

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

FERNANDA MARISA DA CUNHA

**ESTRATÉGIAS DE MELHORIA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO
DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *Aspergillus niger* A PARTIR DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

São Carlos - SP

2015

**ESTRATÉGIAS DE MELHORIA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO
DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *Aspergillus niger* A PARTIR DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

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

Fernanda Marisa da Cunha

**ESTRATÉGIAS DE MELHORIA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO
DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *Aspergillus niger* A PARTIR DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Dr. Alberto Colli Badino Junior (PPG-EQ/UFSCar)
Co-Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas (PPG-EQ/UFSCar - Embrapa)

SÃO CARLOS

2015

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

C972em Cunha, Fernanda Marisa da.
Estratégias de melhoria do bioprocesso de produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* a partir de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração / Fernanda Marisa da Cunha. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
120 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Engenharia bioquímica. 2. Enzimas. 3. Fermentação. 4. Biorreatores. 5. Celulase. 6. Etanol. I. Título.

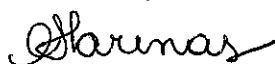
CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE FERNANDA MARISA DA CUNHA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 05 DE MARÇO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Junior
Orientador, UFSCar



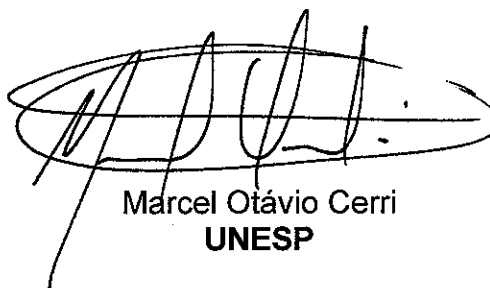
Cristiane Sanchez Farinas
Coorientadora, EMBRAPA/UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
UFSCar



Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UNESP



Everson Alves Miranda
UNICAMP

*Dedico este trabalho aos meus pais, Edson e Silvana,
Pela amizade e apoio incondicional*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Dra Cristiane e Dr Alberto, por terem me guiado no percorrer desta longa jornada. Por todas as palavras de encorajamento, por tudo o que me ensinaram e por todas as vezes que me acompanharam no laboratório durante experimentos;

Agradeço aos meus supervisores no exterior, Dr Michael Ladisch e Dr Eduardo Ximenes, por terem me recebido no LORRE durante 1 ano, por toda orientação para execução dos projetos desenvolvidos na Purdue e por todo suporte oferecido para minha adaptação no exterior;

Às professoras do DEQ UFScar que participaram da banca examinadora da minha Qualificação de Doutorado e cujas contribuições agregaram muito à tese: Professoras Dras. Teresa e Rosineide, obrigada;

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório da UFSCar, da Embrapa e da Purdue, que me apoiaram no dia-a-dia e nos intermináveis cultivos em biorreatores. O meu Muito Obrigada principalmente aos alunos que trabalharam em equipe e formaram parcerias ao longo deste período em diferentes projetos: Ana Laura, Camila, Daniel, Gabriela, Mateus, Melissa e Vanessa;

Aos profissionais, analistas e técnicos da UFSCar, Embrapa e Purdue que tanto me ensinaram e me apoiaram: Silviane, Amadeus, Linda e Tommy;

À Embrapa e ao PPG-EQ/UFSCar pela infraestrutura e suporte às atividades acadêmicas,

Ao CNPq pela bolsa de doutorado, à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior através do programa PDSE e à FAPESP pelo apoio financeiro nos projetos desenvolvidos;

Ao meu marido Brandon e nossas famílias; eu sou eternamente grata por terem compreendido a minha ausência em tantos momentos importantes e por sempre estarem ao meu lado, mesmo distantes.

“Inspiration exists, but it has to find you working.”

Pablo Picasso

RESUMO

CUNHA, F. M. **Estratégias de melhoria do bioprocesso de produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* a partir de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. 2015.

A produção de etanol de segunda geração (2G) a partir do bagaço de cana-de-açúcar é uma estratégia promissora para aumentar a produção de etanol sem necessidade do aumento da área de plantio de cana. A produção do etanol 2G compreende as etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise dos polímeros constituintes da lignocelulose à açúcares simples, fermentação alcoólica e purificação. Em busca da redução de custos no processo de produção de etanol 2G, há a demanda de desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes para a produção de celulases e de coquetéis enzimáticos com maior atividade específica na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a seleção das condições de cultivo mais favoráveis à produção de complexos enzimáticos com altos títulos enzimáticos e melhor desempenho na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G. Para tal, a implementação de estratégias de melhoria do bioprocessos de produção de celulases por *Aspergillus niger* em biorreator tipo tanque agitado foi realizada. A produção enzimática por um novo método de cultivo, denominado fermentação sequencial (FSeq), foi comparada com a do método de cultivo submerso convencional (FSm) em cultivos em frascos agitados e em biorreatores tipo tanque agitado e aerado. Cultivos foram realizados para avaliação do efeito do método de cultivo, frequência de agitação, controle de pH, pré-tratamento do bagaço de cana e de seu tamanho de partícula e do tipo de impelidor utilizado na produção enzimática utilizando bagaço de cana como substrato indutor. A maior produção enzimática foi de 1.599 e 4.212 UI.L⁻¹ de endoglucanase e xilanase, respectivamente, obtida em cultivos conduzidos com impelidor turbina de Rushton pelo método FSeq, utilizando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor de tamanho de partículas menores que 0,5 mm, frequência de agitação de 700 rpm, aeração de 0,5 vvm e pH fixo em 5,0. Cultivos empregando um impelidor tipo orelha de elefante com escoamento ascendente resultaram em produções enzimáticas ainda mais altas, de 2.712 e 5.837 UI.L⁻¹ de endoglucanase e xilanase, respectivamente. Dados os resultados superiores obtidos em cultivos conduzidos pelo novo método FSeq, foi decidido avaliar o método de cultivo FSeq utilizando diferentes linhagens de *Aspergillus sp* e também em cultivos utilizando diferentes materiais lignocelulósicos como substrato indutor, como farelo de trigo, farelo de soja, e combinações entre farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, em frascos agitados. Além do método de pré-tratamento por explosão a vapor, o qual se mostrou vantajoso para a produção de endoglucanases, o pré-tratamento hidrotérmico também foi avaliado na produção enzimática pelo método FSeq, o qual se mostrou vantajoso para a indução de xilanases. Os coquetéis enzimáticos produzidos foram aplicados na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, em combinação com um coquetel enzimático comercial, e um melhor desempenho de hidrólise foi obtido com os coquetéis produzidos pelo novo método de fermentação FSeq em comparação com os produzidos por FSm, representando ganhos percentuais de hidrólise de até 10%. Além disso, a produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com coquetéis enzimáticos produzidos por FSeq resultou em eficiência até 7% maior do que a produção de etanol a partir do bagaço hidrolisado por coquetéis produzidos por FSm. Os resultados obtidos validam que o novo método de fermentação sequencial favorece a produção de coquetéis enzimáticos não somente com maiores atividades enzimáticas, mas também com melhor desempenho no processo de produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados relacionados aos efeitos das variáveis operacionais e do método de cultivo na produção enzimática devem contribuir para o desenvolvimento de sistemas de cultivos trifásicos empregando diferentes tipos de materiais lignocelulósicos em biorreatores.

ABSTRACT

CUNHA, F. M. **Strategies for improving the bioprocess for cellulase production by *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production.** Thesis. Department of Chemical Engineering, Federal University of Sao Carlos- UFSCar. 2015.

The second generation ethanol (2G) production from sugarcane bagasse is a promising strategy to increase ethanol production per hectare. The 2G ethanol production comprises the steps of biomass pretreatment, hydrolysis of lignocellulose polymers into simple sugars, fermentation and purification. Aiming to reduce 2G ethanol production costs, the development of more efficient bioprocesses for the production of cellulase with high specificity to lignocellulose hydrolysis is needed. Therefore, the goal of this work was finding the cultivation condition more favorable to the production of enzymatic cocktails with higher performance on sugarcane bagasse hydrolysis and 2G ethanol production. In order to achieve this, the implementation of strategies to improve the bioprocess for cellulase production by *Aspergillus niger* in a stirred tank bioreactor was carried out. The enzymatic production under a new fermentation method, referred to as sequential fermentation (FSeq), was compared to the conventional submerged fermentation method in both shake flasks and stirred tank bioreactor. Experiments were performed to evaluate the effect of the fermentation method, agitation speed, pH control, sugarcane bagasse pretreatment and particle size, and impeller type on enzyme production using sugarcane bagasse as substrate. The highest enzymes production in cultivations using Rushton turbine impeller were 1,599 and 4,212 IU.L⁻¹ for endoglucanase and xylanase, respectively, in cultivations under the new FSeq method, using steam explosion pretreated sugarcane bagasse of particle sizes smaller than 0.5 mm, agitation speed of 700 rpm, aeration of 0,5 vvm and pH 5.0. Cultivations carried out using the Elephant ear up-pumping flow impeller allowed higher enzymes production of 2,712 and 5,837 IU.L⁻¹ for endoglucanase and xylanase, respectively. Given the superior performance of FSeq method in comparison to the FSm method, the decision was made to evaluate the FSeq method in cultivations employing different *Aspergillus sp* strains and with different lignocellulosic substrates, such as wheat bran, soybean meal, and mixtures of wheat bran and sugarcane bagasse, in shake flasks cultivations. Besides the steam-explosion pretreatment of the sugarcane biomass, which had shown to be favorable to endoglucanase production, the liquid hot water pretreatment was also evaluated, which was found to be favorable to xylanase induction. The enzymatic cocktails produced were employed on sugarcane bagasse hydrolysis, combined with a commercial enzyme, and the extracts produced under the FSeq method resulted in a percentual hydrolysis gain about 10% higher than FSm cocktails. Moreover, the 2G ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysates by FSeq cocktails were up to 7% more efficient than the ethanol production using FSm sugarcane bagasse hydrolysates. The results obtained here validate the new sequential fermentation method as a promising strategy for the production of enzymatic cocktails with higher enzymatic activities as well as with higher performance on sugarcane bagasse hydrolysis and 2G ethanol production in comparison to the FSm method. The findings concerning the effects of different operational variables and cultivation methods on (hemi)cellulolytic enzymes production in a stirred tank bioreactor will contribute to the development of three-phasic cultivation systems employing different types of lignocellulosic biomass in bioreactors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1G** primeira geração
- 2G** segunda geração, referindo-se ao etanol celulósico
- BCB** biorreator pneumático tipo coluna de bolhas
- BIn** bagaço de cana-de-açúcar *in natura*
- BEx** bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor
- BHid** bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método hidrotérmico
- BTA** biorreator tipo tanque agitado e aerado
- Dp** diâmetro de partícula (em mm)
- EEUP** impelidor tipo orelha de elefante de escoamento ascendente (*Elephant Ear with up-pumping*)
- FES** fermentação no estado sólido
- FS** farelo de soja
- FSm** fermentação submersa
- FSeq** fermentação sequencial
- FT** farelo de trigo
- PA** para análise (reagente com alto grau de pureza)
- TR** impelidor tipo turbina de Rushton (turbina de 6 pás planas)

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
Capítulo 1 - Introdução e Objetivos	1
1.1 Introdução	2
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo geral	5
1.2.2 Etapas do projeto	5
1.3 Estrutura do trabalho	7
Capítulo 2 –Revisão Bibliográfica	9
2.1 Contextualização do etanol celulósico	10
2.2 Enzimas (hemi)celulolíticas e hidrólise de materiais lignocelulósicos	12
2.2.1 Celulases	12
2.2.2 Xilanases	14
2.3 Produção de celulases e xilanases	15
2.3.1 Fungos filamentosos produtores de (hemi)celulases	16
2.3.2 Substratos para a produção de (hemi)celulases	17
2.3.3 Métodos de cultivo	20
2.3.4 Método de fermentação sequencial (FSeq)	22
2.3.5 Tipos de biorreatores	24
2.3.6 Variáveis operacionais de cultivos em biorreatores	25
2.4 Análise da revisão da literatura	27

Capítulo 3 - Cultivos em biorreator tipo tanque agitado para a produção de (hemi)celulases a partir de bagaço de cana-de-açúcar.....	28
3.1 Introdução	29
3.2 Materiais e métodos	31
3.2.1 Substrato.....	31
3.2.2 Microrganismo.....	32
3.2.3 Meio nutriente.....	32
3.2.4 Estratégias de planejamento experimental	33
3.2.5 Condições de Pré-cultivo.....	34
3.2.6 Cultivos em FSm e FSeq para produção enzimática.....	35
3.2.7 Métodos analíticos	36
3.3 Resultados e discussões.....	37
3.3.1 Cultivos preliminares em frascos Erlenmeyer: Efeito dos métodos de cultivo, pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e tamanho de partícula na produção enzimática	37
3.3.2 Efeitos das condições operacionais em cultivos em BTA	41
3.3.2.1 Efeito da frequência de agitação e do métodos de cultivo na produção de (hemi)celulases	41
3.3.2.2 Efeito do pré-tratamento da biomassa, frequência de agitação e controle de pH na produção de (hemi)celulases	43
3.3.2.3 Efeito do tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar na produção de (hemi)celulases	46
3.3.6 Efeito do tipo de impelidor na produção de (hemi)celulases em cultivos trifásicos em biorreator tipo tanque agitado e aerado utilizando bagaço de cana-de-açúcar	49
3.4 Conclusões	55
Capítulo 4 - Aplicação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de (hemi)celulases por <i>Aspergillus niger</i> pelo processo de fermentação sequencial.....	57

4.1	Introdução	58
4.2	Materiais e métodos	60
4.2.1	Microrganismo.....	60
4.2.2	Matéria-prima lignocelulósica.....	60
4.2.3	Meio nutriente.....	60
4.2.4	Condições de pré-cultivo	60
4.2.5	Produção enzimática	61
4.2.6	Hidrólise enzimática	61
4.2.7	Procedimentos analíticos.....	62
4.3	Resultados e discussões.....	63
4.3.1	Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de endoglucanases por <i>A. niger</i> A12.....	65
4.3.2	Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de xilanases por <i>A. niger</i> A12.....	68
4.3.3	Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.....	71
4.4	Conclusões	73

Capítulo 5 - Validação do método de fermentação sequencial para a produção de celulasas por diferentes linhagens de fungos filamentosos e aplicação na sacarificação de bagaço de cana-de açúcar.....74

5.1	Introdução	75
5.2	Materiais e métodos	76
5.2.1	Substrato.....	76
5.2.2	Microrganismos	76
5.2.3	Meio nutriente.....	77
5.2.4	Condições de pré-cultivo	77
5.2.5	Produção enzimática	78
5.2.6	Atividades enzimáticas	78

5.2.7	Concentração dos extratos enzimáticos.....	79
5.2.8	Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	79
5.3	Resultados e discussões.....	80
5.3.1	Efeito dos pré-tratamentos na composição do bagaço de cana-de-açúcar..	80
5.3.2	Produção Enzimática	81
5.3.3	Aplicação dos extratos produzidos na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	84
5.4	Conclusões	88
Capítulo 6 - Produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por coquetéis enzimáticos produzidos por diferentes métodos de cultivo ...		
89		
6.1	Introdução	90
6.2	Materiais e Métodos.....	91
6.2.1	Microrganismo.....	91
6.2.2	Matéria-prima lignocelulósica.....	91
6.2.3	Meio nutriente.....	91
6.2.4	Condições de Pré-cultivo.....	92
6.2.5	Produção enzimática	93
6.2.6	Hidrólise enzimática	93
6.2.7	Fermentação alcoólica.....	94
6.2.8	Procedimento analítico.....	95
6.3	Resultados e discussões.....	96
6.3.1	Testes preliminares de ajuste de condições de hidrólise e fermentação	96
6.3.2	Produção de extratos enzimáticos por diferentes métodos de cultivo para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol 2G.....	100
6.4	Conclusões	104
Capítulo 7 – Conclusões gerais.....		
105		

7.1	Conclusões gerais	106
7.2	Sugestões para trabalhos futuros	108
Capítulo 8 -Referências		109
Apêndice A - Artigo: "Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method"		120
Apêndice B - Artigo: "Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production"		129

Capítulo 1

Introdução e Objetivo

1.1 Introdução

No atual cenário global de alta e crescente demanda energética, associado à dependência econômica dos países em relação à variação de custos de combustíveis não renováveis e também às preocupações ambientais relacionadas às alterações climáticas, surge a necessidade de desenvolvimento de sistemas energéticos baseados em fontes renováveis, como os materiais lignocelulósicos. Uma alternativa para se atingir o maior aproveitamento desses materiais na produção de etanol e, ao mesmo tempo aumentar a produção de etanol por área de plantio, é a utilização da fração celulósica destes vegetais para a produção do etanol celulósico, chamado também de etanol de segunda geração ou etanol 2G.

O etanol 2G já se encontra em fase de produção comercial na Itália, Estados Unidos e Brasil, sendo os resíduos agroindustriais mais abundantes em cada região, como a palha de arroz e palha de trigo na Itália, palha de milho nos Estados Unidos e bagaço e palha de cana-de-açúcar no Brasil, os materiais lignocelulósicos mais utilizados como matérias-primas para a sua produção (Oscar, 2012). No entanto, a grande maioria das usinas de etanol 2G opera atualmente em escala piloto, buscando a otimização do processo de produção do etanol 2G de modo a se obter um produto competitivo no mercado.

No Brasil, o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, resíduos do processo de etanol de primeira geração, são materiais lignocelulósicos abundantes e disponíveis, sendo as matérias-primas principais para a produção do etanol 2G. A fim de viabilizar o processo de conversão da celulose contida no bagaço de cana-de-açúcar em glicose através de hidrólise enzimática, o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de enzimas celulolíticas é etapa crucial para a viabilidade econômica da produção do etanol 2G em escala industrial, uma vez que as celulasas são enzimas de alto custo (Chandel *et al.*, 2012; Singhanía *et al.*, 2010).

Pesquisas recentes apontam a relevância da produção de extratos multi-enzimáticos não somente com altos índices de atividade enzimática, mas também com uma composição direcionada ao substrato que se deseja hidrolisar (Maeda *et al.*, 2011; Prevot *et al.*, 2013). Frente à esta demanda tecnológica, o Departamento de Engenharia Química da UFSCar em parceria com a Embrapa Instrumentação vêm desenvolvendo pesquisas focadas na produção de celulasas a partir de materiais lignocelulósicos e na operação de biorreatores na presença destas partículas voltados à produção de coquetéis enzimáticos para aplicação na produção de etanol de segunda geração.

Em pesquisas anteriores, foram realizados estudos hidrodinâmicos em

biorreatores pneumáticos na presença de bagaço de cana-de-açúcar, a padronização de um inóculo com etapa inicial no estado sólido e o desenvolvimento de um novo método de fermentação para a produção de celulasas a partir de bagaço de cana-de-açúcar em biorreatores, denominado de fermentação sequencial (FSeq). Este método de cultivo foi desenvolvido fundamentado na hipótese de que a interação do fungo com o substrato indutor desde a etapa de germinação dos esporos favoreceria a produção enzimática, o que foi comprovado pelos maiores índices de produção enzimática por *Aspergillus niger* quando cultivado pelo método de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como substrato, tanto em frascos agitados quanto em biorreatores.

Apesar dos resultados promissores obtidos na FSeq, pontos-chave passíveis de melhoria deste tipo de bioprocessos foram identificados, abrindo oportunidades para o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e com menores custos, como por exemplo, com a avaliação do tamanho de partícula e tipo do substrato lignocelulósico utilizado, da configuração do biorreator e dos parâmetros operacionais durante estes cultivos.

Sendo assim, a proposta do presente projeto de doutorado foi o desenvolvimento de estratégias de melhoria do bioprocessos para a produção de enzimas celulolíticas na presença de bagaço de cana-de-açúcar através da adaptação de biorreatores tipo tanque agitado e aerado para cultivos na presença de bagaço de cana-de-açúcar. As estratégias de melhoria compreenderam a avaliação da influência do pré-tratamento do substrato bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor e de seu tamanho de partícula, a validação de desempenho do método de fermentação sequencial frente ao método submerso convencional e também a avaliação da influência de variáveis operacionais dos cultivos, como a frequência de agitação e controle de pH, na produção enzimática por *Aspergillus niger*. Os extratos enzimáticos produzidos sob as diferentes condições estudadas foram concentrados e aplicados na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, seguida por fermentação alcoólica por leveduras e os desempenhos dos extratos foram avaliados em termos de produção de etanol celulósico produzido.

Estudos adicionais de validação do método de fermentação sequencial para a produção de celulasas e xilanases utilizando diferentes resíduos agroindustriais, como farelo de trigo e farelo de soja, assim como a combinação entre o farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado foram também realizados. Adicionalmente, durante período de estágio sanduíche no Laboratório de engenharia de recursos renováveis do Departamento de Engenharia Agrícola e Biológica da Universidade de Purdue (Estados Unidos), avaliou-se a aplicação do método de cultivo sequencial com outras linhagens de fungos filamentosos, a

saber, *Aspergillus niger* A12 (selvagem), *Aspergillus niger* 3T5B8 (mutante) e *Aspergillus oryzae* P27C3 (selvagem) quando cultivados utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e pré-tratado pelo método hidrotérmico com água quente como substratos indutores.

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do projeto foi o desenvolvimento e implementação de estratégias de melhoria no bioprocessamento de produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* a partir de bagaço de cana-de-açúcar, a fim de selecionar-se a melhor condição para a produção de coquetéis com altos títulos enzimáticos e com melhor desempenho na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G. Para este fim, os impactos das características do material lignocelulósico indutor, das condições de cultivo e de parâmetros de operação de biorreatores na produção de celulasas foram investigados.

1.2.2 Etapas do projeto

Com a finalidade de se atingir o objetivo geral, o presente trabalho foi subdividido nas seguintes etapas:

- Avaliar a influência do método de cultivo (submerso convencional ou sequencial), do pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar por explosão a vapor e de seu tamanho de partícula na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em cultivos realizados em frascos agitados;
- Avaliar a influência do método de cultivo: fermentação submersa convencional (FSm) ou fermentação sequencial (FSeq), em cultivos em biorreator tanque agitado de 4,0 L utilizando-se bagaço de cana *in natura* de diâmetro de partícula de 1 a 2 mm;
- Avaliar a influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em cultivos em biorreator utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIn) ou pré-tratado por explosão a vapor (BEx) de diâmetro de partícula de 1 a 2 mm;
- Avaliar o efeito da frequência de agitação (400 e 700 rpm) na produção de enzimas celulolíticas em cultivos em biorreator utilizando BIn e BEx de diâmetro de partícula de 1 a 2 mm;
- Avaliar a influência do controle de pH na produção de celulasas durante os cultivos em biorreator;
- Selecionar o melhor diâmetro de partícula do bagaço de cana-de-açúcar em cultivos em biorreator, avaliando-se diâmetros de partícula (D_p , em mm): $D_p \leq 0,5$; $0,5 \leq D_p \leq 1$ e $1 \leq D_p \leq 2$;
- Avaliar a influência do tipo de impelidor na produção de enzimas celulolíticas,

em cultivos em biorreator com impelidores do tipo turbina de Rushton (escoamento radial) e do tipo orelha de elefante ou *Elephant Ear* com escoamento ascendente (escoamento misto);

- Estender a aplicação do novo método de fermentação sequencial (FSeq) para a produção de celulases utilizando-se diversos tipos de resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor) em cultivos em frascos agitados, e sua aplicação na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar;
- Estender a aplicação do novo método de fermentação sequencial (FSeq) para a produção de celulases por diferentes linhagens de fungos filamentosos em cultivos utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e por tratamento hidrotérmico (*liquid hot water*, LHW) em cultivos em frascos agitados, e sua aplicação na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar (projeto de estágio no exterior);
- Aplicação dos extratos enzimáticos produzidos por fermentação submersa convencional (FSm) ou por fermentação sequencial (FSeq) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado seguida por fermentação alcoólica para a produção de etanol de segunda geração.

1.3 Estrutura do trabalho

A presente tese está dividida em 8 capítulos, a saber:

- **Capítulo 1.** Apresenta a introdução, justificativa e objetivo do trabalho.
- **Capítulo 2.** Apresenta uma revisão bibliográfica dos assuntos relacionados à produção de enzimas (hemi)celulolíticas, os substratos e tipos de biorreatores utilizados nestes bioprocessos, hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e fermentação alcoólica para a produção de etanol celulósico.

Na sequência, os capítulos foram divididos de acordo com as etapas desenvolvidas a fim de cumprir o objetivo geral do projeto de tese. Cada capítulo inclui uma breve introdução ao assunto abordado, também como os materiais e métodos e procedimentos experimentais utilizados, seguidos pelos resultados e discussões de cada etapa do trabalho. São eles:

- **Capítulo 3.** Cultivos em biorreatores tipo tanque agitado para a produção de celulases a partir de bagaço de cana-de-açúcar: efeitos das variáveis operacionais e do método de cultivo
- **Capítulo 4.** Aplicação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de (hemi)celulases por *Aspergillus niger* pelo processo de fermentação sequencial
- **Capítulo 5.** Aplicação do método de fermentação sequencial para a produção de celulases por diferentes linhagens de fungos filamentosos e aplicação na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar
- **Capítulo 6.** Produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por coquetéis enzimáticos produzidos por diferentes métodos de cultivo
- **Capítulo 7.** Conclusões gerais
- **Capítulo 8.** Referências

Os resultados publicados em artigos em revistas indexadas até o momento da defesa foram incluídos na forma de apêndices:

- **Apêndice A - Artigo** "Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method"

- **Apêndice B - Artigo** "Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production"

Capítulo 2

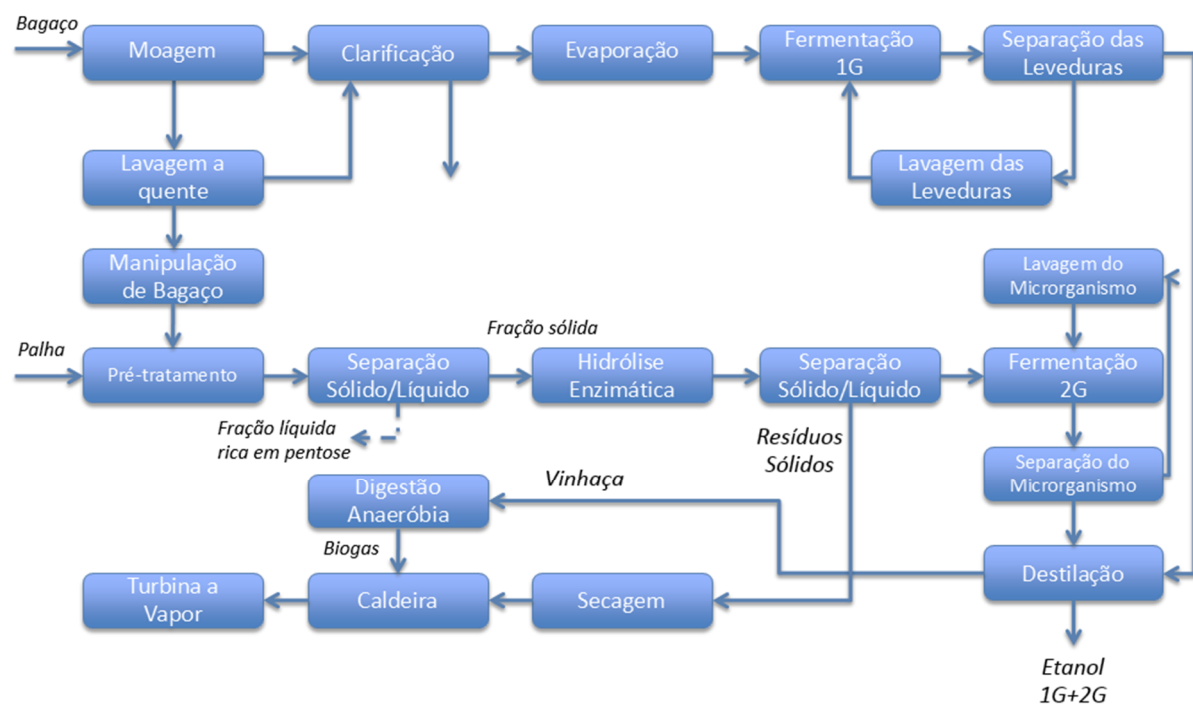
Revisão Bibliográfica

2.1 Contextualização do etanol celulósico

A necessidade de substituição dos combustíveis fósseis por fontes de energia renováveis, reduzir a dependência econômica dos países com relação ao petróleo e a preocupação de cumprimento das metas de redução de emissão de gás carbônico se refletem na busca por combustíveis renováveis e baratos, como o etanol de segunda geração (Macrelli; Galbe; Wallberg, 2014; Pandey *et al.*, 2011).

O processo de produção do de segunda geração (2G), ou etanol celulósico, é mais complexo que o processo convencional de produção de etanol 1G, que é o etanol produzido a partir da fermentação do caldo de cana concentrado. A produção do etanol 2G ocorre através de uma série de etapas: pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise, fermentação e etapas de separação e purificação. Portanto, no caso do etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar, após o pré-tratamento do material, a celulose contida no bagaço e na palha da cana-de-açúcar precisa ser primeiramente convertida à glicose através de uma etapa de hidrólise enzimática e então a glicose liberada pode ser fermentada por leveduras (Figura 2.1).

