte do habitat natural de crescimento dos fungos filamentosos.

Domingues e colaboradores (2001) estudaram a produção de celulases em batelada por uma linhagem mutante de *T. reesei*, utilizando glicose e lactose como únicas fontes de carbono. Foram avaliadas em escala de 50 mL diferentes concentrações de glicose, glicose+lactose e somente lactose. As atividades obtidas com a combinação das duas fontes de carbono mostraram um efeito positivo. Foi observada também uma ação sinérgica entre as fontes de carbono, resultando na produção de 2,8 FPU.mL<sup>-1</sup>.

Ahamed e Vermette (2008) realizaram um estudo visando o aumento da produção de celulases em biorreator tipo tanque agitado operado em batelada alimentada, utilizando co-culturas de *T. reesei* e *A. niger* e

provaram que ambas as espécies são capazes de assimilar a lactose e ácido lactobiônico como indutores de celulases. No entanto, ao mesmo tempo em que ambas as espécies podem assimilar rapidamente açúcares simples como glicose e frutose e fontes ricas de nitrogênio como a peptona, as mesmas crescem lentamente e com uma fase *lag* maior quando na presença de lactose, celulose e sais de amônia.

Assim como a lactose, outras fontes de carbono podem servir tanto para o crescimento celular, quanto como indutores da síntese enzimática, como lignocelulose, celulose pura e seus derivados, soforose e celobiose. (GONG E TSAO 1975; AGUIAR e MENEZES, 2000).

A utilização do bagaço de cana como indutor foi comparada frente aos indutores CMC e papel de filtro, sendo que a produção de celulases por linhagens fúngicas como *Aspergillus niger* obtida na presença do bagaço de cana foi superior às obtidas na presença dos demais indutores (MENEZES e colaboradores, 1976; AGUIAR E MENEZES, 2000).

Resultados semelhantes foram obtidos por Sridevi e colaboradores (2009), que obtiveram maiores atividades enzimáticas com a utilização de materiais lignocelulósicos como indutores na carga de 0,5% (m/v) em sistemas submersos em meio Czapek-Dox. Além disso, o pré-tratamento da serragem, bagaço de cana, farelo de trigo e palha de arroz resultou no aumento da produção de celulases. As atividades enzimáticas foram de 2,0 U.mL<sup>-1</sup> de FPase e 2,5 U.mL<sup>-1</sup> CMCCase para o bagaço de cana *in natura* e de 6,6 U.mL<sup>-1</sup> de FPase e 6,0 U.mL<sup>-1</sup> CMCCase para o bagaço de cana pré-tratado.

Muitos estudos aplicaram o material lignocelulósico após algum pré-tratamento físico ou químico e obtiveram sucesso na produção enzimática (KOCHER e colaboradores, 2008; ACHARYA e colaboradores, 2008; SUKUMARAN, 2009; entre outros). O propósito do pré-tratamento é a remoção de parte da lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade dos materiais lignocelulósicos (SINGH e colaboradores, 2009).

As etapas de pré-tratamento, entretanto, apresentam algumas desvantagens como o aumento do custo do processo. Além disso, no caso dos

tratamentos químicos, existe a possibilidade de liberação de subprodutos indesejáveis que podem inibir os microrganismos nas etapas seguintes do processo, além da liberação de efluentes tóxicos (SUN e CHENG, 2002; MOSIER e colaboradores, 2004). Tais características fazem com que ainda seja interessante o desenvolvimento de pesquisas a fim de se alcançar bons resultados de produção enzimática com a utilização de substratos *in natura*.

Além de serem indutores baratos para a produção enzimática por microrganismos, um outro motivo faz com que a utilização da lignocelulose seja atrativa: o fato de que a escolha do substrato indutor afeta as características do coquetel enzimático produzido. Portanto, quando se trata de cultivos cujo objetivo é produzir enzimas para aplicação específica na hidrólise do bagaço de cana na cadeia do etanol 2<sup>a</sup> de geração, o bagaço de cana como indutor favorece o direcionamento das características do coquetel enzimático.

### 3.6.3. pH e Temperatura

O pH do meio de crescimento afeta a eficiência da germinação dos esporos do *Aspergillus*, a produção proteolítica e a morfologia de crescimento (ROSE e van ZYL, 2008).

O pH ideal para o crescimento dos fungos varia na faixa de 4,0 a 7,0. No entanto, em intervalos de pH entre 2,0 e 9,0 eles são capazes de sobreviver e crescer (GRIFFIN, 1994).

No estudo para a produção de celulases por *T. reesei* realizado por Mandels e Sternberg (1976), foi aplicado um pH inicial de 5,0 a 6,0, sendo este estudo até hoje utilizado como referência na elaboração de meios de cultivo. As pesquisas atuais para a produção de celulases por *A. niger* utilizam pH inicial entre 4,0 e 7,0, em alguns casos com monitoramento e controle ao longo do tempo (AHAMED e VERMETTE, 2008; MAEDA e colaboradores, 2009) e em outros casos com pH livre (DOMINGUES e colaboradores, 2001;

SOHAIL e colaboradores, 2009; RITTER e colaboradores, 2010; AHAMED e VERMETTE, 2010).

Nos cultivos sem controle de pH, o *A. niger* tende a acidificar rapidamente o pH do meio. Segundo Domingues e colaboradores (2000) em estudo relacionado com o efeito das condições de cultivo na morfologia e produção de celulases por *T. reesei*, em cultivos em batelada sem controle de pH, o mesmo caiu nos primeiros 2 dias e depois subiu, sendo que em valores de pH próximos e inferiores a 3,0 a perda de FPU chegou a 50%.

Padrão semelhante de acidificação do meio foi obtido por Sohail e colaboradores (2009), em cultivos com *A. niger* para a produção de celulases; nos quais foi observado que o pH caiu nas primeiras 20 h até 3,5~4,0 e depois se estabilizou.

Sohail e colaboradores (2009) avaliaram a influência da temperatura e do pH na produção de celulases por uma linhagem de *A. niger* crescida em fermentação submersa em meio de Mandels e Weber (1969). Foram avaliados valores de pH de 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 e temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C. Os melhores resultados foram obtidos em pH 4,0 e temperatura de 35°C. Além disso, as produções de CMC<sub>Case</sub> e  $\beta$ -glicosidase iniciaram-se somente quando o pH do meio aproximou-se de 4,0.

#### **3.6.4. Produção do inóculo**

É conhecido que o tamanho do inóculo e também a forma de preparo do inóculo afetam a morfologia de crescimento do fungo filamentosos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de todo o sistema fermentativo e a síntese de proteínas (EL-ENSHASY e colaboradores, 2006).

De um modo geral, o preparo do inóculo para os sistemas fermentativos a partir de fungos filamentosos é realizado de duas maneiras distintas: pela inoculação de esporos do microorganismo ou então pela

ativação ou germinação dos esporos a fim do desenvolvimento de micélios em meio líquido para posterior inoculação em fermentadores.

A inoculação direta de esporos em fermentadores é mais frequente em FES, sendo que o tamanho do inóculo varia de estudo para estudo. Geralmente os estudos para a produção de celulasas por *A. niger* em FES utilizam o tamanho do inóculo compreendido no intervalo entre  $10^5$  esporos.g de substrato<sup>-1</sup> como nos trabalhos de Kang e colaboradores (2004) e por Sohail e colaboradores (2009) e  $10^7$  esporos.g de substrato<sup>-1</sup>, como no trabalho de Sukumaran e colaboradores (2009). Porém, há alguns estudos em FS nos quais a inoculação de esporos se dá diretamente no meio líquido de fermentação, como avaliado por Sales e colaboradores (2010) em concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

Nos casos nos quais a alternativa é a inoculação do biorreator com os micélios do fungo filamentosos já desenvolvidos em meio líquido, este desenvolvimento é realizado em meio nutriente denominado de meio para preparo do inóculo ou meio de pré-cultivo. As condições deste meio podem ser semelhantes às do meio de produção enzimática ou, como ocorre em muitos casos, podem ser utilizadas diferentes fontes de carbono nos meios de cultura de preparação de inóculo e de produção enzimática.

O tamanho do inóculo nos casos de um pré-cultivo é uma relação entre o volume de meio de inóculo e o volume final de meio de produção, descrito em termos de porcentagem, o que na maioria dos casos varia em torno de 5% (AHAMED E VERMETTE, 2008) a 10% (DOMINGUES e colaboradores, 2001; SUKUMARAN e colaboradores, 2009; RITTER e colaboradores, 2010).

Na etapa de preparação do inóculo a tendência é a utilização de uma fonte de carbono de fácil assimilação pelo microrganismo (na maioria dos casos, glicose) e, posteriormente, a substituição desta fonte de carbono no meio de produção ou somente a adição de uma outra fonte, também indutora. Alguns trabalhos, porém, reportam a utilização de um indutor da síntese de celulasas já nesta etapa.

Castro e colaboradores (2010), em estudos relacionados com a produção de celulasas por *T. harzianum*, inocularam os esporos para pré-cultura em meio nutriente de Mandels e Weber (1969) adaptado com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e, posteriormente, substituíram a glicose no meio de produção enzimática por 7,5 g.L<sup>-1</sup> de bagaço de cana pré-tratado, desempenhando a função de fonte de carbono e indutor.

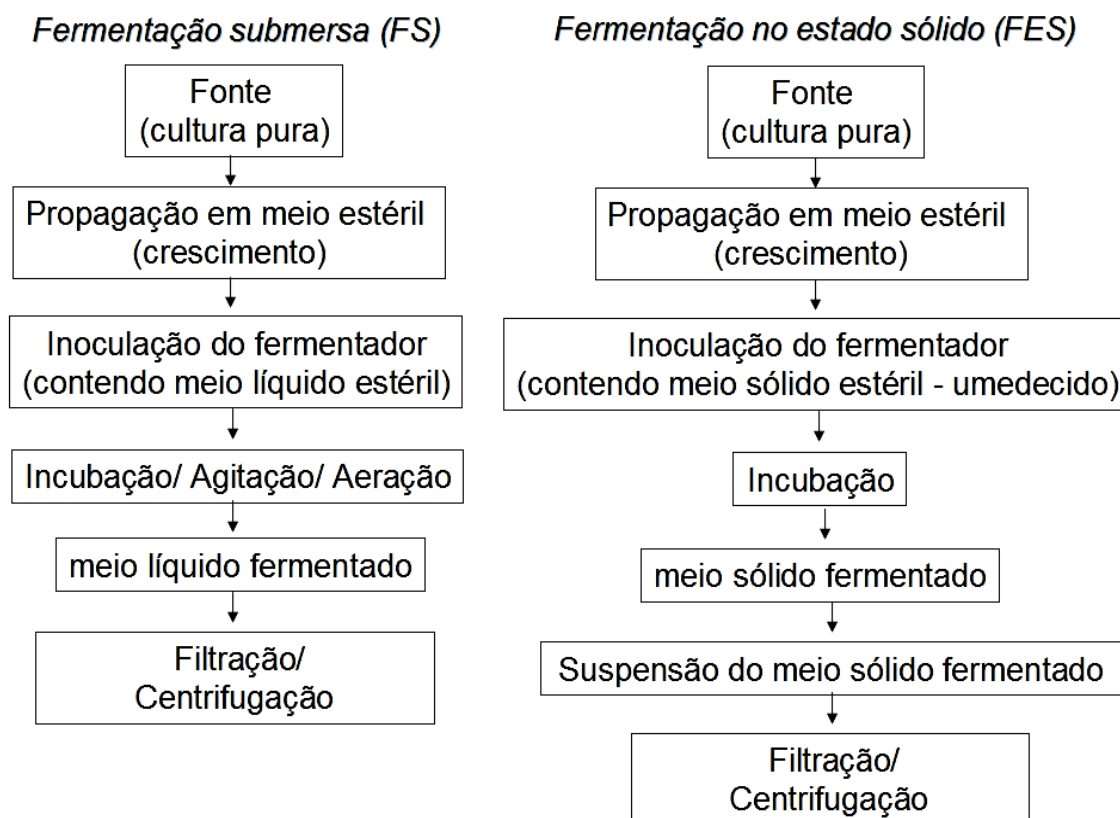
Ahamed e Vermette (2008), pesquisando a produção de celulasas por *T. reesei*, utilizaram 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose (fonte de C) e 10 g.L<sup>-1</sup> de celulose (fonte de C e também indutor) no meio de produção do inóculo e no meio de produção utilizaram a concentração de celulose de 50 g.L<sup>-1</sup> substituindo a glicose por pulsos de lactose e ácido lactobiônico em regime de batelada alimentada.

Maeda e colaboradores (2009) utilizaram somente CMC no meio de produção e avaliaram o efeito do preparo do inóculo na produção de celulasas em biorreator tanque agitado por *P. funiculosum*: um inóculo crescido em meio nutriente contendo somente glicose e um outro contendo somente CMC como fonte de carbono e indutor. O melhor desempenho obtido foi no segundo caso, no qual o fungo já adaptado com a celulose apresentou maiores atividades (128,6; 1862,7 e 1359,6 U.L<sup>-1</sup> de FPase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente), além de uma fase de adaptação menor, resultando também em maior produtividade.

### **3.7. TIPOS DE PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES**

As duas principais tecnologias para a produção de celulasas são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), cujos diagramas são apresentados na Figura 3.7. Ambos os sistemas diferem entre si em relação às suas condições ambientais. Na FES, a água encontra-se

complexada ao substrato ou absorvida pela parede das partículas, havendo ausência ou quase ausência de água livre (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).



**Figura 3.7 Diagrama dos sistemas fermentativos em FS e FES**

Entre as vantagens e desvantagens de cada sistema, a grande vantagem da FS é a homogeneidade dos sistemas fermentativos e o conhecimento de técnicas de monitoramento e controle bem estabelecidas; no entanto, a FS resulta em produtos três a quatro vezes mais diluídos, aumentando os custos de separação e purificação (HOWARD e colaboradores, 2003; CASTRO E PEREIRA JR, 2010).

A FES, apesar da desvantagem da limitação de água livre, a qual pode prejudicar a taxa de crescimento celular e o tempo de adaptação celular, demanda menores custos de infraestrutura e operação e resulta em menor impacto ambiental pelo fato de possibilitar a utilização de rejeitos industriais



como substrato, agregando valor aos mesmos enquanto utiliza uma matéria-prima de baixo custo (SUKUMARAN e colaboradores, 2009).

A produção de celulases e outras enzimas celulolíticas por meio de cultivos de fungos compõem sistemas estritamente aeróbios, que são realizados em diferentes tipos de biorreatores, tanto em FS quanto em FES. O fator limitante crítico nestes sistemas é, portanto, prover o ambiente ótimo de transferência de massa de oxigênio, como consequência da baixa solubilidade de oxigênio no meio de fermentação (FREITAS e TEIXEIRA, 2001).

Um biorreator ideal deve, conseqüentemente, prover condições adequadas de oxigenação, possibilitando que células cresçam e produzam seus metabólitos; além de outras condições que favoreçam manter o ambiente próprio para crescimento e reação, como pH, substrato, sais nutricionais e vitaminas (SHÜRGERL, 1987; CHISTI 1989).

### **3.7.1. Fermentação no estado sólido**

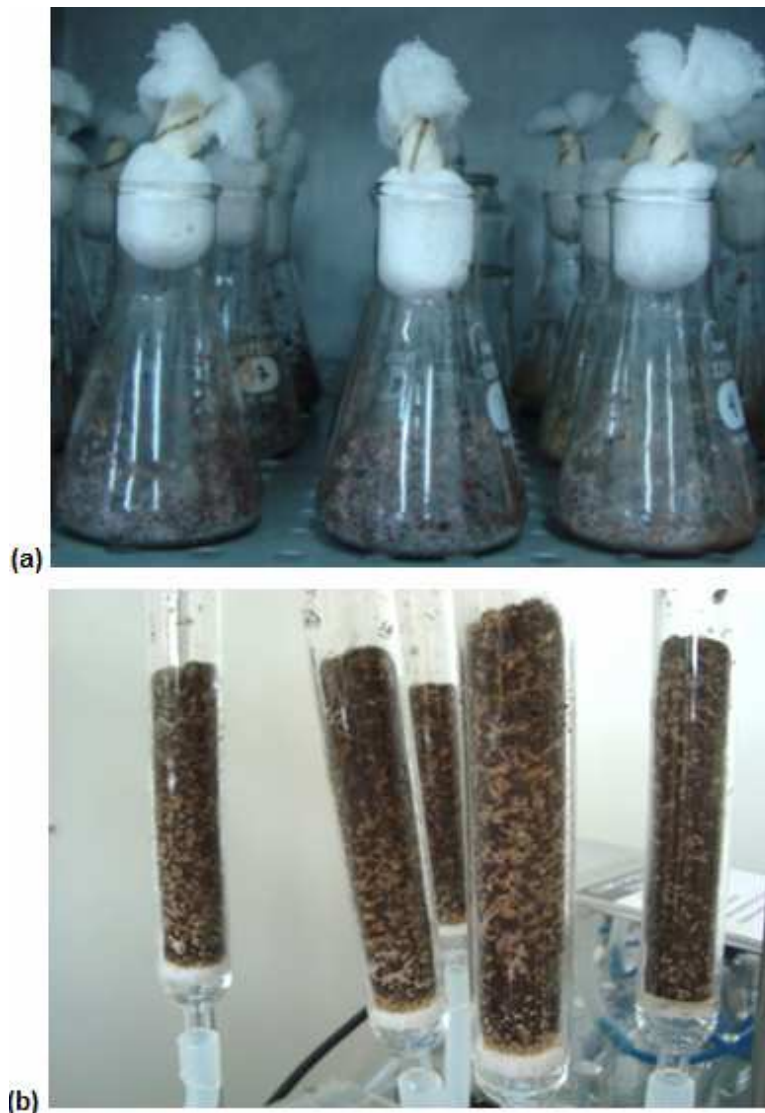
O uso de FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes microrganismos. A vantagem de realizar a fermentação em condições próximas ao natural é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo em FS. Além disso, as enzimas produzidas por FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e possui uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER e LENZ, 2004).

A FES é um processo alternativo e muito atrativo para a produção de celulases, pois além de possibilitar a utilização de substratos lignocelulósicos, a FES gera menor volume de efluente e demanda menores investimentos para manutenção da esterilidade do meio, uma vez que há baixo risco de contaminação por bactérias, devido à ausência de água livre (RAGHAVARAO e colaboradores, 2003; CHANDRA e colaboradores, 2007).

A FES apresenta uma ampla faixa de aplicações não somente em pequena escala, como também nas escalas piloto e industrial. Existem diversos tipos de biorreatores para FES e cada um apresenta um desempenho diferente; portanto, deve-se escolher o modelo mais adequado (LEE e colaboradores, 2011).

Para a produção de celulases por fungos filamentosos em FES, quatro tipos de configurações principais de biorreatores se distinguem: biorreator do tipo bandejas, biorreator do tipo tambor rotativo, biorreator do tipo colunas de leito fixo e biorreatores agitados (MITCHEL e colaboradores, 2006).

Em escala de bancada, os biorreatores mais utilizados são sistemas fermentativos realizados em frascos tipo Erlenmeyer, os quais podem ser mantidos em condições estáticas ou sob agitação, e fermentadores do tipo colunas de leito fixo (Fig. 3.8).