Figura 2.1 Modelo de processo integrado de produção de etanol de primeira e segunda geração.



Fonte: Modificado de: Macrelli, Galbe e Wallberg, 2014.

O processo de sacarificação da celulose através de hidrólise enzimática e a fermentação da glicose em etanol podem ocorrer de forma sequencial (Figura 2.1), ou simultânea, cujos processos são respectivamente denominados por sacarificação e fermentação sequenciais (do inglês, SHF) e sacarificação e fermentação simultâneas (do inglês, SSF), sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* o microrganismo mais comumente utilizado para a produção de etanol, capaz de fermentar as hexoses presentes no hidrolisado celulósico (Sanchez; Cardona, 2008).

Atualmente, há um interesse crescente no desenvolvimento de cepas de leveduras capazes de hidrolisar não somente as hexoses, como também as pentoses derivadas da hidrólise da xilana e, deste modo, se atingir rendimentos ainda maiores na produção de etanol 2G (Weber *et al.*, 2010). Outras frentes de pesquisa também buscam avaliar os impactos de compostos tóxicos à levedura oriundos da etapa de hidrólise do material lignocelulósico, como ácidos fracos, componentes fenólicos, derivados furânicos (Sanchez; Cardona, 2008) e de sais (Casey *et al.*, 2013).

A primeira usina de etanol celulósico em escala comercial entrou em operação na Itália, em 2013, como uma iniciativa do Grupo Mossi e Ghisolfi. Capaz de processar materiais lignocelulósicos como palha de trigo, de arroz e cana do reino, a estimativa é a de produção de 50 milhões de litros de etanol 2G por ano (Novozymes, 2013). Nos Estados Unidos, usinas têm sido construídas direcionadas principalmente ao processamento da palha de milho. No Brasil, onde a produção de etanol de primeira geração (1G) é aclamada como sendo a de menor custo de produção do mundo, a utilização do bagaço de cana para a produção de etanol 2G é vista como uma alternativa promissora para a produção de um bioetanol com ainda menores impactos ambientais, principalmente se integrado às já existentes usinas de etanol 1G (Macrelli; Mogensen; Zacchi, 2012).

A primeira usina brasileira para a produção de etanol 2G foi inaugurada pela GranBio em 2014 em São Miguel dos Campos, AL, com estimativa de produção de 74 milhões de etanol por ano. A planta utiliza a tecnologia de pré-tratamento da indústria italiana Beta-Renewables, enzimas fornecidas pela Novozymes (Dinamarca) e leveduras fornecidas pela DSM (Holanda) e é capaz de colher, estocar e processar até 400 mil toneladas de biomassa por ano (Lane, 2014).

Apesar da produção comercial do etanol 2G já ser uma realidade, a redução dos custos do processo de produção e o aumento de eficiência ainda são necessários para a expansão deste produto em escala comercial no mercado de forma competitiva. Neste sentido, a obtenção de enzimas de menor custo e maior eficiência na hidrólise de materiais

lignocelulósicos a açúcares simples é um ponto-chave para a viabilização econômica do etanol 2G. Por este motivo, o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de celulases tem recebido crescente interesse por parte de centros de pesquisa e indústrias (Chandel, 2012; De Souza *et al.*, 2011).

2.2 Enzimas (hemi)celulolíticas e hidrólise de materiais lignocelulósicos

De acordo com o modelo clássico de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, as principais enzimas que atuam em sua degradação podem ser divididas em dois grupos: celulases e hemicelulases. Outras enzimas, chamadas de enzimas acessórias, auxiliam indiretamente a conversão de hidrólise da celulose à medida em que atuam na degradação dos demais componentes da parede celular, aumentando a acessibilidade das enzimas à fibra celulósica. São elas: monooxigenases, pectinases, lacases, manganês peroxidase, entre outras (Horn *et al.*, 2012; Van Dyk e Pletschke, 2012; Znameroski; Glass, 2013).

2.2.1 Celulases

As celulases, por atuarem diretamente na degradação dos polissacarídeos de celulose, liberando oligossacarídeos e monômeros de glicose, são as principais enzimas necessárias no processo de produção do etanol 2G. Há três classes principais de celulases: endoglucanase (endo-1, 4- β -D-glucanase, EG, EC 3.2.1.4); celobiohidrolase ou exoglucanase (exo-1, 4- β -D-glucanase, CBH, EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (1, 4- β -D-glicosidase, BG, EC 3.2.1.21) (Horn *et al.*, 2012; Singhanian *et al.*, 2010; Zhang; Himmel; Mielenz, 2006).

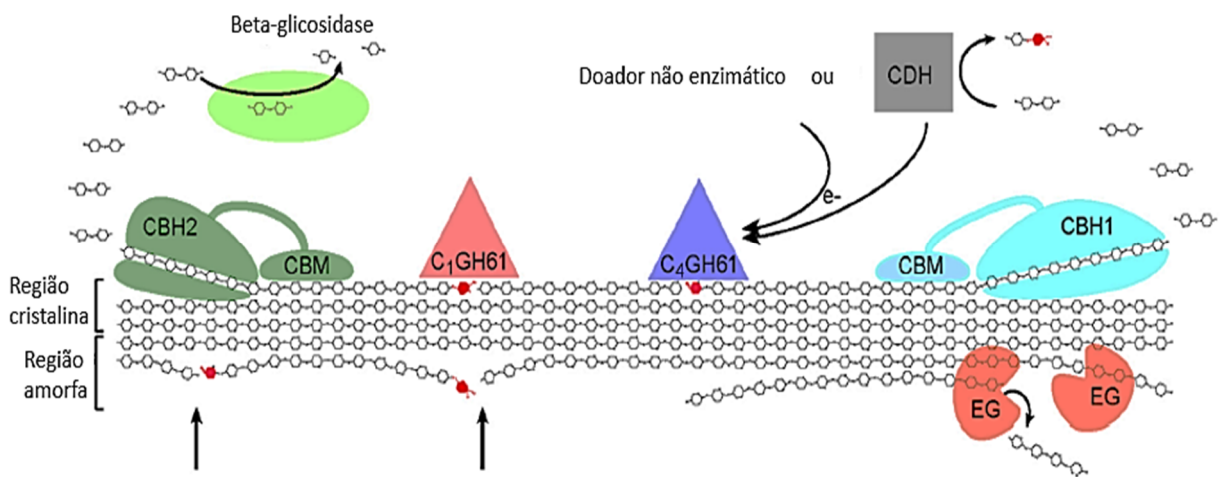
A forma de atuação destas enzimas é apresentada na Figura 2.2: enquanto as enzimas endoglucanases clivam as ligações internas e amorfas da cadeia de celulose, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, as exoglucanases (CBH1 e CBH2) atuam nos terminais redutores e não-redutores da cadeia de celulose, liberando assim oligossacarídeos e celobiose, que é hidrolisada à glicose pela ação da enzima β -glicosidase.

As celulases produzidas por fungos filamentosos, em geral, têm pH ótimo na faixa ácida (entre 4,0 e 5,0) e temperatura ótima entre 47 e 61 °C (Castro, 2006). Seu desempenho durante a hidrólise de substratos complexos como a lignocelulose pode sofrer influência de muitos fatores, entre eles a estabilidade enzimática, a sinergia entre as diferentes enzimas contidas no complexo enzimático, o estado em que a enzima se encontra e a

composição do substrato a ser hidrolisado (Heinzelman *et al.*, 2009).

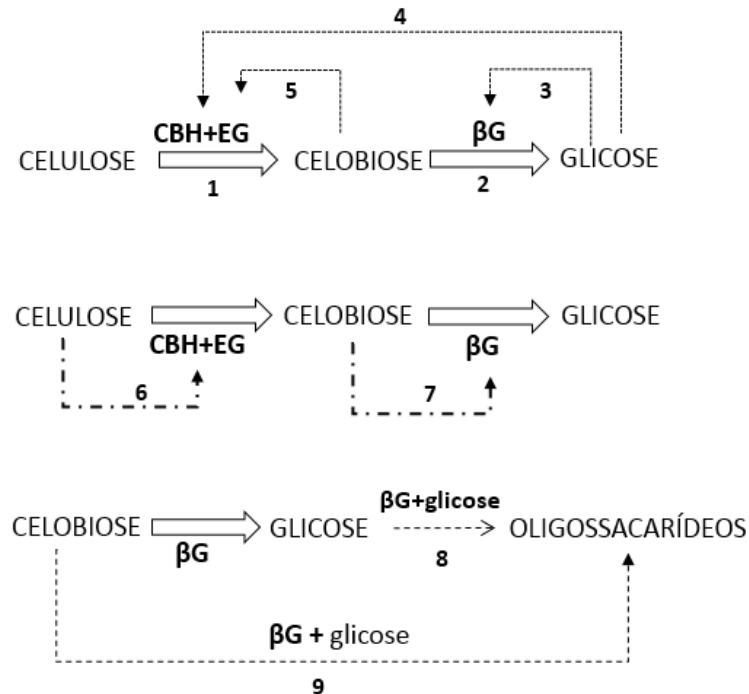
É importante ressaltar ainda, que estas enzimas podem sofrer inibição pelo seu produto, como demonstrado na Figura 2.3. Deste modo, as endoglucanases e exoglucanases sofrem inibição pela presença de glicose e celobiose, enquanto a β -glicosidase é inibida pela presença de glicose.

Figura 2.2 Novo modelo de atuação de enzimas na degradação da celulose. Abreviações: EG, endoglucanase; CBH, celobiohidrolase; CDH, celobiose-dehidrogenase; CBM, módulo de ligação de carboidrato; GH61, monooxigenases líticas de polissacarídeos.



Fonte: Adaptado de Horn et al, 2012.

Figura 2.3 Inibição das celulases: principais rotas cinéticas e interação na relação de formação de produto. Abreviações: EG, endoglucanase; CBH, celobiohidrolase; β G, β -glicosidase. (a) principais reações (1,2), (b) inibição por glicose (3,4), (c) inibição por celobiose (5), (d) inibição pelo substrato (6,7), (e) transglicosilação (8,9).



Fonte: Adaptado de Andric *et al.*, 2010.

2.2.2 Xilanases

As xilanases (EC 3.2.1.8) são as principais enzimas responsáveis pela degradação da xilana, o principal constituinte da hemicelulose e um dos principais componentes da parede celular vegetal, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose. Assim como as celulases, as xilanases podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos e sob diferentes condições de cultivo (Pandey *et al.*, 2011; Polizeli *et al.*, 2005).

Apesar de várias enzimas estarem relacionadas à hidrólise da xilana, as principais enzimas envolvidas são a endoxilanase (endo-1,4- β -xilanase) e a β -xilosidase (β -d-xilohidrolase). Devido a heterogeneidade da hemicelulose, outras enzimas também participam de sua degradação, como: α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, carboidrato esterases (acetil-xilano-esterase, glucuronil esterase e feruloil esterase) e carboidrato liases (Sweeney e Xu, 2012).

A endo- β -xilanase atua nas ligações internas da cadeia principal de xilana, sobre as ligações entre resíduos de xilose, enquanto a β -xilosidase libera xilose a partir de

xilobiose e de oligossacarídeos. Estas enzimas são comumente chamadas de enzimas acessórias no processo de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, à medida em que a remoção da hemicelulose que envolve as fibras da celulose facilita o acesso das enzimas celulásicas ao seu substrato (Haltrich *et al.*, 1996; Meyer; Rosgaard; Sorensen, 2009; Perez *et al.*, 2002).

A presença de xilanases no coquetel enzimático se faz fundamental, portanto, para um maior desempenho da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (De Souza *et al.*, 2011). A maioria das xilanases produzidas por fungos filamentosos apresenta pH entre 4,0 e 7,0, e temperatura ótima em torno de 50 °C (Polizeli *et al.*, 2005).

2.3 Produção de celulasas e xilanases

O principal entrave para a produção industrial do etanol 2G está relacionado ao seu alto custo de produção, decorrente principalmente do alto custo da etapa de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos. Nesta etapa, o alto custo das enzimas celulasas, associado às altas cargas enzimáticas necessárias no processo, tem um alto impacto no custo total do processo (Wyman, 2007). Portanto, o desenvolvimento de estratégias para melhoria dos bioprocessos de produção de celulasas é essencial para a obtenção de complexos enzimáticos mais concentrados e de maior desempenho na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

A produção de celulasas e xilanases é realizada por microrganismos, principalmente por fungos filamentosos, na presença de um substrato indutor. Deste modo, os coquetéis enzimáticos produzidos terão características distintas de acordo com as condições de cultivo empregadas, o microrganismo produtor, o(s) substrato(s) indutor(es) e o biorreator utilizado.

Atualmente, as pesquisas visando o desenvolvimento da produção de celulasas compreendem as seguintes linhas (Yoon, Ngoh e Chua, 2013):

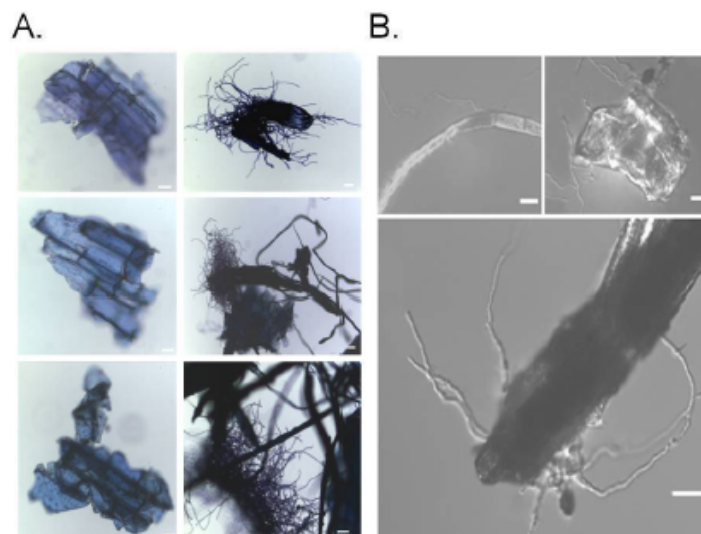
- Seleção do substrato mais adequado;
- Seleção das condições operacionais mais adequadas;
- Modificação genética das linhagens fúngicas;
- Utilização de co-cultura de fungos;
- Implementação de melhorias na configuração dos biorreatores utilizados.

2.3.1 Fungos filamentosos produtores de (hemi)celulases

As celulases são enzimas que podem ser induzidas em bactérias aeróbias e anaeróbias, actinomicetos e fungos. A grande maioria das bactérias, no entanto, não é capaz de degradar a parede celular vegetal, pois a expressão de enzimas é incompleta. Os fungos filamentosos, por sua vez, são capazes de expressar um sistema completo, contendo as três classes de celulases (endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases) em diferentes proporções e, portanto, são os microrganismos mais utilizados para a produção de celulases (Pandey *et al.*, 2011).

Os fungos são organismos heterotróficos, que se desenvolvem na forma de hifas, cujo conjunto constitui o micélio, o qual atua em todas as funções vegetativas do fungo, inclusive na liberação de enzimas-chave para a hidrólise de materiais lignocelulósicos (Esposito; Azevedo, 2010). Estes fungos se reproduzem através de esporos e têm a capacidade de crescer na ausência de água livre, o que possibilita sua aplicação tanto em cultivos sólidos ou submersos, utilizando resíduos agroindustriais. Um esquema de um fungo filamentoso se desenvolvendo na superfície de um substrato sólido é apresentado na Figura 2.4.

Figura 2.4 Crescimento do *Aspergillus niger* no bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx). Conídios de *A. niger* após crescimento por 24 horas em meio de batelada sem extrato de levedura e suplementado com 0,5% de bagaço pré-tratado por explosão a vapor como fonte de carbono. (A) Fragmentos de bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx) corados com azul de toluidina sem inoculação (painel da esquerda) e inoculado com *A. niger* e cultivado por 24 h a 30 °C (painel da direita). (B) Aumento do BEx inoculado com *A. niger* e cultivado por 24 h a 30 °C. Barras = 20 μ m.



Fonte: De Souza *et al.*, 2011.

Os fungos filamentosos mais estudados e aplicados industrialmente para a produção de celulases são os do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*. Os estudos de mapeamento genético identificaram 14.600 e 9.129 genes nas linhagens de *A. niger* e *T. reesei*, respectivamente, dos quais cerca de 200 e 170 apresentam atividade relacionada à degradação de substratos complexos, como a celulose. Enquanto o fungo filamentoso *T. reesei* se destaca pela alta expressão de endoglucanase, o *A. niger* se destaca por uma expressão mais alta de β -glicosidase, enzima também fundamental para uma alta conversão final de hidrólise enzimática, e maior versatilidade na produção de enzimas acessórias como esterases e xilanases (De Souza *et al.*, 2011).

Além destes, outros fungos filamentosos são capazes de produzir celulases como, por exemplo, os dos gêneros *Penicilium*, *Fusarium* e *Phanerochaete* (Howard *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2011), sendo que somente no período de 1950 a 2003 uma coleção de mais de 14.000 linhagens de fungos já havia sido listada como produtoras de enzimas celulolíticas.

2.3.2 Substratos para a produção de (hemi)celulases

O substrato empregado industrialmente para a indução de celulases por *T. reesei* é a lactose, por ser o único substrato economicamente viável atualmente em processos em larga escala (Singhania *et al.*, 2010). Pesquisas utilizando outros substratos comerciais como preparados de celulose microcristalina ou em flocos têm sido frequentemente reportada (Adsul *et al.*, 2007; Ahamed e Vermette, 2010; Singhania *et al.*, 2010; Soni; Nazir; Chadha, 2010).

Uma alternativa para redução de custos no processo de produção de enzimas (hemi)celulolíticas é a utilização de materiais lignocelulósicos como fonte de carbono indutora, uma vez que os resíduos agroindustriais são abundantes e disponíveis, além da possibilidade de economia de custos relativos à estocagem e descarte destes materiais (Bensaid, Conti e Fino, 2012; Kovacs *et al.*, 2009; Lavenson *et al.*, 2012).

Em cultivos em que são aplicados materiais lignocelulósicos como substrato, faz-se necessário o conhecimento das características químicas e físicas dos mesmos. Fatores como composição, tamanho de partícula, umidade e pH podem ser determinantes na fisiologia de crescimento dos microrganismos ao usar estas matérias como fonte de carbono e suporte para seu crescimento (Membrillo *et al.*, 2008; Pandey, 1999; Papagianni *et al.*, 2004).

Estrutura dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são estruturas bastante complexas, formadas por três frações principais denominadas: celulose, hemicelulose e lignina. De um modo geral, os materiais lignocelulósicos contêm, aproximadamente, 40-50 % de celulose, 20-40 % de hemicelulose e 20-30 % de lignina (Chandra *et al.*, 2007). Este substrato é de difícil degradação devido à recalcitrância de seus componentes e à sua inacessibilidade (Horn *et al.*, 2012).

A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal, conferindo suporte à planta. A celulose é um homopolímero de glicose, cujas moléculas são unidas por ligações β -(1,4) glicosídicas e cuja unidade de repetição é a celobiose (dímero de glicose). A fibra de celulose se agrega na forma de microfibrilas, sendo que cada uma pode ter de 100 a até 10.000 unidades de glicose e é cristalina e insolúvel, o que dificulta sua degradação. A fibra de celulose contém regiões mais ordenadas, denominadas regiões cristalinas, e menos ordenadas, denominadas regiões amorfas (Horn *et al.*, 2012).

A hemicelulose é um heteropolímero de diversos graus de polimerização, formada por uma cadeia principal de D-xilose, ligada a moléculas de D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido glucônico e ácido galacturônico. Esta composição varia de uma planta para outra e a hemicelulose é nomeada de acordo com a proporção de açúcares em sua composição. Por serem os resíduos agrícolas ricos em xilose, a xilana é a principal hemicelulose nestes materiais (Polizeli *et al.*, 2005). As hemiceluloses geralmente são mais fáceis de degradar do que as celulosas devido à maior facilidade de remoção de seus terminais ramificados, que se solubilizam a relativamente baixas temperaturas (150-180 °C) (Hendriks; Zeeman, 2009).

A lignina é o terceiro componente da biomassa vegetal mais abundante na natureza. É um composto aromático constituído por três componentes principais: álcool coniferil, álcool sinapil e álcool p-coumaril. Devido à grande recalcitrância e resistência da lignina, a mesma é rígida e hidrofóbica, resistente ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo (Agbor *et al.*, 2011; Hendriks e Zeeman, 2009). Por isso, não há atualmente um processo simples para degradação enzimática da lignina, mesmo havendo relatos de degradação microbiana de compostos aromáticos como os que compõem a lignina (Fuchs, Boll e Heider, 2011; Horn *et al.*, 2012).

Pré-tratamentos físico-químicos da lignocelulose

A fim de se remover a camada de hemicelulose-lignina que envolve a celulose

e facilitar o acesso às suas fibras, uma etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico é necessária (Dien *et al.*, 2008; Mosier *et al.*, 2005a). Tratamentos termoquímicos como a explosão a vapor, com ou sem a adição de ácido diluído, são capazes de aumentar a porosidade da lignocelulose e aumentar a acessibilidade à celulose. Portanto, inicialmente o material *in natura* pode ser submetido a um tratamento mecânico para a redução do tamanho de partícula e após isso ser submetido a uma ou duas etapas de aquecimento e imersão em um catalisador, o qual pode ser ácido, básico ou até mesmo água em altas temperaturas (Pimenova; Hanley, 2004).

No caso dos pré-tratamentos na ausência de um catalisador, como o pré-tratamento por explosão a vapor e o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água quente (do inglês *LHW- liquid hot water*) a própria água e ácido acético liberados do material lignocelulósico são capazes de solubilizar a hemicelulose em oligômeros ou polímeros de hemicelulose (Allen *et al.*, 2001; Dien *et al.*, 2006; Mosier *et al.*, 2005b).

O pré-tratamento por explosão a vapor é a técnica mais usada e aplicada na indústria sucroalcooleira. No Brasil, esta técnica é muito utilizada para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar devido ao baixo custo, a possibilidade de utilização da água como catalisador e compatibilidade com as usinas de cana-de-açúcar. No pré-tratamento por explosão a vapor a biomassa é exposta à alta pressão com o vapor saturado a 160-240 °C e pressões de 0,7 a 4,8 MPa. Após alguns segundos, há uma despressurização rápida (ou “explosão”) e resfriamento. Estes minutos são suficientes para a solubilização da hemicelulose no meio líquido, enquanto a lignina é transformada pela alta temperatura. As desvantagens deste pré-tratamento são a possível degradação da hemicelulose e a formação de compostos inibidores à fermentação e a destruição da lignina, com possibilidade de complexação e redução da digestibilidade. Por isso, muitas vezes a lavagem do hidrolisado após o pré-tratamento se torna necessária (Agbor *et al.*, 2011; Laser *et al.*, 2002; Mosier, *et al.* 2005b).

O pré-tratamento hidrotérmico com água quente (LHW) se difere da explosão a vapor pois neste caso a água é mantida no estado líquido e sob temperaturas mais baixas entre 180-190 °C. Durante o pré-tratamento a hemicelulose é solubilizada, mas há menor risco de degradação do que durante a explosão a vapor devido às temperaturas mais amenas, havendo maior formação de poli e oligossacarídeos. Dependendo do grau de severidade deste pré-tratamento, a lignina pode ser parcialmente removida e o controle do pH entre 4 e 7 auxilia a prevenção da formação de monômeros e sua subsequente degradação. A desvantagem deste processo é a alta diluição dos açúcares removidos e maior consumo de

água (Agbor *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Mosier *et al.*, 2005b).

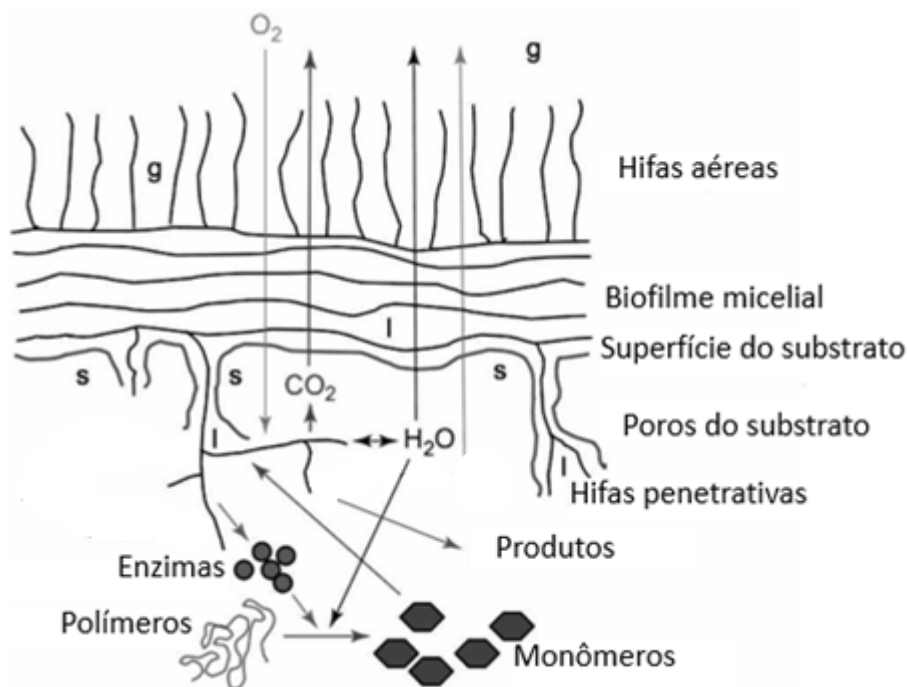
2.3.3 Métodos de cultivo convencionais para a produção de (hemi)celulases

Os fungos filamentosos são capazes de se desenvolver em tanto em cultivos realizados em meio nutriente líquido (fermentação submersa – FSm) quanto na ausência de água livre (fermentação no estado sólido – FES).

Cada método de cultivo possui suas vantagens e desvantagens de acordo com o produto de interesse em cada bioprocessos. No entanto, é importante ressaltar que a fisiologia dos fungos filamentosos em cada método de cultivo é diferente: algumas enzimas e substratos secundários são produzidos em diferentes concentrações em FSm e FES; algumas enzimas apresentam diferentes características relacionadas a massa molar, parâmetros cinéticos e condições ótimas. Além disso, algumas linhagens fúngicas podem produzir um determinado metabólito em um método de fermentação, mas não em outro (Barrios-Gonzalez, 2012).

O método de fermentação no estado sólido (FES) se caracteriza pela ausência de água livre. Neste caso, a umidade do substrato é controlada. A fermentação no estado sólido apresenta a vantagem de proporcionar ao fungo filamentosos um ambiente similar ao seu habitat natural. Este método de cultivo possibilita ainda a utilização de resíduos agroindustriais como suporte ao seu crescimento e como substrato indutor. Deste modo, um filme de micélio cobre a superfície do substrato sólido e, a partir daí, hifas do fungo penetram os poros do substrato sólido (hifas penetrativas) e outras hifas crescem também na parte externa à superfície do substrato (hifas aéreas), como mostra a Figura 2.5 (Holker e Lenz, 2005).

Figura 2.5 Esquema do processo em micro-escala que ocorre durante a fermentação no estado sólido (FES).



Fonte: Adaptado de Holker e Lenz, 2005.

As principais vantagens da fermentação no estado sólido são complexos enzimáticos mais concentrados e menores gastos nas etapas de separação e purificação devido ao baixo teor de água. No entanto, as desvantagens deste método incluem gradientes de nutrientes, pH, umidade e temperatura no interior dos reatores durante os cultivos. Além disso, há pouco conhecimento sobre a fisiologia dos fungos e outros microrganismos quando se desenvolvem em substratos sólidos (Barrios-Gonzalez, 2012; Pandey *et al.*, 1999; Singhanian *et al.*, 2010).

A fermentação submersa (FSm) é aquela em que o microrganismo é inoculado diretamente em meio nutriente líquido. No caso dos fungos filamentosos, a fermentação para a produção de enzimas pode se iniciar tanto pela inoculação de esporos quanto pela inoculação de micélios desenvolvidos numa etapa de pré-cultivo. Este tipo de fermentação é o empregado industrialmente para a produção de celulases, sendo a principal vantagem deste método de cultivo o conhecimento consolidado da fisiologia dos fungos filamentosos e de reatores desenvolvidos para operar em cultivos submersos, tornando mais fácil a operação e monitoramento deste tipo de cultivo (Singhanian *et al.*, 2010).

A produção industrial de celulases é realizada utilizando-se substratos indutores comerciais, principalmente lactose em cultivos com o fungo *T. reesei*. No entanto,

outros substratos vem sendo amplamente reportados na literatura com aplicação na produção de celulases, como a celulose cristalina, em flocos e também a celulose presente em resíduos agroindustriais (Chandel *et al.*, 2012; Singhania *et al.*, 2010).

Enquanto na fermentação no estado sólido o desenvolvimento dos fungos geralmente se limita às interações com a matriz sólida, em cultivos submersos o fungo filamentosos está submetido a uma maior variação de forças hidrodinâmicas, promovida pela agitação e aeração dos biorreatores. Deste modo, a morfologia de crescimento do microrganismo em FSm pode variar desde a formação de micélios dispersos, aglomerados densos de hifas ou formação de pellets (Cunha *et al.*, 2012a,b; Papagianni; Nokes; Filer, 2001).

De acordo com o fungo filamentosos e do produto de interesse em cada cultivo, as condições de cultivo podem ser manipuladas para oferecer a morfologia desejada para o fungo filamentosos e a obtenção de maiores rendimentos do processo. Entre os fatores investigados que impactam a morfologia de cultivo encontram-se o pH, nutrientes, agitação, aeração e o modo de preparo do inóculo (Cox; Paul; Thomas, 1998; Cunha *et al.*, 2012a; Domingues *et al.*, 2000; Papagianni, 2004).

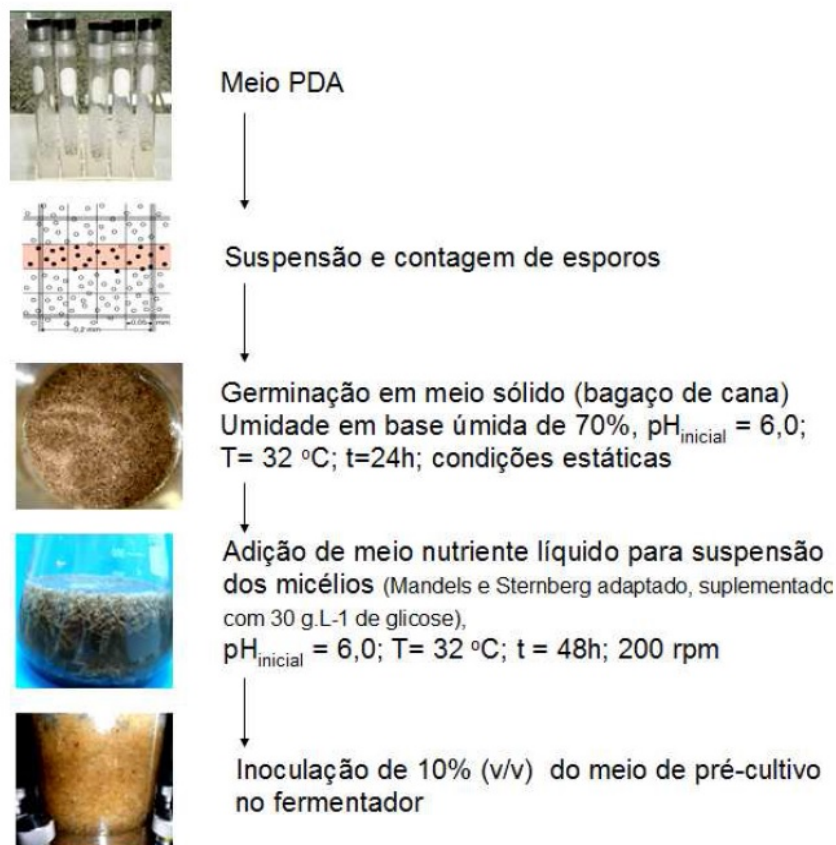
2.3.4 Método de fermentação sequencial (FSeq)

Este método de cultivo foi recentemente desenvolvido com o intuito de combinar as vantagens dos métodos de fermentação no estado sólido e submersa. O método se caracteriza por uma primeira etapa de pré-cultivo no estado sólido, seguido pela adição de meio líquido. Após o tempo de pré-cultivo, todo o meio é transferido para um cultivo submerso para a produção de enzimas utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono e indução (Cunha *et al.*, 2012a,b). O método de cultivo sequencial é apresentado em etapas na Figura 2.6.

O pré-cultivo, etapa diferencial do método sequencial em comparação com o método convencional de fermentação submersa, é a etapa de grande impacto na produtividade de bioprocessos com fungos filamentosos. As condições de germinação dos esporos resultam em morfologia de crescimento específicas, impactando na expressão de metabólitos secundários (Bizukoje e Ledakowicz, 2006). No caso da fermentação sequencial, a germinação do fungo filamentosos desde a etapa de pré-inóculo utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono e indutor, pode favorecer a produção de enzimas

direcionadas à hidrólise deste substrato durante cultivos em frascos agitados ou biorreatores.

Figura 2.6 Fluxograma do procedimento do método de fermentação sequencial.



Fonte: Adaptado de Cunha, 2012.

Em pesquisas anteriores, cultivos desenvolvidos em fermentação submersa tanto em frascos agitados quanto em biorreatores do tipo coluna de bolhas resultaram em morfologia de crescimento na forma de pellets bem definidos. Quando realizados nas mesmas condições de cultivos em fermentação sequencial, os cultivos resultaram em uma morfologia de crescimento do fungo *A. niger* A12 na forma de filamentos dispersos (Cunha *et al.*, 2012a,b). Este mesmo padrão também foi observado em cultivos com linhagens de *T. reesei* e *T. harzianum* (Florencio *et al.*, 2015). Em ambos os estudos, a morfologia de crescimento dispersa do fungo filamentososo pelo método de cultivo FSeq favoreceu o crescimento do microrganismo em contato com o material lignocelulósico indutor em comparação com os cultivos em que o fungo cresceu na forma de pellets e, conseqüentemente, houve maior produção enzimática.

O método de cultivo sequencial tem sido bem recebido pela comunidade

acadêmica, o que pode ser confirmado através das recentes publicações e citações no curto espaço de tempo desde que o método foi desenvolvido e novos projetos de mestrado e doutorado iniciados abordando o tema. Devido aos resultados promissores atingidos com o método de fermentação sequencial em projetos anteriores, na presente tese o mesmo foi avaliado utilizando diferentes resíduos agroindustriais, linhagens de microrganismos e biorreator.

2.3.5 Tipos de biorreatores

As condições de operação de biorreatores têm um impacto significativo na fisiologia de crescimento dos fungos filamentosos e, conseqüentemente, nos rendimentos dos processos de produção de enzimas. Uma vez que o fungo tende a formar biofilmes e crescer aderido em superfícies sólidas, a produção de enzimas em fermentação submersa deve ser realizada com o monitoramento da morfologia de crescimento do fungo filamentoso, a qual pode ser diferente de acordo com o meio nutriente e também das condições físico-químicas de operação dos biorreatores (Ahamed e Vermette, 2009; Singhania *et al.*, 2010; Villena; Gutierrez-Correa, 2007).

Em fermentação submersa, a morfologia de crescimento do fungo filamentoso na forma de filamentos livres resulta em uma alta viscosidade do caldo de cultivo, com conseqüente dificuldade de homogeneização do cultivo e dificuldade de transferências de massa e calor. O crescimento na forma de pellets geralmente resulta em uma menor viscosidade do meio de cultivo e maior facilidade de operação mas, no entanto, em menor contato entre o fungo e o substrato indutor insolúvel (Domingues *et al.*, 2000). Portanto, uma condição ótima entre as variáveis operacionais de biorreatores e a morfologia do fungo utilizado deve ser encontrada.

Há estudos limitados compreendendo projetos de reatores para fermentação no estado sólido e, por esta razão, na maioria das pesquisas em FES os cultivos para a produção de celulasas são realizados em frascos Erlenmeyer. Tipos de reatores utilizados em escala de laboratório para a produção de celulasas compreendem (Durand, 2003; Yoon; Ngoh; Chua, 2013):

- a) Leito fixo;
- b) Leito fluidizado (gás-sólido);
- c) Tambor rotativo e

d) Reator estático (bandejas).

Os biorreatores para a produção de enzimas em fermentação submersa podem ser classificados em tipo convencional (biorreator tipo tanque agitado e aerado - BTA), e não-convencionais pneumáticos (tipo *airlift* ou coluna de bolhas – BCB).

Os biorreatores pneumáticos vêm sendo aplicados na produção de celulases em escala de laboratório, em pesquisas aplicando inclusive resíduos agroindustriais como substrato indutor à produção de celulases e xilanases (Cunha *et al.*, 2012b; Kim; Kang; Lee, 1997; Michelin *et al.*, 2013; Siedenberg *et al.*, 1997). As vantagens dos biorreatores pneumáticos incluem facilidade de construção, operação e manutenção, devido à ausência de um selo mecânico, além de apresentarem um baixo consumo de potência e altas velocidades de transferência de oxigênio (Cerri; Badino, 2010; Luo; Al-Dahhan, 2008). No entanto, a principal desvantagem dos biorreatores pneumáticos é o fato de que tanto a agitação quanto a aeração são promovidos pela injeção de ar no reator e, portanto, estes sistemas são menos versáteis que os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado (Fontana; Polidoro; Da Silveira, 2009).

Os biorreatores tipo tanque agitado e aerado (BTA) são amplamente utilizados na indústria para a produção de celulases. A principal vantagem destes biorreatores é a versatilidade de operação e a facilidade de controle e monitoramento dos cultivos, que são bem desenvolvidos. A desvantagem deste sistema é a alta demanda de energia requerida para manter a homogeneidade dos caldos de cultivo (Howard *et al.*, 2003).

2.3.6 Variáveis operacionais de cultivos em biorreatores

Em cultivos submersos, a manutenção de níveis adequados de oxigenação no caldo cultivo para suprir o crescimento do microrganismo é um fator determinante. Em cultivos com fungos filamentosos que envolvem caldos de cultivo altamente viscosos, tanto a agitação quanto a aeração em biorreatores tipo tanque agitado podem ser manipuladas de modo a se atingir a homogeneidade do caldo e atender à demanda de oxigênio requerida pelo microrganismo.

A transferência de oxigênio nos cultivos pode ser avaliada em termos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), o qual é influenciado pela geometria do biorreator e condições de operação, pelas propriedades físicas do caldo de cultivo e pelas características do microrganismo e de outros sólidos em suspensão. O aumento

da agitação favorece a transferência de oxigênio nos biorreatores, através do rompimento de bolhas e consequente aumento das áreas interfaciais gás-líquido e gás-sólido. No entanto, o aumento da agitação nos cultivos pode resultar em altas taxas de cisalhamento e no rompimento dos filamentos de microrganismos (Bustamante, 2013).

É importante ressaltar, portanto, a necessidade de se manipular a velocidade de agitação nos cultivos a fim de manter níveis de agitação suficientemente altos para garantir a homogeneidade e níveis adequados de transferência de massa durante os cultivos, evitando também a formação de aglomerados celulares densos. No entanto, os níveis de agitação não podem ser tão altos a ponto de danificar a estrutura celular do microrganismo em decorrência de alto cisalhamento. Além disso, o aumento da velocidade de agitação pode resultar em maior formação de espuma (Ahamed e Vermette, 2010).

Outro parâmetro importante em biorreatores tipo tanque agitado e aerado é o tipo de impelidor utilizado. Recentemente, Bustamante, Cerri e Badino (2013) demonstraram o forte impacto do tipo de impelidor no perfil hidrodinâmico de biorreatores. Em cultivos com a bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico, Bustamante (2013) observou que o sistema de agitação composto por dois impelidores do tipo turbina de Rushton (TR) promoveu um ambiente mais hostil ao microrganismo, resultando em fragmentos celulares de hifas curtas, enquanto o impelidor tipo orelha de elefante de escoamento ascendente (EEUP) resultou num crescimento controlado do microrganismo.

O efeito da velocidade de agitação na produção de celulases em cultivos com substratos solúveis ou utilizando farelos de trigo e de milho têm sido estudado (Ahamed e Vermette, 2010; Gerlach et al, 1998; Wang et al, 2013). Michelin *et al* (2013), em seu estudo de comparação de biorreatores, avaliaram a influência da agitação em cultivos para a produção de xilanases por *A. niger* em biorreatores agitados entre 300 e 400 rpm, utilizando sabugo de milho de partículas menores que 1 mm e constataram que a frequência de rotação de 400 rpm foi a mais adequada. Siedenbergl et al (1997) avaliaram o efeito da agitação entre 300 e 750 rpm na produção de xilanases por *A. awamori* utilizando farelo de trigo como substrato com partículas entre 1 e 2 mm e entre 5 e 6 mm. Foi possível observar uma maior produção de xilanases a 300 rpm com partículas de farelo de trigo maiores, que melhor protegeram o fungo filamentoso do cisalhamento, uma vez que o fungo cresceu aderido à superfície do substrato e no seu interior.

Cultivos em sistemas trifásicos utilizando bagaço de cana-de-açúcar de tamanho de partícula até 2 mm são apresentados no Capítulo 3, onde a influência das variáveis operacionais em cultivos em biorreator tanque agitado será discutida.

2.4 Análise da revisão da literatura

Apesar da existência de estudos que investigaram os efeitos da velocidade de agitação na produção enzimática, não foram encontrados estudos relacionados com a produção de celulases a partir de bagaço de cana-de-açúcar que tenham avaliado a interação entre o efeito da agitação e as características do material sólido. À medida em que a literatura indica que em cultivos utilizando materiais lignocelulósicos como substrato o fungo filamentoso é capaz de crescer aderido à superfície ou no interior do substrato, este estudo, assim como a avaliação de diferentes tipos de impelidores na produção enzimática em cultivos utilizando resíduos agroindustriais, são relevantes para o desenvolvimento de processos empregando diferentes tipos de materiais lignocelulósicos em biorreatores.

Considera-se ainda de fundamental importância a avaliação do efeito do tamanho de partícula em cultivos trifásicos em biorreatores, uma vez que tanto a homogeneidade dos cultivos quanto à interação de indução fungo-substrato podem ser impactados por esta variável.

Por último, em virtude dos resultados promissores obtidos em projetos anteriores aplicando-se o método de fermentação sequencial em biorreatores pneumáticos, considera-se relevante a avaliação de desempenho destes coquetéis enzimáticos na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, também como a aplicação deste método de cultivo em cultivos em biorreator tipo tanque agitado e utilizando diferentes substratos agroindustriais e linhagens de microrganismos.

Capítulo 3

Cultivos em biorreatores tipo tanque agitado para a produção de celulases a partir de bagaço de cana-de-açúcar: efeitos das variáveis operacionais e do método de cultivo

3.1 Introdução

Melhorias na produção do etanol de segunda geração (2G) demandam a consideração de aspectos ambientais e econômicos, incluindo a dependência aos combustíveis fósseis e o reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Um fator crítico no desenvolvimento de biorefinarias para a produção de etanol 2G é o alto custo das celulases, enzimas responsáveis pela degradação da celulose presente nos materiais lignocelulósicos e que representam uma parte significativa dos custos totais da produção do etanol 2G (Klein-Marcuschamer *et al.*, 2012; Macrelli; Galbe; Wallberg, 2014). O desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes é, portanto, necessário a fim de se superar esta limitação econômica.

A composição do material lignocelulósico favorece a sua aplicação como um recurso renovável para a produção de biocombustíveis e enzimas. A biomassa vegetal é principalmente composta por três tipos de polímeros: celulose (35-50%), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-20%). As proporções relativas e interação entre estas frações afetam a recalcitrância do material, assim como a sua aplicação para diferentes propósitos (Agbor *et al.*, 2011; Limayem; Ricke, 2012; Van Dyk e Pletschke, 2012). Quando materiais lignocelulósicos são utilizados como substratos para a produção enzimática, uma etapa de pré-tratamento aumenta a disponibilidade da celulose. Cada tipo de pré-tratamento, no entanto, apresenta suas vantagens e desvantagens. O uso do pré-tratamento por explosão a vapor é capaz de remover a hemicelulose da biomassa, tornando a celulose mais disponível ao ataque enzimático e biológico. Este procedimento é amplamente utilizado para o bagaço de cana-de-açúcar, devido à não-necessidade de adição de agentes químicos (exceto água) e pelo fato de que a demanda de energia é baixa e a técnica é compatível com os já existentes sistemas de biorefinarias (Agbor *et al.*, 2011; De Albuquerque Wanderley *et al.*, 2013; Wyman *et al.*, 2011).

Muitos microrganismos são capazes de degradar os materiais lignocelulósicos através da produção de complexos enzimáticos contendo celulases (celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidases) e xilanases. Outras enzimas acessórias são também produzidas, as quais podem aumentar a acessibilidade da celulose e aumentar a hidrólise de materiais lignocelulósicos. São elas as monooxigenases líticas de polissacarídeos, lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase, entre outras (Horn *et al.*, 2012; Van Dyk e Pletschke, 2012; Znameroski; Glass, 2013). Os microrganismos mais amplamente estudados são os fungos filamentosos *Trichoderma sp.* e *Aspergillus sp.*, os quais são capazes de

secretar enzimas em níveis muito altos (De Souza *et al.*, 2011; Ries *et al.*, 2013).

As celulases e hemicelulases podem ser produzidas por dois tipos de fermentação convencionais: a fermentação submersa (FSm) e a fermentação no estado sólido (FES). O método de fermentação submersa tem sistemas de monitoramento e controle bem desenvolvidos e aumento de escala relativamente simples. Por outro lado, a fermentação no estado sólido apresenta a vantagem de oferecer ao fungo filamentosos um ambiente muito próximo ao de seu habitat natural e uma interação mais próxima entre o microrganismo e o substrato indutor, o que pode resultar em maiores rendimentos de enzimas produzidas (Barrios-Gonzalez, 2012; Rodriguez-Zuniga *et al.*, 2013). Um novo método de fermentação sequencial (FSeq) recentemente desenvolvido por Cunha *et al.* (2012a) combina as vantagens do cultivo no estado sólido e submerso em um único processo e pode ser potencialmente utilizado para a produção de celulases em cultivos em frascos agitados e em biorreatores pneumáticos.

Os biorreatores utilizados para a produção submersa de enzimas podem ser pneumaticamente agitados, como nos biorreatores do tipo coluna de bolhas, ou mecanicamente agitados, como os biorreatores tipo tanque agitado e aerado (BTA) (Ahamed e Vermette, 2010; Thomasi; Cerri; Badino, 2010). O biorreator tipo tanque agitado e aerado é o mais amplamente utilizado para a produção de celulases e, embora substratos comerciais sejam mais frequentemente utilizados para a produção de celulases, há um aumento no número de pesquisas utilizando materiais lignocelulósicos para a produção de celulases e hemicelulases em biorreatores (Cunha *et al.*, 2012b; Delabona *et al.*, 2012a; Michelin *et al.*, 2013).

O crescimento fúngico sob diferentes condições ambientais pode resultar em diferenças na fisiologia e expressão de enzimas, assim como na expressão de enzimas com diferentes características em termos de massa molar, parâmetros cinéticos e desempenho de hidrólise (Barrios-Gonzalez, 2012; Papagianni; Nokes; Filer, 2001). A influência do tamanho de partícula do substrato para a produção enzimática em fermentação no estado sólido tem sido reportada recentemente (Membrillo *et al.*, 2008; Schmidt; Furlong, 2012). No entanto, não foram encontradas pesquisas até o presente momento a respeito do efeito do tamanho de partícula do substrato sólido quando empregado como substrato indutor em biorreatores para fermentação submersa.

Embora extensivas pesquisas sobre a produção de enzimas venham sendo reportadas, investigações mais profundas são necessárias abordando a influência de variáveis operacionais como tamanho de partícula de substratos sólidos, método de cultivo e condições



de agitação em cultivos em biorreatores tipo tanque agitado utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Estes parâmetros são de relevante importância no projeto de bioprocessos para a produção de enzimas em larga escala. A fim de contribuir com o desenvolvimento de engenharia de bioprocessos para a produção de celulases, o presente trabalho investiga, portanto, a influência do método de cultivo (submerso ou sequencial), o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, o tamanho de partícula, o controle de pH, a frequência de agitação e o tipo de impelidor na produção de (hemi)celulases por *Aspergillus niger* em biorreator tipo tanque agitado e aerado.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Substrato

O substrato indutor foi o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço de cana *in natura* (BIn) foi fornecido pela Edra Ecosystemas (Ipeúna, Brasil) e o bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx) foi fornecido pelo Centro e Tecnologia Canavieira (CTC - Piracicaba, Brasil). Ambas amostras foram originadas na mesma região do estado de São Paulo (Brasil) e o pré-tratamento por explosão a vapor foi conduzido a 17×10^5 Pa e 205 °C por 20 min. As análises composicionais foram realizadas previamente por Rodriguez-Zuniga *et al.* (2011) e por Cunha *et al.* (2014), respectivamente. As composições químicas das amostras são apresentadas na Tabela 3.1. As amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram moídas em moinho de facas e os tamanhos de partícula selecionados por peneiramento nas faixas de (descritas em termos de diâmetro característico médio d_p): $d_p \leq 0,5$, $0,5 \leq d_p \leq 1,0$, $1,0 \leq d_p \leq 2,0$ e $2,0 \leq d_p \leq 2,4$ mm.

Tabela 3.1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado.

	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> ¹	Bagaço de cana-de-açúcar explodido ²
		
Hexoses (%)	46,6	71,2
Pentoses (%)	26,5	0,5
Lignina (%)	21,7	27,8

¹Rodriguez-Zuniga *et al.*, 2011. ²Cunha *et al.*, 2014.

3.2.2 Microrganismo

O agente das fermentações foi uma linhagem do fungo filamentosso *Aspergillus niger* (*A. niger* A12), da coleção da EMBRAPA-CTAA (Rio de Janeiro, Brazil) (Couri; De Farias, 1995). A linhagem foi mantida sob congelamento a -18°C e ativada em placas contendo ágar de batata por 7 dias a 32 °C. As suspensões de esporos foram preparadas pela adição de 10 mL de Tween-80 (0,3% v/v) e as concentrações de esporos foram medidas utilizando uma câmara de Neubauer.

3.2.3 Meio nutriente

O meio de cultivo utilizado foi o meio descrito por Mandels e Sternberg (1976) e adaptado por Cunha *et al.* (2012a) contendo (em m/v): 0,14% de (NH₄)₂SO₄, 0,20% de KH₂PO₄, 0,03% de CaCl₂, 0,02% de MgSO₄.7H₂O, 0,50% de peptona, 0,20% de extrato de levedura, 0,03% de uréia, 0,10% de Tween 80, and 0,10% de solução salina (5 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 1,6 mg/L de MnSO₄.H₂O, 1,4 mg/L de ZnSO₄.7H₂O e 2,0 mg/L de CoCl₂). A adição de glicose aos meios líquidos de pré-cultivo e cultivo teve como intuito proporcionar efetiva germinação e crescimento fúngico, sendo a primeira fonte imediata de carbono para seu desenvolvimento.

3.2.4 Estratégias de planejamento experimental

Duas abordagens de delineamento experimental foram conduzidas a fim de se investigar o efeito de diferentes variáveis operacionais e condições ambientais na produção enzimática: o planejamento estatístico fatorial seguida pela análise de variância (ANOVA) e o método de uma avaliação de uma variável por vez (do inglês: *one-variable-at-a-time* - OVAT).

No primeiro grupo de experimentos, realizados em frascos agitados, um planejamento experimental fatorial 2^3 completo foi inicialmente utilizado para avaliar os efeitos do método de cultivo, tipo de bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*, BIn, ou pré-tratado por explosão a vapor, BEx) e o tamanho de partícula do substrato na eficiência da produção de endoglucanase. Para todas as condições os experimentos foram conduzidos em duplicatas. Os valores e tipos de variáveis independentes e seus níveis são apresentados na Tabela 3.2. O software estatístico Statística (v. 7.0) foi empregado para analisar os dados experimentais, utilizando-se a análise de variância (ANOVA, 95% nível de confiança) e a construção de gráficos de Pareto para a identificação dos fatores significativos na produção de endoglucanase. Um conjunto de experimentos adicionais utilizando partículas de granulometrias intermediárias ($0,5 \leq d_p \leq 1,0$ mm) e maiores ($2,0 \leq d_p \leq 2,4$ mm) foram também incluídos nesta parte do estudo, a fim de se elucidar o efeito destas variáveis na produção enzimática.

Tabela 3.2. Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial 2^3 .

Fatores	Níveis	
	(-1)	(+1)
Tamanho de partícula (mm)	$d_p \leq 0,5$	$1,0 \leq d_p \leq 2,0$
Bagaço	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	Bagaço de cana-de-açúcar explodido
Método de cultivo	Fermentação submersa	Fermentação sequencial

Onde: d_p = diâmetro de partícula.

Devido à complexidade de experimentos realizados em biorreator tanque agitado de 4 L de volume útil, um conjunto de experimentos-chave foi planejado utilizando a abordagem OVAT a fim de se avaliar o efeito do método de cultivo, tipo de bagaço de cana-

de-açúcar, frequência de agitação, controle de pH e granulometria dos sólidos durante os cultivos. Após este conjunto de experimentos em biorreatores, um planejamento experimental fatorial 2^2 foi realizado para se investigar o efeito do pré-tratamento e da agitação na produção enzimática. Os valores e tipos das variáveis independentes são apresentadas na Tabela 3.3. Os resultados foram analisados utilizando o software estatístico Statística (v. 7.0) como é descrito acima.

Tabela 3.3. Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial 2^2 .

Fator	Níveis	
	(-1)	(+1)
Bagaço	Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	Bagaço de cana-de-açúcar explodido
Agitação (rpm)	400	700

3.2.5 Condições de Pré-cultivo

Procedimento de pré-cultivo: os esporos de *A. niger* foram inicialmente ativados em meio PDA (*potato-dextrose-agar*) por 5 dias. Após completa esporulação, os esporos foram ressuspensos e inoculados nos meios de pré-cultivo, os quais foram preparados de forma diferenciada de acordo com o método de cultivo desejado, FSm ou FSeq.

Pré-cultivo para fermentação sequencial (FSeq): no método de fermentação sequencial, a primeira etapa de pré-cultivo foi realizada no estado sólido. Portanto, esporos foram inoculados nas matérias-primas lignocelulósicas escolhidas a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/g de meio sólido, em frascos Erlenmeyer de 500 mL. A umidade do indutor lignocelulósico foi ajustada através da adição do meio nutriente líquido descrito na seção 3.2.3, sem suplementação com glicose, na proporção de 12 mL de meio nutriente a cada 5 g de meio sólido. Os frascos permaneceram incubados em condições estáticas, em estufa a 32 °C por 24 h. Após este período, houve a transição dos pré-cultivos para fermentação submersa através da adição de 200 mL de meio nutriente líquido descrito na seção 3.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 6,0. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32°C por 48 h (Cunha *et al.*, 2012a). Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10 % (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

Pré-cultivo para fermentação submersa (FSm): no método de fermentação convencional, o inóculo foi preparado diretamente em meio líquido. Nesta etapa, os esporos foram inoculados diretamente no meio nutriente líquido descrito na seção 3.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 4,5, a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/mL. Os pré-cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de volume útil, mantidos em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por aproximadamente 50 h, quando houve completa germinação dos esporos. Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10 % (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

3.2.6 Cultivos em FSM e FSeq para produção enzimática

A faixa de granulometria do substrato, tipo de bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*, BIn, ou pré-tratado por explosão a vapor, BEx) e o método de cultivo (FSm ou FSeq) na produção enzimática foram inicialmente avaliados em cultivos em frascos tipo Erlenmeyer. Estes resultados foram então validados em cultivos em biorreator tipo tanque agitado (BTA), no qual os efeitos de controle de pH e frequência de agitação foram também avaliados. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicatas e foram calculados como média \pm desvio padrão.

Os cultivos em frascos agitados foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de volume útil em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por 96 h. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 h, filtradas e centrifugadas a 11000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Os extratos foram analisados a fim de se quantificar atividades enzimática de endoglucanase (CMCase), xilanase e a concentração de açúcares redutores.

Em cultivos em biorreator, um biorreator tipo tanque agitado de 4 L (Bioflo IIC, New Brunswick Scientific, USA) foi equipado com dois impelidores do tipo Rushton com 6 pás planas e eletrodos de oxigênio dissolvido e pH, como descrito previamente por Bustamante, Cerri e Badino (2013). Os cultivos foram conduzidos por 30 h a 400 e 700 rpm, 0,5 vvm e 32 °C. Nos cultivos com controle de pH, o pH foi mantido em 5,0 pela adição de soluções 1 mol.L⁻¹ HCl e 2 mol.L⁻¹ NaOH. Os cultivos para avaliação de desempenho do impelidor do tipo orelha de elefante com escoamento ascendente, EEUP (do inglês: *Elephant ear up-pumping*), foram conduzidos por 30 h a 800 rpm, 0,6 vvm e 32 °C. Amostras foram coletadas em intervalos de 6 h e centrifugadas a 11000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Os

coquetéis enzimáticos foram analisados a fim de se quantificar atividades enzimática de endoglucanase (CMCase) e xilanase. A concentração de açúcares redutores nos caldos de fermentação foram determinadas a fim de se monitorar o crescimento fúngico através do consumo de açúcares redutores, como glicose.