**Figura 3.8 Biorreatores para FES: (a) fermentação em frasco erlenmeyer e (b) fermentação em reator de colunas**

A FES possui fatores essenciais para um bom desempenho do sistema, como escolha do substrato apropriado, tamanho das partículas e umidade. Em relação à granulometria do substrato, partículas muito pequenas, ao mesmo tempo em que possuem maior área de contato com o microrganismo, podem compactar e causar limitação na transferência de oxigênio; partículas muito grandes por outro lado, proporcionam maiores condições de aeração, mas resultam em menor área de contato com o microrganismo (PANDEY e colaboradores, 1999).

A umidade do substrato em FES é o fator mais importante na produção enzimática, e deve ser ótima. Pelo fato de o fungo filamentosso crescer na superfície do substrato ou no interior do mesmo, o teor de umidade se altera durante o cultivo como resultado da evaporação e atividades metabólicas. Se a umidade do substrato for muito baixa, o crescimento do fungo pode ser comprometido. Por outro lado, se a umidade do substrato for muito alta, pode preencher as lacunas entre as partículas e criar um ambiente de anaerobiose (BAYSAL e colaboradores 2003; RAGHAVARAO e colaboradores, 2003).

Apesar de todas as vantagens da FES, seus sistemas de controle e automação ainda não se encontram totalmente desenvolvidos. Por este motivo, quando se deseja processos em grande escala ou mesmo em processos onde é necessário evitar a limitação por água livre, a FS ainda é a técnica escolhida na maioria dos casos.

### **3.7.2. Fermentação submersa**

A FS apresenta processos difusionais e de misturas facilitados pelo caráter homogêneo do sistema e seu monitoramento e controle em tempo real é facilitado pelas muitas informações disponíveis sobre cinéticas de crescimento e produção nestes sistemas (CASTRO, 2006).

Em fermentadores, a fermentação submersa pode ocorrer de duas formas: sem agitação, na qual os micélios crescem na superfície do meio líquido ou com agitação, na qual os micélios se desenvolvem dispersos no meio líquido (CARLILE e WATKINSON, 1996 citado por SILVEIRA, 2003).

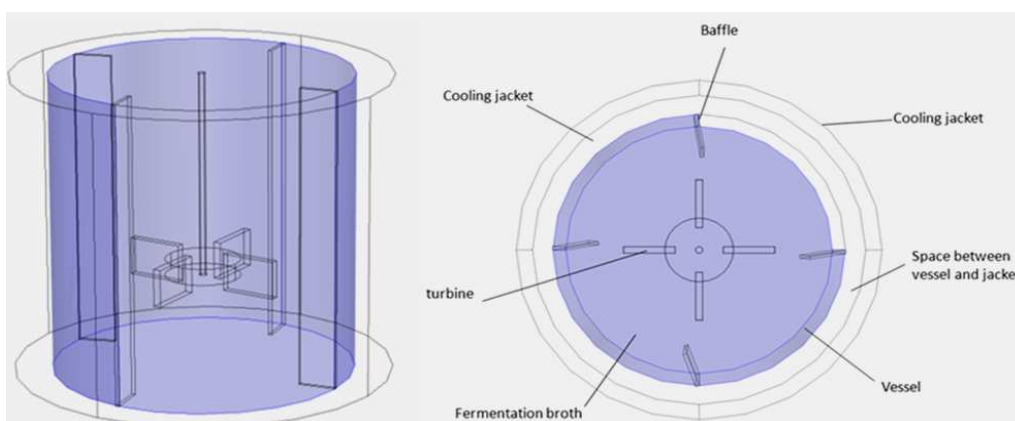
Outro fator importante na FS está relacionado à sensibilidade dos fungos filamentosos e de suas enzimas a tensões de cisalhamento. García-Kirchner e colaboradores (2005), em seus estudos sobre o efeito da composição do meio de cultivo nas condições de crescimento e produção de

$\beta$ -glicosidade por *Aspergillus niger* C-6, observaram que agitações intensas alteraram a morfologia do fungo e reduziram a produção de  $\beta$ -glicosidade.

Os tipos de biorreatores para cultivos submersos podem ser classificados como convencionais ou não-convencionais, de acordo com critérios de projeto relacionados a mecanismos de agitação e aeração. Os biorreatores convencionais são os reatores do tipo tanque agitado e aerado e os não-convencionais são do tipo pneumáticos (SHÜRGERL, 1987 citado por CERRI, 2005).

### 3.7.2.1. Biorreatores convencionais tipo tanque agitado

Nos biorreatores convencionais, a agitação ocorre de forma mecânica através de impelidores conectados a um eixo giratório e a aeração pela parte inferior do biorreator como ilustra a Figura 3.9. A agitação do biorreator tipo tanque agitado tem várias funções como a de transferir quantidade de movimento, massa e calor, e também de homogeneização das suspensões (CERRI, 2005).



**Figura 3.9 Biorreator tipo tanque agitado e aerado (Adaptado de UCL London/ Fermenter Mechanics)**

O biorreator tipo tanque agitado e aerado tem sido mais estudado para a produção de enzimas lignocelulolíticas (HOWARD e colaboradores, 2003). A desvantagem deste tipo de biorreator deve-se à alta demanda de energia para a manutenção dos níveis de oxigênio dissolvido necessários (WASE e colaboradores, 1985). Em contrapartida, reatores alternativos tipo pneumáticos vêm apresentando melhores resultados em processos biotecnológicos, pois fornecem ambientes mais favoráveis para processos fermentativos.

### **3.7.2.2. Biorreatores pneumáticos**

Os biorreatores pneumáticos tipo coluna de bolhas e tipo *airlift* são classificados como não-convencionais, pois nestes reatores a agitação e a homogeneização dispensam o uso de agitadores mecânicos para a dispersão da fase gasosa na fase líquida. Nestes reatores, o contato entre o gás e a fase líquida se dá através da alimentação de uma corrente de gás através de dispositivos distribuídos, como placas perfuradas e aspersores (TRAGER e colaboradores, 1989).

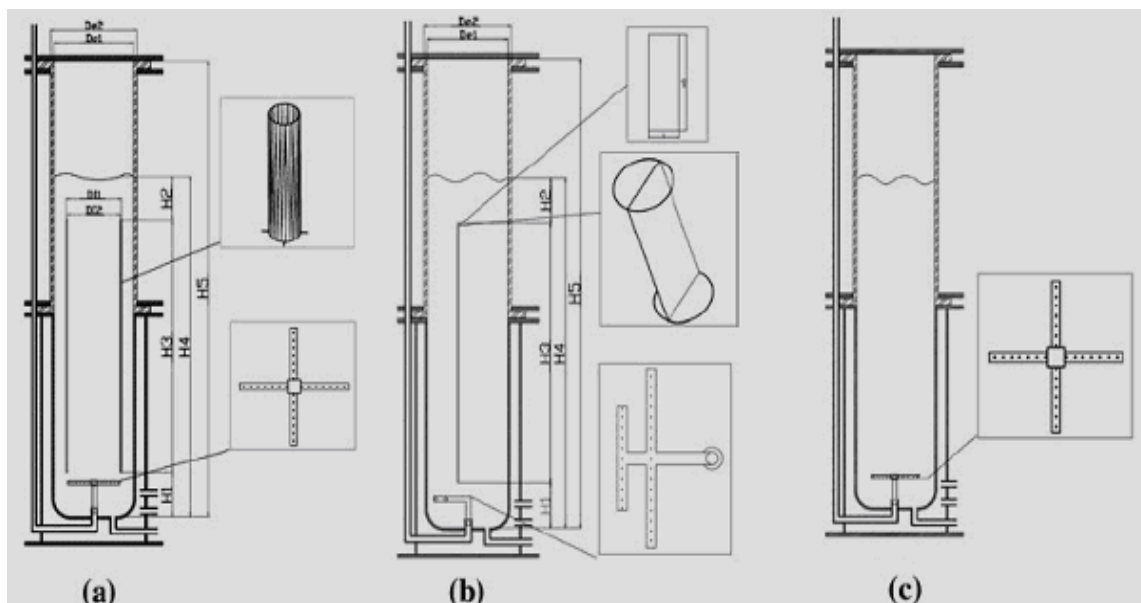
Os biorreatores pneumáticos podem apresentar diferentes configurações, cada uma com diferentes características hidrodinâmicas, resultando em diferentes performances para cada tipo de aplicação desejada. Devido à ausência de partes mecânicas móveis, o risco de contaminação e a demanda energética são consideravelmente reduzidas nestes biorreatores em comparação aos convencionais, apresentando grande potencial em sistemas aeróbios (CERRI, 2005).

Um fator importante nos biorreatores pneumáticos é que nestes o suprimento de oxigênio depende fundamentalmente da aeração, a qual é responsável também pela homogeneização do meio. Por isso, este sistema é menos flexível que o reator tanque agitado e requer, portanto, projetos mais cuidadosos (FONTANA e colaboradores, 2009).

Os biorreatores do tipo *airlift* apresentam padrão de escoamento bem definido além de altas velocidades de líquido aliadas a um baixo e uniformemente distribuído cisalhamento, possibilitando criar um ambiente ótimo para o crescimento de muitos microrganismos. Estes reatores se tornam, portanto, vantajosos para várias aplicações biotecnológicas (KLEIN e colaboradores, 2002) e têm emergido como um dos mais promissores dispositivos na engenharia de reações químicas, bioquímicas e ambientais (ZHANG e colaboradores, 2006).

Para as diferentes configurações do tipo *airlift*, três seções importantes do ponto de vista de mistura são: a base, onde está localizado o distribuidor de gás e onde o meio é reciclado da região de descida (*downcomer*), a região de subida (*riser*) e a região de descida (SIKULA e colaboradores, 2007).

Os biorreatores do tipo *airlift* são classificados de acordo com o caminho pelo qual a circulação do líquido entre as regiões de subida e descida são projetadas. Dentre as variações de reatores *airlift*, duas classes básicas precisam ser distinguidas: reatores de circulação interna (Fig. 3.10a), o qual é caracterizado pela distinção entre as regiões de subida através da instalação de um tubo interno concêntrico na coluna cilíndrica de líquido, e do tipo *split* (Fig. 3.10b), o qual é caracterizado pela separação entre as regiões de subida e descida através de defletores que fornecem uma geometria de partição no cilindro (AL-MASRY E DUKKAN, 1998).



**Figura 3.10** Diferentes configurações de biorreatores pneumáticos (a) *airlift* de circulação interna; (b) *airlift* tipo *split* e (c) coluna de bolhas (THOMASI e colaboradores, 2010)

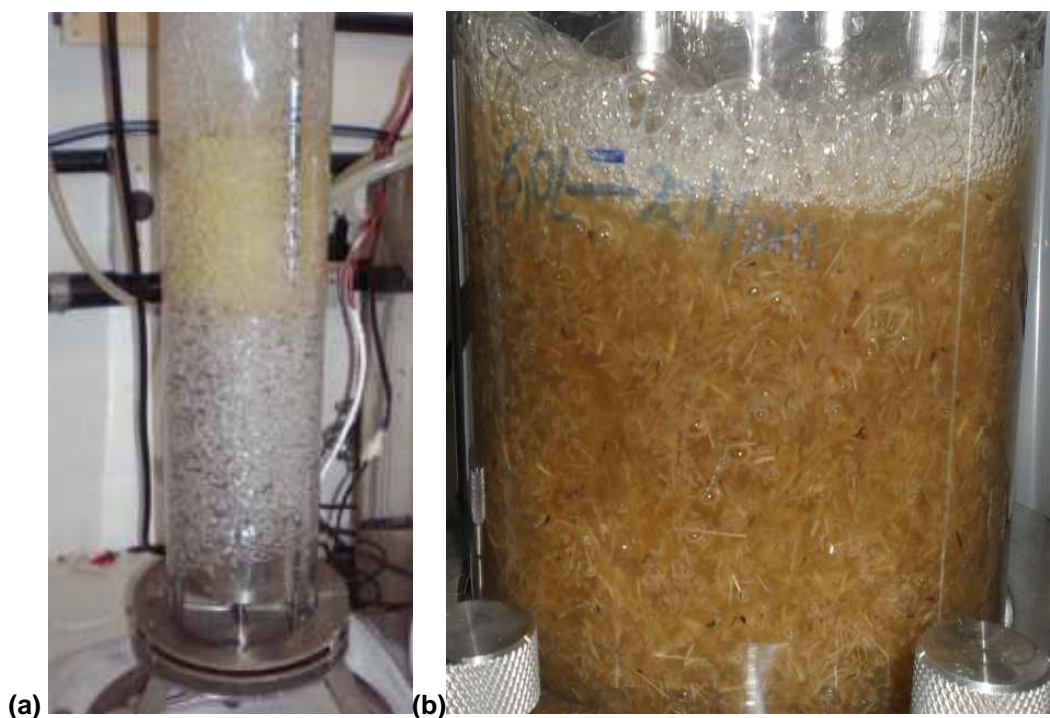
Os biorreatores do tipo coluna de bolhas (Fig. 3.10c), ou torre, são uma simplificação do *airlift* e consistem basicamente de um vaso cilíndrico com um distribuidor de gás na região inferior, próxima à base do reator. O gás é então borbulhado dentro de uma fase líquida ou de uma suspensão sólido-líquido.

Os reatores coluna de bolhas devem sua ampla área de aplicações a uma série de vantagens que oferecem tanto em projeto quanto em operação quando comparados a outros reatores. Isto se deve ao fato destes reatores apresentarem baixos custos de operação e manutenção, seus altos coeficientes de transferência de massa e calor, pela ausência de partes móveis e por serem compactos (KANTARCI e colaboradores 2005).

O padrão de escoamento nos biorreatores coluna de bolhas pode ser homogêneo ou heterogêneo. Nos sistemas com escoamento homogêneo (Fig. 3.11a) não são observadas a coalescência e a fragmentação de bolhas em todo comprimento da coluna do reator e a mistura é moderada. Tal perfil geralmente ocorre para velocidades superficiais do gás menores que  $5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ .



Quando se opera com velocidades superficiais do gás maiores, geralmente se observa regime heterogêneo (Fig. 3.11b) com distribuição entre os tamanhos das bolhas, coalescência e fragmentação de bolhas (KANTARCI e colaboradores, 2005). Regime semelhante com a ocorrência de coalescência e heterogeneidade na distribuição dos tamanhos das bolhas são obtidos também em cultivos com alta densidade celular, nos quais o aumento na viscosidade do meio decorrente da presença da biomassa intensifica o aumento na coalescência de bolhas de ar, afetando fortemente a dissolução de oxigênio no meio (GLUSZCZ e MICHALSKI, 1994 citados por FONTANA e colaboradores, 2009).



**Figura 3.11 Biorreator coluna de bolhas (a) escoamento homogêneo em sistema ar-água e (b) escoamento heterogêneo em sistema trifásico meio líquido/ar/bagaço de cana e microrganismo**

As reações químicas são afetadas e podem ser até mesmo controladas através das características hidrodinâmicas dos sistemas. Por este motivo, há muito interesse tanto das indústrias quanto dos centros de pesquisa

em entender as interações em sistemas multifásicos complexos para viabilizar o desenvolvimento de projetos e de aumento de escala (JACKOBSEN e colaboradores, 2005).

Em processos bioquímicos, outro fator importante a ser considerado em sistemas fermentativos é o efeito dos diferentes padrões de escoamento no crescimento microbiano e na produtividade obtida em cada um dos sistemas. Apesar dos biorreatores pneumáticos já serem objetos de estudos hidrodinâmicos há algumas décadas, somente estudos recentes tem abordado a influência destes parâmetros em sistemas não-Newtonianos, como em cultivos envolvendo microrganismos filamentosos, por exemplo.

Em relação à velocidade de cisalhamento nas diferentes configurações de biorreatores, a literatura clássica informa que em níveis similares de transferência de oxigênio, os pneumáticos apresentam menores taxas de cisalhamento (ONKEN e WEILAND, 1983; TRAGER e colaboradores, 1989). No entanto, estudos recentes com fluidos não-newtonianos propõem modelos mais completos para quantificação das condições de cisalhamento, incorporando ao modelo considerações sobre a geometria, reologia e parâmetros operacionais, e têm obtido resultados opostos ao da literatura clássica (CERRI e colaboradores, 2008).

Thomasi e colaboradores (2010) realizaram a comparação entre os desempenhos de diferentes configurações de biorreatores pneumáticos em cultivos com *S. clavuligerus*, utilizando correlações da velocidade média de cisalhamento e velocidade superficial do gás com propriedades reológicas do fluido. Foram obtidos baixos índices de consistência e concentração celular em *airlift* de cilindros concêntricos, associados à altas velocidades médias de cisalhamento. Em coluna de bolhas foram obtidos altos índices de consistência e de concentração celular associados a uma menor velocidade de cisalhamento. Apesar de o biorreator coluna de bolhas apresentar valores de velocidade de cisalhamento menores que as obtidas em biorreatores *airlift* de cilindros concêntricos e *split*, todos apresentaram valores maiores que os reportados para biorreatores convencionais.

Ao mesmo tempo em que os resultados obtidos por Thomasi e colaboradores (2010) divergem dos dados da literatura clássica, os mesmos confirmam os resultados obtidos em estudos recentes realizados por Cerri e colaboradores (2008), os quais avaliaram a influência das condições de cisalhamento em sistemas fermentativos em biorreatores convencionais e *airlift* de circulação interna, o qual apresentou maiores velocidades de cisalhamento.

Deve-se ressaltar que dentre os tipos de biorreatores pneumáticos a configuração do biorreator do tipo coluna de bolhas é a que apresenta a vantagem de menores velocidades de cisalhamento, resultando em menor dano à estrutura física dos microrganismos e à produtividade do processo.

### **3.7.3. Sistemas trifásicos**

O uso de biorreatores trifásicos tem sido ampliado além das aplicações em processos químicos, sendo que os sistemas que contêm baixa densidade de partículas têm encontrado aplicações em processos biotecnológicos como os fermentativos e tratamento aeróbio de efluentes (KAWASE e colaboradores, 1996).

Os sistemas fermentativos utilizando fungos filamentosos são sistemas multicomponentes e multifásicos complexos e em constante desenvolvimento (WANG e colaboradores, 2009). No entanto, a grande maioria dos estudos de sistemas trifásicos em biorreatores *airlift* corresponde a estudos hidrodinâmicos utilizando sistemas ideais ou mesmo sólidos de tamanho e formas definidas.

Uma vez que os sólidos em suspensão influenciam a morfologia de crescimento dos fungos filamentosos assim como as características de transporte de massa e calor e produtividade do sistema, é relevante a revisão de estudos hidrodinâmicos em sistemas trifásicos que reproduzam, o máximo possível, o comportamento de sistemas reais.

Jurascik e colaboradores (2006) estudaram a influência da presença do fungo filamentososo *A. niger* na hidrodinâmica de biorreatores *airlift* através da comparação dos resultados obtidos na fermentação de glicose a ácido glucônico em seis diferentes concentrações de biomassa (0 a 7,5 g.L<sup>-1</sup>) em um sistema trifásico gás-líquido-sólido e em um sistema bifásico ar-água. Os experimentos foram realizados em um biorreator *airlift* de 40 L à temperatura de 30°C. Nas condições experimentais estudadas, o fungo cresceu na forma de *pellets* de diferentes tamanhos ( $0,5 < dp(mm) < 5,0$ ) e formas (oval e esférica), não apresentando influência significativa na velocidade de circulação do sistema. No entanto, em relação à transferência de massa no sistema, o aumento da concentração da biomassa apresentou um impacto negativo, pois aumentos na concentração da biomassa geraram baixos valores de retenção gasosa total.