3.2.7 Métodos analíticos

A atividade de endoglucanase foi determinada tendo como substrato uma solução de carboximetilcelulose (Sigma, EUA) 0,4% m/v em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8 (Ghose, 1987). Para tal, em 0,5 mL de CMC 4% foram adicionados 0,5 mL do coquetel enzimático diluído em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8. A reação ocorreu a 50 °C por 10 min e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). Foram adicionados 13 mL da água destilada em cada tudo de reação e a absorvância final das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 µmol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

A atividade de xilanase, por sua vez, foi determinada utilizando-se como substrato uma solução de xilana 1% m/v (*oat spelt*, Sigma, EUA) em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0 (Bailey; Poutanen, 1989). Para tal, em 2,0 mL de xilana 1% foram adicionados 1,0 mL do coquetel enzimático diluído em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0. A reação ocorreu a 50 °C por 30 min e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). Foram adicionados 13 mL da água destilada em cada tudo de reação e a absorvância final das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 µmol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

As proteínas presentes nos coquetéis enzimáticos foram quantificadas a partir da metodologia de Bradford (1976) e os resultados foram expressos em mg de proteína.mL⁻¹ equivalente a albumina do soro bovino (BSA).

Para as análises de eletroforese, os extratos enzimáticos brutos produzidos em FSeq e FSm foram concentrados através de precipitação com acetona. Ao extrato bruto produzido foi gotejada acetona PA na proporção de 1:4 de extrato enzimático:acetona e, em seguida, a suspensão foi acondicionada a -20 °C por 4 horas. Ao final, a solução foi

centrifugada a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 10.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi suspenso em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,0 em um volume 10 vezes menor que o volume inicial antes da precipitação. Os coquetéis enzimáticos concentrados foram submetidos a eletroforese com agente desnaturante (SDS-PAGE) segundo o método de Laemmli (1970) com gel de poliacrilamida 12% m/v, para determinar o perfil das proteínas presentes nos complexos enzimáticos. Amostras das soluções enzimáticas concentradas foram aquecidas por 5 minutos em tampão desnaturante (Tris-HCl 75 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 5% v/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,01% v/v). Foram aplicados aproximadamente 3,5 μg de proteínas (determinadas pelo método de Bradford) em cada canaleta pré-formada em gel de eletroforese. Na primeira canaleta foi aplicado 4 μL do marcador de massa molecular PreciseTM (AMRESCO) 15 – 115 kDa. A corrida eletroforética foi realizada durante 90 minutos (60 V para 0-30 min, e 110 V para 30-90 min) em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v). A revelação do gel ocorreu em duas etapas: o gel foi corado com Comassie Blue R-250 por 40 min e descorado por 12 horas utilizando uma solução ácido acético 6% e etanol 3% v/v.

3.3 Resultados e discussões

Em um primeiro passo, os experimentos foram planejados para avaliar os efeitos do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, do tamanho de partícula e do método de cultivo na produção de endoglucanases em cultivos em frascos Erlenmeyer. Num segundo passo, estes resultados foram validados e os efeitos da frequência de agitação, do método de cultivo e do tipo de impelidor na produção de (hemi)celulases foram avaliados em cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado (BTA). Os experimentos foram conduzidos em duplicatas e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

3.3.1 Cultivos preliminares em frascos Erlenmeyer: Efeito dos métodos de cultivo, pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e tamanho de partícula na produção enzimática

As respostas para os efeitos do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, diâmetro de partícula (dp), e método de cultivo são apresentados na Figura 3.1. Cultivos em frascos agitados foram conduzidos a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 rpm, utilizando bagaço de cana *in natura*

(BIn) ou pré-tratado por explosão a vapor (BEx), com tamanhos de partícula (d_p em mm) nas faixas de $d_p \leq 0,5$ e $1,0 \leq d_p \leq 2,0$. Os métodos de cultivo empregados foram o método de cultivo submerso convencional (FSm) e o novo método de fermentação sequencial (FSeq). A combinação entre os experimentos foi planejada de acordo com um delineamento 2^3 fatorial, com todos os experimentos realizados em duplicata (Tabela 3.2). Dado o importante efeito do tamanho de partícula do bagaço de cana, experimentos adicionais utilizando partículas de tamanhos intermediários ($0,5 \leq d_p \leq 1,0$ mm) e maiores ($2,0 \leq d_p \leq 2,4$ mm) foram também conduzidos a fim de se investigar mais profundamente o efeito desta variável, como apresentado na Figura 3.1.

A maior atividade de endoglucanase ($1.727 \pm 19 \text{ IU.L}^{-1}$) em cultivos em frascos agitados foi obtida através de cultivo no método FSeq, com bagaço de cana pré-tratado e tamanho de partículas na faixa entre 1 e 2 mm, como mostra a Figura 3.1. Após uma análise de variância (ANOVA) a $p \leq 0,05$, pode-se observar pelo gráfico de Pareto (Figura 3.2) que as três variáveis analisadas apresentaram efeito estatístico significativo na produção de endoglucanase nos cultivos em frascos agitados. Como pode ser observado, o aumento no tamanho de partícula foi a variável com efeito mais pronunciado para o aumento da produção enzimática, seguido pelo efeito do pré-tratamento por explosão a vapor e pelo método de cultivo empregado.

Figura 3.1 Produção de endoglucanases após 72 h de cultivos em frascos agitados utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIn) ou pré-tratado por explosão a vapor (BEx) com diferentes faixas de tamanhos de partícula (Dp, em mm), seguindo o método de cultivo submerso ou sequencial.

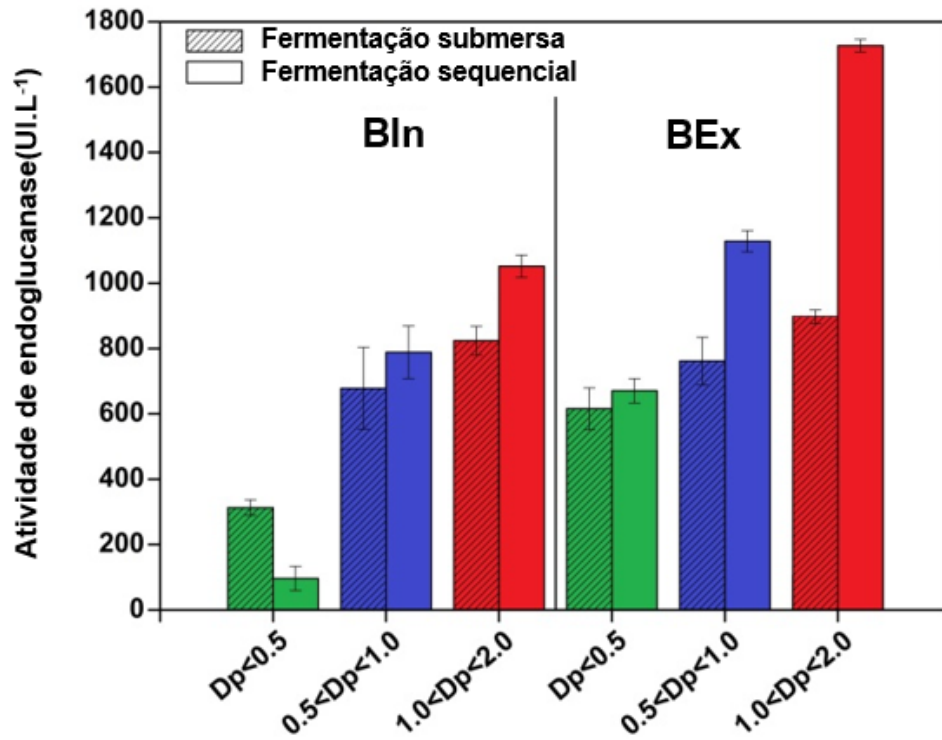
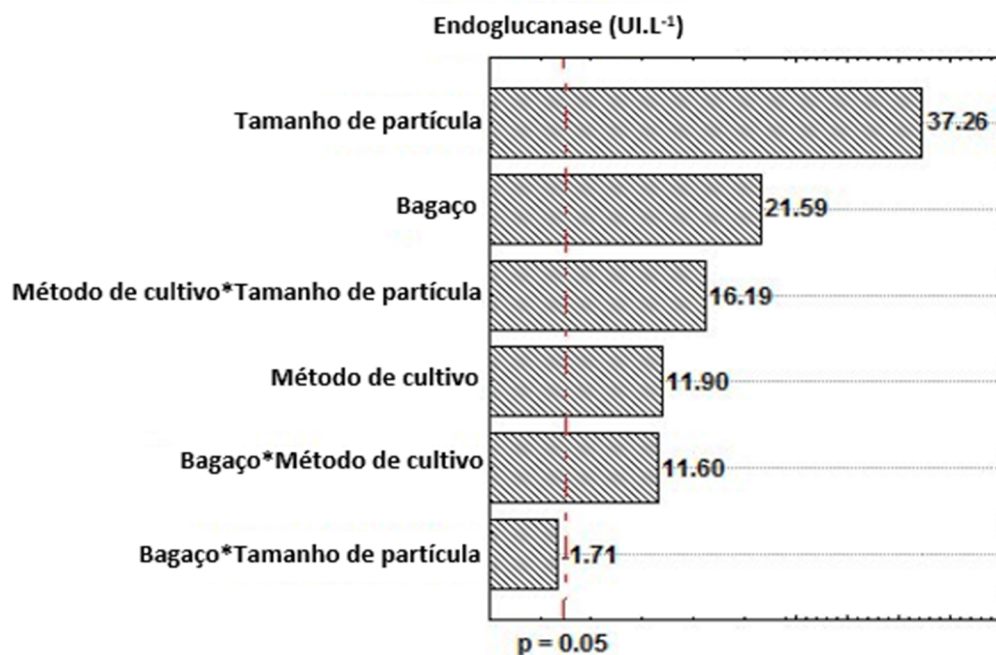


Figura 3.2 Gráfico de Pareto com os efeitos do tamanho de partícula, do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor e do tamanho de partícula na produção de endoglucanases após 72 h de cultivos em frascos agitados.



A partir deste conjunto de experimentos em frascos agitados pode-se concluir que tamanhos de partícula de bagaço de cana menores que 0,5 mm prejudicaram o crescimento fúngico, enquanto o aumento de partículas até 2 mm teve um efeito positivo na produção de endoglucanases. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que embora partículas de tamanhos menores têm maior área superficial, aumentando o contato entre o fungo filamentososo e o substrato sólido, partículas muito pequenas tendem a empacotar, causando conseqüente limitação de oxigênio entre as partículas sólidas, limitando assim o crescimento do fungo (Pandey *et al.*, 1999; Barrios-Gonzalez, 2012; Esperanca *et al.*, 2014). Este efeito bem conhecido do tamanho de partícula em fermentações no estado sólido se mostrou válido também em fermentações trifásicas empregando bagaço de cana-de-açúcar em cultivos em frascos agitados.

Foi observado que conforme o tamanho de partícula foi aumentado em até 2 mm, o substrato sólido atuou como um suporte adequado ao crescimento fúngico, provavelmente devido ao aumento da interação entre o fungo e o substrato indutor e, conseqüentemente, resultando em maior produção enzimática. No entanto, tamanhos de partícula maiores que 2 mm não foram adequados aos cultivos devido ao intenso crescimento fúngico, o qual resultou em aglomerados fungo-substrato muito densos (em ambos métodos de cultivo, FSm e FSeq), o que comprometeu a homogeneidade do caldo de fermentação. Os cultivos com tamanhos de partícula entre 2,0 e 2,4 mm foram, portanto, descartados pois a formação de aglomerados impossibilitou a transferência do inóculo ao biorreator.

O uso do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor resultou numa produção de endoglucanase cerca de 64 % maior em comparação com cultivos utilizando bagaço de cana *in natura*, em cultivos conduzidos em FSeq utilizando bagaço de cana com $1,0 \leq d_p \leq 2,0$ mm. Isto provavelmente pode ser explicado pelo teor mais alto de celulose no bagaço de cana pré-tratado (Tabela 3.1). Além disso, a explosão a vapor e outros pré-tratamentos aumentam a porosidade do material lignocelulósico através da remoção da hemicelulose, tornando a celulose mais acessível ao fungo (Sun; Cheng, 2002; Wyman *et al.*, 2011; Van Dyk; Pletschke, 2012).

A influência do pré-tratamento na produção de endoglucanases foi maior nos cultivos em FSeq do que em FSm, o que pode ser explicado pelo fato de que a germinação do fungo durante FSeq ocorreu em fermentação no estado sólido, promovendo um maior contato do microrganismo com o substrato indutor. Uma interação estatisticamente significativa entre o pré-tratamento do bagaço de cana e o método de cultivo pode ser observada no gráfico de Pareto na Figura 3.2, onde o efeito positivo do pré-tratamento e o uso do novo método de

FSeq na produção de endoglucanases mostrou-se significativa (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Em cultivos com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor com $1,0 \leq d_p \leq 2,0$ mm, o método de fermentação sequencial aumentou a produção de endoglucanase em até 92%, em comparação com o método de fermentação submerso convencional, demonstrando o impacto da etapa de pré-cultivo na produção de endoglucanase por *A. niger*. A influência do ambiente de germinação dos esporos, assim como da qualidade e do tamanho do inóculo nos perfis de crescimento de fungos filamentosos foi reportada em outros estudos (Bizukoje; Ledakowicz, 2006; Gabelle *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012).

Após a avaliação do impacto do tamanho de partícula do bagaço de cana e de seu pré-tratamento e da avaliação da vantagem da utilização do método de cultivo sequencial na produção de endoglucanases em cultivos em frascos agitados, o próximo passo foi a validação destes resultados em maior escala. A seção a seguir descreve a produção de enzimas (hemi)celulolíticas em biorreator tanque agitado e aerado (BTA).

3.3.2 Efeitos das condições operacionais em cultivos em BTA

Após observação de efeitos combinados das condições de cultivo em frascos agitados, ambos os bagaços *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor foram utilizados em cultivos trifásicos para uma investigação mais profunda sobre a influência do método de cultivo, frequência de agitação, controle de pH, tipo de impelidor utilizado e tamanho de partícula de bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulases. Um primeiro grupo de experimentos preliminares foi planejado a fim de se avaliar o efeito de uma variável por vez (OVAT), devido à complexidade de cultivos em BTA. Após estes experimentos preliminares, um planejamento experimental 2^2 fatorial completo foi utilizado para investigar a significância dos efeitos do tipo de bagaço de cana e da frequência de agitação na produção enzimática.

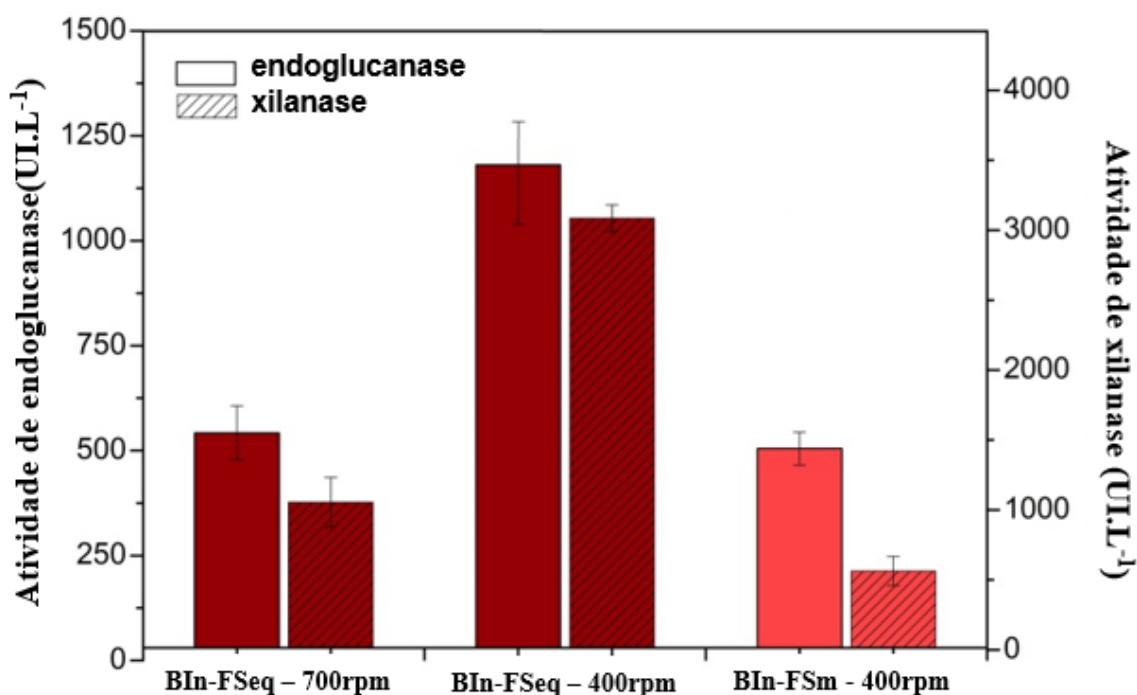
3.3.2.1 Efeito da frequência de agitação e do métodos de cultivo na produção de (hemi)celulases

Os efeitos da frequência de agitação (400 e 700 rpm) e do método de cultivo (FSeq e FSm) na produção de (hemi)celulases em cultivos em biorreator foram avaliados utilizando bagaço de cana *in natura* com tamanho de partícula entre 1 e 2 mm. Os resultados (Figura 3.3) mostraram que em FSeq a agitação de 400 rpm foi mais adequada à produção

enzimática, uma vez que não foi observado crescimento fúngico significativo a 700 rpm. Isto foi evidenciado pelo nível de oxigênio dissolvido no meio de cultivo a 700 rpm, o qual permaneceu estável acima de 85% e voltou a aumentar a 100% após apenas algumas horas de cultivo. Em frequências de agitação constantes, isto pode ser consequência de baixo crescimento fúngico e, conseqüentemente, baixa demanda de oxigênio. Esta possibilidade foi confirmada pela baixa viscosidade observada do meio de cultivo e pela baixa produção enzimática observados em cultivos a 700 rpm.

O impacto negativo da maior frequência de agitação na produção enzimática pode também estar associado ao contato reduzido do fungo ao substrato sólido. Mudanças no crescimento fúngico relacionado à mudanças na frequência de agitação eram esperados, uma vez que alterações na frequência de agitação afetam os padrões de mistura, transferência de calor e de massa e também o cisalhamento ao qual o fungo é exposto, assim como os padrões de crescimento de fungos filamentosos e a produção de metabólitos (Gabelle *et al.*, 2012; Lin; Scholz; Krull, 2010; Papagianni, 2004).

Figura 3.3 Produção de endoglucanase e xilanase após 30 h de cultivo um biorreator tanque agitado utilizando bagaço de cana *in natura* (BIn) com tamanho de partícula $1,0 \leq dp \leq 2,0$ e frequências de agitação de 400 e 700 rpm, utilizando o método de fermentação sequencial (FSeq) ou submerso (FSm) em pH 5,0. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.



Uma comparação entre os métodos de cultivo FSm e FSeq foi realizada em

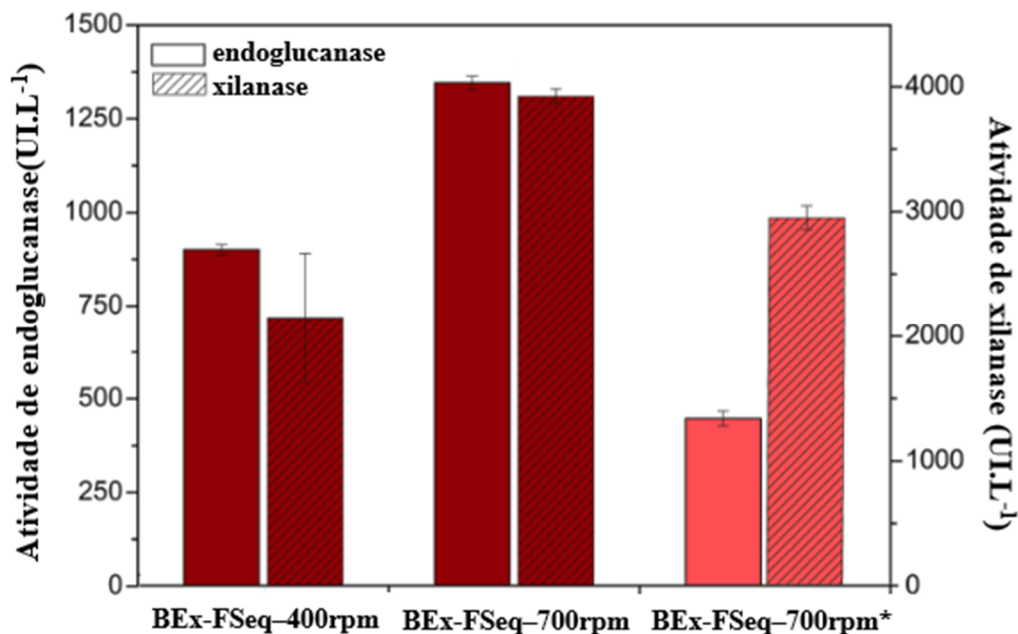
termos de produção de endoglucanase e xilanase (Figura 3.3) na frequência de agitação selecionada de 400 rpm. A produção de enzimas foi de 2,5 vezes maior para endoglucanase e 5,5 vezes maior para xilanase em cultivos conduzidos pelo método de fermentação sequencial ao invés do método convencional de cultivo submerso. Foi observado que tanto nos cultivos em frascos agitados quanto nos cultivos em biorreatores, o pré-cultivo do método de fermentação sequencial resultou em uma morfologia de cultivo na forma de micélios dispersos, enquanto o crescimento fúngico em cultivos em fermentação submersa convencional ocorreu na forma de aglomerados densos de hifas, o que possivelmente prejudicou o contato entre o fungo e o substrato indutor sólido. Os resultados obtidos estão de acordo com resultados de trabalhos prévios utilizando os métodos de cultivo FSeq e FSm em cultivos em frascos agitados e em biorreator pneumático tipo coluna de bolhas com bagaço de cana *in natura* (Cunha *et al.*, 2012 a, b).

Uma comparação entre os resultados obtidos em FSeq utilizando bagaço de cana *in natura* de tamanho de partícula entre 1 e 2 mm em biorreator tipo tanque agitado (BTA) e os resultados obtidos previamente por Cunha *et al.* (2012b) em biorreator coluna de bolhas (BCB) indicam que os mesmos níveis de produção de endoglucanase em ambos reatores, de 1.181 ± 141 e 719 ± 85 IU.L⁻¹ em BTA e BCB, respectivamente, com correspondentes produtividades volumétricas de 57 ± 13 e 46 ± 3 UI.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, podem ser atingidos. Isto deve ser destacado como um resultado muito positivo, pois uma vez que tanto a produção quanto a produtividade volumétrica foram similares em ambos biorreatores, a decisão de se utilizar BTA ou BCB para a produção de celulases pode se basear em vantagens operacionais específicas de cada tipo de biorreator.

3.3.2.2 Efeito do pré-tratamento da biomassa, frequência de agitação e controle de pH na produção de (hemi)celulases

Após a seleção do método de cultivo FSeq como uma alternativa promissora para a produção de enzimas utilizando bagaço de cana-de-açúcar em biorreator tanque agitado, o próximo passo foi a avaliação dos efeitos da frequência de agitação (400 ou 700 rpm) e do controle de pH na produção de enzimas utilizando o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEx) como substrato indutor (Figura 3.4).

Figura 3.4 Produção de endoglucanase e xilanase após 30 h de cultivo em biorreator tanque agitado utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) com tamanhos de partícula $1,0 \leq dp \leq 2,0$ e frequências de agitação de 400 e 700 rpm, utilizando o método de fermentação sequencial (FSeq) em pH 5,0. O símbolo * indica cultivo sem controle de pH. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

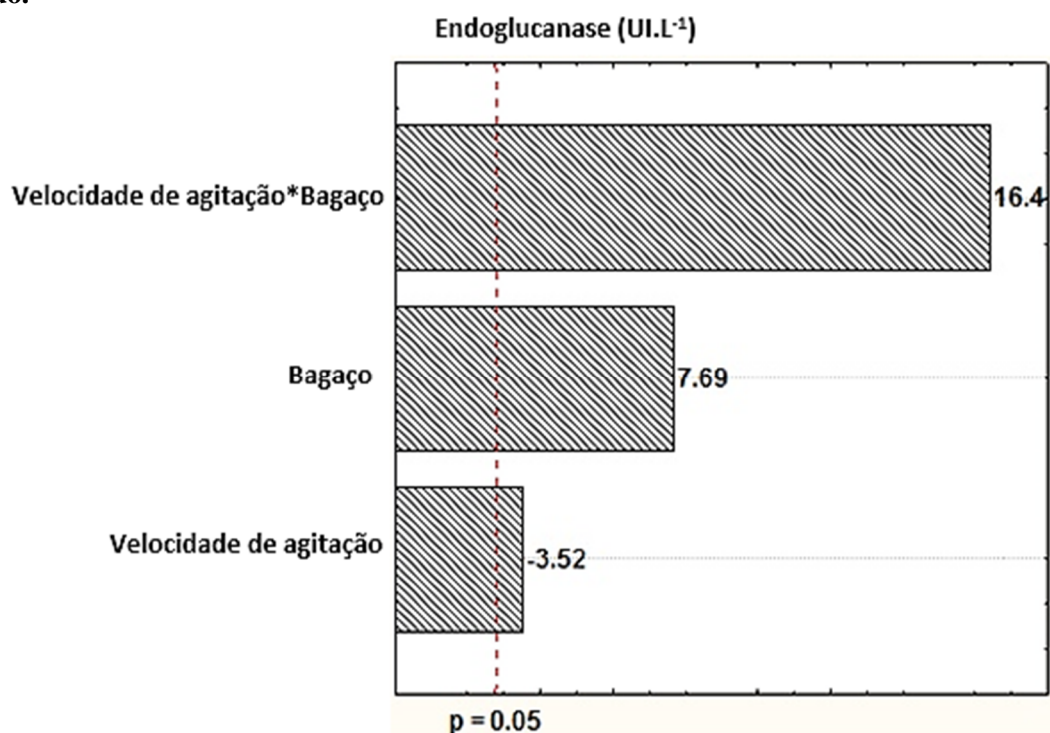


Um resultado interessante obtido foi que em cultivos com substrato pré-tratado (BEx), uma maior produção de endoglucanase e xilanase foi obtida em cultivos com frequência de agitação mais alta, de 700 rpm (Figura 3.4), ao contrário do resultado obtido em cultivos com o substrato *in natura* (Bin), onde a melhor produção enzimática obtida ocorreu em cultivos com frequência de agitação de 400 rpm (Figura 3.3). Pode-se concluir que existe uma relação entre o tipo de substrato utilizado como fonte de carbono e indução e a frequência de agitação ideal para o crescimento fúngico. Este resultado pode ser explicado pelo rápido crescimento fúngico em cultivos com o BEx, cujo substrato é mais acessível ao fungo, resultando em um rápido crescimento do microrganismo associado a um rápido aumento na viscosidade do caldo fermentativo. Conseqüentemente, tanto a homogeneidade do meio quanto a transferência de massa foram prejudicados em cultivos conduzidos no nível de agitação mais baixa, de 400 rpm.

A fim de se aprofundar e confirmar estes resultados obtidos, as diferentes condições de cultivo foram também analisadas de acordo com um delineamento estatístico fatorial 2² completo (Tabela 3.3) seguido pela análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,05$). O gráfico de Pareto (Figura 3.5) mostra os efeitos da frequência de agitação e do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na produção de endoglucanase. Pode-se observar que houve

uma interação estatisticamente significativa entre os fatores, com um efeito positivo da aplicação do pré-tratamento no bagaço de cana em cultivos em frequências de agitação mais intensas. Estes resultados tem implicações relevantes para o desenvolvimento de cultivos trifásicos com materiais lignocelulósicos, uma vez demonstrado aqui que a frequência de agitação deve ser avaliada para cada tipo de substrato que se deseja aplicar em um determinado bioprocessos.

Figura 3.5 Gráfico de Pareto com os efeitos da frequência de agitação e do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor após 30 h de cultivo em biorreator tipo tanque agitado.



Na sequência, experimentos foram conduzidos sem o controle de pH, a fim de se determinar o efeito do uso de condições mais simplificadas de operação e, ao mesmo tempo, reduzir custos associados aos procedimentos para manutenção do pH dos cultivo controlado a pH 5,0. Foi observado que o crescimento do fungo em ambientes sem controle de pH resultou numa redução de pH de 5,0 para 2,3 após as primeiras 24 h de cultivo, devido à produção de ácidos orgânicos pelo metabolismo primário do fungo. Embora as linhagens de *A. niger* são conhecidas por crescerem em condições de baixos valores de pH, esta condição de cultivo não foi favorável para a produção enzimática. Quedas nas produções de endoglucanases e xilanases de 2,9 e 1,3 vezes, respectivamente, foram observadas em cultivos com pH livre, em comparação com cultivos com pH controlado em 5,0.

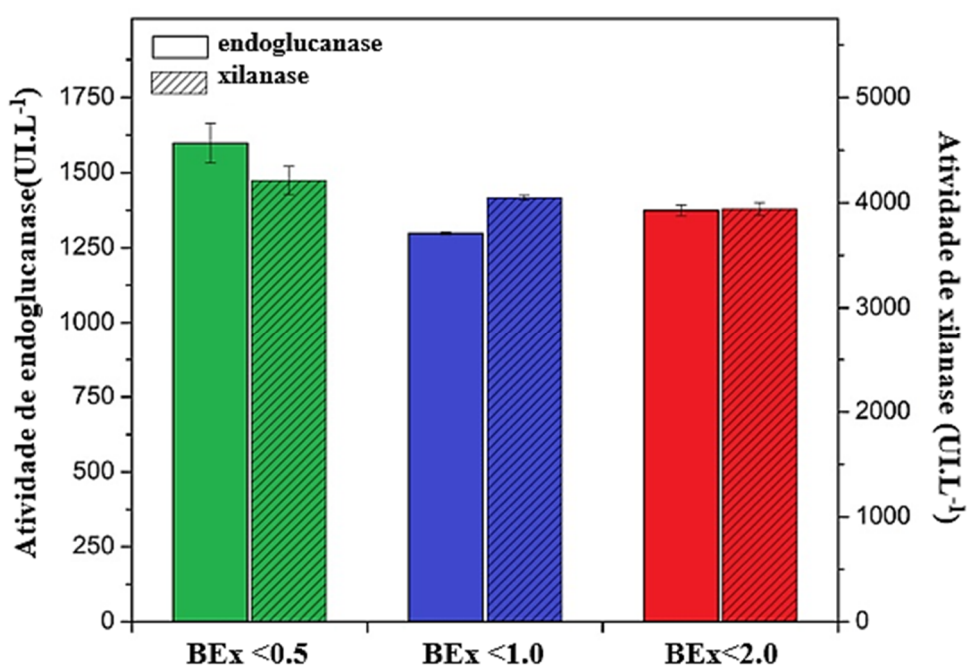
Entre as condições avaliadas no presente trabalho, utilizando bagaço de cana-

de-açúcar de tamanho de partícula de 1 a 2 mm, pode-se concluir que a melhor condição para a produção enzimática foi obtida em cultivos pelo método de cultivo FSeq, utilizando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, BEx, com frequências de agitação de 700 rpm e pH 5,0. Estas condições resultaram em produções de 1.374 ± 18 e 3.940 ± 61 UI.L⁻¹ de endoglucanases e xilanases, respectivamente. Após a seleção dos parâmetros de cultivo, a próxima etapa do trabalho compreendeu a avaliação do tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar na produção de (hemi)celulases, uma vez que esta variável apresentou um forte efeito na produção de enzimas em cultivos preliminares conduzidos em frascos agitados.

3.3.2.3 Efeito do tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar na produção de (hemi)celulases

A influência do tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar na produção de endoglucanase e xilanase foi avaliada utilizando bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e as demais condições operacionais selecionadas nas etapas anteriores: o método de cultivo sequencial (FSeq), frequência de agitação de 700 rpm e pH controlado em 5,0. As faixas tamanhos de partícula avaliadas $d_p \leq 0,5$; $0,5 \leq d_p \leq 1,0$; e $1,0 \leq d_p \leq 2,0$ mm (Figura 3.6).

Figura 3.6 Produção de endoglucanase e xilanase após 30 h de cultivo um biorreator tanque agitado utilizando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEx) com diferentes tamanhos de partícula, em cultivos pelo método de fermentação sequencial (FSeq), agitação de 700 rpm, aeração de 0,5 vvm e pH 5,0. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

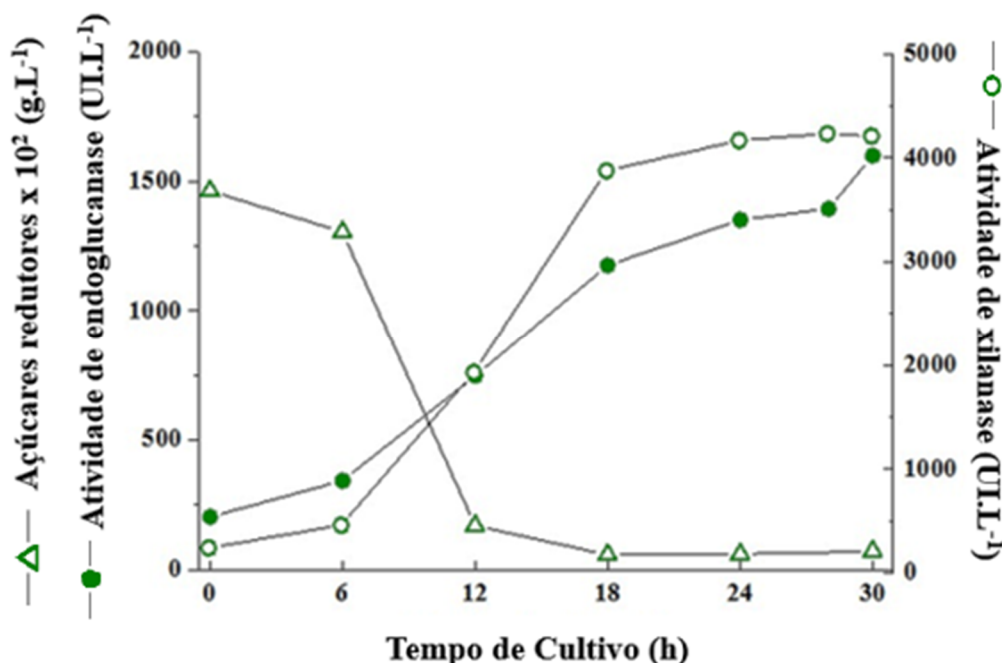


Pode-se observar na Figura 3.6 que a utilização de bagaço de cana com tamanho de partícula menor que 0,5 mm favoreceu a produção de endoglucanases e xilanases em biorreator. Este é um resultado interessante, uma vez que é oposto ao determinado como ideal em cultivos em frascos agitados. Em frascos agitados, o aumento do tamanho das partículas sólidas pode ter promovido um maior suporte para o crescimento fúngico, enquanto em cultivos em biorreatores tipo tanque agitado, a homogeneidade do meio de cultivo promovida com partículas menores de 0,5 mm apresentou maior vantagem.

A produção de xilanases, no entanto, mostrou-se não ser muito influenciada pelo tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar, resultando em maiores índices em cultivos com substrato de tamanhos de partícula nas faixas entre $d_p \leq 0,5$ e $0,5 \leq d_p \leq 1,0$ mm. Isto pode ser explicado pelo fato de que a fração hemicelulósica da biomassa é mais facilmente acessada pelo fungo durante os cultivos, em comparação com as fibras de celulose, uma vez que a hemicelulose reveste as fibrilas de celulose e pode até mesmo estar parcialmente solubilizada no meio líquido. A hemicelulose é termo-sensível e consiste de polímeros curtos e heterogêneos, os quais podem ser facilmente degradados (Agbor *et al.*, 2011).

Os parâmetros do bioprocessamento e características de substrato que resultaram em maior produção de enzimas (hemi)celulolíticas por *A. niger* em cultivos em biorreatores tipo tanque agitado e aerado foram: método de cultivo sequencial (FSeq) utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) de tamanho de partícula menor que 0,5 mm, frequência de agitação de 700 rpm e pH 5,0. Os perfis de produção enzimática sob estas condições são apresentados na Figura 3.7.

Figura 3.7 Produção de endoglucanase e xilanase e concentração de açúcares redutores em função do tempo em cultivos em biorreator tanque agitado utilizando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEx) com tamanho de partícula $d_p \leq 0,5$ mm. Condições: 32 °C, método de fermentação sequencial (FSeq), agitação de 700 rpm, aeração de 0,5 vvm e pH 5,0.



Pode-se observar na Figura 3.7 um rápido decaimento da concentração de açúcares redutores, o qual foi relacionado ao rápido consumo de glicose no início do cultivo. As produções de endoglucanase e xilanase iniciaram-se logo após o esgotamento da glicose, o que ocorreu aproximadamente após 12 h do início do cultivo. Isto já era esperado, porque o fungo começa a assimilar o bagaço de cana-de-açúcar como fonte de açúcares após a exaustão da glicose, como já observado anteriormente por Cunha *et al.* (2012b). A produção de xilanase foi mais pronunciada que a de endoglucanase e tendeu a se estabilizar após 18 h de cultivo, enquanto a produção de endoglucanase aumentou até 30 h. As maiores atividades de endoglucanase e xilanase, de 1.599 ± 66 e 4.212 ± 133 U.L⁻¹, respectivamente, foram obtidas após 30 h de cultivo.

Uma comparação entre as produções de endoglucanase em cultivos em frascos agitados e em biorreator BTA mostram que embora os mesmos níveis de atividades enzimáticas possam ser obtidas em ambos sistemas de cultivos, a produtividade volumétrica de endoglucanase foi de até 2,2 vezes superior em cultivos em BTA, com valores de produtividades volumétricas de endoglucanase de 23,99 e 53,30 U.L⁻¹.h⁻¹ em cultivos em frascos agitados e BTA, respectivamente.

A partir dos resultados apresentados, pôde-se concluir que a aplicação do método de cultivo sequencial (Fseq) e o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

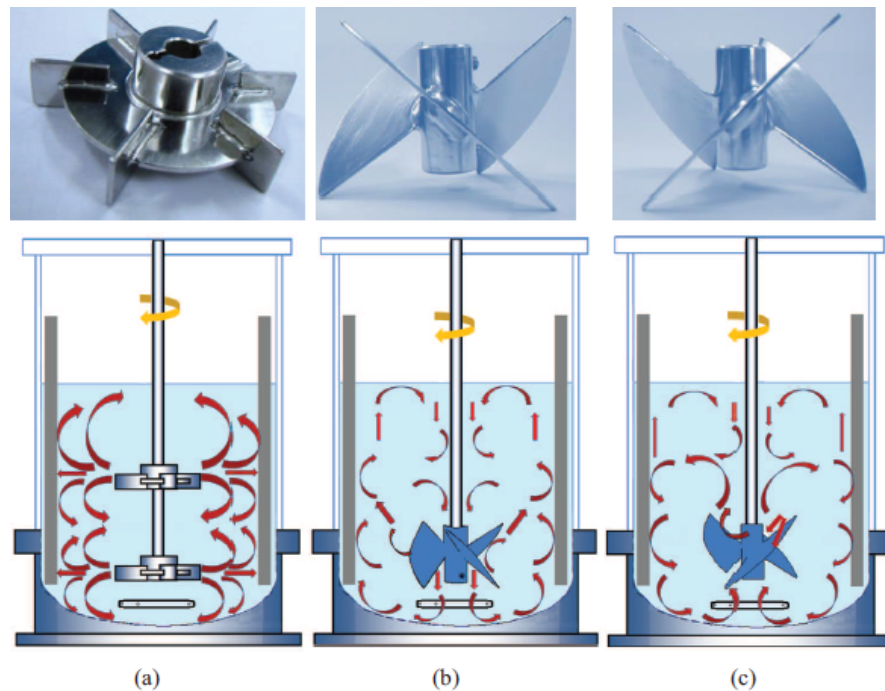
aumentaram a produção de enzimas (hemi)celulolíticas tanto em frascos agitados quanto em biorreatores tipo tanque agitado. Além disso, o controle de pH é necessário para o aumento dos índices de produção enzimática, enquanto menores tamanhos de partícula promoveram uma melhor homogeneidade durante cultivos em BTA e, conseqüentemente, o aumento da produção enzimática. Os efeitos combinados da frequência de agitação com o pré-tratamento do bagaço de cana podem impactar significativamente a produção de (hemi)celulases e devem ser considerados no desenvolvimento de bioprocessos trifásicos.

3.3.3 Efeito do tipo de impelidor na produção de (hemi)celulases em cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado utilizando bagaço de cana-de-açúcar

Em bioprocessos conduzidos em biorreatores do tipo tanque agitado e aerado, há uma ampla versatilidade de configuração de geometrias e de variáveis operacionais. A configuração geométrica do reator é um fator capaz de influenciar com alto impacto o desempenho dos cultivos à medida que interfere no padrão de crescimento de microrganismos. Nesse sentido, o sistema de agitação pode ser alterado de acordo com o tipo de impelidor utilizado, alterando assim os padrões de escoamento no biorreator e, conseqüentemente, afetando a produtividade dos cultivos com microrganismos (Bustamante, 2013; Mirro; Voll, 2009).

Os impelidores podem ser classificados de acordo com o tipo de escoamento que produzem, que pode ser radial, axial ou misto. Como se pode observar na Figura 3.8, os impelidores do tipo turbina de Rushton ou turbina com 6 pás planas (TR) proporcionam um escoamento radial no reator, com o líquido sendo direcionado a partir do eixo do reator até as paredes do mesmo. Já os impelidores do tipo orelha de elefante (do inglês: *Elephant Ear*, EE), são impelidores que promovem um escoamento misto, tanto radial quanto axial, direcionando as linhas de corrente para cima ou para a base do reator e, portanto são classificados como impelidores de escoamento ascendente (*up-pumping* - UP) ou descendente (*down-pumping* - DP).

Figura 3.8 Padrão de escoamento para três sistemas de impelidores. (a) Combinação de dois impelidores tipo turbina de Rushton - TR (fluxo radial). (b) impelidor tipo orelha de elefante com fluxo ascendente (EEUP). (c) impelidor tipo orelha de elefante com fluxo descendente (EEDP). Fonte: Bustamante, 2013.



O desempenho de impelidores do tipo orelha de elefante foram recentemente avaliados em comparação ao impelidor convencional tipo turbina de Rushton (TR) por Bustamante (2013) em cultivos com a bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus*. Pôde-se observar que o impelidor tipo EEUP foi capaz de fornecer transferência de oxigênio adequada ao microrganismo, associado à menores níveis de cisalhamento em comparação com o impelidor tipo turbina de Rushton (TR), resultando em maior produtividade nos cultivos para a produção de ácido clavulânico.

Frente ao promissor desempenho do impelidor EEUP em cultivo com microrganismos filamentosos, esta etapa do trabalho compreendeu a sua aplicação em cultivos trifásicos com bagaço de cana-de-açúcar para a produção de (hemi)celulases por *A. niger*. Para que fosse possível uma comparação de desempenho entre os impelidores EEUP e TR, optou-se por operar os cultivos com impelidor EEUP nas mesmas condições iniciais de k_{La} em que foram operados os cultivos anteriores conduzidos com impelidor TR. Para tal, as equações 3.1 e 3.2, desenvolvidas em biorreator tipo tanque agitado para fluidos Newtonianos por Bustamante, Cerri e Badino (2013), foram aplicadas:

$$k_{La(RT)} = 7,65 \cdot 10^{-6} \cdot N^{0,778} \cdot \phi_{ar}^{0,688} \cdot \mu^{-0,620} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$R^2 = 0,98$$

$$k_{La(EEUP)} = 6,01 \cdot 10^{-9} \cdot N^{1,706} \cdot \phi_{ar}^{0,618} \cdot \mu^{-0,716} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

$$R^2 = 0,99$$

onde:

N = frequência de rotação do impelidor (rpm)

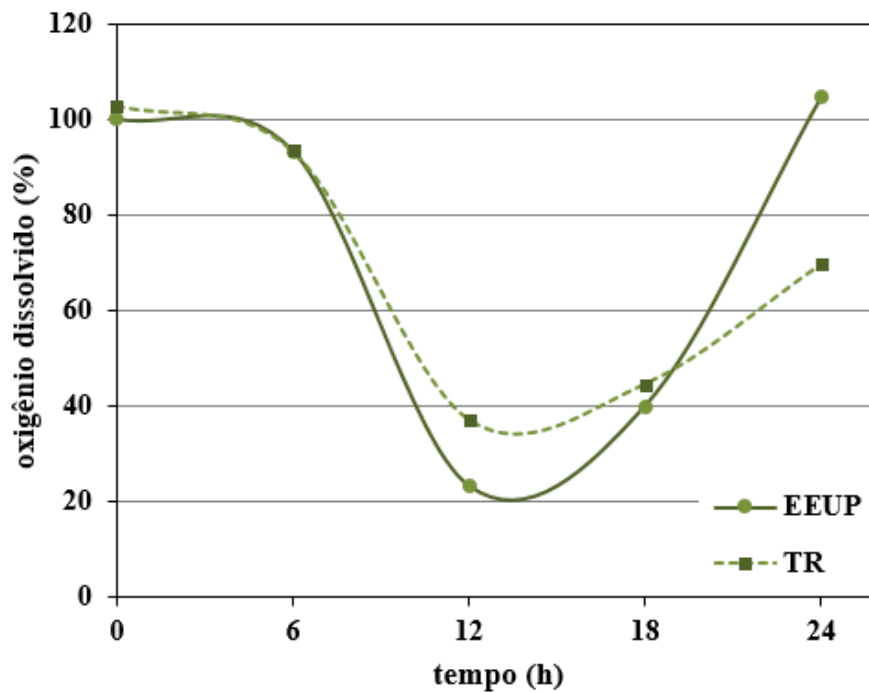
ϕ_{ar} = vazão específica de alimentação de ar (vvm)

μ = viscosidade dinâmica ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

Uma vez selecionadas as condições de agitação e aeração para cultivos utilizando impelidor TR em 700 rpm e 0,5 vvm, por meio das equações 3.1 e 3.2 foi possível o cálculo das condições de operação (agitação e aeração) que resultam em mesmo k_{La} para o impelidor EEUP, que foram de 800 rpm e 0,6 vvm. Portanto, as condições de cultivo com impelidor tipo EEUP foram conduzidas seguindo o método de fermentação submersa e sequencial (FSm e FSeq), utilizando bagaço de cana-de-açúcar explodido (BEx) de tamanho de partícula menor que 0,5 mm, em cultivos com pH 5,0, frequência de agitação de 800 rpm e 0,6 vvm de aeração a 32 °C por 30 h.

Através do perfil de oxigênio dissolvido (OD) ao longo dos cultivos em fermentação sequencial utilizando os impelidores TR e EEUP (Figura 3.9) é possível observar que a queda na concentração de oxigênio dissolvida no cultivo com o impelidor EEUP foi mais acentuada nas primeiras 12 h de cultivo. Uma vez que as condições de agitação e aeração dos biorreatores permaneceram constantes, pode-se utilizar esta informação como um indicativo de demanda de oxigênio pelo fungo filamentoso, o qual apresentou seu crescimento mais rápido e mais intenso nos cultivos nos quais o impelidor EEUP foi utilizado.

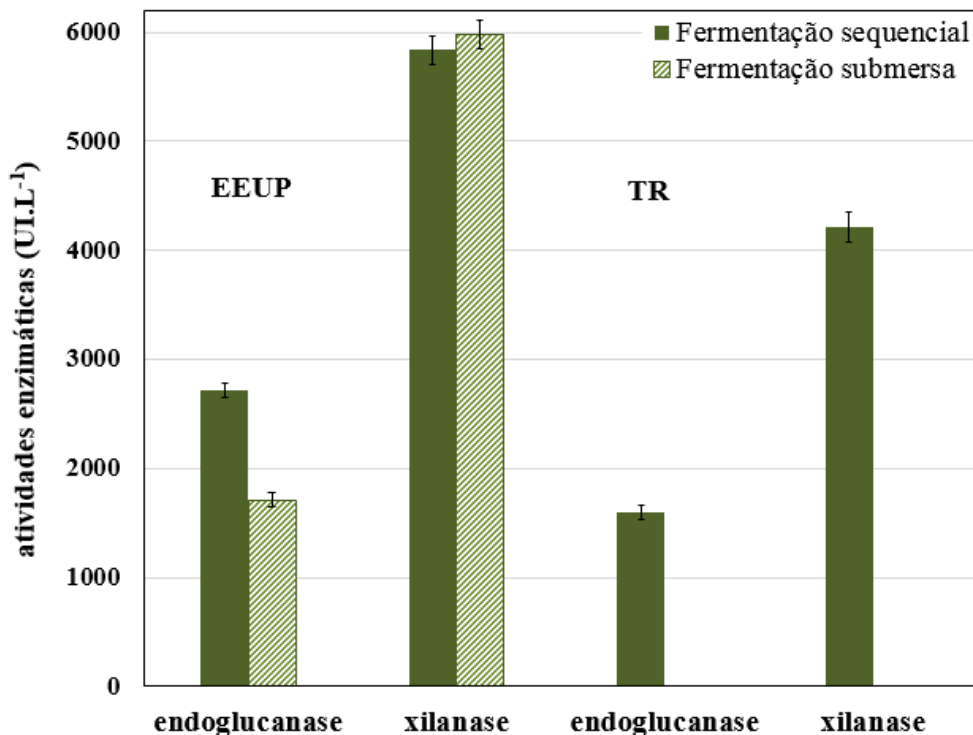
Figura 3.9 Perfis de concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos cultivos em fermentação sequencial utilizando os impelidores TR e EEUP



O fato do meio de cultivo conter partículas sólidas de bagaço de cana impossibilitou as medidas de massa seca para quantificação do crescimento celular. No entanto, os dados de maior produção enzimática apresentados na Figura 3.10 em cultivos com o impelidor EEUP em comparação com cultivos utilizando o impelidor TR confirmam que o EEUP forneceu condições de cultivo mais favoráveis para a produção enzimática, o que pode ser resultado condições mais amenas de cisalhamento promovidas por este tipo de impelidor, promovendo maior crescimento celular e favorecendo o contato fungo-substrato indutor.

Conforme pode se observar na Figura 3.10, nos cultivos com o impelidor EEUP as produções de endoglucanase e xilanase foram 70 e 39% superiores, respectivamente, em comparação com os cultivos com impelidor tipo turbina de Rushton, evidenciando a vantagem de utilização de impelidor tipo EEUP em cultivos com fungos filamentosos na presença de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor.

Figura 3.10 Produção de endoglucanase e xilanase em cultivos em biorreator tanque agitado pelo método de cultivo sequencial e submerso utilizando impelidor orelha de elefante com escoamento ascendente (EEUP) e impelidor turbina de Rushton (TR). Condições: 32 °C, 800 rpm, 0,6 vvm e pH 5,0.



Bustamante (2013) demonstrou condições de cisalhamento mais amenas produzidas com o impelidor EEUP em comparação com o impelidor TR em cultivos com uma bactéria filamentosa. No presente estudo, as condições mais amenas de cisalhamento podem ter promovido uma maior interação do fungo-substrato, favorecendo a produção mais alta de endoglucanases e xilanases. Além disso, uma maior interação fungo-substrato favorece o crescimento do fungo filamentoso aderido às partículas sólidas, as quais produzem um efeito de proteção do fungo contra o cisalhamento. O efeito de proteção do fungo filamentoso por partículas de farelo de trigo durante diferentes condições de agitação foi observada por Siedenberg *et al.* (1997).

Além disso, pode-se extrair da Figura 3.10 a informação de que o método de fermentação sequencial apresentou vantagens na produção de endoglucanases, com resultados até 59% superiores aos obtidos por fermentação submersa. Foi observado que, assim como nos cultivos com impelidor TR, a produção de endoglucanases foi crescente até 30 h de cultivo, enquanto a produção de xilanases foi mais rápida, com pico de produção em 24 h, resultando em produções de 2.712 e 5.837 IU.L⁻¹ de endoglucanase e xilanase, respectivamente, pelo método de cultivo sequencial.

Perfil das proteínas produzidas por FSm e FSeq

Os coquetéis enzimáticos produzidos em biorreator munido do impelidor tipo EEUP foram concentrados através de precipitação com acetona, conforme descrito na Seção 3.2.7 e os perfis enzimáticos dos coquetéis antes e depois da etapa de concentração são apresentados na Tabela 3.4. Após a concentração, os complexos enzimáticos foram analisados em gel de eletroforese (SDS-PAGE) e em gel de poliácridamida 12% m/v, conforme descrito na Seção 3.2.7.

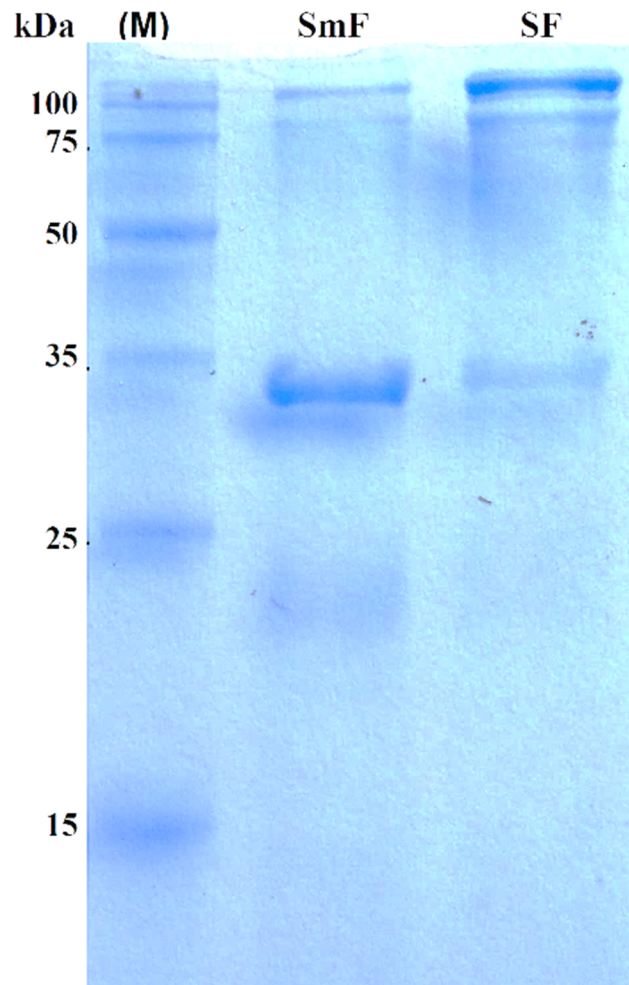
Pode-se observar pelo gel de eletroforese (Figura 3.11) que embora os perfis proteicos em ambos os complexos enzimáticos sejam similares, proteínas de maior massa molar, de 70–100 kDa estavam presentes em maior concentração no complexo enzimático produzidos por FSeq, enquanto proteínas de massas molares menores, em torno de 30 kDa, estavam presentes em maior concentração no complexo enzimático produzido por FSm.

Apesar de não ser possível classificar as proteínas marcadas como endoglucanases ou xilanases, devido ao ampla variação de massa molecular destas enzimas, estes resultados indicam metabolismos distintos de *A. niger* A12 quando cultivado sob os diferentes métodos de cultivo.

Tabela 3.4 Perfil dos complexos enzimáticos produzidos no estado bruto após 30 h de cultivo e após etapa de concentração através de precipitação com acetona

Método de cultivo	Proteínas ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	Endoglucanase (UI.mL^{-1})	Xilanase (UI.mL^{-1})
<i>Extratos brutos</i>			
Fermentação Sequencial - Fseq	78,5	2,7	4,5
Fermentação Submersa - FSm	61,9	1,7	5,3
<i>Extratos concentrados</i>			
Fermentação Sequencial - Fseq	381,1	7,2	11,0
Fermentação Submersa - FSm	313,1	4,6	12,0

Figura 3.11 Perfil obtido em gel de eletroforese de proteínas presentes nos extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* A12 após 30 h de cultivos em biorreator tanque agitado pelos métodos de fermentação submersa (FSm) e sequencial (FSm). (M) indica o marcador.



3.4 Conclusões

A produção de endoglucanases em cultivos em frascos agitados foi influenciada pelo método de cultivo, com maior produção alcançada utilizando o método de cultivo sequencial empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e diâmetro de partículas de até 2 mm.

Em cultivos em biorreator tanque agitado, o efeito combinado entre o tipo de substrato e a frequência de agitação teve um grande impacto na produção de (hemi)celulases, e a vantagem de utilização do método de cultivo sequencial foi validada.

Maior produção enzimática foi alcançada cultivos em biorreatores com controle de pH e menores tamanhos de partícula, as quais favoreceram a homogeneidade dos

cultivos trifásicos e a produção enzimática.

O impelidor do tipo orelha de elefante com escoamento axial ascendente apresentou vantagens em relação ao impelidor radial turbina de Rushton. Estes resultados relacionados aos efeitos das variáveis operacionais e do método de cultivo na produção de celulasas devem contribuir para o desenvolvimento de sistemas de cultivos trifásicos empregando diferentes tipos de materiais lignocelulósicos em biorreatores.

Capítulo 4

Aplicação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de (hemi)celulases por *Aspergillus niger* pelo processo de fermentação sequencial

4.1 Introdução

Buscando-se atingir a viabilidade econômica do processo de produção do etanol de segunda geração, novos bioprocessos para a produção de enzimas (hemi)celulolíticas vem sendo desenvolvidos com a finalidade de se reduzir o custo das enzimas. O custo da etapa de hidrólise enzimática é um dos principais custos do processo de produção do etanol 2G (Chandel *et al.*, 2012; Singhanian *et al.*, 2010). Uma abordagem para a redução de custo na produção destas enzimas é a utilização de materiais lignocelulósicos como fonte de carbono indutora à produção de enzimas por fungos filamentosos, em substituição à lactose, substrato comercial atualmente aplicado industrialmente (Singhanian *et al.*, 2010).

No Brasil, devido às extensões territoriais e ao clima do país, existe uma grande variedade de materiais lignocelulósicos disponíveis a baixo custo, gerando o interesse de sua utilização para produção de etanol de segunda geração. Os materiais lignocelulósicos são compostos basicamente de polímeros de carboidratos, ligados covalentemente à lignina, que podem ser hidrolisados e fermentados para a produção de etanol e outros bioprodutos (Lavenson *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2011).