Trager e colaboradores (1989) estudaram a fermentação da glicose a ácido glucônico por *A. niger* em diferentes biorreatores a fim de verificar a influência do tipo de reator na morfologia do microrganismo. Foi observado que no reator tipo tanque agitado e aerado de 10 L o fungo cresceu na forma de micélios dispersos, o que ocasionou aumento na viscosidade do meio e menor taxa de transferência de massa que nos biorreatores *airlift* de 4 L e 260 L. O fungo cresceu na forma de *pellets* de tamanhos de 1 a 2 mm e a viscosidade do meio não sofreu alterações, gerando alta transferência de massa e conversões de até 98% (m/m) no biorreator *airlift* de 260 L.

Klein e colaboradores (2002) estudaram a transferência de massa em biorreatores *airlift* de circulação externa de 10 e 34 L. Os autores variaram a vazão de alimentação de ar utilizando um sistema trifásico real, no qual a fase sólida foi composta de *pellets* rígidos de *A. niger* de 0,73 mm e avaliaram as interações entre *pellets* e bolhas. Foi observado que a produção de ácido glucônico foi influenciada positivamente pelo aumento da vazão de ar injetado no reator. Por outro lado, o aumento da concentração de células causou diminuição nos valores do coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) como resultado das interações dos *pellets* com as bolhas, aumentando a coalescência a fragmentação de bolhas no reator.

Freitas e Teixeira (2001) estudaram a transferência de oxigênio em um sistema trifásico com alta carga de sólidos em um reator *airlift* de circulação interna. Nos experimentos foram variados a densidade e a carga de partículas sólidas de alginato de cálcio. Os resultados obtidos em relação à carga de sólidos no reator mostraram que esta tem forte influência negativa na transferência de massa de oxigênio no sistema, pois para um aumento na carga de sólidos de 20 - 30%, foram obtidas reduções do  $k_L a$  da ordem de 40-70%, devido ao aumento na coalescência de bolhas. Os resultados relacionados com a influência da densidade das partículas na transferência de massa mostraram que um pequeno aumento na densidade das partículas tem forte influência negativa nos valores de  $k_L a$ .

A produção de celulases por fungos filamentosos em biorreatores aerados compreende sistemas trifásicos ar/meio líquido/fungo filamentosos. Este sistema torna-se ainda mais complexo à medida que se substitui os indutores solúveis à síntese enzimática por indutores insolúveis, como substratos lignocelulósicos.

Na presença de indutores insolúveis, a transcrição de celulases não é totalmente conhecida. Por ser a celulose insolúvel, acredita-se que ela não deva ser capaz de iniciar a síntese enzimática como indutor. Em vez disso, uma pequena quantidade de celulases constitutivas é capaz de iniciar a hidrólise formando oligossacarídeos, os quais podem penetrar na célula e disparar a síntese de celulases pelo microrganismo (SUTO e TOMITA, 2001). Os experimentos realizados *in vitro* com uma linhagem de *T. reesei* por VERA (1998) suportam esta teoria, pois mostram que o fungo induzido produz uma quantidade baixa de enzimas que iniciariam a hidrólise da celulose a sofrose e outros oligossacarídeos solúveis, os quais poderiam ser absorvidos pela célula e disparar a síntese de celulases em maiores quantidades.

Kim e colaboradores (1997) compararam em seus estudos a produtividade de celulases e xilanases por *A. niger* KKS na presença de palha de arroz, em vários biorreatores (frascos agitados de 100 mL, coluna de bolhas de 0,8 L, tanque agitado e aerado de 2,1 L e reator *airlift* de circulação externa de 1,4 L), tanto em regime batelada quanto em batelada alimentada. Os

biorreatores tipo coluna de bolhas e *airlift* apresentaram melhores resultados do que o biorreator tipo tanque agitado, provavelmente devido aos valores do coeficiente de transferência de oxigênio, que foram bem mais altos nos dois primeiros. No entanto, a produtividade em FPase no reator tanque agitado diferiu dos outros casos por apresentar resultados 10% maiores que o reator coluna de bolhas. As produtividades máximas obtidas em biorreator coluna de bolhas para FPase e xilanase foram  $8,8 \text{ FPA.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e  $813 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente, em regime de batelada alimentada.

Siedenberg e colaboradores (1997) compararam a produção de xilanase por *Aspergillus awamori* em meio complexo contendo farelo de trigo nos biorreatores *airlift* tipo torre e tanque agitado. Foram estudadas as interações entre o fungo e o substrato sólido assim como as influências da vazão de ar, da frequência de agitação e do tamanho das partículas do farelo de trigo. Os resultados relacionados à influência da granulometria das partículas mostraram que, para partículas de 5 a 6 mm, o *Aspergillus* cresceu na forma de *pellets* densos, aderidos na superfície e também no interior do sólido, resultando em proteção ao fungo contra o cisalhamento e em maiores produtividades de xilanase. Já no estudo com partículas de 1 a 2 mm, o *Aspergillus* cresceu na forma de micélios dispersos, resultando em aumento da viscosidade do meio, aumento na velocidade de crescimento celular, porém com menor produção de xilanase. Em relação à comparação dos tipos de biorreatores, tanto a velocidade de crescimento quanto a produtividade em xilanase foram maiores no biorreator *airlift* do que no reator tanque agitado.

Frente aos principais componentes dos processos de produção de celulasas apresentados e, tendo em vista a necessidade do aumento de eficiência destes bioprocessos, a proposta do presente trabalho foi o desenvolvimento de um processo não-convencional para a produção de celulasas visando contribuir para a viabilidade econômica da aplicação da rota enzimática na produção de etanol celulósico. A abordagem foi estudar a aplicação do resíduo agroindustrial bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como substrato indutor da expressão enzimática desde a eapa de produção do

inóculo, em FES, e posterior transição para cultivos submersos visando a produção enzimática em FS utilizando biorreatores pneumáticos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAL**

#### **4.1.1. Substrato**

O substrato sólido da FS foi bagaço de cana *in natura* cedido pela empresa EDRA ECOSSISTEMAS, SP, na granulometria de 1 a 2 mm. Este mesmo material foi utilizado nas etapas de produção do inóculo por FES e como indutor nos sistemas fermentativos em FS.

#### **4.1.2. Microrganismo**

O agente das fermentações foi uma linhagem de *Aspergillus niger*, denominado *A. niger* 12, da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). Os esporos foram armazenados sob condições de congelamento a -50°C. As etapas de ativação dos esporos que precederam a inoculação nos biorreatores são descritas no item 4.2.2.

#### **4.1.3. Meios de cultivo**

O meio nutriente utilizado nas fermentações foi o meio de Mandels e Sternberg (1976), com adaptações, como apresentado na Tabela 4.1.



**Tabela 4.1 Composição do meio de cultivo utilizado (Mandels e Sternberg (1976), adaptado)**

reagente	concentração	unidade
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4	g. L <sup>-1</sup>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,0	
Uréia	0,3	
$\text{CaCl}_2$	0,3	
Peptona	5,0	
Extrato de levedura	2,0	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	
Tween 80	1,0	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0	mg. L <sup>-1</sup>
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6	
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,4	
$\text{CoCl}_2$	2,0	

Em todos os ensaios fermentativos o meio de cultivo descrito na Tabela 4.1 foi suplementado com o indutor bagaço de cana-de-açúcar, na concentração de 1% (m/v).

O pH do meio foi ajustado antes da esterilização de acordo com as condições de cada cultivo. Nos cultivos realizados em frascos agitados, o pH inicial do meio foi ajustado em 6,0; nos cultivos em biorreator coluna de bolhas o pH foi monitorado e mantido fixo em valores que variaram entre os ensaios (5,0 e 6,0).

O efeito da suplementação do meio nutriente com diferentes fontes de carbono, glicose (10 e 20 g.L<sup>-1</sup>) e lactose (10 g.L<sup>-1</sup>) foi avaliada na primeira etapa deste trabalho e, portanto, variou entre os ensaios.

Nos cultivos em biorreator pneumático, o controle de espuma foi realizado através da adição do anti-espumante Onispuma AE-500 (ONIBRAS - Ribeirão Preto, SP) ao meio de cultivo.

#### 4.1.4. Biorreator

Os experimentos foram realizados inicialmente em frascos Erlenmeyer de 500 mL, em volumes de cultivo de 100 mL, mantidos em mesa incubadora rotativa.

Para aumento de escala, o biorreator utilizado foi do tipo *airlift* com 5,0 L de volume útil (comercializado pela empresa Tecnal-Equipamentos para Laboratório Ltda, Brasil).

Foram avaliados sistemas trifásicos nos três tipos de configurações: *airlift* de circulação interna, dos tipos cilindros concêntricos e *split*, e no biorreator do tipo coluna de bolhas. Os ensaios fermentativos, porém, foram realizados todos na configuração coluna de bolhas, operando com vazão específica de ar de 4 vvm. Além disso, foram monitorados o pH e o oxigênio dissolvido e foi realizado controle da temperatura.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Procedimento experimental

Antes do início dos ensaios fermentativos, algumas etapas foram realizadas simultaneamente, como apresentado na Fig. 4.1. O microrganismo foi ativado e pré-cultivado em diferentes condições estudadas, enquanto simultaneamente a preparação do substrato (peneiramento para seleção da granulometria) e a preparação do meio nutriente eram realizadas.

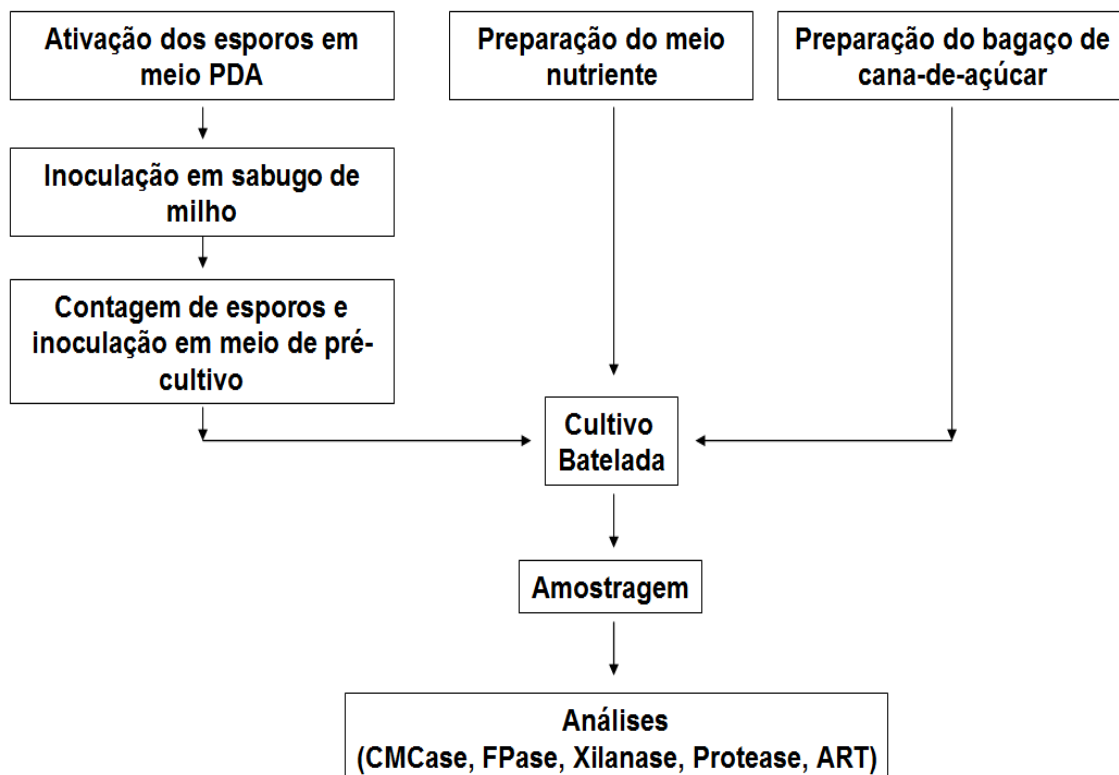


Figura 4.1 Fluxograma das etapas gerais da etapa fermentativa

#### 4.2.2. Ativação da linhagem e preparo do inóculo

A primeira etapa de ativação dos esporos correspondeu à inoculação dos esporos em meio ágar seguida por incubação em estufa a 32°C por 5 dias e posterior armazenamento sob refrigeração. Uma segunda etapa de ativação dos esporos foi necessária a fim de obter a quantidade de esporos necessária para a etapa de preparação do inóculo e consistiu na suspensão dos esporos do meio ágar através da adição de solução Tween 80 0,3% (m/v) e posterior inoculação em meio de sabugo de milho suplementado com solução salina de peptona (COURI e FARIAS, 1995), seguida por incubação em estufa a 32°C por 5 dias.

Após as etapas de ativação dos esporos, os mesmos foram ressuspensos do meio sabugo de milho através da adição de solução Tween 80 0,3% (m/v). O número de esporos por mL da suspensão foi determinado por contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Antes da inoculação nos biorreatores, os esporos foram germinados em meios de pré-cultivos, sendo que dois tipos de preparação de inóculo foram avaliados: preparo de inóculo convencional e não-convencional.

#### **4.2.3. Preparo do inóculo convencional**

O inóculo denominado convencional é o inóculo cujos esporos são germinados por fermentação submersa em meio nutriente líquido enriquecido com glicose, sem a adição de quaisquer indutores da síntese enzimática.

As etapas de produção do inóculo convencional são apresentadas na Figura 4.2. Neste procedimento foram inoculados  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup> em meio nutriente de Mandels e Sternberg (1976) adaptado e suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose. O pH inicial foi ajustado a 4,5 antes da esterilização em autoclave a 121°C, 1 atm, durante 20 minutos e o cultivo foi mantido incubado a 32°C em agitação constante de 200 rpm até a completa formação de hifas, tempo este de aproximadamente 50 h.

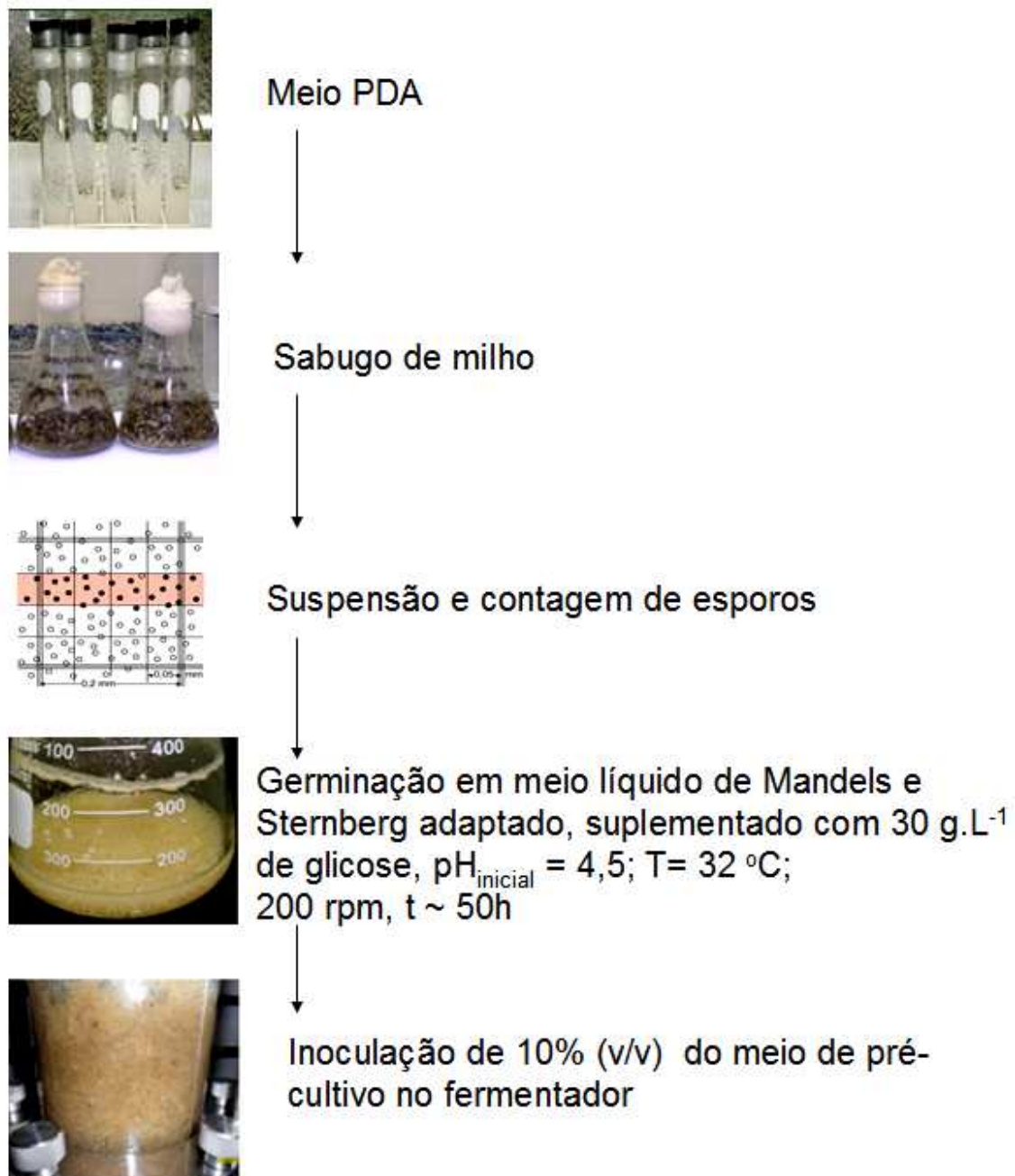


Figura 4.2 Etapas para a produção do inóculo líquido convencional

#### **4.2.4. Preparo do inóculo não-convencional, com fase inicial em FES**

Este tipo de inóculo foi preparado na presença do indutor sólido bagaço de cana, conforme descrito por BACCHIN e colaboradores (2010) com etapa inicial em FES.

Neste procedimento, apresentado na Figura 4.3, foram inoculados  $10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> diretamente no substrato indutor (bagaço de cana). A umidade do bagaço de cana foi ajustada em 70% em base úmida através da adição de meio nutriente de Mandels e Sternberg (1976) adaptado, cujo pH foi ajustado em 6,0 antes da esterilização em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 20 minutos. O cultivo permaneceu em FES sob incubação a 32°C em condições estáticas por 24 h, até o surgimento dos micélios. Após este período foi adicionado meio nutriente líquido suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose (200 mL de meio líquido adicionados a cada 5 g de bagaço de cana inicial). Este sistema foi mantido incubado em agitação constante por 48 h, período necessário para a obtenção de máxima concentração celular.

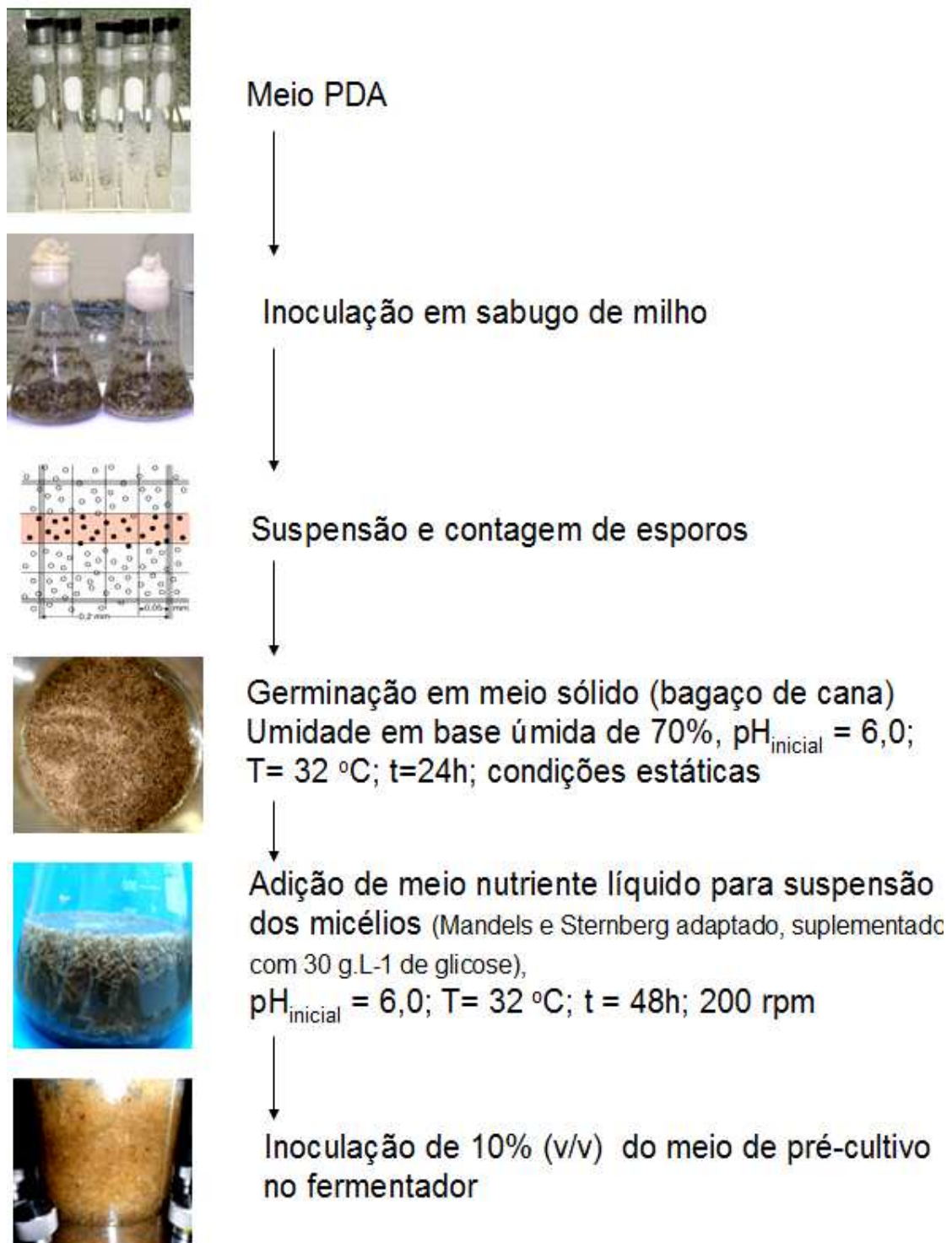


Figura 4.3 Etapas para a produção do inoculo não-convencional, com fase inicial em FES

#### **4.2.5. Preparação das amostras**

Amostras dos cultivos foram retiradas periodicamente para análises posteriores. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 15 minutos para obtenção do sobrenadante e armazenadas a -18°C.

### **4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA**

#### **4.3.1. Concentração de glicose**

A concentração de glicose foi determinada pelo método de DNS segundo Miller (1959).

#### **4.3.2 Atividade de CMCase**

A atividade da CMCase foi determinada pela reação entre o substrato carboxi-metil-celulose (Sigma, EUA) 0,4% em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8.

A reação foi realizada pela adição de 0,5 mL do substrato a 0,5 mL da amostra enzimática previamente diluída e incubados a 50°C por 10 min. A conversão da reação foi avaliada pelo método de DNS segundo Miller (1959) em termos da concentração de açúcares redutores produzidos ao longo do tempo. Uma unidade de atividade (U) corresponde a 1  $\mu$ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação, em pH 4,8 a 50°C.



### 4.3.3 Atividade de Xilanase

A atividade da xilanase foi avaliada pela reação das amostras enzimáticas previamente diluídas com uma solução 1% do substrato xilana (tipo *oat spelts*, SIGMA) em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0.

A reação foi realizada pela adição de 1,0 mL da amostra enzimática a 2,0 mL do substrato, incubados a 50°C por 20 min. A atividade enzimática foi avaliada em termos de produção de açúcares redutores pelo método de DNS segundo Miller (1959).

Uma unidade de atividade xilanase corresponde a 1  $\mu$ mol de xilose liberado por minuto nas condições descritas.

### 4.3.4 Atividade de FPase

A ação sinérgica das enzimas celulolíticas CMCase, avicelase e  $\beta$ -glucosidase foi avaliada sobre o substrato celulósico papel de filtro, constituído de regiões amorfas e cristalinas.

A reação envolveu 1,0 mL da amostra enzimática previamente diluída e o substrato papel de filtro Whatman nº1 (1 x 6 cm) em 2,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8, incubados a 50°C por 1 h. A atividade foi avaliada pelos açúcares redutores produzidos e quantificados pelo método DNS (MILLER, 1959).

Uma unidade FPU (*Filter Paper Unit*) corresponde à produção de um  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto nas condições descritas.

#### 4.3.5 Atividade de Proteases

A atividade das enzimas proteolíticas foi determinada utilizando como substrato uma solução 0,5% de azocaseína (SIGMA) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0, conforme descrito por CHARNEY e TOMARELLI (1947).

A reação foi realizada após adição de 1,0 mL da amostra enzimática a 1,0 mL do substrato, sendo o meio reacional mantido a 37°C por 40 min. Após este período foi adicionado 1,0 mL de ácido tricloroacético 10% ao meio reacional como agente de precipitação e as amostras foram centrifugadas por 3000 rpm por 15 min. A 1,0 mL do sobrenatante foi adicionado como composto cromóforo 1,0 mL de hidróxido de potássio 5 N e a atividade proteolítica foi expressa através da diferença de absorvância a 428 nm, entre as amostras enzimáticas analisadas com seus respectivos brancos.

Uma unidade de atividade de protease (1U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorvância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *A. niger* NA PRESENÇA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Nesta primeira etapa do trabalho foi avaliado o efeito do tipo e da concentração da fonte de carbono no meio de cultivo na produção de celulases por *A. niger*. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado em 6,0 antes da esterilização.

O procedimento experimental foi conduzido utilizando-se o tipo de inóculo não-convencional. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, mantidos sob agitação constante de 200 rpm em mesa incubadora rotativa a 32°C. As concentrações estudadas referem-se à suplementação do meio de cultivo com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de lactose.

Os experimentos foram realizados em duplicata e os consumos das fontes de carbono e os resultados de atividade de CMCase em função do tempo são apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente.

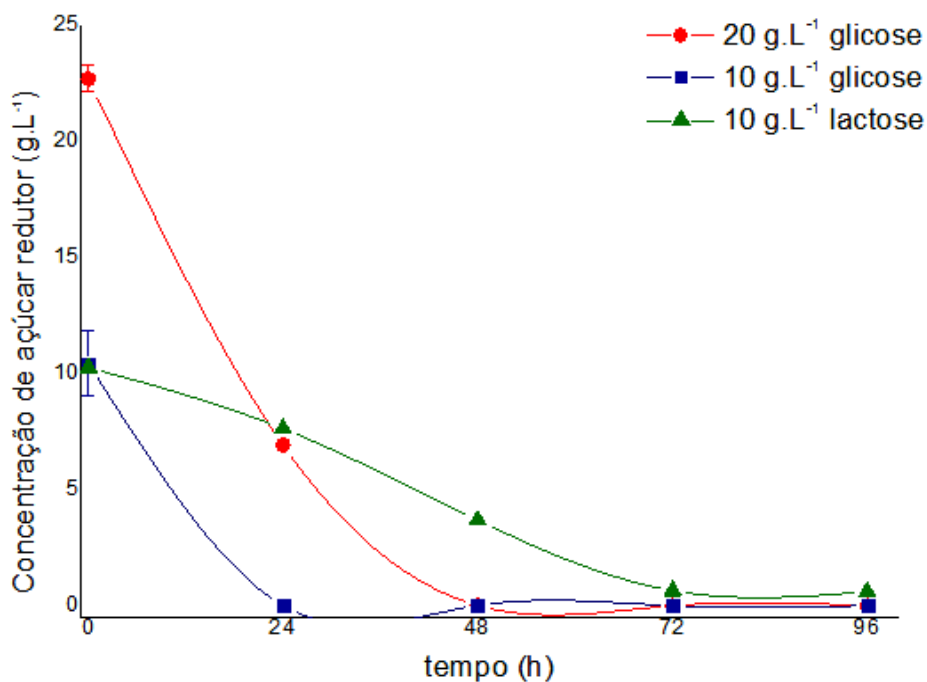


Figura 5.1 Concentração de açúcares redutores (g.L<sup>-1</sup>) em função do tempo em cultivos com inóculo não-convencional em mesa incubadora rotativa

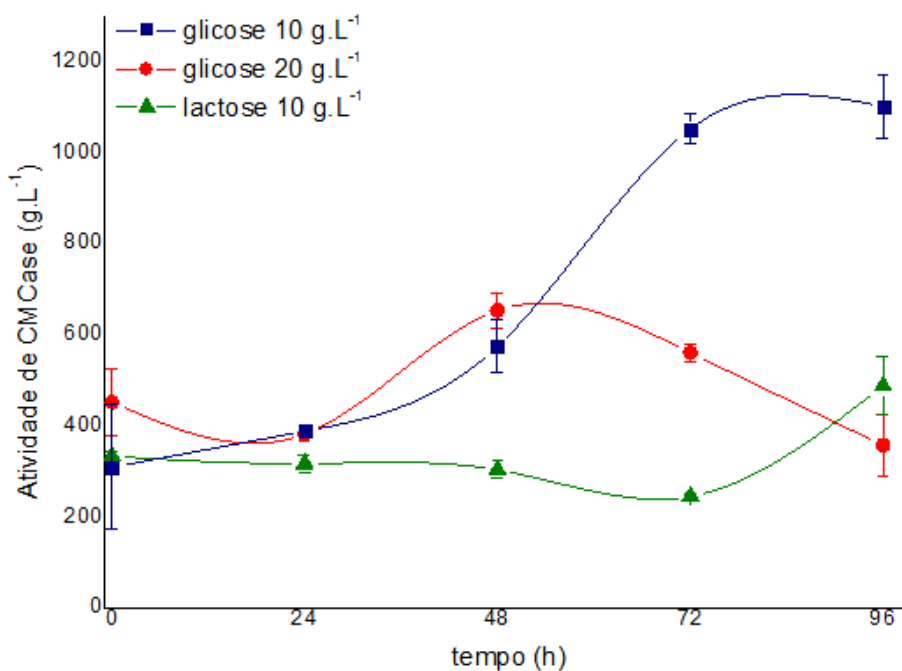


Figura 5.2 Atividades de CMCase (U.L<sup>-1</sup>) obtidas em função do tempo em meios de cultivos com diferentes fontes de carbono, com tipo de inóculo não-convencional em mesa incubadores rotativa

Pode-se observar pelos resultados apresentados o consumo mais lento da lactose em comparação ao consumo de glicose nos cultivos. Observa-se ainda que maior atividade de CMCase, de  $1052 \pm 34 \text{ U.L}^{-1}$ , foi obtida com a suplementação do meio nutriente com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose.

Em condições de suplementação do meio de cultivo com concentrações de glicose de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  foram observados níveis de atividades enzimáticas inferiores, com pico de  $653 \pm 38 \text{ U.L}^{-1}$  em 48 h, os quais podem ser justificados pelos efeitos de inibição devido à presença de alta concentração do produto de hidrólise, a glicose. Além disso, nos cultivos realizados com  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose houve um expressivo aumento da viscosidade devido à alta concentração celular, condições que poderiam prejudicar a transferência de massa no cultivo e que prejudicariam também uma operação eficiente em biorreatores pneumáticos.

No ensaio com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose, os resultados obtidos foram também inferiores. No intervalo de tempo estudado, os cultivos nestas condições apresentaram um longo período de atraso nos níveis de produção de atividades enzimáticas, sendo que um aumento na atividade enzimática foi observado somente após 72 h de cultivo, alcançando um valor máximo de  $488 \pm 64 \text{ U.L}^{-1}$  após 96 h.

Tais resultados estão de acordo com a literatura no que se refere ao fato de que lactose é mais lentamente metabolizada pelo microrganismo do que a glicose. Em estudos de engenharia metabólica com espécies de *Trichoderma reesei*, Kubicek e colaboradores (2009) afirmam que a d-galactose resultante da hidrólise da lactose é capaz de induzir a síntese de celulasas pelo microrganismo, embora este mecanismo não seja totalmente compreendido.

Embora a lactose seja muito difundida como uma alternativa promissora de fonte de carbono e indução da síntese de celulasas, na concentração utilizada e nas condições estudadas de sistema descontínuo e multifásico na presença de bagaço de cana, os resultados foram inferiores em comparação aos obtidos com mesma concentração de glicose.

Domingues e colaboradores (2001) utilizaram com sucesso a combinação das fontes de carbono glicose (20 g.L<sup>-1</sup> e 40 g.L<sup>-1</sup>) e lactose (15 g.L<sup>-1</sup>) com finalidade de crescimento e indução, respectivamente, sendo esta uma alternativa para avaliação em estudos futuros.

## **5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PREPARO DE INÓCULO NA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *A. niger* NA PRESENÇA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Após a seleção da glicose na concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> como a melhor fonte de carbono a ser adicionada ao meio de cultivo, o segundo passo consistiu na avaliação do efeito da preparação do inóculo na produção de celulases por *A. niger*.

Nesta etapa as condições de cultivo foram fixadas e foram avaliados os desempenhos dos sistemas fermentativos inoculados com o tipo de inóculo convencional (preparado como descrito no item 4.2.3.) ou com o tipo de inóculo não convencional com etapa inicial em FES (preparado como descrito no item 4.2.4).

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, mantidos sob agitação constante de 200 rpm em mesa incubadora rotativa a 32°C e o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado em 6,0 antes da esterilização.

Os ensaios foram realizados em duplicatas e os perfis de consumo de glicose, evolução do pH e produção de CMCase ao longo do tempo são apresentados nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente.

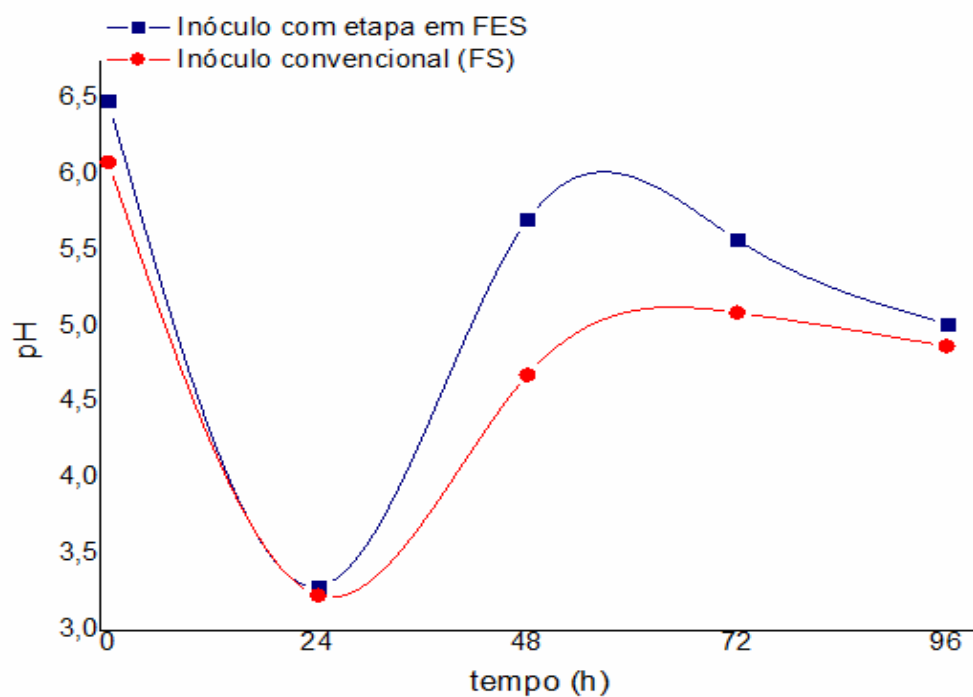


Figura 5.3 Evolução do pH em função do tempo nos cultivos com o inóculo convencional e com o inóculo não-convencional em mesa incubadora rotativa

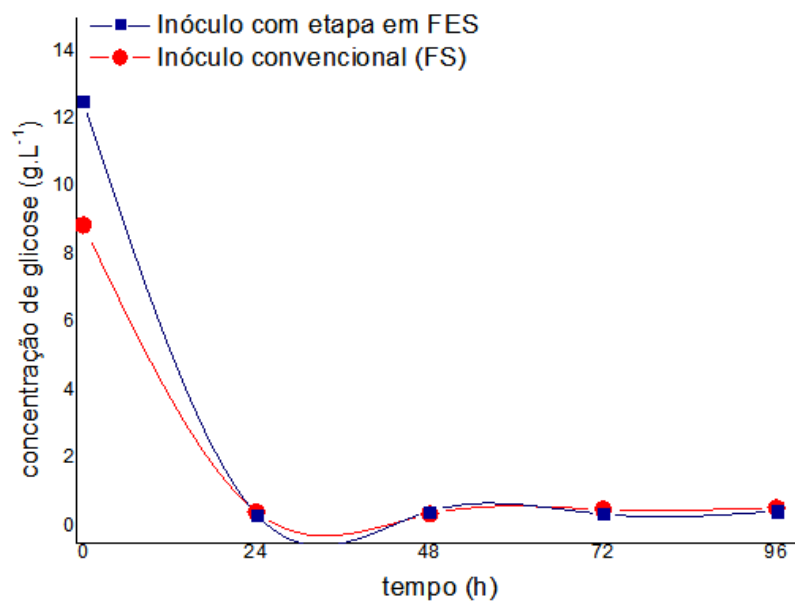


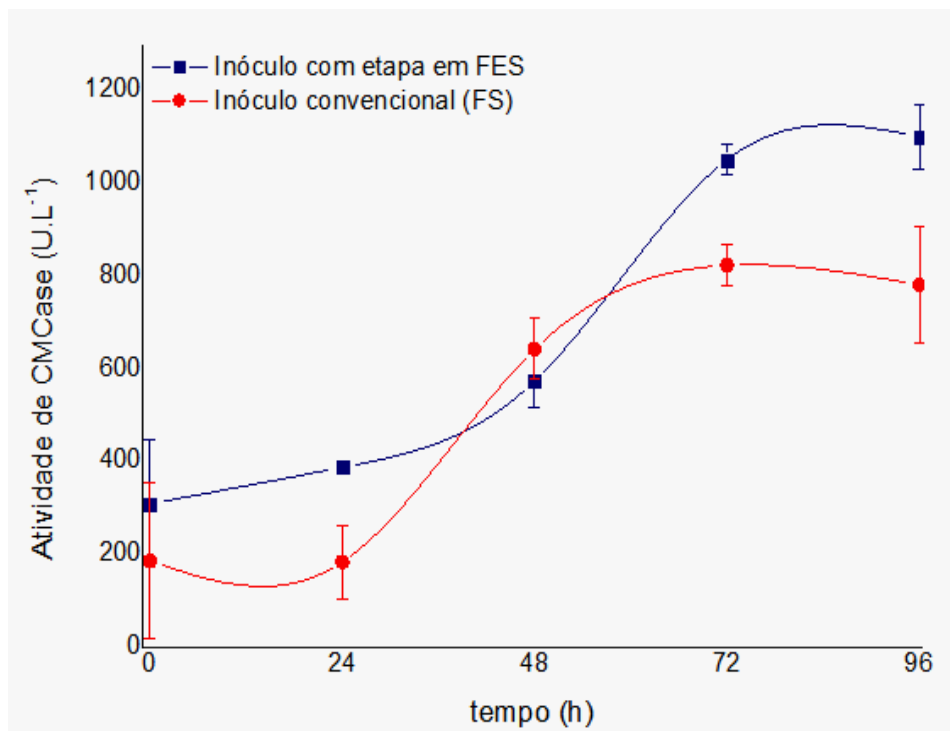
Figura 5.4 Concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em função do tempo cultivo com o inóculo convencional e com o inóculo não-convencional em mesa incubadora rotativa

Pode-se observar pela Fig. 5.3 que as variações de pH ao longo dos cultivos foram semelhantes em ambos os tipos de inóculo. A queda do pH nas primeiras horas e posterior tendência de subida e estabilização após o esgotamento da fonte de carbono, o qual ocorreu em 24 h (Fig. 5.4), estão de acordo com os perfis obtidos em cultivos com fungos filamentosos divulgados na literatura, como os de Domingues e colaboradores (2000), Bailey e colaboradores (2003) e Sohail e colaboradores (2009).