A avaliação de diferentes matérias-primas lignocelulósicas como fonte de celulose está focada nos resíduos agroindustriais, os quais em geral apresentam composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Devido a estes fatores, estes materiais orgânicos podem ser utilizados na produção de enzimas celulolíticas por microrganismos, atuando como indutores da síntese enzimática, fontes de carbono e nitrogênio e como suporte para o crescimento microbiano (Pandey *et al.*, 1999). Neste sentido, resíduos agroindustriais podem ser utilizados como indutores, como o bagaço de laranja, farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar, entre outros.

Os materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento fúngico são considerados ideais, porém, principalmente quando se trata da utilização de materiais lignocelulósicos, sua suplementação com meio nutriente pode ser necessária. Enquanto o bagaço de cana-de-açúcar não é uma fonte rica em nitrogênio, outros resíduos agroindustriais derivados da soja e do trigo são boas fontes proteicas e podem ser adicionados ao bagaço de cana-de-açúcar como fonte suplementar de nitrogênio, promovendo o aumento da relação N:C e, conseqüentemente, favorecendo as condições de cultivo para o microrganismo, como observado por (Delabona *et al.*, 2012b).

Na presença de materiais lignocelulósicos, as espécies de *Aspergillus* são

capazes de produzir uma grande variedade de enzimas a fim de promover a degradação eficiente do material lignocelulósico, como celulasas, xilanases e pectinases, sendo que a composição dos extratos enzimáticos produzidos é influenciada pelo substrato indutor utilizado (Kang *et al.*, 2004). O complexo enzimático celulolítico consiste em três classes principais de enzimas: endoglucanases (1-4- β -D-glucanglucanohidrolases), exoglucanases (exo 1,4- β -D-glucan-celobihidrolase) e β -glucosidases ou celobiasas, enzimas que atuam em regiões distintas da cadeia da celulose, porém, de forma sinérgica. A atuação de enzimas acessórias como as xilanases, também é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal, facilitando o acesso à celulose (Horn *et al.*, 2012; Van Dyk e Pletschke, 2012).

A obtenção do complexo enzimático pode ocorrer através de dois tipos convencionais de bioprocessos: a fermentação submersa (FSm), que ocorre em meio líquido, e a fermentação estado sólido (FES), a qual se caracteriza pelo cultivo em um suporte sólido, na ausência de água livre, mas com umidade controlada para que o metabolismo do microrganismo possa ser ativado (Chinn, Nokes e Strobel, 2006). Alternativamente aos métodos de cultivo convencionais, Cunha *et al.* (2012a,b) desenvolveram um processo de fermentação sequencial (FSeq), caracterizado pela preparação de um pré-cultivo com etapa inicial no estado sólido e posterior transição para cultivos submersos. Estudos recentes têm demonstrado a superioridade da fermentação sequencial frente à fermentação submersa convencional para a produção de celulasas por *A. niger* utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar como substrato indutor tanto em frascos agitados quanto em biorreator pneumático do tipo coluna de bolhas (Cunha *et al.*, 2012).

Neste contexto, esta etapa do trabalho objetivou a ampliação de aplicação do método de fermentação sequencial, o qual foi desenvolvido inicialmente para cultivos somente com bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, para a produção enzimática utilizando diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, avaliando-se também a aplicação dos extratos produzidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Para tal, a produção de endoglucanases e xilanases foi avaliada em cultivos utilizando-se os substratos: farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor, além das combinações 1:1 de farelo de trigo com bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. As condições de cultivo foram reproduzidas em fermentação submersa e sequencial para comparação dos resultados.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Microrganismo

O agente das fermentações foi uma linhagem do fungo filamentosso *Aspergillus niger* (*A. niger* A12), da coleção da EMBRAPA-CTAA, mantido sob congelamento a -18°C em solução crioprotetora.

4.2.2 Matéria-prima lignocelulósica

Os indutores lignocelulósicos utilizados neste presente trabalho foram bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BIn), cedido pela Edra Ecosistemas SP, bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx), cedido por uma usina local, e farelos de trigo e de soja comercialmente adquiridos. O tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar seco utilizado foi selecionado através de peneiramento, entre 0,5 e 1,0 mm, o mesmo tamanho de partícula médio do farelo de trigo e do farelo de soja utilizados.

4.2.3 Meio nutriente

O meio de cultivo utilizado foi o meio descrito por Mandels e Sternberg (1976) e adaptado por Cunha *et al.* (2012a) contendo (em m/v): 0,14% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,20% de KH_2PO_4 , 0,03% de CaCl_2 , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50% de peptona, 0,20% de extrato de levedura, 0,03% de uréia, 0,10% de Tween 80, and 0,10% de solução salina (5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 mg/L de CoCl_2). A adição de glicose aos meios líquidos de pré-cultivo e cultivo teve como intuito proporcionar efetiva germinação e crescimento fúngico, sendo a primeira fonte imediata de carbono para seu desenvolvimento.

4.2.4 Condições de pré-cultivo

Procedimento de pré-cultivo: Os esporos de *A. niger* foram inicialmente ativados em meio PDA (*potato-dextrose-agar*) por 5 dias. Em seguida, os esporos foram suspensos e inoculados em sabugo de milho (Couri; De Farias, 1995). Após completa esporulação em sabugo de milho, os esporos foram ressuspensos e inoculados nos meios de pré-cultivo, os quais foram preparados de forma diferenciada de acordo com o método de cultivo desejado, FSm ou FSeq.

Pré-cultivo para fermentação sequencial: no método de fermentação

sequencial, a primeira etapa de pré-cultivo foi realizada no estado sólido. Portanto, esporos foram inoculados nas matérias-primas lignocelulósicas escolhidas a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/g de meio sólido, em frascos Erlenmeyer de 500 mL. A umidade do indutor lignocelulósico foi ajustada através da adição do meio nutriente líquido descrito na seção 4.2.3, sem suplementação com glicose, na proporção de 12 mL de meio nutriente a cada 5 g de meio sólido. Os frascos permaneceram incubados em condições estáticas em estufa a 32°C por 24 h. Após este período, houve a transição dos pré-cultivos para fermentação submersa através da adição de 200 mL de meio nutriente líquido descrito na seção 4.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 6,0. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32°C por 48 h (Cunha *et al.*, 2012a). Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10 % (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

Pré-cultivo para fermentação submersa: no método de fermentação convencional, o inóculo foi preparado diretamente em meio líquido. Nesta etapa, os esporos foram inoculados diretamente no meio nutriente líquido descrito na seção 4.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 4,5, a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/mL. Os pré-cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de volume útil, mantidos em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por aproximadamente 50 h, quando houve completa germinação dos esporos. Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10 % (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

4.2.5 Produção enzimática

A produção de celulasas e xilanasas por *A. niger* foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de volume útil. O meio nutriente utilizado foi similar o mesmo descrito na seção 4.2.3, exceto que nesta etapa o meio nutriente foi suplementado com 10 g/L de glicose e 1% m/v da matéria-prima lignocelulósica indutora. Os frascos foram inoculados com 10% v/v das suspensões de pré-cultivo e os cultivos ocorreram em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por 96 h. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 h, filtradas e centrifugadas a 11000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

4.2.6 Hidrólise enzimática

Para os ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, os

complexos enzimáticos foram primeiramente concentrados por ultrafiltração utilizando-se uma membrana de poli(etersulfona) do tipo fibra oca com 115 cm² e diâmetro de corte de 10 kDa. Os ensaios de ultrafiltração foram então conduzidos com reciclo, em pressão constante (0,92 atm) e resfriamento mantido com banho de gelo a fim de se evitar a desnaturação das enzimas. Os extratos foram concentrados aproximadamente 10 vezes em volume e então aplicados nos ensaios de hidrólise, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5% m/m de sólidos (bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor), em um volume total 30 mL de complexo enzimático em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. As cargas enzimáticas utilizadas nos experimentos de hidrólise foram padronizadas em 0,2 FPU por grama de bagaço de cana-de-açúcar seco. A hidrólise foi realizada por 30 h em mesa incubadora rotativa a 50 °C e 200 rpm, e amostras foram retiradas após 0, 6, 12, 18, 24 e 30 h após o início da reação. As amostras foram filtradas à vácuo e mantidas sob congelamento para posterior análise para determinação da concentração de glicose liberada no meio reacional.

4.2.7 Procedimentos analíticos

A atividade de endoglucanase foi determinada tendo como substrato uma solução de carboximetilcelulose (Sigma, EUA) 0,4% m/v em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8 (Ghose, 1987). Para tal, em 0,5 mL de CMC 4% foram adicionados 0,5 mL do coquetel enzimático diluído em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8. A reação ocorreu a 50 °C por 10 min e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). Foram adicionados 13 mL da água destilada em cada tudo de reação e a absorvância final das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 µmol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

A atividade de xilanase, por sua vez, foi determinada utilizando-se como substrato uma solução de xilana 1% m/v (oat spelt, Sigma, EUA) em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0 (Bailey; Poutanen, 1989). Para tal, em 2,0 mL de xilana 1% foram adicionados 1,0 mL do coquetel enzimático diluído em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0. A reação ocorreu a 50 °C por 30 min e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). Foram adicionados 13 mL da água

destilada em cada tudo de reação e a absorvância final das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 μmol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

Para as análises de eletroforese, os extratos enzimáticos brutos produzidos em FSeq e FSm utilizando os diferentes resíduos agroindustriais como substrato indutor foram submetidos a eletroforese segundo o método de Laemmli (1970). Os extratos concentrados foram submetidos a eletroforese com agente desnaturante (SDS-PAGE), com gel de poliacrilamida 12% m/v, para determinar o perfil das proteínas presentes nos complexos enzimáticos. As amostras foram aquecidas por 5 minutos em tampão de desnaturante (Tris-HCl 75 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 5% v/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,01% v/v) e posteriormente aplicadas em igual volume em canaletas pré formadas em gel de eletroforese. Na primeira canaleta foi aplicado 4 μL do marcador de massa molecular PreciseTM (AMRESCO) 15 – 115 kDa. A corrida eletroforética foi realizada durante 90 minutos (60 V para 0-30 min, e 110 V para 30-90 min) em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v). A revelação do gel ocorreu em duas etapas: o gel foi corado com Comassie Blue R-250 por 40 min e descorado por 12 horas utilizando uma solução ácido acético 6% etanol 3% (v/v).

4.3 Resultados e discussões

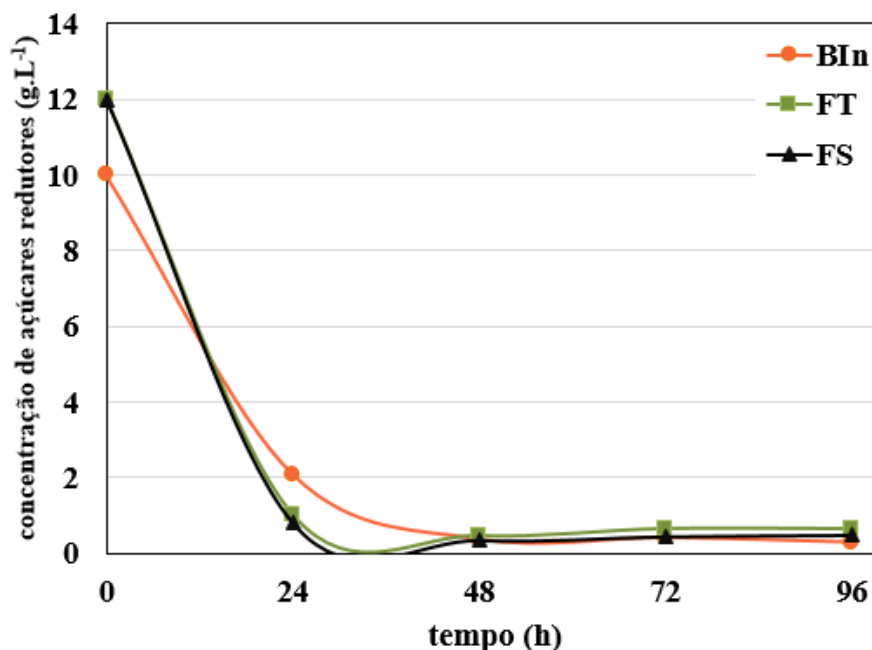
A avaliação da influência do tipo de matéria-prima lignocelulósica utilizada para a indução da síntese de enzimas celulolíticas por *A. niger* foi avaliada em 12 diferentes condições de cultivo, conforme Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Condições de cultivo avaliadas para a produção de celulasas e xilanases

Tipo de material lignocelulósico	Método de cultivo	
	Fermentação submersa (FSm)	Fermentação sequencial (FSeq)
Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (BIn)	X	X
Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx)	X	X
Farelo de trigo (FT)	X	X
Farelo de soja (FS)	X	X
Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e farelo de trigo (BIn:FT)	X	X
Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e farelo de trigo (BEx:FT)	X	X

Açúcares simples como a glicose são conhecidos por inibir a produção enzimática caso estejam presentes em altas concentrações. No entanto, se adicionados aos meios nutrientes em concentrações adequadas podem favorecer o crescimento celular e a produção enzimática (Botella *et al.*, 2007; Sales *et al.*, 2011). No presente estudo, foi possível observar o esgotamento de açúcares redutores nos cultivos após decorridas as primeiras 24 h, independentemente do tipo de matéria-prima lignocelulósica utilizada e de suas combinações (Figura 4.1). Após a exaustão da glicose, os indutores lignocelulósicos passaram a ser a fonte de carbono principal para o *A. niger* nos cultivos.

Figura 4.1 Concentração de açúcares redutores em função do tempo de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono. FS: farelo de soja; FT: farelo de trigo; BIn: bagaço de cana-de-açúcar in natura. Os resultados são apresentados como médias \pm desvios.



Foram utilizadas como parâmetro de desempenho de cada matéria-prima lignocelulósica as produções de endoglucanase e xilanase em cada condição de cultivo. Os picos de produção de ambas as enzimas foram obtidos após 72 h de cultivo, portanto, foram estes os valores utilizados como comparação entre os experimentos. Todos os cultivos foram conduzidos em duplicata e estão apresentados como médias \pm desvios.

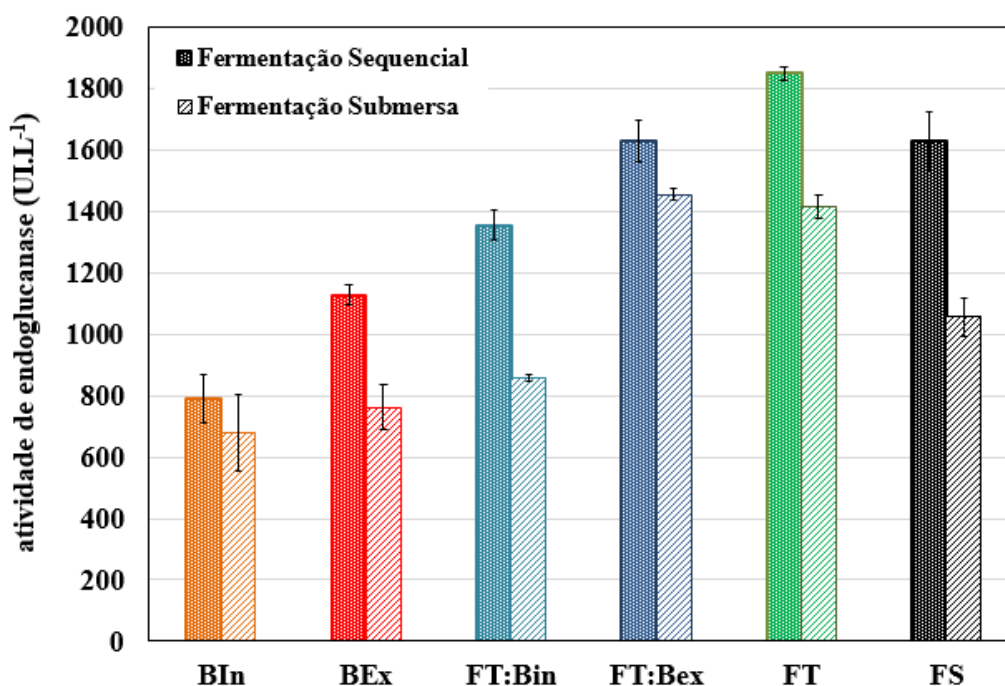
4.3.1 Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de endoglucanases por *A. niger* A12

A influência dos diferentes tipos de fonte de carbono na produção de endoglucanases pelo fungo filamentoso *A. niger* está apresentada na Figura 4.2. Pode-se observar que pelo método de fermentação sequencial o maior pico de produção de endoglucanases, de 1.850 ± 22 U.I.L⁻¹, foi obtido utilizando-se somente o farelo de trigo (FT) como indutor. Além disso, analisando-se os cultivos em fermentação sequencial, pode-se observar a vantagem da utilização do farelo de trigo como suplementação ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, resultando em 1.354 ± 49 U.I.L⁻¹, enquanto o pico foi de 789 ± 80 U.I.L⁻¹ quando somente BIn foi utilizado.

Em relação ao pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, o mesmo mostrou-se favorável à produção de endoglucanases por *A. niger* pelo método de fermentação sequencial, visto que quando comparados os substratos BIn e BEx observou-se que o pré-tratamento deste material favoreceu a produção enzimática. Isso refletiu diretamente nos valores apresentados na Figura 4.2, na qual observa-se a superioridade dos resultados com BEx, cuja produção de endoglucanases foi de $1.128 \pm 32 \text{ UI.L}^{-1}$.

Observando-se os resultados obtidos pelo método de fermentação sequencial e por fermentação submersa convencional em condições similares de pH, temperatura, frequência agitação e tamanho de inóculo em FSm e FSeq, pode-se afirmar pelas atividades enzimáticas obtidas utilizando os indutores FT, FT+BIn e FT+Bex, que os cultivos validaram a vantagem de utilização do FT como fonte de carbono nos cultivos, tanto isoladamente ou como fonte de carbono suplementar a outros substratos, com vantagem de utilização do método de cultivo sequencial para a produção de celulases.

Figura 4.2. Picos de produção de endoglucanase (UI.L^{-1}) obtidos após 72 h de cultivo em fermentação sequencial e submersa com BIn (bagaço de cana-de-açúcar *in natura*), BEx (bagaço de cana-de-açúcar explodido), FT (farelo de trigo), FS (farelo de soja) e combinação 1:1 FT-BIN e 1:1 FT-BEx. Os resultados são apresentados como médias \pm desvios.



Comparando-se os resultados obtidos pelo método de fermentação sequencial e submersa, observou-se que o método de fermentação sequencial resultou em maior produção

de endoglucanases para todos os substratos avaliados. Além disso, assim como observado por Cunha *et al.* (2012 a, b), a morfologia de crescimento de *A. niger* em fermentação sequencial foi predominantemente na forma de micélios dispersos, enquanto a fermentação submersa favoreceu o crescimento na forma de densos aglomerados celulares. Este resultados estão de acordo com o reportado anteriormente por Cunha *et al.* (2012 a, b), os quais obtiveram resultados até três vezes superiores em fermentação sequencial em relação à fermentação submersa quando utilizado bagaço de cana-de-açúcar *in natura* como indutor.

Os resultados obtidos neste trabalho por fermentação submersa estão de acordo também com os dados apresentados por Farinas *et al.* (2008) e por Delabona *et al.* (2012a) onde se constatou que a produção de endoglucanases utilizando farelo de trigo é superior se comparada a cultivos com outros materiais lignocelulósicos como farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja.

A caracterização das matérias-primas lignocelulósicas, expostas na Tabela 4.2, indica que apesar do alto teor proteico e celulósico e do baixo teor de hemicelulose, o FS apresenta aproximadamente duas vezes mais lignina do que o FT, o que dificulta o acesso do complexo enzimático ao substrato. Este fator justifica a melhor produção enzimática ao se utilizar FT como fonte de carbono, por este apresentar um conteúdo mais equilibrado e adequado a produção de celulasas e hemicelulasas.

Tabela 4.2 Composição química de diferentes materiais lignocelulósicos

Material Lignocelulósico	Hexoses (%)	Pentoses (%)	Lignina (%)	Proteínas (%)
Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (BIn) ¹	46,62	26,51	21,70	1,52
Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) ²	71,2	0,5	23,0	NI
Farelo de soja ¹	34,59	18,13	9,78	43,22
Farelo de trigo ¹	10,86	28,88	4,89	17,61

¹(Rodriguez-Zuniga *et al.*, 2011). ²(Cunha *et al.*, 2014). NI: não informado.

Expressando os resultados obtidos nos cultivos em fermentação sequencial em termos de produtividades volumétricas de endoglucanases, os resultados obtidos no presente estudo correspondem a 26 UI.L⁻¹.h⁻¹ nos cultivos com FT e 11 UI.L⁻¹.h⁻¹ com BIn.

Comparando-se os resultados obtidos no presente estudo com a literatura, pode-se afirmar que os mesmos estão de acordo com o esperado. Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) em cultivos no estado sólido utilizando a mesma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* A12 do presente estudo, obtiveram perfis similares da influência da suplementação do bagaço de cana-de-açúcar com farelo de trigo, cujos valores corresponderam a produtividades volumétricas de endoglucanases de 4,2 UI.L⁻¹.h⁻¹ nos cultivos somente com o bagaço de cana-de-açúcar, 11,1 UI.L⁻¹.h⁻¹ com a combinação do bagaço de cana-de-açúcar (40%) com farelo de trigo (60%), e 18,1 UI.L⁻¹.h⁻¹ em cultivos somente com farelo de trigo como substrato indutor.

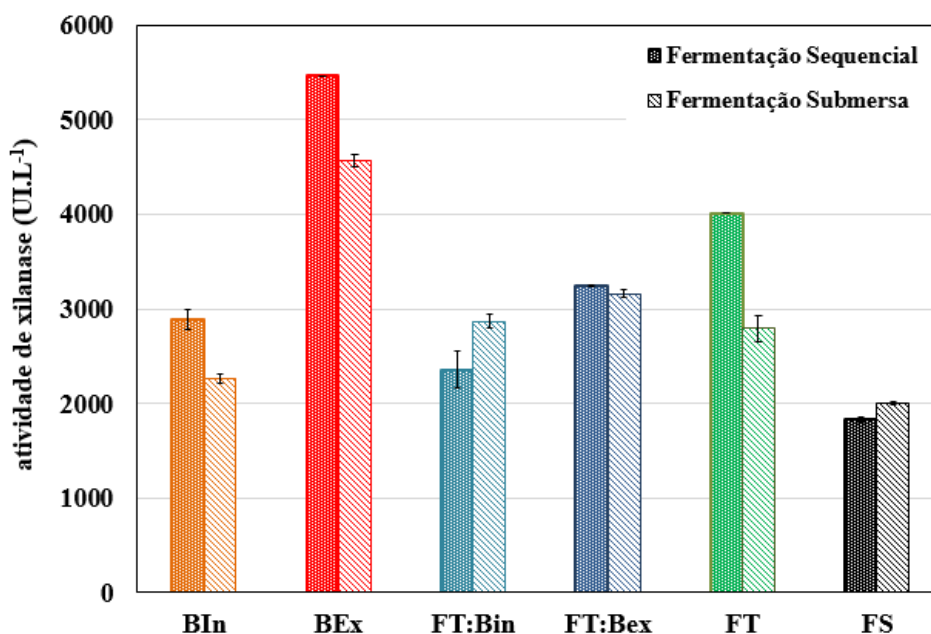
O fato dos resultados obtidos no presente estudo em cultivos submersos encontrarem-se na mesma ordem de grandeza dos obtidos por Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) em cultivos no estado sólido destaca a fermentação sequencial como um método promissor, uma vez que os extratos enzimáticos obtidos por fermentação no estado sólido geralmente são até três vezes mais concentrados.

4.3.2 Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais na produção de xilanases por *A. niger* A12

Os resultados obtidos em termos de pico de produção de xilanase são apresentados na Figura 4.3. É possível afirmar que, diferentemente do obtido para endoglucanase, o BEx foi a melhor fonte de carbono empregada, tanto para a fermentação sequencial quanto para a submersa, seguido pela produção com o farelo de trigo. Os resultados de pico de produção de xilanases obtidos foram de 4.573±67 UI.L⁻¹ e 5.469 UI.L⁻¹, nos cultivos em fermentação submersa e sequencial, respectivamente.

Pode-se observar também pela Figura 4.3 que, assim como para a endoglucanase, o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana favoreceu a síntese de xilanases por *A. niger* pelo método de fermentação sequencial, resultando no pico de produção de xilanases de 5.469 UI.L⁻¹, enquanto 2.892±106 UI.L⁻¹ foram obtidos quando utilizado o BIn.

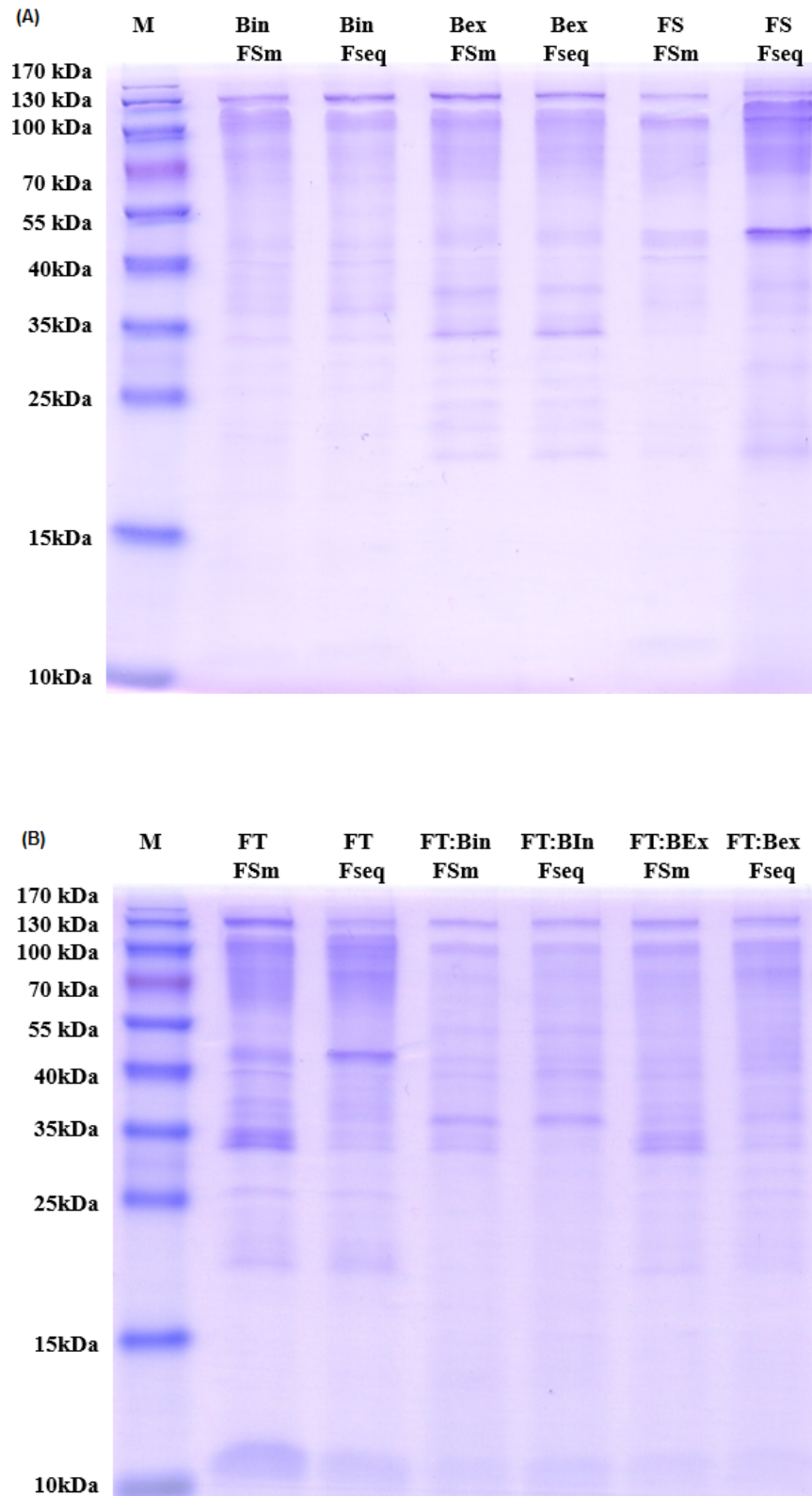
Figura 4.3 Picos de produção de xilanase (U.L.L⁻¹) obtidos após 72 h de cultivo em fermentação sequencial e fermentação submersa com BIN (bagaço de cana-de-açúcar *in natura*), BEx (bagaço de cana-de-açúcar explodido), FT (farelo de trigo), FS (farelo de soja) e combinação 1:1 FT-BIN e 1:1 FT-BEx. Os resultados são apresentados como médias \pm desvios.



Comparando-se os valores de atividade de xilanase obtidos no presente estudo com a literatura, pode-se afirmar que estão de acordo com o esperado, uma vez que o pico de produção de xilanas obtido nos cultivos em fermentação sequencial com FT, de 4.017 ± 6 U.L.L⁻¹ estão da mesma ordem de grandeza do obtido por Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2010) em cultivos no estado sólido utilizando a mesma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* A12, de 3.300 U.L.L⁻¹.