A rápida acidificação do meio de cultivo durante as primeiras horas de cultivo, as quais correspondem ao período de rápido consumo da fonte de carbono é comum em cultivos com *A. niger* e pode ser atribuída à síntese de metabólitos ácidos durante seu crescimento (SRIDEVI e colaboradores, 2009). Após o esgotamento da fonte de carbono o pH apresenta tendência de subida, que pode ser justificada pelo consumo do carbono disponível nas fontes de nitrogênio orgânicas e simultânea liberação de íons amônio.

Pode-se observar que embora os cultivos com diferentes preparos de inóculo tenham apresentado perfis semelhantes de consumo de glicose e evolução do pH ao longo do tempo, os resultados alcançados em relação à atividade enzimática apresentaram perfis com características bastante distintas (Fig 5.5).





**Figura 5.5 Atividades de CMCase obtidas em função do tempo em cultivos com o inóculo convencional e com o inóculo não-convencional em mesa incubadora rotativa**

Em cultivos cujo inóculo foi preparado com etapa inicial de germinação em FES com bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono e indução, não houve atraso no início de produção enzimática e os níveis de atividades enzimáticas de CMCase obtidas foram superiores ( $1052 \pm 34 \text{ U.L}^{-1}$ ) em relação às atividades de CMCase obtidas nos cultivos cujo inóculo foi preparado em meio líquido nutriente sem nenhuma indução à síntese enzimática ( $824 \pm 44 \text{ U.L}^{-1}$ ).

Outro aspecto observado entre as condições estudadas foram as morfologias de crescimento apresentadas pelo microrganismo em ambos os cultivos. Na Figura 5.6 pode-se observar a diferença entre as morfologias de crescimento de *A. niger* nos cultivos estudados. O preparo do inóculo com fase inicial em FES favoreceu o crescimento do *A. niger* sob a forma de micélios dispersos, enquanto o preparo do inóculo em meio nutriente líquido favoreceu o crescimento sob a forma de *pellets* densos.

Uma vez que a reação de hidrólise da celulose depende do contato célula-substrato, pode-se afirmar que a inclusão de uma etapa inicial em FES no preparo do inóculo favoreceu a produção de celulases não somente pela adaptação do microrganismo para assimilação do bagaço de cana como substrato indutor, como também por ter favorecido o crescimento na morfologia dispersa, facilitando o contato célula-substrato.

Por se tratar de sistemas fermentativos trifásicos complexos, composto por etapas de produção do inóculo tanto em FES quanto em FS, a excelente reprodutibilidade dos experimentos deve ser destacada, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos.

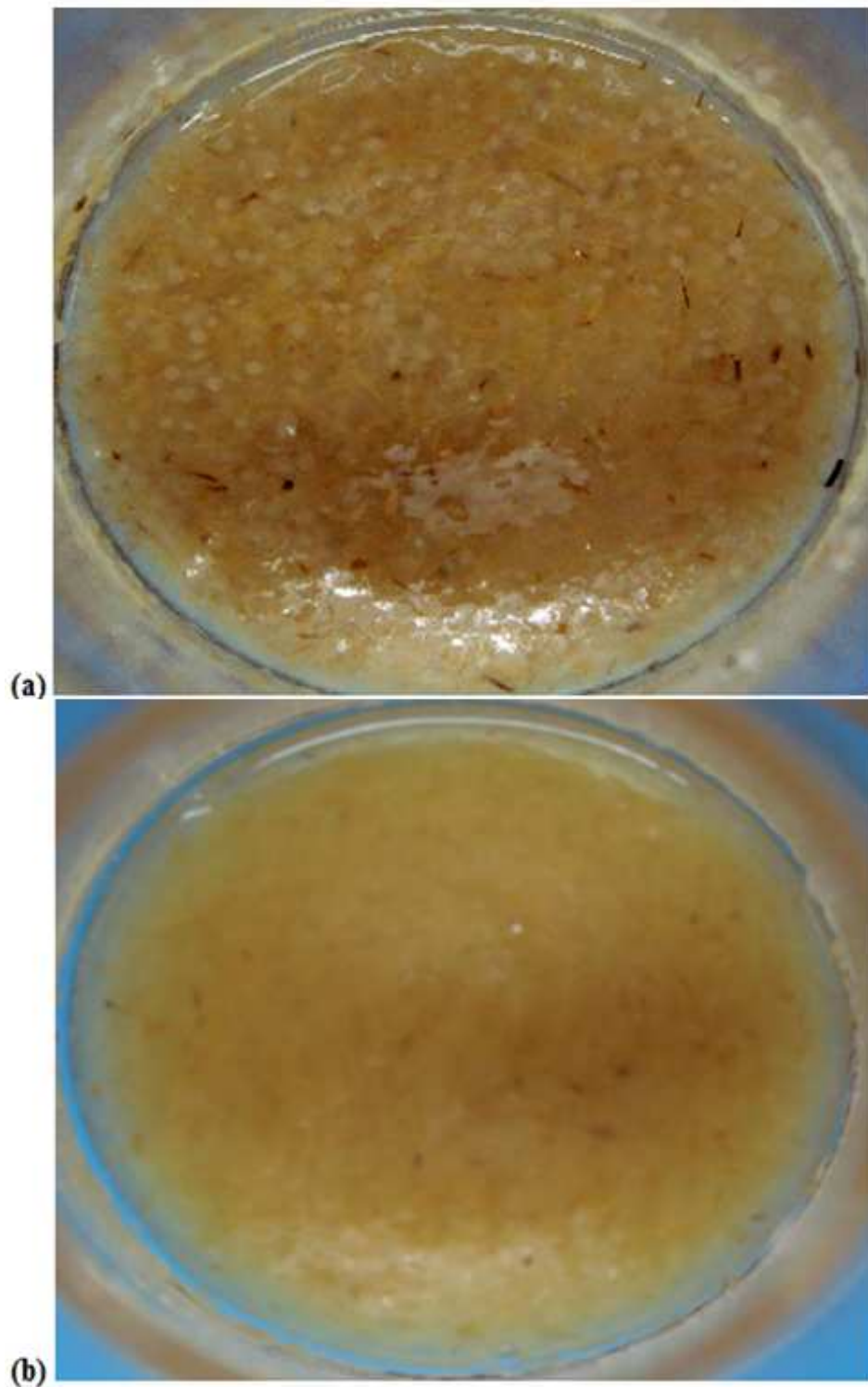


Figura 5.6 Macromorfologia de crescimento do *A. niger* após 24h em cultivos (a) com o inóculo convencional e (b) com o inóculo não-convencional

### 5.3 ADAPTAÇÃO DE BIORREATORES PNEUMÁTICOS DE 5,0 L PARA CULTIVOS NA PRESENÇA DE SÓLIDOS

Uma vez obtidas fonte de carbono adequada e as melhores condições para o preparo do inóculo a serem utilizadas nos cultivos realizados em frascos agitados, o próximo passo foi a avaliação da viabilidade de produção das celulasas em sistemas trifásicos na presença de bagaço de cana com alta granulometria (1 a 2 mm) em biorreatores não-convencionais, a fim da validação dos resultados obtidos em frascos agitados em biorreatores pneumáticos de 5,0 L de volume útil.

Estudos hidrodinâmicos realizados por Esperança e colaboradores (2010, 2011) em sistemas compostos por bagaço de cana *in natura* e água reportam a viabilidade da operação destes sistemas em biorreatores pneumáticos de 2,0 e de 5,0 L de volume útil. Foram avaliadas as configurações *airlift* de cilindros concêntricos, *airlift* tipo *split* e coluna de bolhas, com diferentes granulometrias de bagaço de cana *in natura* e explodido ( $0,212 < dp(\text{mm}) < 0,710$ ) e vazões de ar de 2 a 6 vvm para reator *airlift* de 5,0L. Os estudos mostraram que é possível a operação de sistemas bagaço de cana e água com carga de sólidos de até 1% m/v mantendo-se bons padrões de escoamento e de transferência de oxigênio.

No entanto, nos ensaios fermentativos realizados no presente trabalho a esterilização do bagaço de cana *in natura* imerso no meio de cultivo foi necessária, além do fato de que o bagaço de cana possuiu uma granulometria maior, entre 1 e 2 mm. A esterilização promoveu a adsorção de água do meio de cultura pelo bagaço de cana, causando aumento de sua densidade. Isto afetou a operação dos biorreatores *airlift* pela dificuldade de recirculação dos sólidos devido à sua sedimentação na região de escoamento de descida e na região abaixo dos aspersores.

As dificuldades encontradas na operação deste sistema nos biorreatores tipo *airlift* de cilindros concêntricos e *split* podem ser avaliadas e possivelmente contornadas através de alterações na geometria dos reatores

e/ou na utilização de menores granulometrias dos sólidos. No entanto, estas não foram alternativas viáveis neste trabalho, sobretudo pela necessidade de manutenção da granulometria do bagaço para validação dos resultados obtidos em escalas menores.

O biorreator pneumático tipo coluna de bolhas, no entanto, forneceu bons desempenhos nos testes realizados, com a ressalva de que para uma eficiente aplicação do biorreator coluna de bolhas nos cultivos com *A. niger* na presença de bagaço de cana em alta granulometria, fizeram-se necessárias algumas adaptações como, por exemplo, nos sistemas de inoculação e amostragem.

#### **5.4 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PREPARAÇÃO DO INÓCULO EM BIORREADORES PNEUMÁTICOS – VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os biorreatores coluna de bolhas de 5,0L de volume útil foram equipados com sistemas de monitoramento de oxigênio dissolvido (OD) e controles de pH e temperatura. O pH foi ajustado através da adição de soluções diluídas de HCl 1M e NaOH 2M e os níveis de espuma controlados com a adição de anti-espumante.

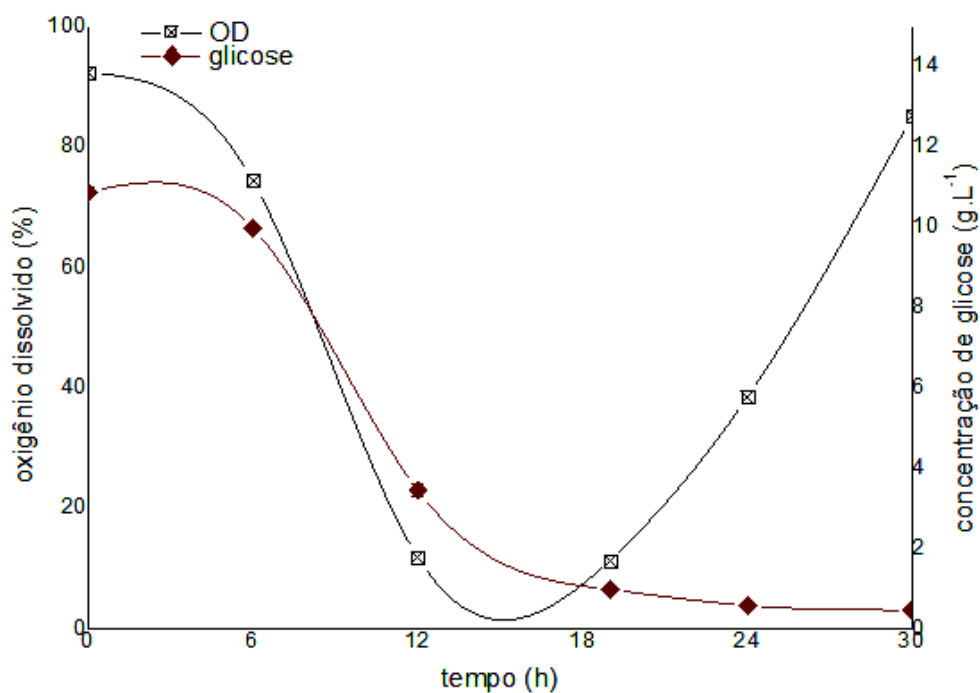
##### **5.4.1 Produção de celulasas em biorreator coluna de bolhas em pH 6,0 com inóculo não-convencional**

Nesta etapa realizou-se ensaios em duplicata reproduzindo-se as melhores condições obtidas em menor escala (frascos agitados). Foi utilizado o

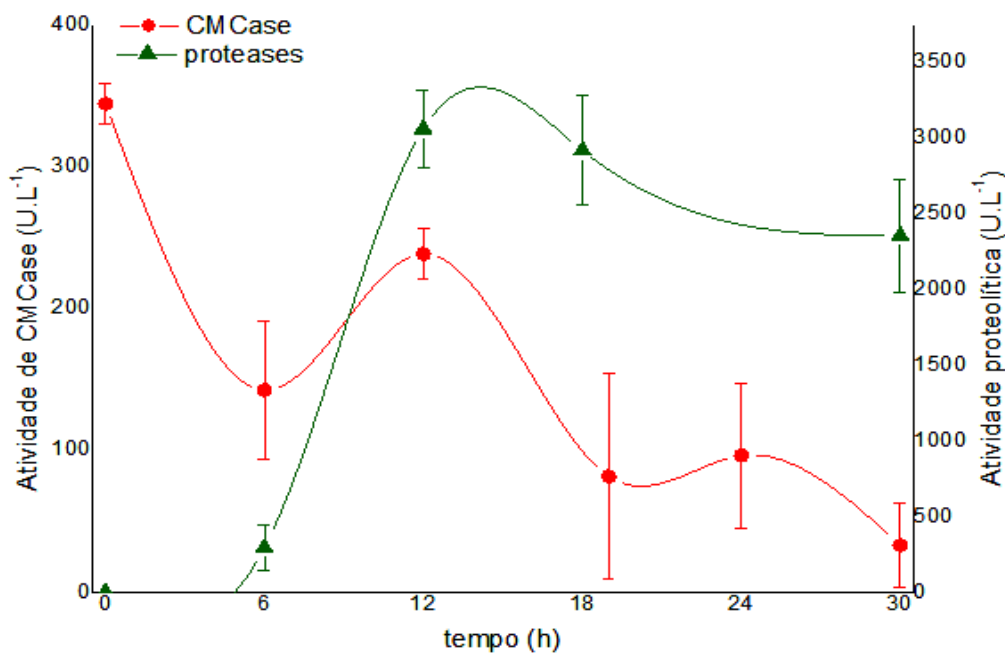
inóculo não-convencional, preparado com etapa inicial em FES, e o pH dos cultivos foi fixado em 6,0.

Os resultados obtidos para concentrações de glicose e de oxigênio dissolvido (OD) e atividades enzimáticas de CMCase e proteases são apresentados nas Figuras 5.7 e 5.8.

Pode-se observar na Figura 5.7 um rápido consumo da fonte de carbono (glicose) associado a um rápido decaimento do OD nas primeiras horas de cultivo (entre 12 e 18 h). Além disso, a Figura 5.8 apresenta as atividades enzimáticas de CMCase e proteases obtidas.



**Figura 5.7** Concentrações de glicose e de OD em função do tempo de cultivo com o inóculo não-convencional e pH 6,0



**Figura 5.8** Atividades enzimáticas (U.L<sup>-1</sup>) de CMCase e proteases em função do tempo de cultivo com o inóculo não-convencional e pH 6,0

Os resultados obtidos sugerem que os altos coeficientes de transferência de massa nos cultivos em biorreator coluna de bolhas favoreceram um rápido crescimento celular associado ao rápido consumo de glicose e oxigênio dissolvido ao longo da fermentação.

O intervalo de tempo imediatamente antes e após o esgotamento da fonte de carbono corresponde aos valores máximos de atividades enzimáticas obtidas e o aumento da concentração de OD associado aos altos valores de concentração de proteases no meio após a exaustão da fonte de carbono sugerem o decaimento da concentração celular e lise após 18 h.

Apesar do rápido padrão de consumo de glicose nos cultivos, os índices de CMCase ( $239 \pm 17$  U.L<sup>-1</sup>) obtidos nestas condições, no entanto, foram baixos até mesmo em comparação com os obtidos nas etapas anteriores em frascos agitados. Além disso, as baixas atividades de CMCase podem ser justificadas pela presença de uma alta atividade de proteases no caldo fermentativo, que alcançaram valores em torno de  $3065 \pm 254$  U.L<sup>-1</sup>.

Atividades de proteases desta ordem foram obtidas por O'Donnel e colaboradores (2001) em cultivos com *A. niger* recombinante, em biorreator tanque agitado de 15 L em condições ácidas com pH livre. Após adotada estratégia de controle de pH, a atividade foi reduzida em até 6 vezes, embora os autores tenham observado que a alteração de pH causa a síntese de um espectro diferente de proteases, o qual pode ter atividade total maior ou menor em cada caso.

A adição de inibidores de proteases nas etapas de separação e purificação possibilita a obtenção de coquetéis enzimáticos mais estáveis. Além disso, há estudos que aplicam inibidores de proteases na etapa de produção das enzimas. Illanes e colaboradores (1988) estudaram a estabilidade de celulases produzidas por *T. reesei*. A adição do inibidor PMSF (*phenylmethylsulphonyl fluoride*) ao caldo na fase estacionária de cultivo permitiu que as exoglucanases, que se degradavam na fase estacionária de crescimento do fungo, se mantivessem mais estáveis. A adição do inibidor de proteases promoveu a inativação das proteases conferindo completa proteção das enzimas e evitando a perda de atividade enzimática.

Anthony e colaboradores (2003) estudaram a inibição de proteases durante a fermentação para a produção de xilanases por uma linhagem de *A. fumigatus* resistente à alcalinidade. Foi obtido que a adição de  $\text{CuSO}_4$  ao cultivo provocou desativação total das proteases enquanto a xilanase permaneceu ativa. A adição deste inibidor na fermentação possibilitou o aumento da produção de xilanase em três vezes.

Outras alternativas para a redução do nível de produção de proteases, além de controle do pH e o uso de inibidores de proteases já citados, são a imobilização celular e a otimização da composição do meio de cultivo para redução da quantidade de fontes orgânicas de N. Porém, uma vez que o pH do meio de cultivo tem forte influência na produção enzimática de vários processos e as estratégias de controle de proteases pelo controle do pH tem gerado bons resultados (O'DONNELL e colaboradores, 2001), esta alternativa foi escolhida.



É fato conhecido que as espécies as *Aspergillus* são capazes de produzir proteases ácidas, básicas ou neutras (CASTRO e colaboradores, 2009). Embora as proteases de *Aspergillus niger* sejam predominantemente ácidas, devido à tendência que estas espécies apresentam de acidificar o meio de cultivo, a literatura diverge sobre um pH ótimo para expressão destas enzimas, pois estas dependem não somente da linhagem utilizada como também da composição do meio de cultivo e das condições de operação, sendo reportados como melhores para expressão de proteases, valores de pH em intervalos muito amplos, de 4,0 a 7,0 (O'DONNEL e colaboradores, 2001; AHAMED e colaboradores, 2005; PARANTHAMAN e colaboradores, 2009).

O'DONNEL e colaboradores (2001) verificaram em seus estudos para controle de proteases por *A. niger* que a diminuição na atividade de proteases obtida em um caldo de cultivo é uma relação entre condições desfavoráveis para sua atividade enzimática e a variação na expressão de um espectro diferente de proteases, provocadas por variações no pH de cultivo.

Sendo assim, a estratégia adotada como tentativa de diminuição da atividade de proteases e obtenção de maiores índices de celulasas nos cultivos subsequentes foi a manutenção do pH em 5,0, o valor de pH ótimo para atividade de celulasas.

#### **5.4.2 Produção de celulasas em biorreator coluna de bolhas em pH 5,0 com inóculos convencional e não-convencional**

Nesta etapa foram realizados ensaios para a produção de celulasas em fermentador do tipo coluna de bolhas de 5,0 L de volume útil, avaliando-se o efeito dos dois tipos de preparação do inóculo. O pH foi fixado em 5,0 a fim de se minimizar a ação das proteases e aumentar a atividade das celulasas.

#### 5.4.2.1. Produção de celulases em biorreator coluna de bolhas – inóculo não-convencional

Estes ensaios foram realizados em duplicata nas mesmas condições da duplicata do item 5.4.1, com única alteração no valor do pH, agora mantido em 5,0 como estratégia para redução dos níveis de proteases.

Os resultados das concentrações de glicose e OD ao longo do tempo, também como as atividades enzimáticas obtidas, são apresentados nas Figuras 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12.

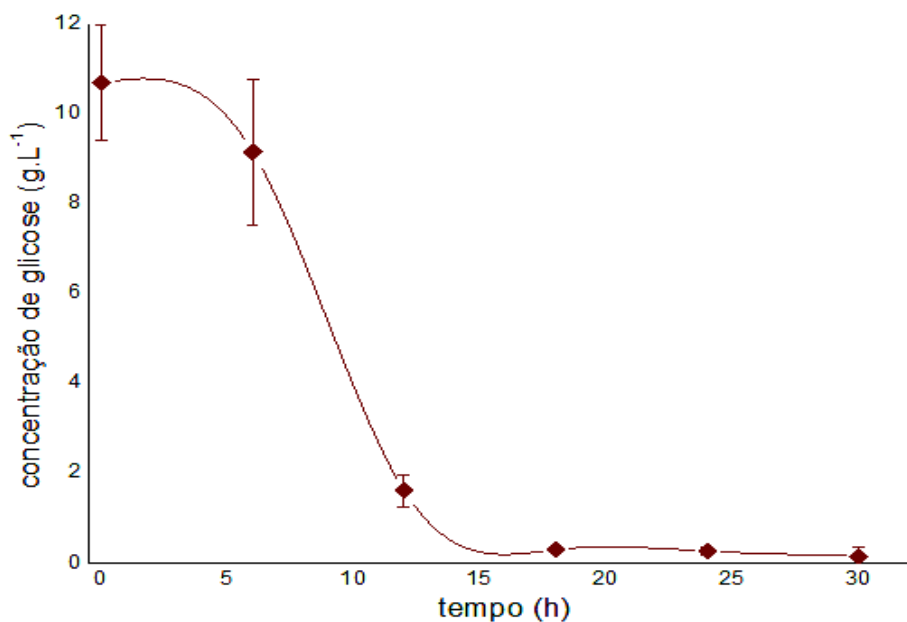


Figura 5.9 Concentração de glicose em função do tempo de cultivo com o inóculo não-convencional e pH 5,0

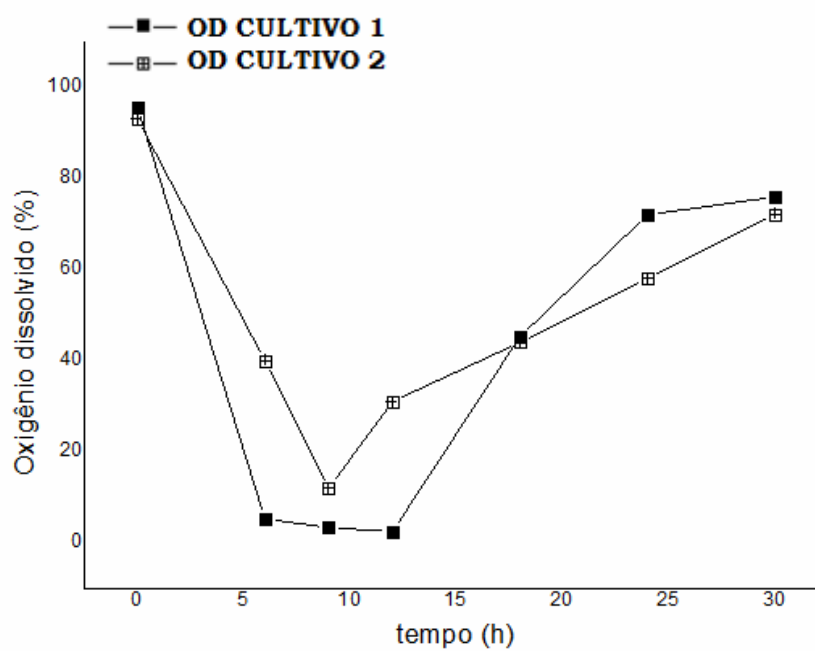


Figura 5.10 Concentração de OD em função do tempo de cultivo com o inóculo não-convencional e pH 5,0

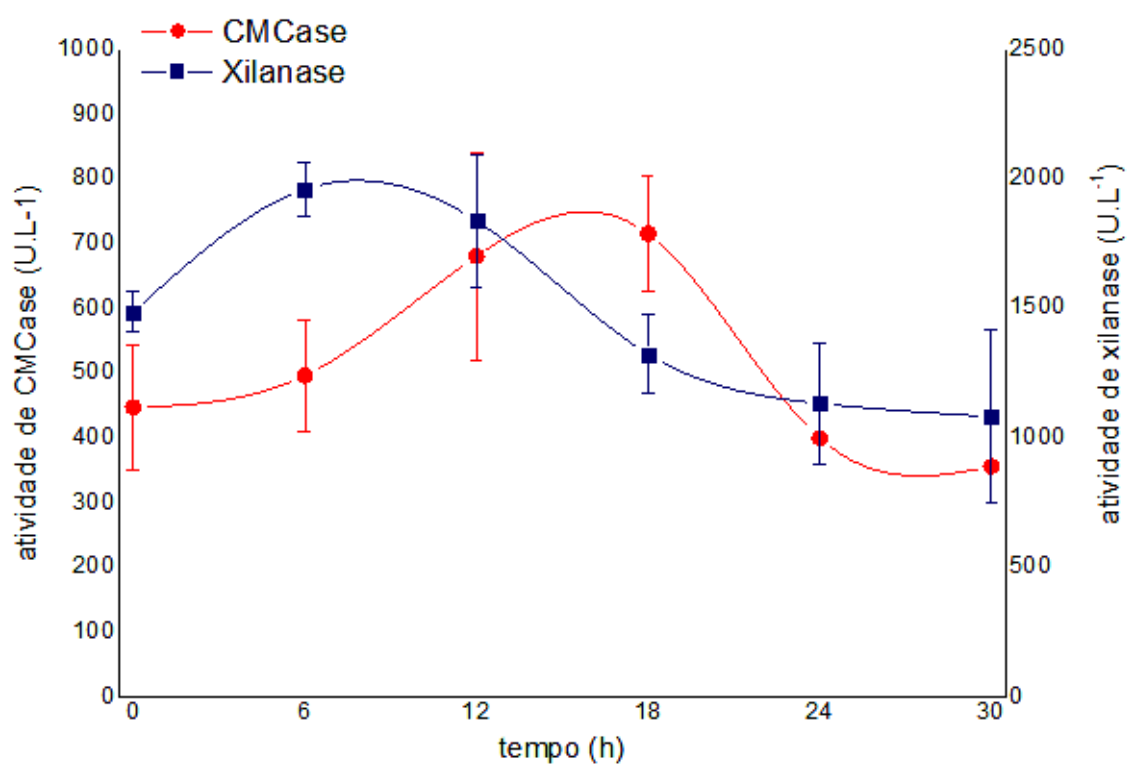
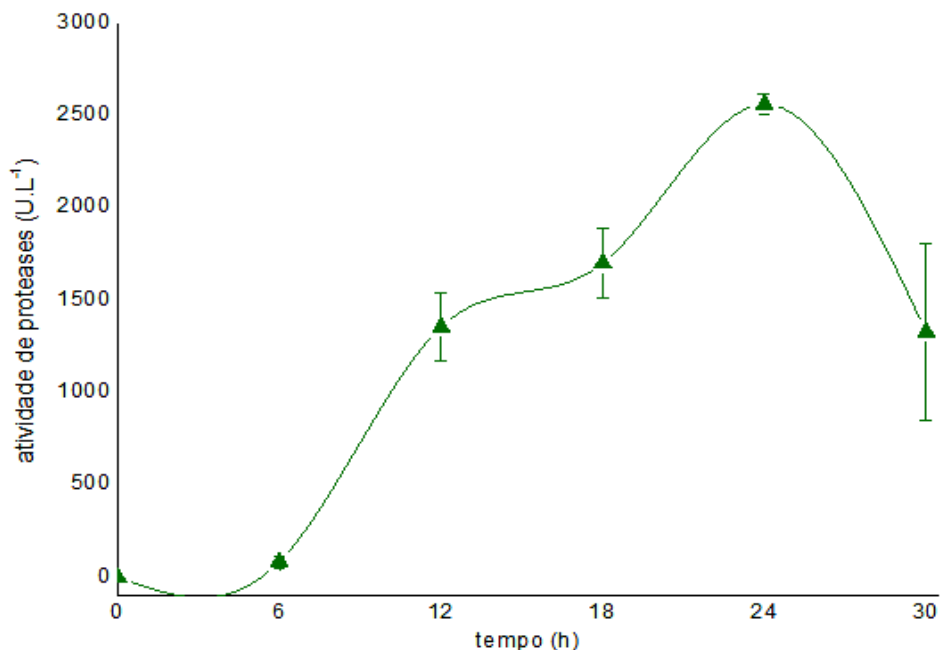


Figura 5.11 Atividades enzimáticas (U.L<sup>-1</sup>) de CMCCase e xilanase em função do tempo de cultivo com o inóculo não-convencional e pH 5,0



**Figura 5.12 Atividades de proteases (U.L<sup>-1</sup>) em função do tempo de cultivo com o inóculo não-convencional e pH 5,0**

A partir dos resultados obtidos verifica-se o rápido consumo da fonte de carbono e um decaimento mais rápido de oxigênio do que nos cultivos realizados nas mesmas condições em pH 6,0. Um maior crescimento celular já era esperado em condições mais ácidas, uma vez que em cultivos em pH livre o *A. niger* tende a acidificar o pH do meio.

O mesmo perfil de evolução de OD foi observado em função do tempo de cultivo. Seu consumo foi rápido até o esgotamento da fonte de carbono, com posterior aumento da concentração após o término da glicose (entre 12 e 18 h). Além disso, o pico obtido de atividade de CMCase foi mais uma vez próximo ao esgotamento da fonte de carbono, em 18 h de cultivo.

Pode-se observar, através dos desvios apresentados entre os cultivos realizados em duplicata, a reprodutibilidade do padrão de consumo de glicose, sugerindo o mesmo padrão de crescimento celular entre os cultivos. No entanto, devido à característica complexa do sistema de cultivo trifásico, as concentrações de oxigênio dissolvido nos meios de cultivo ao longo do tempo de cultivo diferiram entre si.

A partir da Fig. 5.11 pode-se observar, através de uma análise conjunta dos perfis de produção de CMCCase e xilanase ao longo do tempo de cultivo, que os mesmos compõem um perfil induzido de produção enzimática. É possível verificar que num primeiro momento o fungo foi induzido a produzir xilanases para a remoção de hemicelulose do substrato indutor (bagaço de cana) e, posteriormente, foi induzido a produzir CMCCase para hidrólise da celulose. O índice máximo de xilanase obtido após 6 h de cultivo foi de  $1961 \pm 102 \text{ U.L}^{-1}$ , enquanto o índice máximo de CMCCase foi de  $716 \pm 89 \text{ U.L}^{-1}$ , obtido entre 12 e 18 h de cultivo.

Observa-se ainda que ambos índices enzimáticos de xilanase e CMCCase foram muito superiores aos obtidos em pH 6,0. A mudança de pH de 6,0 para 5,0 resultou num aumento de 66% de atividade enzimática de CMCCase associado a uma redução de 17% na atividade máxima de proteases (de  $3065 \pm 254$  para  $2560 \pm 57 \text{ U.L}^{-1}$ ), evidenciando a importância do pH neste sistema fermentativo.

#### **5.4.2.2. Produção de celulases em biorreator coluna de bolhas – inóculo convencional**

Estes ensaios foram realizados em duplicata nas mesmas condições do item 5.4.2.1, porém, com a preparação do inóculo de forma convencional. Os resultados de concentrações de glicose e de OD e de atividades enzimáticas obtidas ao longo do cultivo são apresentados nas Figuras 5.13 e 5.14, 5.15 e 5.16.

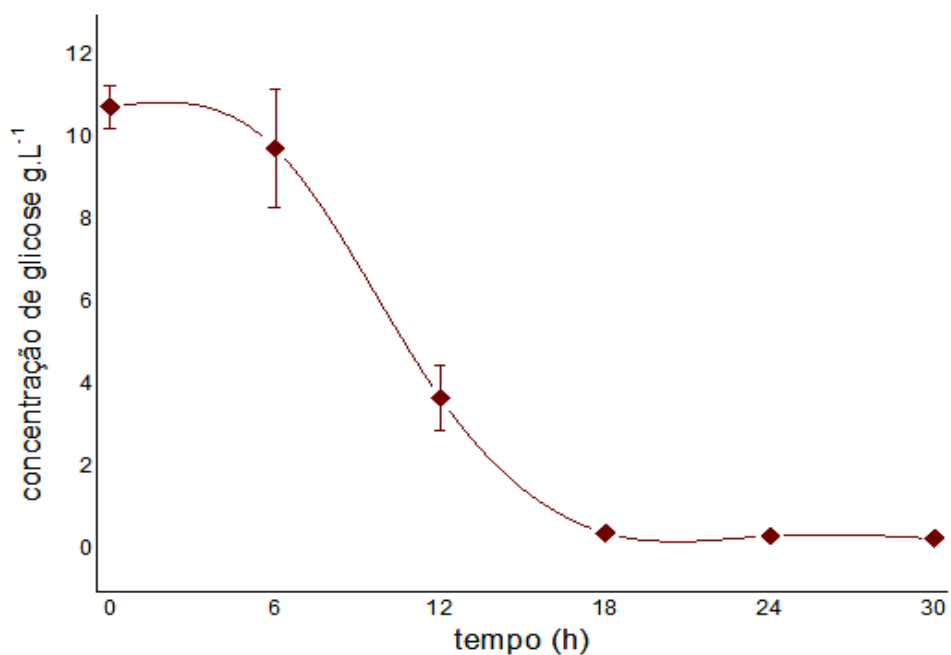


Figura 5.13 Concentração de glicose em função do tempo de cultivo com o inóculo convencional e pH 5,0

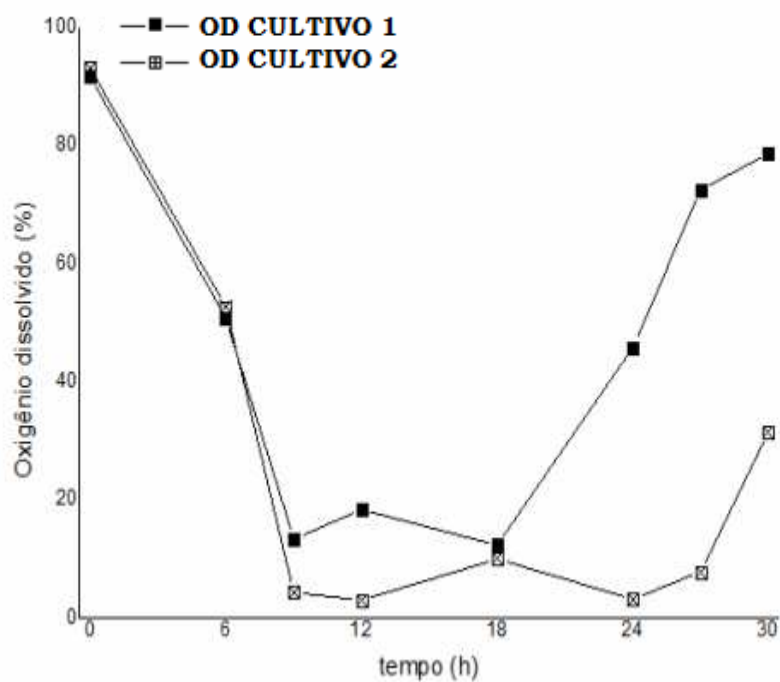


Figura 5.14 Concentração de OD em função do tempo de cultivo com o inóculo convencional e pH 5,0

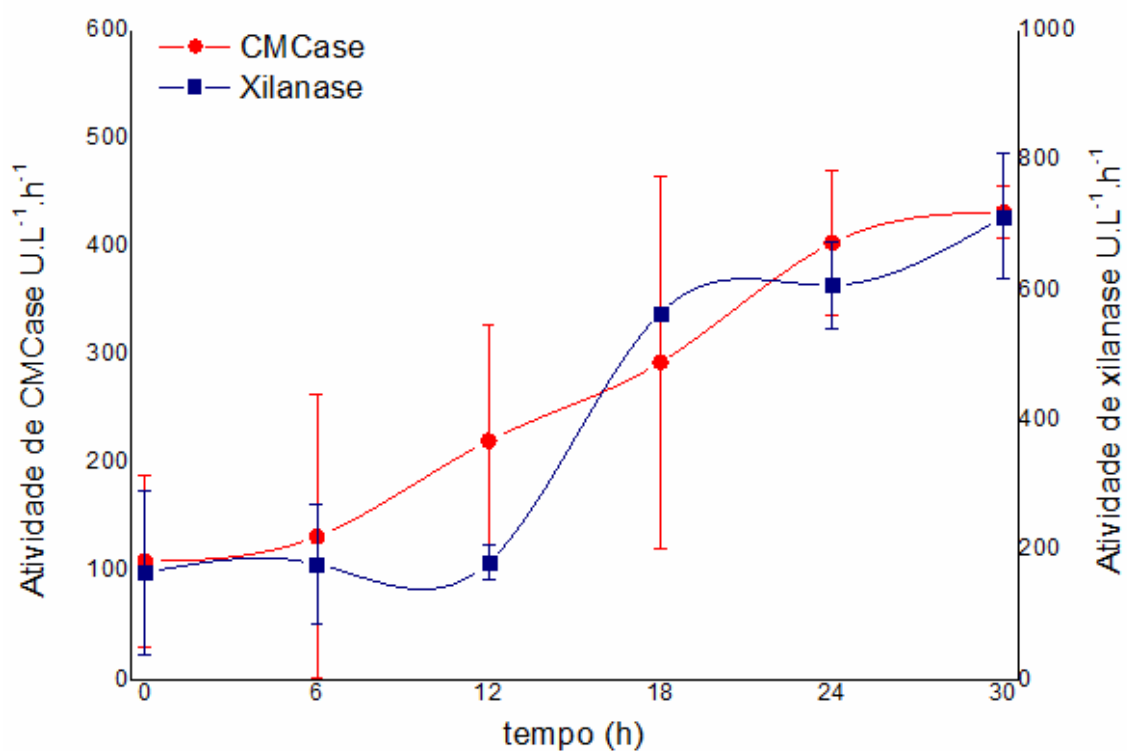


Figura 5.15 Atividades enzimáticas (U.L<sup>-1</sup>) de CMCase e xilanase em função do tempo de cultivo com o inóculo convencional e pH 5,0