Ensaio de eletroforese foram realizados a fim de se identificar diferenças qualitativas nos coquetéis enzimáticos produzidos a partir de diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono indutora. Como exibido nas Figuras 4.4 (A) e (B), pode-se observar distintos perfis proteicos nos coquetéis enzimáticos produzidos em cultivos com substratos indutores distintos. Comparando-se os coquetéis obtidos a partir de diferentes substratos e a partir de diferentes métodos de cultivos (FSm ou FSeq), pode-se observar que a variação de substrato indutor causa um maior impacto no perfil de enzimas produzidas. As amostras de cultivos com farelo de soja e farelo de trigo mostraram proteínas bem distintas quando produzidas por diferentes métodos de cultivo.

Figura 4.4 Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%) corado com Coomassie Blue R-250. Amostras de coquetéis brutos de fermentação submersa (FSm) e sequencial (FSeq) utilizando diferentes resíduos agroindustriais: Gel (A): (BIn) bagaço de cana-de-açúcar *in natura*; (BEx) bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor; (FS) farelo de soja. Gel (B): (FT) farelo de trigo; (FT:BIn) mistura 1:1 FT:BIn; (FT:BEx) mistura 1:1 FT:BEx.



Pode-se observar que os coquetéis de farelo de trigo e farelo de soja apresentam proteínas de massas molares distintas entre si e também em relação aos coquetéis induzidos por bagaço de cana-de-açúcar. Uma vez que todos os coquetéis foram produzidos pela mesma linhagem de fungo *Aspergillus niger* A12, bandas específicas para coquetéis enzimáticos brutos produzidos a partir dos diferentes substratos evidenciam que os diferentes substratos são metabolizados de maneira diferente pelo fungo filamentososo, o qual produz coquetéis com composição de proteínas diferentes, apesar de muitas vezes resultarem em atividades enzimáticas totais da mesma ordem de grandeza. Este era um resultado esperado, uma vez que o crescimento fúngico sob diferentes condições ambientais pode resultar em diferenças na fisiologia e expressão de enzimas, também como na expressão de enzimas com diferentes características em termos de massa molar, parâmetros cinéticos e desempenho de hidrólise (Barrios-Gonzales, 2012; Papagianni; Nokes; Filer, 2001).

A identificação das proteínas observadas nos géis como endoglucanases ou xilanases é complexa em amostras de coquetéis enzimáticos brutos, devido às grandes faixas de peso molecular em que se encontram as celulases e xilanases. Xilanases microbianas são sub-unidades de proteínas que se encontram na faixa de massas moleculares entre 8 - 145 kDa (Kulkarni; Shendye; Rao, 1999). Xilanases de *Aspergillus niger* E-1, especificamente, foram isoladas e classificadas em massas moleculares entre 19 kDa e 86 kDa por Takahashi, Hiroaki e Shuichiro (2013), enquanto celulases de *A. niger* sp. foram encontradas dentro da mesma faixa de massa molecular, de 40 kDa por Akiba *et al.* (1995) e 25 kDa por De Souza *et al.* (2011). Portanto, para a classificação das proteínas como celulases ou xilanases, as amostras podem ser analisadas em zimogramas em trabalhos futuros, adicionando-se os substratos correspondentes de cada enzima nos géis de eletroforese.

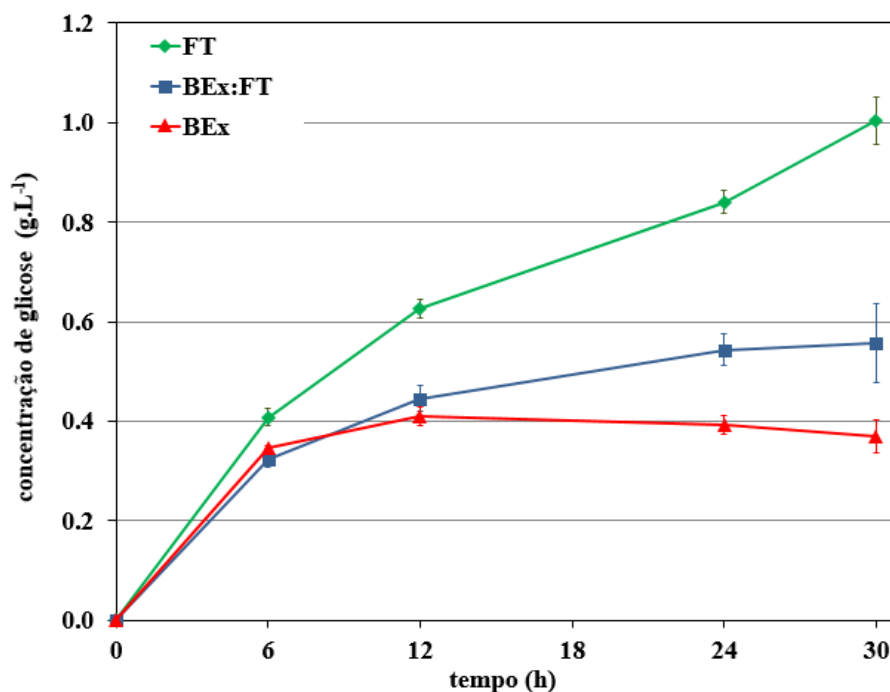
4.3.3 Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar

O objetivo desta etapa foi a de avaliar se coquetéis enzimáticos produzidos por substratos indutores diferentes apresentam diferentes desempenhos na hidrólise do bagaço de cana de açúcar. Portanto, nos ensaios de hidrólise enzimática, três coquetéis produzidos em fermentação sequencial (FSeq) com destacada atividade enzimática foram selecionados, sendo eles: os coquetéis produzido com farelo de trigo (FT), com bagaço de cana-de-açúcar explodido (BEx) e com a combinação 1:1 farelo de trigo:bagaço de cana-de-açúcar explodido (FT:BEx).

Os coquetéis enzimáticos brutos foram concentrados de acordo com

procedimento descrito na Seção 4.2.5. A carga enzimática de celulases totais empregada em cada ensaio foi mantida constante em $0,2 \text{ FPU}\cdot\text{g}^{-1}$ de substrato seco. Os perfis de concentração de glicose liberada no decorrer da hidrólise são apresentados na Figura 4.5. Apesar carga enzimática utilizada ter sido baixa, devido à limitação do processo de concentração enzimática utilizado, foi possível se observar a diferença de desempenho entre os complexos enzimáticos utilizados na hidrólise do material lignocelulósico.

Figura 4.5 Perfis de concentração de glicose liberada ao longo tempo de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor utilizando extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* A12 utilizando como substrato (FT) farelo de trigo; (BEx) bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor; (FT:BEx) combinação 1:1 de FT e BEx.



Pode-se observar que apesar das baixas concentrações de glicose liberadas, justificadas pelas baixas cargas enzimáticas aplicadas, o desempenho do coquetel produzido com farelo de trigo na liberação de glicose foi de cerca de 2,7 vezes maior que utilizando-se o coquetel produzido com bagaço de cana-de-açúcar explodido. Pode-se observar ainda que a suplementação do bagaço de cana-de-açúcar explodido com farelo de trigo na proporção de 1:1 não somente favoreceu a produção enzimática de endoglucanases como também resultou em um desempenho de hidrólise de 51 % maior em relação ao coquetel enzimático produzido utilizando somente com o BEx como substrato indutor.

A maior conversão de hidrólise utilizando coquetéis enzimáticos produzidos com farelo de trigo pode ser explicada pela forte indução de β -glicosidase em cultivos

utilizando este substrato. Apesar de esta enzima não ter sido avaliada no presente estudo, a maior produção de β -glicosidase utilizando farelo de trigo como indutor, em vez de bagaço de cana-de-açúcar, foi observada em cultivos realizados em fermentação no estado sólido por (Delabona *et al.*, 2012b). A proporção balanceada entre β -glicosidase e celulasas é ideal para um bom desempenho de hidrólise, uma vez que o acúmulo de celobiose por falta de β -glicosidase pode inibir a ação das celobiohidrolases (Maeda *et al.*, 2011).

4.4 Conclusões

A utilização de diferentes resíduos agroindustriais e suas combinações possibilitou a avaliação da influência da escolha de cada fonte de carbono em cultivos com *A. niger* para a produção de celulasas pelo método de fermentação sequencial.

Os extratos produzidos apresentaram diferenças não somente nos índices de atividade enzimática, como também no perfil de proteínas induzidas.

Dentre os materiais lignocelulósicos avaliados isoladamente (bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor, farelo de soja e farelo de trigo), os resultados mais promissores em fermentação sequencial foram obtidos com o farelo de trigo, com atividades de 1.850 ± 22 e 4.017 ± 6 UI/L de endoglucanase e xilanase, respectivamente. Além disso, observou-se também pelo desempenho dos coquetéis enzimáticos produzidos utilizando diferentes substratos como fonte de carbono indutora na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, a alta performance do coquetel enzimático produzido com farelo de trigo.

Os cultivos realizados com a combinação dos substratos na razão de 1:1 farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado evidenciam a vantagem de se utilizar o farelo de trigo como fonte de nitrogênio suplementar de baixo custo ao bagaço de cana-de-açúcar.

Capítulo 5

Validação do método de fermentação sequencial para a produção de celulasas por diferentes linhagens de fungos filamentosos e aplicação na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar

5.1 Introdução

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é uma rota promissora em comparação com abordagens de hidrólise química devido ao seu baixo impacto ambiental (Singhania *et al.*, 2010). A fim de se garantir que a hidrólise enzimática será efetiva em converter substratos lignocelulósicos em açúcares, a utilização de coquetéis enzimáticos específicos é necessária. Entretanto, o alto custo de produção das celulasas limita a sua produção industrial (Singhania *et al.*, 2010).

Pesquisas recentes apontam que complexos enzimáticos produzidos na presença de materiais lignocelulósicos, em substituição a substratos indutores comerciais, têm um alto potencial de hidrólise devido à sua especificidade ao substrato (Castro *et al.*, 2010). Complexos enzimáticos produzidos por diferentes linhagens microbianas também têm demonstrado diferentes efeitos na hidrólise destes materiais (Maeda *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2009).

Devido à complexidade e resistência dos materiais lignocelulósicos, seu uso para a produção de celulasas e xilanases pode requerer, a princípio, uma etapa de pré-tratamento a fim de tornar a fração celulósica mais disponível para o ataque microbiano. O pré-tratamento pode melhorar significativamente não somente a produção enzimática, como também a hidrólise de materiais lignocelulósicos (Ladisich, 2010; Wyman *et al.*, 2011).

No Brasil, o material lignocelulósico principal para aplicação na produção de enzimas e para produção de etanol de segunda geração é o bagaço de cana-de-açúcar, devido à sua disponibilidade nas usinas de etanol. Entre os pré-tratamentos químicos e físicos que podem ser utilizados para o bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento por explosão a vapor e o pré-tratamento hidrotérmico têm recebido atenção crescente por aumentarem a digestibilidade do material lignocelulósico sem a necessidade de adição de compostos químicos além de água (Kim *et al.*, 2009; Mosier *et al.*, 2005a). Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico resulta em alta preservação da xilana, não observada no pré-tratamento por explosão a vapor.

Os métodos de cultivo para a produção de celulasas podem ser divididos em fermentação no estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm), cada um com suas vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação desejada. Em vista da demanda tecnológica para estratégias de melhoria na produção de celulasas utilizando materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, um novo método de cultivo que combina as vantagens da FES e da FSm em um único processo foi desenvolvido. O método sequencial

no estado sólido e submerso tem mostrado resultados promissores (Cunha, F. M. *et al.*, 2012).

O objetivo desta etapa do trabalho foi, portanto, ampliar a aplicação do método de cultivo sequencial para produção de (hemi)celulases por diferentes linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus sp.* isolados do bioma brasileiro. O efeito do pré-tratamento por explosão a vapor e o pré-tratamento hidrotérmico também foram avaliados e os coquetéis enzimáticos concentrados e aplicados na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Substrato

O substrato indutor foi o bagaço de cana-de-açúcar, submetido a diferentes pré-tratamentos. O bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx), cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC - Piracicaba, Brasil), foi previamente pré-tratado a 17×10^5 Pa e 205°C por 20 min. O bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico (BHid) foi pré-tratado no Laboratório de Engenharia dos Recursos Renováveis (LORRE) na Universidade de Purdue (EUA), utilizando tubos de aço inoxidável (2,54 cm de diâmetro x 2,1 mm de espessura de parede x 11,4 cm de comprimento) fechado com um par de terminais Swagelok (Swagelok, EUA) conforme descrito por Kim, Mosier e Ladisch (2009). O bagaço foi aquecido a 190°C colocando-se os tubos em um banho de areia fluidizado (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL) a 190°C por 20 min (5 min de aquecimento e 15 min de tempo de pré-tratamento). Após isso, os tubos foram transferidos em água fria para serem resfriados. O material pré-tratado foi seco a 40°C e estocado até o uso. As composições de ambos os bagaços foram determinadas de acordo com o procedimento do NREL (Sluiter *et al.*, 2008a,b). As amostras de BEx e BHid não foram submetidas a nenhum tipo de lavagem após o pré-tratamento.

5.2.2 Microrganismos

Três linhagens de *Aspergillus* foram utilizadas para a produção enzimática: *A. niger* A12 (linhagem selvagem isolada de pimenta do reino), *A. oryzae* P27C3 (linhagem selvagem isolada do solo da Amazônia) e *A. niger* 3T5B8 (mutante morfológico, de acordo com Couri e De Farias (1995). A linhagem *A. niger* A12 foi selecionada por ser a linhagem utilizada no desenvolvimento do método de fermentação sequencial, a linhagem *A. niger* 3T5B8 foi selecionada por ser uma linhagem mutante que indicou resultados promissores para

a produção de celulases em fermentação no estado sólido (Pirota *et al.*, 2014), etapa inicial do método de fermentação sequencial, e a linhagem *A. oryzae* P27C3 foi selecionada por produzir coquetéis enzimáticos com altos títulos de xilanase e feruloil esterase em fermentação submersa (Braga *et al.*, 2014). Todas as linhagens estão depositadas na Coleção da Embrapa Tecnologia de Alimentos no Rio de Janeiro, Brasil.

5.2.3 Meio nutriente

O meio de cultivo utilizado foi o meio descrito por Mandels e Sternberg (1976) e adaptado por Cunha *et al.* (2012a) contendo (em m/v): 0,14% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,20% de KH_2PO_4 , 0,03% de CaCl_2 , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50% de peptona, 0,20% de extrato de levedura, 0,03% de uréia, 0,10% de Tween 80, and 0,10% de solução salina (5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 mg/L de CoCl_2). A adição de glicose aos meios líquidos de pré-cultivo e cultivo teve como intuito proporcionar efetiva germinação e crescimento fúngico, sendo a primeira fonte imediata de carbono para seu desenvolvimento.

5.2.4 Condições de pré-cultivo

Procedimento de pré-cultivo: Os esporos das três linhagens de fungos foram ativados em meio PDA (*potato-dextrose-agar*) por 5 dias. Após completa esporulação das placas, os esporos foram ressuspensos e inoculados nos meios de pré-cultivo, os quais foram preparados de forma diferenciada de acordo com o método de cultivo desejado, FSm ou FSeq.

Pré-cultivo para fermentação sequencial: no método de fermentação sequencial, a primeira etapa de pré-cultivo foi realizada no estado sólido. Esporos foram inoculados nas matérias-primas lignocelulósicas escolhidas a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/g de meio sólido, em frascos Erlenmeyer de 500 mL. A umidade do indutor lignocelulósico foi ajustada através da adição do meio nutriente líquido descrito na seção 5.2.3, sem suplementação com glicose, na proporção de 12 mL de meio nutriente a cada 5 g de meio sólido. Os frascos permaneceram incubados em condições estáticas, em estufa a 32°C por 24 h. Após este período, houve a transição dos pré-cultivos para fermentação submersa através da adição de 200 mL de meio nutriente líquido descrito na seção 5.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 6,0. Os frascos foram mantidos

em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32°C por 48 h (Cunha *et al.*, 2012a). Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10% (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

5.2.5 Produção enzimática

A produção de celulases e xilanases por *Aspergillus sp.* foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 200 mL de volume útil. O meio nutriente utilizado foi similar o mesmo descrito na seção 5.2.3, exceto que nesta etapa o meio nutriente foi suplementado com 10 g/L de glicose e 1% m/v da matéria-prima lignocelulósica indutora. Os frascos foram inoculados com 10% v/v de pré-cultivo e os cultivos permaneceram em mesa incubadora rotativa a 250 rpm e 32 °C por 72 h. Ao final dos cultivos, os extratos produzidos foram filtrados à vácuo e centrifugados a 11.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Todos os cultivos foram conduzidos em quintuplicatas e, após o final dos cultivos, os coquetéis enzimáticos produzidos foram combinados para formar um único extrato proveniente de cada fungo filamentosos.

5.2.6 Atividades enzimáticas

A atividades enzimáticas foram analisadas de acordo com o procedimento da IUPAC (Ghose, 1987), seguindo a metodologia aplicada no Laboratório de Engenharia de Recursos Renováveis (LORRE, Purdue University), onde esta etapa do projeto foi desenvolvida. As atividades enzimáticas calculadas neste capítulo diferem, portanto, das calculadas dos demais capítulos da presente tese devido à diferenças nos métodos analíticos.

A atividade de endoglucanase foi determinada tendo como substrato uma solução de 1% carboximetilcelulose de baixa viscosidade em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Para tal, em 0,40 mL de CMC 1% m/v foram adicionados 0,10 mL do coquetel enzimático diluído em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8. A reação ocorreu a 50 °C por 15 min e foi interrompida pela adição de 2,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 µmol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

A atividade de xilanase, por sua vez, foi determinada utilizando-se como

substrato uma solução de xilana 1% m/v (*oat spelt*) em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Para tal, em 0,40 mL de xilana 1% foram adicionados 0,10 mL do coquetel enzimático diluído em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8. A reação ocorreu a 50 °C por 15 min e foi interrompida pela adição de 2,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 μ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

As análises para determinação da β -glicosidase e β -xilosidase foram realizadas utilizando como padrão reagentes p-nitrofenol (pNP). Em cada tubo reacional foram adicionados 0,40 mL do substrato (p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNP- β xil) ou p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo, (pNP- β -glic) e 0,10 mL do coquetel enzimático. A reação foi conduzida a 50 °C por 15 min e foi interrompida pela adição de 2,0 mL reagente DNS. A absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 410 nm.

5.2.7 Concentração dos coquetéis enzimáticos

Os coquetéis enzimáticos produzidos foram ultrafiltrados antes de sua aplicação na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. As ultrafiltrações frontais e sem reciclo foram conduzidas utilizando uma célula de ultrafiltração com membranas de poli(etileno sulfona) de 10 kDa NMWL acoplada a um sistema de ultrafiltração modelo Amicon 8400 (Millipore, USA). Um banho de água gelada foi utilizado para evitar degradação enzimática durante o processo. Os coquetéis enzimáticos foram concentrados aproximadamente 80 vezes em volume e a concentração em termos de atividades enzimáticas é apresentada na Tabela 5.2.

5.2.8 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) ou hidrotérmico (BHid) foi realizada utilizando combinações de extrato enzimático comercial e enzimas produzidas em laboratório, utilizando um incubador de hibridização (FINEPCR, Korea) a 50°C e 40 rpm por 72 h. Uma carga enzimática fixa de enzima comercial foi aplicada, com suplementação de extratos enzimáticos produzidos em laboratório por *A. niger* A12, *A. niger* 3T5B8 e *A. oryzae* P27C3.

Os ensaios de hidrólise avaliados foram realizados em tubos Falcon de 50 mL com teor de sólidos de 5% m/v de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BEx ou BHid) em

tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 contendo 0,02% de azida de sódio. A carga enzimática de Cellic Ctec 2 foi fixa em 4,3 mg de proteínas totais (medidas pelo método de nitrogênio total), combinadas com extratos enzimáticos contendo atividades de xilanase de 70, 107, 143, 179 UI.mL⁻¹. As amostras foram analisadas em HPLC (coluna Aminex HPX-87H) para determinação de glicose liberada em cada ensaio de hidrólise.

5.3 Resultados e discussões

5.3.1 Efeito dos pré-tratamentos na composição do bagaço de cana-de-açúcar

A análise composicional do bagaço de cana-de-açúcar após cada tipo de pré-tratamento, explosão a vapor (BEx) ou hidrotérmico (BHid) é apresentada nas Tabelas 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 Teor de componentes insolúveis presentes as amostras de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamentos BEx e BHid

Componentes	Bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx)	Bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico (BHid)
Hexoses (%)	71,2 ± 1,7	69,8 ± 0,8
Pentoses (%)	0,5 ± 0	1,9 ± 0,1
Lignina (%)	22,8 ± 2,0	21,9 ± 2,1
Cinzas (%)	2,9 ± 0	1,1 ± 0,1
Acetato (%)	0 ± 0	0,3 ± 0
Total	97 ± 4	94 ± 3

Tabela 5.2 Teor de componentes solúveis presentes nas amostras após os pré-tratamentos no BEx e BHid

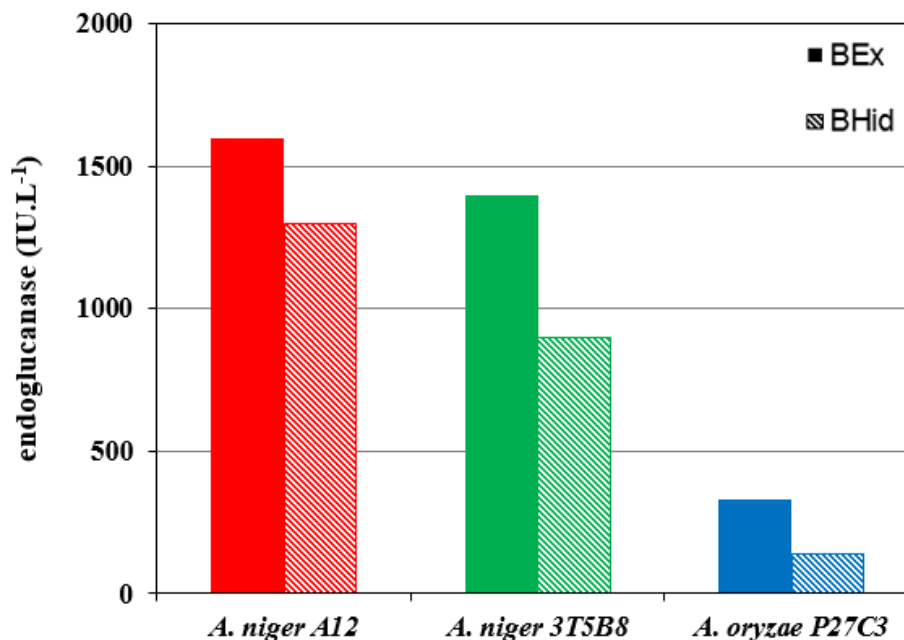
Componentes	Bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx)	Bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico (BHid)
celbiose (g.L ⁻¹)	0,09	0,00
glucose (g.L ⁻¹)	0,14	0,05
xilose (g.L ⁻¹)	0,75	0,45
arabinose (g.L ⁻¹)	0,09	0,26
ácido acético (g.L ⁻¹)	0,04	0,06
ácido láctico (g.L ⁻¹)	0,06	0,00
xilooligômeros (g.L ⁻¹)	2,10	4,10

Pode-se observar que ambos os pré-tratamentos resultaram em amostras de bagaço de cana-de-açúcar com teores muito próximos de lignina e hexoses e que o pré-tratamento por explosão a vapor foi mais eficiente na remoção das pentoses (Tabela 5.1). Pode-se observar pela Tabela 5.2 que enquanto BEx possui maior teor de xilose, o BHid apresentou maiores teores de xilooligômeros e arabinose, os quais podem atuar como fortes inibidores na etapa de hidrólise da celulose.

5.3.2 Produção Enzimática

A Figura 5.1 mostra a produção de endoglucanases nas seis condições de cultivo avaliadas, com *A. niger* A12, *A. niger* 3T5B8 e *A. oryzae* P27C3, utilizando BEx e BHid. É possível observar que as produções de endoglucanase por *A. niger* A12 e *A. niger* 3T5B8, foram de até 20 e 50 %, respectivamente, maiores em cultivos utilizando BEx em comparação com os utilizando BHid. Uma vez que ambos BEx e BHid têm os mesmos teores de hexoses, a alta concentração de xilooligômeros no BHid e outros compostos, como arabinose e compostos fenólicos liberados durante o tratamento hidrotérmico, podem ter causado a inibição de endoglucanases secretadas no meio de cultivo. O efeito inibitório dos xilooligômeros na hidrólise da celulose foi recentemente reportado por Qing, Yang e Wyman (2010) e por Ximenes *et al.* (2010).

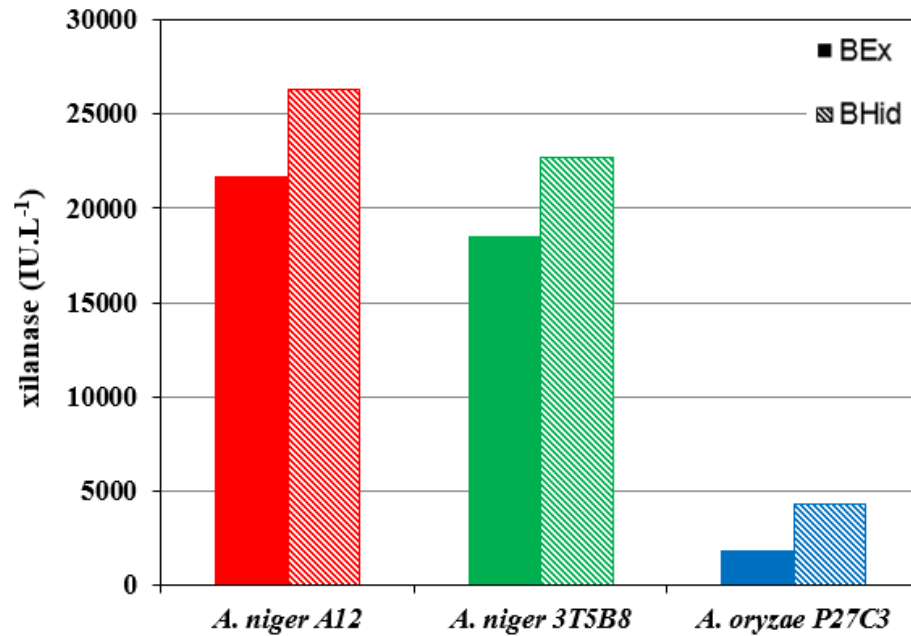
Figura 5.1 Produção de endoglucanase por linhagens de *Aspergillus* após 72 h de cultivo pelo método de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e pelo tratamento hidrotérmico (BHid).



Nota: As análises enzimáticas nesta etapa do projeto foram realizadas seguindo um método de análise diferenciado.

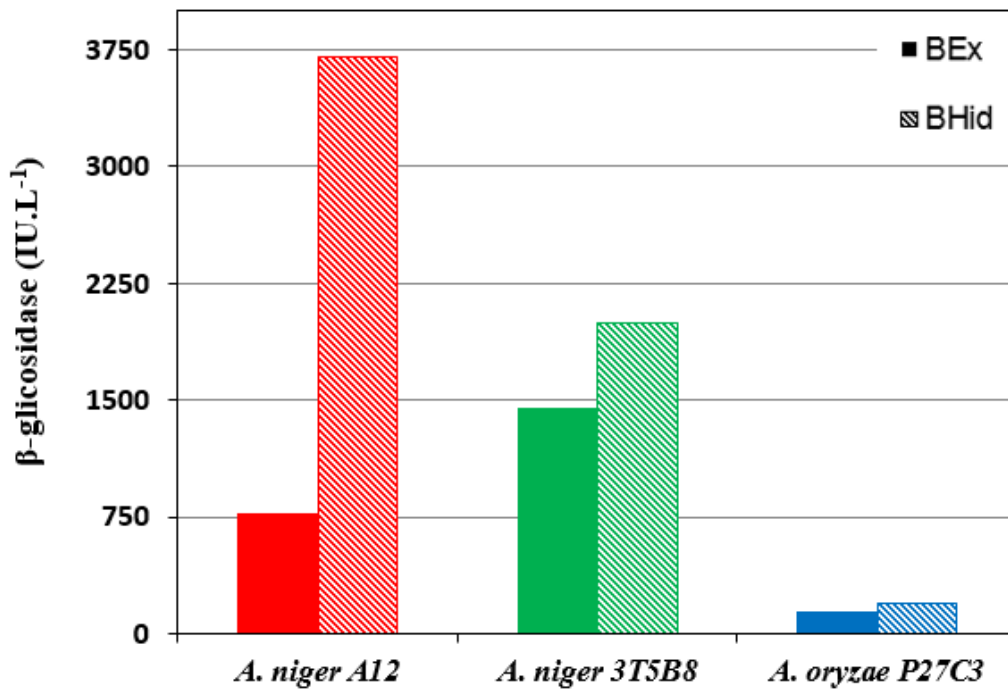
Um efeito oposto foi observado com relação à produção de xilanase (Figura 5.2) e β -glicosidase (Figura 5.3). O bagaço pré-tratado hidrotérmico (BHid) forneceu condições de cultivo mais favoráveis à produção destas enzimas. Para as linhagens de *A. niger*, a produção de xilanases foi de até 23 % maior quando BHid foi utilizado em vez do BEx. A produção de β -glicosidase por *A. niger* A12 foi de até 4 vezes maior quando o BHid foi o substrato indutor. Pode-se observar pelos dados da Tabela 5.1 que a lignina e as hexoses estão presentes nas mesmas proporções nas amostras de BEx e BHid. Entretanto, a proporção de pentoses é mais alta no BHid, o que pode explicar a produção mais alta de xilanase obtida em cultivos com este bagaço. Enquanto o pré-tratamento por explosão a vapor liberou uma maior quantidade de açúcares como a glicose, xilose e celobiose, o pré-tratamento hidrotérmico conservou a fração de oligossacarídeos (Tabela 5.2).