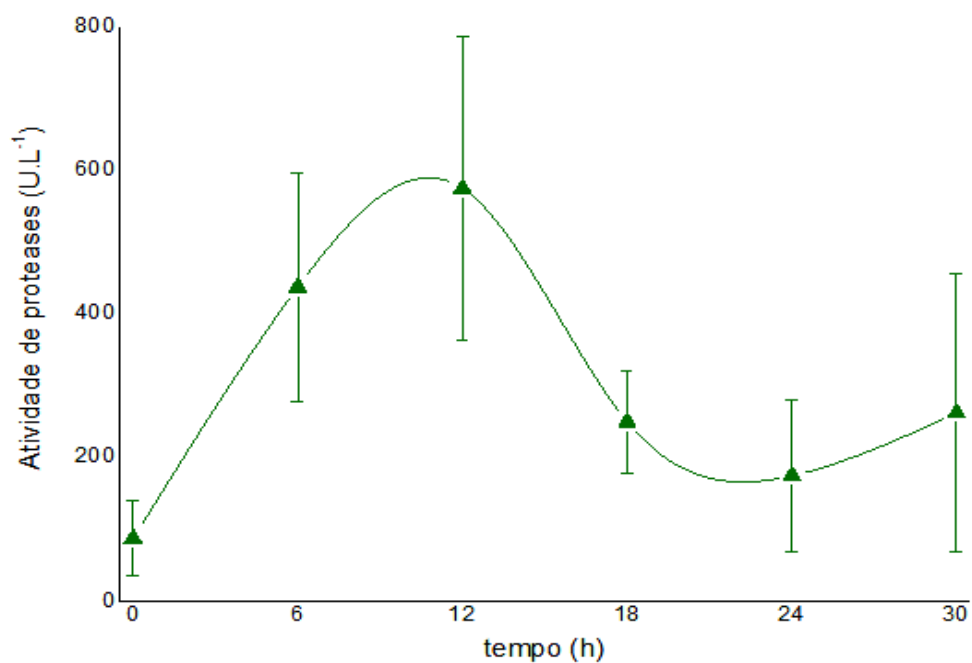


Figura 5.16 Atividades enzimáticas (U.L<sup>-1</sup>) de proteases em função do tempo de cultivo com o inóculo convencional e pH 5,0

Observa-se um rápido decaimento da concentração de OD simultâneo ao consumo da fonte de carbono. Associadas a isso, baixas atividades enzimáticas foram obtidas tanto para CMCase quanto para xilanase e proteases. A atividade de CMCase apresentou uma tendência de estabilização entre 24 e 30 h de cultivo e os valores máximos de xilanase, CMCase e proteases obtidos foram de  $714 \pm 97$ ,  $324 \pm 24$  e  $115 \pm 42$  U.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Ao contrário do perfil induzido de produção enzimática apresentado nos cultivos utilizando o inóculo não-convencional (Fig. 5.11), nos ensaios realizados utilizando o inóculo convencional (Fig 5.15) observa-se que os perfis de xilanase e celulase estão mais próximos de um perfil constitutivo de expressão enzimática, pois ambos os índices foram muito baixos e nitidamente associados ao crescimento celular, o que pode ser observado pelo padrão de consumo de glicose. Este perfil pode ser atribuído ao fato de que com o inóculo convencional o fungo não é previamente adaptado ao substrato indutor (bagaço de cana). Tal fato pode dificultar sua assimilação, quando comparado aos ensaios nos quais o fungo já estava em contato com o bagaço desde a etapa de produção do inóculo. Ainda, a morfologia de crescimento na forma de micélios aglomerados pode também ter dificultado o contato célula-indutor.

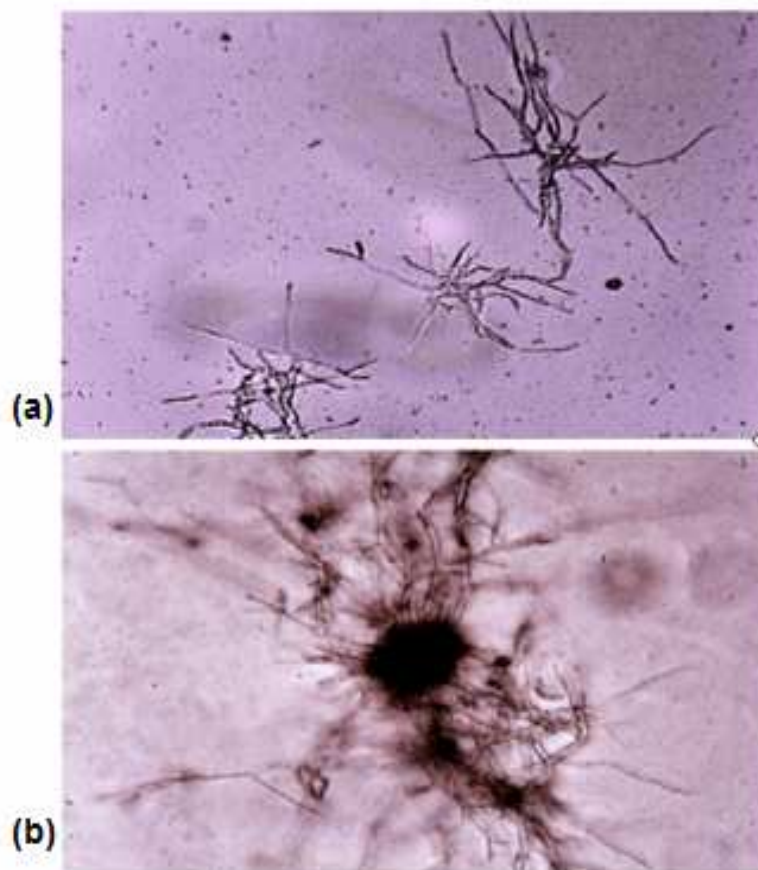
O OD em um dos cultivos apresentou tendência de subida após o esgotamento da fonte de carbono, enquanto no outro o mesmo não voltou a subir e se manteve em níveis mínimos até 27h de cultivo. Este desvio na concentração de OD e os altos desvios obtidos nas produções enzimáticas devem-se em parte à complexidade dos cultivos trifásicos, mas principalmente à característica heterogênea dos meios de cultivo, nos quais observaram-se alta viscosidade e coalescência de bolhas.

Assim como observado nos estudos realizados em menor escala (incubador rotativo), observou-se também nestes cultivos em biorreatores coluna de bolhas que o procedimento de preparação do inóculo influencia a morfologia de crescimento do fungo. A germinação do *A. niger* em etapa inicial em FES favoreceu o crescimento disperso enquanto o inóculo convencional favoreceu o crescimento na forma de aglomerados nos sistemas fermentativos,



dificultando o contato célula-substrato sólido, validando os ensaios realizados em menor escala.

A macro e a micromorfologia observadas nas fermentações para ambas as condições de preparo de inóculo são apresentadas na figura 5.17a e 5.17b. Observa-se pelas figuras que a morfologia de crescimento predominante nos cultivos com o inóculo convencional foi na forma de micélios dispersos enquanto nos cultivos com o inóculo não-convencional o crescimento predominante foi na forma de aglomerados mais porosos e flexíveis, também chamados de *clumps*, em comparação com os *pellets* densos e rígidos obtidos nos cultivos realizados em frascos agitados.



**Figura 5.17** Micromorfologia predominante após decorridas 12 h dos cultivos. (a) fermentação com inóculo não-convencional; (b) fermentação com inóculo convencional; (aumento 200x)

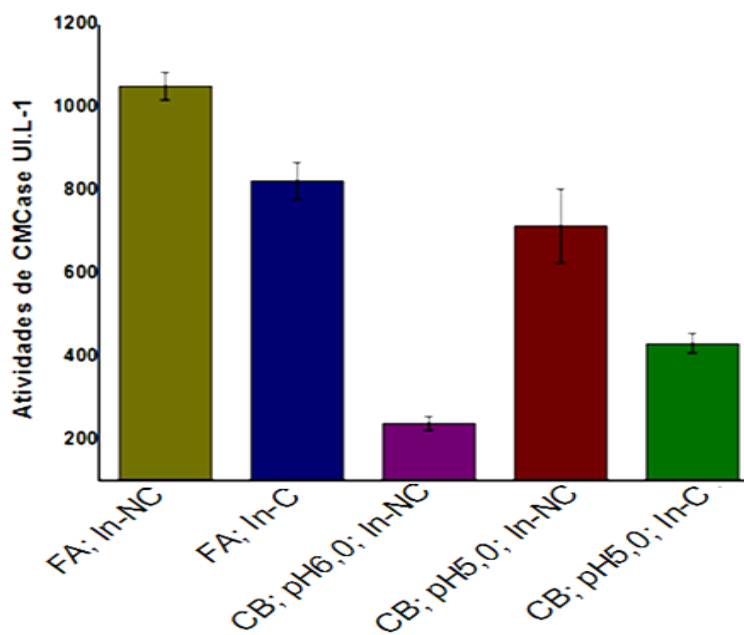
Os resultados estão de acordo com os obtidos por Gerlach e colaboradores (1998). Os autores reportaram que o tamanho dos *pellets* aumentou com o consumo da fonte de carbono e a concentração de OD decaiu devido ao aumento da viscosidade.

Do mesmo modo, Freitas e Teixeira (2001) em estudos hidrodinâmicos em biorreatores pneumáticos afirmaram que o aumento da densidade das partículas em suspensão (neste caso, os *pellets*) tem forte influência negativa na transferência de oxigênio. Somando-se a isto, Klein e colaboradores (2002) reportam que a interação dos *pellets* com as bolhas em seus estudos causou coalescência e a fragmentação de bolhas.

## **5.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TERMOS DE PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA (U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)**

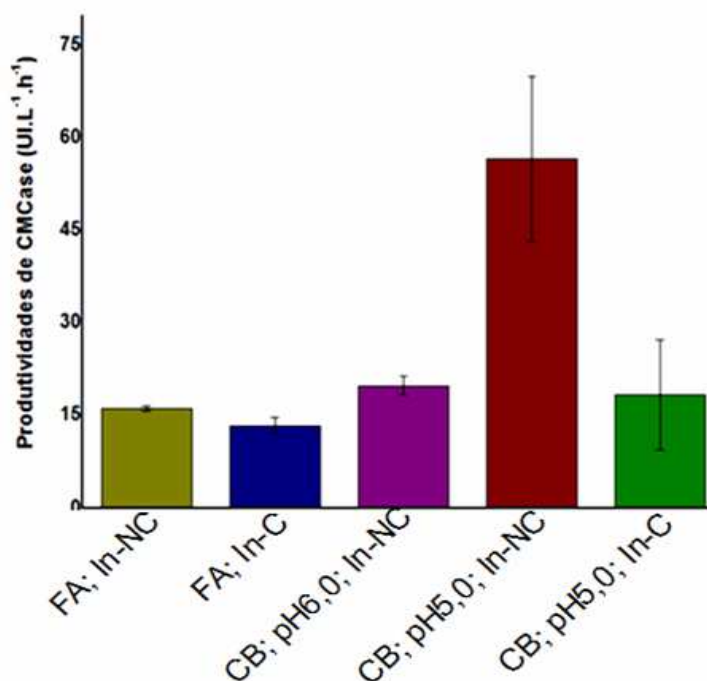
Os resultados obtidos em frasco agitados, os quais apontavam a preparação do inóculo com etapa inicial em FES vantajosa e promissora frente ao inóculo convencional, foram validados em maior escala em biorreatores pneumáticos.

Os resultados obtidos de produção e produtividade de CMCase em cada uma das cinco condições de cultivo possibilitam uma comparação entre cada condição de ensaio no que diz respeito ao tipo de inóculo, pH e tipo de biorreator e são exibidos nas Figuras 5.18 e 5.19, respectivamente.



FA: frascos agitados; CB: coluna de bolhas; In-NC: Inóculo não-convencional; In-C: Inóculo convencional.

Figura 5.18: Produção de CMCase em UI.L<sup>-1</sup> obtida a partir de cada condição de biorreator, pH e tipo de inóculo avaliados



FA: frascos agitados; CB: coluna de bolhas; In-NC: Inóculo não-convencional; In-C: Inóculo convencional.

Figura 5.19: Produtividade de CMCase em UI.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> obtida a partir de cada condição de biorreator, pH e tipo de inóculo avaliados

Comparando-se as produções e produtividades obtidas em cada uma das cinco condições avaliadas, pode-se observar que o maior pico de produção de CMCase foi obtido em frascos agitados (Figura 18). Uma possível justificativa são as condições de agitação mais amenas, que teriam favorecido um contato mais efetivo entre o fungo e o substrato sólido.

No entanto, na comparação entre as produtividades obtidas em cada ensaio (Figura 19), fica evidente na melhor condição de estudo, em pH 5,0 e inóculo não-convencional, a superioridade do biorreator coluna de bolhas, que ao proporcionar maior coeficiente de transferência de massa, possibilitou o rápido crescimento do *A. niger* e, conseqüentemente, maior produtividade volumétrica.

A partir dos resultados gerais, além de observar-se significativos ganhos em produtividade decorrentes da etapa inicial de preparo do inóculo em FES no inóculo não-convencional, corrobora-se ainda a viabilidade de utilização do biorreator coluna de bolhas em sistema multifásico com bagaço de cana.

Ainda a partir dos resultados apresentados é possível ressaltar a relevância da influência do pH nos cultivos e sua capacidade de indicador de consumo de substrato e como regulador da síntese enzimática pelo fungo filamentoso. Observou-se que a variação do pH de 6,0 para 5,0 nas mesmas condições de cultivo influenciou o crescimento do fungo, o que pode ser observado através do consumo mais rápido do substrato (glicose) em pH 5,0. Tal diferenciação de crescimento resultou em um perfil diferenciado de produção das enzimas.

As melhores condições para a produção de celulasas por *A. niger* dentre as variáveis estudadas foram a suplementação do meio nutriente com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, preparação do inóculo com etapa inicial em FES e cultivos em biorreatores pneumáticos do tipo coluna de bolhas em pH 5,0. Na Tabela 5.1 são apresentadas as produtividades volumétricas enzimáticas obtidas no presente trabalho nesta melhor condição de estudo.

Os resultados expressos em termos de produtividade volumétrica possibilitam a comparação entre os resultados obtidos no presente trabalhos e

os resultados disponíveis na literatura. O resultado de atividade de FPase, que por apresentar baixo nível de atividade e estar sujeito a desvios pontuais maiores não foi apresentado anteriormente nas figuras, está representado na Tabela 5.1 com seu respectivo valor de pico de produtividade volumétrica.

**Tabela 5.1 Comparação das atividades obtidas em diferentes escala em termos de produtividades volumétricas ( $U.L^{-1}.h^{-1}$ ) em cultivos realizados com inóculo convencional (FS) e não-convencional (FES+FS).**

Biorreator	tipo de inóculo	Produtividade CMCase ( $U.L^{-1}.h^{-1}$ )	Produtividade Xilanase ( $U.L^{-1}.h^{-1}$ )	Produtividade FPase ( $U.L^{-1}.h^{-1}$ )	autor
<i>coluna de bolhas - 5,0 L</i>	<b>FES+FS</b>	<b>57±13</b>	<b>327±17</b>	<b>10±1</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>Frascos agitados - 200 mL</i>	FS	1,48	NA	0,39	Castro et al, 2010
<i>Frascos agitados - 200 mL</i>	FS	3,6	178,6	2,7	Sales et al, 2010
<i>Coluna de bolhas - 800 mL</i>	FS	NA	758	7,8	Kim et al, 1996
<i>Tanque agitado - 3,5 L</i>	FS	NA	NA	23 a 48	Domingues et al, 2001
<b>**Cultivo em FES</b>		NA	NA	0,36	Rodríguez Zúñiga, 2010

**NA = não avaliado**

Os níveis de produtividades enzimáticas obtidos na literatura divergem de acordo com o microrganismo utilizado (que muitas vezes é recombinante), com o tipo de substrato indutor dos sistemas (que pode ser solúvel, insolúvel, *in natura* ou pré-tratado) e do tipo e escala do biorreator.

Castro e colaboradores (2010), obtiveram produtividades volumétricas de CMCase de  $1,48 U.L^{-1}.h^{-1}$  e  $0,39 U.L^{-1}.h^{-1}$  para FPase em cultivos realizados com a linhagem modelo *Aspergillus niger* ATCC-16404 em frascos agitados, em meio nutriente de Mandels e Sternberg (1969) e como fonte de carbono e indução o bagaço de cana “deslignificado”.

Domingues e colaboradores (2001), utilizando uma linhagem recombinante, *Trichoderma reesei* Rut C-30, obtiveram em cultivo batelada em biorreator tipo tanque agitado de 3,5 L e glicose+lactose como fontes de

carbono e indução, resultados que compreenderam de 23 a 48 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de FPase de acordo com a concentração de glicose utilizada.

Sales e colaboradores (2010), obtiveram produtividades de 3,6 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de CMCase, 2,7 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de FPase e 178,6 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de xilanase, respectivamente, em cultivos em frascos agitados para a produção de celulases por *A. aculeatus* na presença de bagaço de cana processado (residual das usinas).

O estudo da produção de celulases e xilanase por *A. niger* em diferentes tipos de biorreatores foi realizado por Kim e colaboradores (1996), os quais utilizaram como substrato palha de arroz moída, em granulometria não informada. Em biorreator coluna de bolhas de 0,8 L, operando em sistema de batelada foram obtidos 7,8 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de FPase e 758 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de xilanase.

No estado sólido, Rodríguez Zúñiga (2010) avaliou a produção de celulases por uma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* em cultivos utilizando bagaço de cana *in natura* como substrato na granulometria de 1 a 4 mm. Após 72 h de cultivo, foram obtidas atividades de FPase, CMCase e xilanase de 26, 983 e 2362 U.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Tais resultados correspondem a produtividades volumétricas de 0,36; 13,65 e 32,82 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de FPase, CMCase e xilanase, respectivamente. A superioridade entre a produtividade volumétrica de FPase obtida no presente estudo e a produtividade obtida por Rodríguez Zúñiga (2010) surpreende, uma vez que em FES geralmente se obtém extratos enzimáticos de 3 a 4 vezes mais concentrados.

Pelo fato de que neste presente trabalho de dissertação utilizou-se uma linhagem selvagem do *A. niger* e como substrato indutor o bagaço de cana sem nenhum pré-tratamento químico e em uma granulometria relativamente alta, entre 1 e 2 mm, era esperado que os resultados obtidos fossem inferiores aos da literatura. No entanto, em comparação com os resultados publicados, pode-se considerar os índices obtidos bastante promissores, tendo o trabalho alcançado os objetivos propostos.

## CONCLUSÕES

A partir dos ensaios fermentativos para avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de celulasas por *A. niger*, conclui-se que a adição de 10 g.L<sup>-1</sup> foi a melhor alternativa nas condições estudadas, uma vez que foi esta que foi assimilada mais rapidamente pelo microrganismo que a lactose, ao mesmo tempo em que não resultou em inibição das celulasas devido à presença do seu produto de hidrólise, a glicose, como ocorreu em concentração maior, na suplementação com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose.

Quanto ao procedimento de preparação do inóculo, pode-se afirmar que o inóculo não-convencional proposto como objeto de estudo, com etapa inicial em FES, foi superior ao inóculo convencional, uma vez que quando aplicado em sistemas fermentativos resulta na obtenção de produtividade enzimática de CMC<sub>Case</sub> até 3 vezes superior.

Uma vantagem da aplicação de uma etapa inicial em FES na preparação do inóculo é a adaptação do fungo desde a sua germinação para a assimilação desta fonte de carbono (bagaço de cana) como substrato, resultando em uma redução no período de atraso de início de produção das enzimas nos cultivos; outra abordagem é que este tipo de inóculo favorece a morfologia de crescimento na forma de micélios dispersos no meio fermentativo, facilitando o contato célula-substrato e resultando em maior produtividade.

Em relação à viabilidade de operação de biorreatores pneumáticos em sistemas multifásicos e na presença de sólidos de alta granulometria, o biorreator coluna de bolhas mostrou-se não somente uma alternativa viável como também promissora, pelo fato de que os resultados obtidos em produtividade enzimática foram da mesma ordem de grandeza de cultivos realizados com microrganismos geneticamente modificados, indutores solúveis e sistemas semi-contínuos em outros tipos de biorreatores.

Por último, conclui-se que embora a expressão de proteases e celulasas estejam interligadas e estudos de controle de valores de pH que favoreçam a síntese de uma ou outra enzima podem resultar em ganhos significativos em produtividade.



## SUGESTÕES

Após ter sido verificada a viabilidade de operação de cultivos trifásicos em biorreator coluna de bolhas na presença de bagaço de cana, várias possibilidades de abordagem relacionadas à produção de celulases podem ser realizadas, entre estas:

- Desenvolvimento de um bioprocesso para batelada alimentada;
- Estudos de caracterização do extrato enzimático produzido e testes de hidrólise;
- Estudos de avaliação do pH nas diferentes etapas dos cultivos;
- Estudos relacionados à inibição de proteases por inibidores ou através de otimização do meio de cultivo;
- Estudo de avaliação de enriquecimento da alimentação de ar com oxigênio;
- Estudos utilizando bagaços pré-tratados;
- Avaliação de diferentes substratos e combinações de bagaço de cana com outros materiais lignocelulósicos; entre outros.

## REFERÊNCIAS

ACHARYA, P.B.; ACHARYA, D.K.; MODI, H.A. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. **African journal of Biotechnology**. v.7, p.4147-4152, 2008.

AGUIAR C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do CEPPA**. v.18, n.1, p.57-70, 2000.

AHMED A.; SINGH, A.; WARD, O.P. Culture-based strategies for reduction of protease activity in filtrates from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n.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**. n.40, p.399-407, 2008.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v.49, n.3, p.379–387, 2010.

AL-MASRY, W.A.; DUKKAN, A.R. Hydrodynamics and mass transfer studies in a pilot plant airlift reactor: non-Newtonian systems. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. n.37, p.41–48, 1998.

ALVES-PRADO, H.F.; PAVEZZI, F.C.; LEITE, R.S.; OLIVEIRA, V.M. de; SETTE, L.D.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from brazilian cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 1-8, n.161, p. 333-346, 2010.

ANDRADE, L.P.; GALVÃO, C.M.A.; ATALA, D.I.P.; CASTRO e SOUZA, M.A. de; BAUDEL, H.M.; TOMÉ, J.A.T.R. Estudo comparativo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando diferentes coquetéis enzimáticos. **SINAFERM**, Natal-RN, 2009.

ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnol Advances**. Review. v.28, n.3, p.308-324, 2010.

ANTHONY, T. , RAJ,K. C., RAJENDRAN, A., GUNASEKARAN, P. Inhibition of proteases during fermentation improves xylanase production by alkali tolerant *Aspergillus fumigatus* ARI. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol. 96, No. 4. (2003), pp. 394-396, 2003.

BACCHIN, A.L.G.; CUNHA, F.M.; ZANGIROLAMI, T.C.; FARINAS, C.S. Quantificação indireta do crescimento de *Aspergillus niger* em meio contendo sólidos visando à produção de celulasas. In: **COBEQ**, Anais 2010, Foz do Iguaçu-PR. v.1. p.1-..., 2010.

BAILEY, M.J.; TAHTIHARJU, J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.62, n2-3, p.56-162, 2003.

BAILEY, M.J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*, **Applied Microbiology Biotechnology**. n.30, p.5–10, 1989.

BAJPAI, P. Xylanases <sup>a</sup>Thapar Centre for Industrial Research and Development, Patiala, Punjab, Índia **Encyclopedia of Microbiology**. (3.ed.) p.600-612, 2009.

BAYSAL, E.; PEKER, H.; KEMAL, M.; TEMIZ, A. Cultivation of oyster mushroom on waste paper with some added supplementary materials. **Bioresource Technology**. n.89, p.95-97, 2003.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. A Kinetic Model to Predict Biomass Content for *Aspergillus niger* Germinating Spores in the Submerged Culture. **Process Biochemistry**, n.41, p.1063-1071, 2006.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v.42, p.98-101, 2007.

CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**. n.98, p.2415–2457, 2007.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 212p. 2006.

CASTRO, A.M.; ALBUQUERQUE DE CARVALHO, M. L.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA JR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 151–158, 2010a.

CASTRO, A. M.; PEDRO, K.C.N.R.; CRUZ, J.C. da; FERREIRA, M.C.; LEITE, S.G.F.; PEREIRA Jr., N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant  $\beta$ -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010b.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.S1-S5, 2010.

CASTRO, R. J. S.; ABREU, R. F. A. ; PINTO, G. A. S. . Estudo das Condições de Recuperação de Protease Produzida por Fermentação Semi-sólida. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, **SINAFERM**, 2009.

CERRI, M.O. **Avaliação de transferência de calor e massa de um biorreator airlift de circulação interna de bancada para a produção de ácido clavulânico**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP, 2005.

CERRI, M.O.; FUTIWAKI, L.; JESUS, C.D.F.; CRUZ, A.J.G.; BADINO, A.C. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. n.39, p.51–57, 2008.

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

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**. v.23, n.170, p. 501-505, 1947.

CHINN, M.S.; NOKES, S.E.; STROBEL, H.J. Screening of thermophilic anaerobic bacteria for solid substrate cultivation on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**. n.22, p.53–59, 2006.

CHISTI, M.Y. **Air-Lift Bioreactors**. New York, Elsevier. 1989.

COUGHLAN, M.P.; McHALE, A. Purification of  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. **Methods in Enzymology**. v.160, p.437-443, 1988.

COURI, S.; FARIAS, A.X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, v.26, p.314-317. São Paulo, 1995.

DE VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. n.65, p.497-522, 2001.

DHARMAGADDA, V.S.; NOKES, S.E.; STROBEL, H.J.; FLYTHE, M.D. Investigation of the metabolic inhibition observed in solid-substrate cultivation of *Clostridium thermocellum* on cellulose. **Bioresource Technology**. v.101, n.15, p.6039-6044, 2010.

DILLON, A.J.P, ZORGI C., CAMASSOLA, M.; HENRIQUES J.A.P. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.70, p.740–746, 2006.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.; FONSECA, L.P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**. v.26, n.5-6, p.394-401, 2000.

DOMINGUES, F.C.; QUEIROZ, J.A.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**. v.23, n.10, p.771-775, 2001.

EL ENSHASY, H.; KLEINE, J. AND RINAS, U. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**. V.41, P. 2103–2112, 2006.

ESPERANCA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; FARINAS, C.S. ; CERRI, M.O.; CUNHA, F.M.; BADINO, A.C. Estudo da transferência de oxigênio em reator *airlift* contendo bagaço de cana-de-açúcar. In: **COBEQ**. Anais 2010, Foz do Iguaçu, 2010.

ESPERANÇA, M. N. ; FARINAS, C. S.; BADINO, A.C. ; Transferência de Massa em Biorreatores Pneumáticos operando com Suspensões de Bagaço de Cana de Açúcar. In: **SINAFERM**, 2011, Caxias do Sul. Anais, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul : Educs, 2004.

FARINAS, C.S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; NETO, V.B.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 22 – **EMBRAPA**. p.17, 2008.

FASANELLA, C.C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), 2009.

FAO, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Brasília. 2009. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>>. Acessado em out. 2009.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York :Waster & Grugter, 613p ,1984.

FONTANA R.C.; POLIDORO T.A.; SILVEIRA, M.M. da, Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**. n.100, p.4493–4498, 2009.

FREITAS, C.; TEIXEIRA, J.A. Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. **Chemical Engineering Journal**. v.84, p.57-61, 2001.

GARCIA-KIRCHNER, O.; SEGURA-GRANADOS, M.; PASCUAL, P. R. Effect of media conditions on production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus Níger* C-6. Departamentos de Bioprocesos y Biología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, **Instituto Politécnico Nacional**. México, 2005.

GERLACH, S. R. ; SIEDENBERG, D. ; GERLACH, D. ; SHTIGERL, K. ; GIUSEPPIN, M. L. F. e HUNIK, J. . Influence of reactor systems on the morphology of *Aspergillus awamori*. Application of neural network and cluster analysis for characterization of fungal morphology. **Process Biochemistry**. Vol. 33, No. 06, pp. 601-615, 1998.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**. n.101, p.4775-4800, 2010.

GONG, C.S.; TSAO, G.T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Processes**. v.3 (supl.), p.111-139, 1975.

GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A. ; BON, E.P.D.S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**. v.51, n.1-2, p72–78, 2010.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2.ed. New York : Wiley-Liss, 458p, 1994.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R.P. **Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation**. Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina. Peru. n.456, 1997.

HECK, J.X. **Produção, purificação e caracterização de xilanases (EC 3.2.1.8) excretadas por isolados amazônicos de *Bacillus* em cultivo semi-sólido**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. 2005.

HÖLKER U, H.M., LENZ, J, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.64, p.175-186, 2004.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANCEN, E.L.; HOWARD, R. Lignocellulosic biotechnology: issue of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.** v.12, n.12, p.602-619, 2003.

HU, H.L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B.S.; WÖSTEN, H. A. B.; GU, J.D.; DE VRIES, R.P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration Biodegradation.** 2010.

ILLANES, A., GENTINA, J. C. E MARCHESE, M. P. Production and stabilization of cellulases from *Trichoderma reesei*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** Volume 4, Number 4, 407-414, 1988.

JAKOBSEN, H.A.; LINDBORG, H.; DORAO, C.A. Modeling of bubble column reactors progress and limitations. **Industrial and Engineering Chemistry Research.** v.14, n.44, p.5107-5151, 2005.

JAYANT, M.; RASHMI, J.; SHAIENDRA, M.; DEEPESH, Y. Production of cellulase by different co-culture of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* from waste paper, cotton waste and baggase. **Journal of Yeast and Fungal Research.** v.2, n.2, p.24–27, 2011.

JOINT GENOME INSTITUTE. Disponível em <<http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>> Acessado em mai. 2011.

JORNAL CANA. Disponível em <[http://jornalcana.mobi/mobile\\_jc/cana.php?id=43428](http://jornalcana.mobi/mobile_jc/cana.php?id=43428)> Acessado em jun. 2011.



JURAŠČÍK, M.; HUCÍK, M.; SIKULA, I.; ANNUS, J.; MARKOŠ, J. Influence of biomass on hydrodynamics of an internal loop airlift reactor. **Chemical Papers**. V.6, n.60, p.441–445, 2006.

KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG S.I.; KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. n.91, p.153-156, 2004.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**. n.40, p.2263–2283, 2005.

KAWASE, T.; HASHIMOTO, N. Gas holdup and oxygen transfer in three-phase external-loop airlift bioreactors: non-Newtonian fermentation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** n.65, p.325–334, 1996.

KIM, S.W., KANG, S.W. & LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology** n.59, p.63-67. (1997)

KLEIN J.; ROSENBERG, M.; MARKOŠ, J.; DOLGOŠ, O.; KROŠLÁK, M.; KRIŠTOFÍKOVÁ, L'. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* — study of mass transfer in an airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v. 3, n.10, p.197–205, 2002.

KLEMM D, HEUBLEIN B, FINK H P, BOHN A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, Vol. 44, No. 22. pp. 3358-3393, 2005.

KOCHER, G.S.; KALRA, K.L.; BANTA, G.. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. **The Internet Journal of Microbiology**. v. 5, 2008.

KUBICEK, C.P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for biofuels**. n.2, 2009.

LEE,C.K.; DARAH, I.; IBRAHIM, C.O. Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. **Biotechnology Research International**. 2011.

LI, Q.; HARVEY, L.M.; McNEIL, B. The effects of bioprocess parameters on extracellular proteases in a recombinant *Aspergillus niger* B1-D. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.2, n.78, p.333-341, 2008.

MAEDA, R.N.; SILVA, M.M.P.; SERPA, V.I.; POLIKARPOV, I.; PEREIRA Jr., N. Produção de celulases de *Penicillium funiculosum* por fermentação submersa. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - **SINAFERM** 2009. Natal-RN, v.1, p.14-20, 2009.

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

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Fermentation Technology**. n.54, p.256-286, 1976.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**. Washington, v.95, p.391-414, 1969.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química. Brasil. 2009.

MENEZES, T.J.B.; LAMO, P.R. de; ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. **Coletânea do ITAL**. v.7, p.91-96, 1976.

METZ, B., KOSSEN, N.W.E. The growth of molds in the form of pellets - a literature review. **Biotechnol Bioeng**. n.19, p.781-799, 1997.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY. Michigan, 2011. Disponível em <[http://bioenergy.msu.edu/fuels/ethanol/cellulosic\\_ethanol.shtml](http://bioenergy.msu.edu/fuels/ethanol/cellulosic_ethanol.shtml)>. Acessado em: mai. 2011.

MIETTINEN-OINONEN, A. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. VTT Publications, Finlandia, fev. 2004.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**. v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., BEROVIC, M (Eds.) **Solid-State Fermentation. Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation**. Springer, Berlin, Germany, p.38-41, 2006.

MOSIER, N.S.; 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, n.2005, p.673-686. [S.I.], 2004.

MUTHUKRISHNAN, R. Characterisation of cellulase from organisms isolated from rumen fluid. **Pharmaceutical Reviews**. v. 3, n.5, 2007.

O'DONNELL, D.; WANG, L.; XU, J.; RIDGWAY, D.; GU, T., MOO-YOUNG, M. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. **Biochemical Engineering Journal**. v.3, n.8, p.187–193, 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. **Food and Bioprocess Technology**. Volume 3, Number 4, 528-536, 2008.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova** [online]. 2010, vol.33, n.7, pp. 1549-1558

ONKEN, U.; WEILAND, P. Airlift fermenters: construction, behavior, and uses. **Advances in biotechnological processes**. n.1, p.67–95, 1983.

PANDEY, P.S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. n.77, p.149–162, 1999.

PAMBOUKIAN, D.C.R. **Influência das concentrações de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori***. São Paulo, 1997. Dissertação de Mestrado - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**. v.22, n.3, p.189-259, 2004.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos fungos**. 2.ed. v.1, p.605. Santa Cruz do Sul : EDUNISC, 2002.

RAGHAVARAO, K.S.M.S; RANGANATHAN, -T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. n.13, p.127–135, 2003.

RITTER, C.E.T.; SILVEIRA, M.M. da; DILLON, A.J.P.; FONTANA, R.C. Produção de celulases e xilanases em biorreator *airlift* de circulação interna por *Penicillium echinulatum*. **COBEQ**. Foz do iguaçu-PR, 2010.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Uberlândia. Uberlândia-MG, 2010.

ROSE, S.H.; VAN ZYL, W. H.. Exploitation of *Aspergillus niger* for the heterologous production of cellulases and hemicellulases. **The Open Biotechnology Journal** 2: 167-175. 2008.

RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos filamentosos isolados da Estação Ecológica de Juréia-Itatins São Paulo, **Brasil Revista Brasileira de Botânica**. v.27, n.2, p.205-211, abr.-jun., 2004.

SALES, M.R.; MOURA, R.B.; PORTO, T.S.; MACEDO, G.R. de; PORTO, A.L.F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus* **Pesquisa. Agropecuária Brasileira** Brasília, v.45, n.11, p.1290-1296, nov. 2010.

SALES, M. R.; MOURA, R. B.; SILVA, M. F.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species **Annals of Microbiology** p.1-8, feb. 2011.

SANTOS, R.R.M. dos. **Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 80p. 2010.

SCHÜGERL, K. **Bioreaction Engineering Volume 2:** Characteristic features of bioreactors. John Wiley and Sons, 1987.

SHEPERD, M.G.; TONG, C.C.; COLE, A.L. Substrate specificity and mode of action of cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v.193, p.67-74, 1981.

SIEDENBERG, D.; GERLACH, S.R.; CZWALINNA, A.; SCHUGERL, K.; GIUSEPPIN, M.L.F.; HUNIK, J. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors. **Journal of Biotechnology**. n.56, p.205–216, 1997.

SIKULA, I.; JURAŠČÍK, M.; MARKOŠ, J. Modeling of the fermentation in an internal loop airlift reactor. **17th European Symposium on Computer Aided Process Engineering** – 2007.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. **Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos.** Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá. Maringá - PR, Brasil. 2009.

SILVEIRA, M. L. L. **Comparação entre o desempenho do inóculo sólido e inóculo líquido para cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833.** Dissertação (Mestrado). Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2003.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: Comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**. n.100, p.6679–6681, 2009.

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

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

SOHAIL, M., SIDDIQUI, R., AHMAD, A., KHAN, S.A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology** v.6, n. 25, p.437-441, 2009.

SRIDEVI, A.; NARASIMHA, G.; RAJASEKHAR, B. Production of cellulase by *Aspergillus niger* on natural and pretreated lignocellulosic wastes. **The Internet Journal of Microbiology**. v.7, 2009.

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**. n.34, p.421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. **Bioresource Technology**. n.83, p.1-11, 2002.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 92, 305-311 (2001).

THOMASI, S. S. ; CERRI, M.L O. ; BADINO, A. C. . Average shear rate in three pneumatic bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 979-988, 2010.

TRAGER, M. Comparison of air-lift and stirred reactors for fermentation with *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Biotechnology**. n.68, p.12-116, 1989.

ÚNICA. União da Indústria de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acessado em: nov. 2010.

VERA, J.A.E. **Envolvimento da expressão basal do sistema celulolítico na indução do gene que codifica para a celobiohidrolase I em *Trichoderma reesei*: uma abordagem antisense**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 1998.

WANG, C.; JURK, D.; MADDICK, M.; NELSON, G.; MARTIN-RUIZ, C.; VON ZGLINICKI, T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. **Aging Cell**. n.8, p.311–323, 2009.

WASE, D.; McMANAMEY, W.J.; RAYMAHASAY, S.; VAID, A.K. Comparison between cellulose production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an airlift fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**. n.27, p.1166-1172, 1985.

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.