Figura 5.2 Produção de xilanase por linhagens de *Aspergillus* após 72 h de cultivo pelo método de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e pelo tratamento hidrotérmico (BHid).



Nota: As análises enzimáticas nesta etapa do projeto foram realizadas seguindo um método de análise diferenciado.

Figura 5.3 Produção de β -glicosidase por linhagens de *Aspergillus* após 72 h de cultivo pelo método de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e pelo tratamento hidrotérmico (BHid).



O método de fermentação sequencial se mostrou viável para a produção enzimática por diferentes linhagens de fungos, uma vez que todas as linhagens de *Aspergillus* avaliadas foram capazes de produzir celulases e xilanases em cultivos conduzidos pelo método sequencial utilizando bagaço de cana pré-tratado (BIn e BEx) como substrato.

A linhagem de *A. niger* A12 produziu altos títulos de todas as enzimas avaliadas, resultando em 1,26; 26,25; 3,70 e 0,58 IU.mL⁻¹ de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase e β -xilosidase (gráfico não apresentado), respectivamente, em cultivos com bagaço BHid. Estes resultados foram obtidos sob o novo método de cultivo sequencial no estado sólido e submerso e são promissores em comparação aos obtidos por Rodriguez-Zuniga *et al.* (2014) em cultivos no estado sólido, utilizando BHid e a mesma linhagem de *A. niger* A12, o que resultou em atividades de endoglucanase e xilanase de 0,75 e 1,31 IU.mL⁻¹, respectivamente.

A linhagem de *A. oryzae* P27C3 não foi capaz de produzir altos índices enzimáticos utilizando bagaços pré-tratados. Entretanto, mesmo com níveis de produção mais baixos, os perfis de produção enzimática seguiram as mesmas tendências observadas para a linhagens de *A. niger*.

5.3.3 Aplicação dos coquetéis enzimáticos produzidos na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar

Os coquetéis enzimáticos produzidos em fermentação sequencial pelas seis condições de cultivo avaliadas (três linhagens fúngicas cultivadas em bagaço de cana-de-açúcar submetido a dois tipos de pré-tratamentos) foram concentrados conforme descrito na seção 5.2.7 e aplicados na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e por tratamento hidrotérmico. Deste modo, os complexos enzimáticos produzidos utilizando um determinado substrato como indutor à síntese enzimática, foram utilizados para a hidrólise enzimática de amostra semelhante.

A Tabela 5.3 apresenta os perfis dos complexos enzimáticos após a etapa de concentração por ultrafiltração. Nos ensaios de hidrólise enzimática, foi aplicada uma carga fixa de enzima comercial (EC) de 4,3 mg_{proteínas totais}/g_{celulose} e foram realizadas suplementações com os coquetéis enzimáticos produzidos, fixando-se as cargas de 70, 107, 143 e 179 UI_{xilanase}/g_{celulose}. As conversões totais de hidrólise de celulose à glicose obtidas com as combinações de coquetéis enzimáticos descritos são apresentadas nas Figuras 5.4 e 5.5.

Na Figura 5.4 observa-se que a combinação do coquetel enzimático comercial com os coquetéis produzidos pelas linhagens de *Aspergillus* resultou em incremento na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Observou-se que utilizando-se cargas enzimáticas baixas (correspondentes a 70 IU_{xilanase/g_{celulose}}), os coquetéis enzimáticos de *A. niger* 3T5B8 e *A. oryzae* P27C3 resultaram em maior rendimento de hidrólise do que o extrato produzido pelo *A. niger* A12, de acordo com o teste de Tukey com 85% de nível de confiança. No entanto, em cargas enzimáticas tão altas quanto 179 IU_{xilanase/g_{celulose}} os coquetéis enzimáticos das três linhagens apresentaram o mesmo desempenho de hidrólise.

Tabela 5.3 Perfis dos coquetéis enzimáticos produzidos por linhagens de *Aspergillus* pelo método de fermentação sequencial utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e pelo tratamento hidrotérmico (BHid), após etapa de concentração por ultrafiltração

Linhagem	Proteínas (mg.mL ⁻¹)	Endoglucanase (UI.mL ⁻¹)	Xilanase (UI.mL ⁻¹)	β-glicosidase (U.mL ⁻¹)	β-xilosidase (U.mL ⁻¹)
BEx					
<i>A. niger</i> A12	124	144	858	47	18
<i>A. niger</i> 3T5B8	88	48	958	202	32
<i>A. oryzae</i> P27C3	77	12	97	10	2
BHid					
<i>A. niger</i> A12	148	135	1511	533	57
<i>A. niger</i> 3T5B8	90	51	965	181	29
<i>A. oryzae</i> P27C3	68	15	101	10	1,7

Figura 5.4 Conversão total de celulose em glicose (%) obtida em ensaios de hidrólise do BEx com diferentes cargas enzimáticas do coquetel enzimático comercial (EC) e coquetéis enzimáticos produzidos por três linhagens de *Aspergillus* pelo método de fermentação sequencial. Ensaios realizados com 5 % m/m de sólidos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e cargas enzimáticas fixas em 4,3 mg_{proteínas EC}/g_{celulose} e suplementações com cargas fixas de xilanase de 70; 107; 143 e 179 UI_{xilanase}/g_{celulose}.

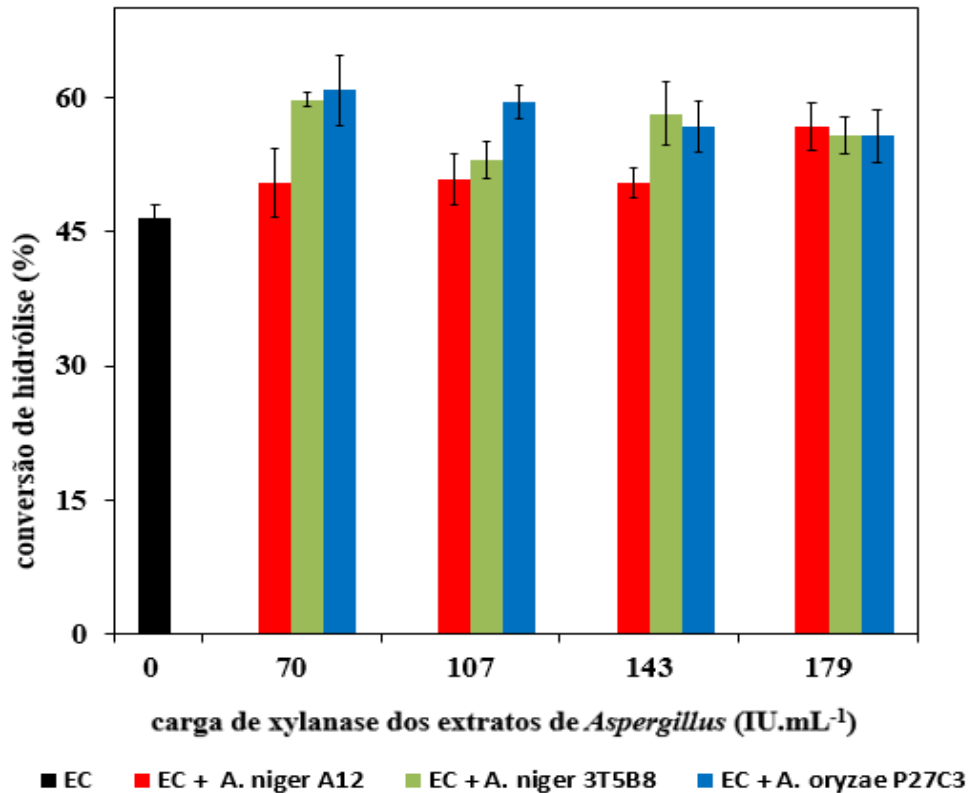
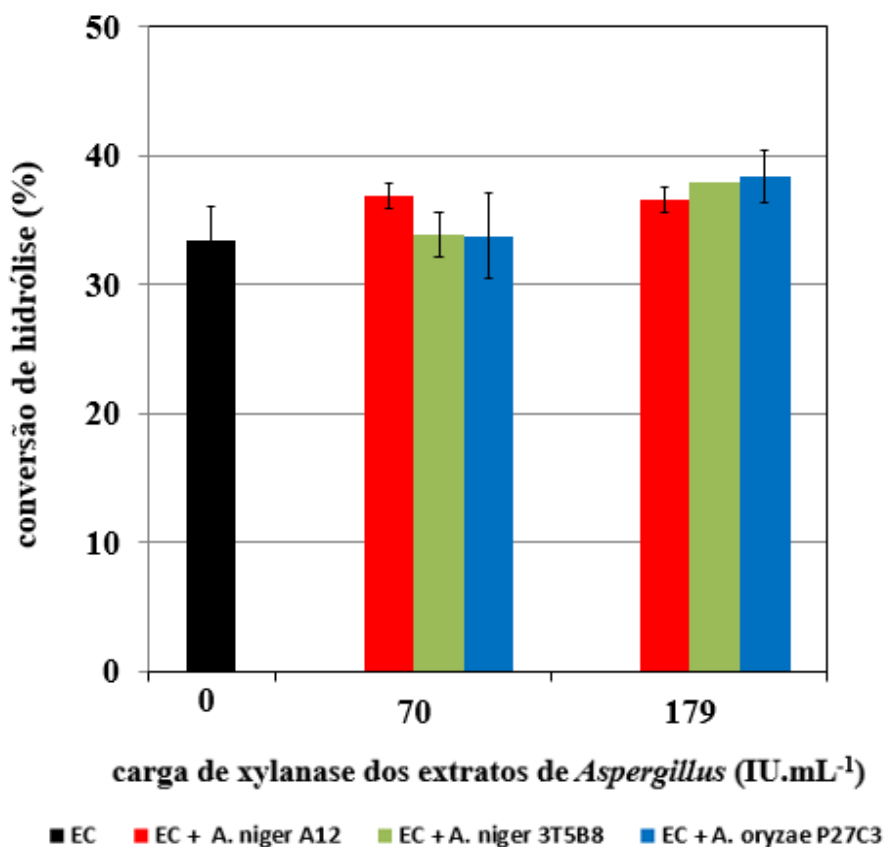


Figura 5.5 Conversão total de celulose em glicose (%) obtida em ensaios de hidrólise do BHid com diferentes cargas enzimáticas do coquetel enzimático comercial (EC) e coquetéis enzimáticos produzidos por três linhagens de *Aspergillus* pelo método de fermentação sequencial. Ensaios realizados com 5 % de sólidos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método hidrotérmico e cargas enzimáticas fixas em 4,3 mg_{proteínas EC}/g_{celulose} e suplementações com cargas fixas de xilanase de 70; 107; 143 e 179 UI_{xilanase}/g_{celulose}.



Observa-se na Figura 5.5 que a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo tratamento hidrotérmico resultou em conversões totais de celulose à glicose mais baixas, independentemente da carga enzimática aplicada. Enquanto a hidrólise com a enzima comercial resultou em 46,5 ± 1,5 % de conversão do BEx, a mesma carga enzimática resultou em apenas 33,5 ± 2,5 % de conversão do BHid.

As baixas conversões de hidrólise do BHid podem ser explicadas pela presença de xilooligômeros detectados na amostra (Tabela 5.2). Estes compostos e outros açúcares solúveis encontrados no material lignocelulósico após o pré-tratamento são inibidores de celulases, sendo os xilooligômeros mais inibidores do que a xilose, capaz de impactar o desempenho enzimático em concentrações tão baixas quanto 1,67 mg.mL⁻¹ (Qing; Yang; Wyman, 2010).

De um modo geral, mesmo na ausência de inibidores, a hidrólise enzimática

tem um aumento de rendimento até uma determinada carga enzimática, a partir da qual não é viável continuar aumentando a carga de enzimas, pois o substrato já se encontra saturado pelas enzimas. Considerando-se que os extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens de *Aspergillus* no presente estudo não foram submetidos à etapas de purificação e nem à adição de estabilizantes, o ganho percentual de 10 % na conversão total de hidrólise enzimática com o incremento de atividades enzimáticas tão baixas quanto $70 \text{ IU}_{\text{xilanase}}/\text{g}_{\text{celulose}}$ pode ser considerado um indicativo de aplicação promissora para estes extratos enzimáticos.

5.4 Conclusões

Foi constatado que o método de fermentação sequencial pode ser aplicado com sucesso para diferentes linhagens de fungos filamentosos. Pode-se afirmar que para as três linhagens de *Aspergillus sp* avaliadas a produção de endoglucanase foi favorecida pelo pré-tratamento por explosão a vapor. No entanto, as produções de xilanase e de β -glicosidase foram maiores nos cultivos utilizando o bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico.

A condição mais favorável à produção enzimática foi alcançada com o *A. niger* A12 em cultivos com o bagaço hidrotérmico, resultando em 1,26; 26,25; 3,70 e 0,58 $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase e β -xilosidase, respectivamente.

Sobre o desempenho dos coquetéis enzimáticos produzidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, pode-se afirmar que todos têm potencial de fornecer ganhos de hidrólise significativos, sobretudo na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, que demonstrou melhores rendimentos de conversão. Os coquetéis produzidos por *A. oryzae* P27C3, embora tenham menor atividade no extrato bruto, quando aplicados na hidrólise do BEx podem resultar em melhor desempenho de hidrólise enzimática do que os coquetéis enzimáticos da linhagem *A. niger* A12.

Capítulo 6

Produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por coquetéis enzimáticos produzidos por diferentes métodos de cultivo

6.1 Introdução

A produção de etanol de segunda geração compreende as etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise dos polímeros constituintes da lignocelulose a açúcares simples, fermentação alcoólica e purificação. Um dos principais entraves na produção de etanol de segunda geração em escala industrial é o alto custo da etapa de conversão da celulose presente nos materiais lignocelulósicos à glicose (Barta *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013; Macrelli; Mogensen; Zacchi, 2012). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes para a produção de enzimas (hemi)celulolíticas, buscando-se redução de custos e também extratos com maior performance na hidrólise enzimática da lignocelulose.

A produção de enzimas *in-loco*, integrada às usinas de produção de etanol de primeira e segunda geração pode oferecer redução de custos no processo referentes à armazenagem e transporte das enzimas. Além disso, a utilização de materiais lignocelulósicos como substrato indutor para a produção enzimática pode reduzir ainda mais os custos das mesmas, uma vez que materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo no Brasil, já se encontram abundantemente disponíveis nas usinas de etanol de primeira geração (Barta *et al.*, 2010; Furlan *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2013).

Estudos recentes apontam a uma vantagem de utilização de complexos enzimáticos produzidos por fermentação no estado sólido e submerso na presença de materiais lignocelulósicos na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (Castro *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2011; Prevot *et al.*, 2013). No entanto, para uma eficiente aplicação da celulose contida na lignocelulose em bioprocessos para a produção de enzimas e hidrólise, uma etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico faz-se necessária a fim de tornar a celulose mais disponível à ataques microbianos e enzimáticos (Mosier *et al.*, 2005a). No Brasil, onde o bagaço de cana-de-açúcar é material lignocelulósico abundante, o pré-tratamento por explosão a vapor se destaca entre os outros tipos de tratamentos por não necessitar de adição de químicos (exceto água) e ser compatível com os sistemas de operação das usinas de etanol já existentes.

Durante os pré-tratamentos pode ocorrer a solubilização da hemicelulose no meio líquido, enquanto a lignina é transformada pela alta temperatura. Dependendo da severidade da reação, da característica do substrato e da carga de sólidos, compostos tóxicos para leveduras e/ou inibidores de celulasas podem ser liberados como, por exemplo, açúcares solúveis, hidroximetil furfural, furfural, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Por esta

razão, uma etapa de lavagem do material pré-tratado pode ser realizada a fim de promover a remoção de compostos como oligossacarídeos e compostos fenólicos que atuam como inibidores na hidrólise enzimática e na fermentação com leveduras (Kim *et al.*, 2011; Ximenes *et al.*, 2010).

O objetivo desta etapa do trabalho foi selecionar o método de cultivo mais vantajoso para a produção de complexos enzimáticos com maior atividade enzimática e também melhor eficiência no processo de produção de etanol 2G. Para se atingir este objetivo, cultivos foram realizados pelo novo método de fermentação sequencial (FSeq) e pelo método de fermentação submersa (FSm) utilizando como substrato indutor o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Os coquetéis enzimáticos produzidos por *A. niger* foram então aplicados na hidrólise de bagaço de cana seguida por fermentação alcoólica para produção de etanol 2G.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Microrganismo

O agente das fermentações foi uma linhagem do fungo filamentosso *Aspergillus niger* (*A. niger* A12), da coleção da EMBRAPA-CTAA, mantido sob congelamento a -18°C.

6.2.2 Matéria-prima lignocelulósica

O indutor lignocelulósico utilizado neste presente trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEx) cedido por uma usina local. Uma vez que foi observado na etapa anterior do projeto (Capítulo 5) a presença de compostos inibidores à ação de celulasas após o pré-tratamento por explosão a vapor, nesta etapa o BEx foi lavado com água quente a 50°C até a água de lavagem atingir o pH neutro (BEx-lav), fator que indica a remoção de compostos fenólicos (Vitcosque *et al.*, 2012). O tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar seco utilizado foi selecionado através de peneiramento, com partículas menores de 0,5 mm.

6.2.3 Meio nutriente

O meio de cultivo utilizado foi o meio descrito por Mandels e Sternberg (1976) e adaptado por Cunha *et al.* (2012a) contendo (em m/v): 0,14% de (NH₄)₂SO₄, 0,20% de

KH_2PO_4 , 0,03% de CaCl_2 , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50% de peptona, 0,20% de extrato de levedura, 0,03% de uréia, 0,10% de Tween 80, and 0,10% de solução salina (5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 mg/L de CoCl_2). A adição de glicose aos meios líquidos de pré-cultivo e cultivo teve como intuito proporcionar efetiva germinação e crescimento fúngico, sendo a primeira fonte imediata de carbono para seu desenvolvimento.

6.2.4 Condições de Pré-cultivo

Procedimento de pré-cultivo: Os esporos de *A. niger* foram inicialmente ativados em meio PDA (*potato-dextrose-agar*) por 5 dias. Em seguida, os esporos foram suspensos e inoculados em sabugo de milho (Couri e Farias, 1995). Após completa esporulação em sabugo de milho, os esporos foram ressuspensos e inoculados nos meios de pré-cultivo, os quais foram preparados de forma diferenciada de acordo com o método de cultivo desejado, FSm ou FSeq.

Pré-cultivo para fermentação sequencial: no método de fermentação sequencial, a primeira etapa de pré-cultivo foi realizada no estado sólido. Portanto, esporos foram inoculados no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BEx-lav) a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/g de meio sólido, em frascos Erlenmeyer de 500 mL. A umidade do indutor lignocelulósico foi ajustada através da adição do meio nutriente líquido descrito na seção 6.2.3, sem suplementação com glicose, na proporção de 12 mL de meio nutriente a cada 5 g de meio sólido. Os frascos permaneceram incubados em condições estáticas, em estufa a 32 °C por 24 h. Após este período, houve a transição dos pré-cultivos para fermentação submersa através da adição de 200 mL de meio nutriente líquido descrito na seção 6.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 6,0. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por 48 h (Cunha *et al.*, 2012a). Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10 % (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

Pré-cultivo para fermentação submersa: no método de fermentação convencional, o inóculo foi preparado diretamente em meio líquido. Nesta etapa, os esporos foram inoculados diretamente no meio nutriente líquido descrito na seção 6.2.3, enriquecido com 30 g/L de glicose e pH inicial 4,5, a fim de se atingir a concentração final de esporos de 10^7 esporos/mL.

Os pré-cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de volume útil, mantidos em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por aproximadamente 50 h, quando houve completa germinação dos esporos. Após o tempo de pré-cultivo, o inóculo foi transferido na proporção de 10 % (v/v) para o meio de cultivo para a produção enzimática.

6.2.5 Produção enzimática

A produção de celulasas e xilanasas por *A. niger* foi conduzida em frascos aletados de 500 ml, contendo 100 ml de volume útil. O meio nutriente utilizado foi similar o mesmo descrito na seção 6.2.3, exceto que nesta etapa o meio nutriente foi suplementado com 10 g/L de glicose e 1% m/v da matéria-prima lignocelulósica indutora. Os frascos foram inoculados com 10% v/v de pré-cultivo e os cultivos permaneceram em mesa incubadora rotativa a 200 rpm e 32 °C por 96 h. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 h, filtradas e centrifugadas a 11.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

6.2.6 Hidrólise enzimática

Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados empregando somente um extrato enzimático comercial Cellic Ctec2®, gentilmente cedido pela Novozymes A/S (Dinamarca), a fim de se selecionar condições adequadas à hidrólise enzimática e fermentação. Foram avaliados: (a) a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e após procedimento de lavagem com água quente (BEx-lav) em frascos Erlenmeyer; (b) a avaliação da carga de azida de sódio adequada aos ensaios de hidrólise enzimática seguida por fermentação alcoólica, sendo a hidrólise realizada em reator de hidrólise rotativa em um reator de hidrólise com rotação de 360°, em tubos contendo 4 mL de volume reacional e 5 % m/v de sólidos, com rotação de 30 rpm a 50 °C por 48 h; (c) a avaliação da cinética da hidrólise enzimática após 0, 24 e 48 h de reação, realizada em frascos Erlenmeyer. Os ensaios de hidrólise enzimática em Frascos Erlenmeyer foram conduzidos em frascos de 500 mL, contendo 5% m/v de sólidos, em um volume total 50 mL de extrato enzimático em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Nos ensaios controle de hidrólise, solução tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 foi adicionada ao bagaço de cana-de-açúcar nas mesmas condições que os ensaios reais, porém sem a presença de enzimas e, posteriormente, este controle foi também encaminhado para a fermentação alcoólica para

verificação de desempenho da levedura em comparação com a fermentação dos hidrolisados enzimáticos.

Nos ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando extratos enzimáticos produzidos por diferentes métodos de cultivo, foi utilizada uma carga fixa da enzima comercial Cellic Ctec2, diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 isolada e também combinada aos coquetéis enzimáticos produzidos. Os coquetéis enzimáticos foram concentrados por ultrafiltração utilizando-se de membranas de polietersulfona vertical de diâmetro de corte de 10 kDa (Vivaspin 20 - GE Healthcare). Os ensaios de ultrafiltração foram conduzidos através de centrifugação a 11.000 rpm e 20 °C por 17 min. Os extratos foram então aplicados nos ensaios de hidrólise, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 5% m/v de sólidos (BEx-lav), em um volume total 50 mL de extrato enzimático em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. A hidrólise foi realizada por 24 h em mesa incubadora rotativa a 50 °C e 250 rpm. As amostras foram filtradas à vácuo e mantidas sob congelamento para posterior análise para determinação da concentração de glicose liberada no meio reacional.

A conversão de hidrólise foi calculada baseado no valor teórico de conversão anidra de celulose à hexoses (glicose, manose e galactose) de 0,9 (162/180), segundo procedimento descrito por Sluiter *et al.*, (2008).

6.2.7 Fermentação alcoólica

Os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar foram fermentados pelo liofilizado comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (*Fleischmann*). A princípio, o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi filtrado e o teor de glicose analisado. Após isso, a fração líquida foi então adicionada glicose até se atingir a concentração final de glicose de 100 g.L⁻¹; este incremento do teor de açúcar do hidrolisado ocorreria em processo integrado de etanol 1G e 2G na mistura do hidrolisado e do melão, de acordo com Pirota *et al.* (2014). A suplementação do meio com sais foi realizada a fim de se realizar os ensaios de fermentação em uma condição próxima à composição de um caldo de fermentação encontrado nas usinas brasileiras, contendo (em g.L⁻¹): KH₂PO₄ (5,6), MgSO₄.7H₂O (1,4), extrato de levedura (6,8) e uréia (5,32). As fermentações foram conduzidas em mesa incubadora rotativa a 32 °C e 200 rpm.

O coeficiente de rendimento de substrato a etanol ($Y_{P/S}$) foi calculado através

da informação de consumo de glicose e de formação de etanol, de acordo com a equação 6.1:

Coeficiente de Rendimento ($Y_{P/S}$):

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (\text{Eq. 6.1})$$

onde:

$Y_{P/S}$ = coeficiente de rendimento de substrato (S: açúcares fermentescíveis) a produto (P: etanol) (g.g^{-1})

ΔP = variação da concentração de etanol (g)

ΔS = variação do consumo de substrato (g)

A eficiência (η) do processo de produção de etanol pode ser calculada pela razão entre o coeficiente de rendimento real do processo e o rendimento teórico da fermentação alcoólica conforme equação 6.2:

Eficiência (η)

$$\eta = \frac{(Y_{P/S})_{real}}{(Y_{P/S})_{teórico}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6.2})$$

onde:

η = eficiência do processo (%)

$(Y_{P/S})_{real}$ = coeficiente de rendimento real do processo (g.g^{-1})

$(Y_{P/S})_{teórico}$ = coeficiente de rendimento teórico ($0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}.\text{g}^{-1}_{\text{hexose}}$)

6.2.8 Procedimento analítico

A atividade de endoglucanase foi determinada tendo como substrato uma solução de carboximetilcelulose (Sigma, EUA) 0,4% m/v em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8 (Ghose, 1987). Para tal, em 0,5 mL de CMC 4% m/v foram adicionados 0,5 mL do coquetel enzimático diluído em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 4,8. A reação ocorreu a 50 °C por 10 min e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). Foram adicionados 13 mL da água destilada

em cada tudo de reação e a absorvância final das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 μ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

A atividade de xilanase, por sua vez, foi determinada utilizando-se como substrato uma solução de xilana 1% m/v (*oat spelt*, Sigma, EUA) em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0 (Bailey; Poutanen, 1989). Para tal, em 2,0 mL de xilana 1% m/v foram adicionados 1,0 mL do coquetel enzimático diluído em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0. A reação ocorreu a 50 °C por 30 min e foi interrompida pela adição de 1,0 mL de reagente DNS. Após 5 min de incubação em água em ebulição, a reação do DNS foi interrompida transferindo-se os tubos para um banho de gelo, segundo Miller (1959). Foram adicionados 13 mL da água destilada em cada tudo de reação e a absorvância final das amostras foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde a 1 μ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação.

A concentração de glicose liberada nos experimentos de hidrólise e fermentação foi determinada através de um kit enzimático para determinação de glicose (Doles, Goiânia, Brasil). A concentração de etanol nas amostras de fermentação foram determinadas através de análise em HPLC (coluna Aminex HPX-87H) para determinação de glicose liberada em cada ensaio de hidrólise.

6.3 Resultados e discussões

6.3.1 Testes preliminares de ajuste de condições de hidrólise e fermentação

Influência do pré-tratamento na hidrólise enzimática e produção de etanol

2G

A primeira etapa de experimentos compreendeu a avaliação da aplicação da hidrólise enzimática seguida por fermentação alcoólica dos substratos: bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx) e o bagaço pré-tratado por explosão lavado com água quente conforme descrito na Seção 6.2.2 (BEx-lav). A carga enzimática da enzima comercial utilizada neste conjunto de experimentos foi de 0,8 mg de proteínas totais por grama de substrato sólido e as hidrólises foram conduzidas com 5% m/v de sólidos em mesa incubadora rotativa por 72 h a 50 °C e 200 rpm.

Tabela 6.1 Efeito da etapa de lavagem do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (BEx) com água quente (BEx-lav) nas etapas de hidrólise enzimática e produção de etanol de segunda geração, na presença de 0,1 % m/v de azida de sódio

	Conversão de hidrólise (%)	Eficiência em etanol (%)
Controle	-	70
BEx	8,4 ± 1,5	21 ± 3
BEx-lav	8,3 ± 1,2	31 ± 3

Pode-se observar pela Tabela 6.1 que a conversão de hidrólise foi similar para ambos os bagaços utilizados, de modo que pode-se concluir que não houve compostos inibidores de enzimas liberados durante o pré-tratamento que pudessem ser removidos pela lavagem com água quente. No entanto, observa-se que a eficiência em etanol 2G foi 10% maior a partir do hidrolisado proveniente da hidrólise do BEx-lavado, o que indica que há compostos inibidores à levedura que foram liberados durante o pré-tratamento por explosão a vapor e que puderam ser removidos pelo processo de lavagem com água quente. Pode-se afirmar, portanto, que uma etapa adicional de lavagem ao final do pré-tratamento tem impacto significativo na produção de etanol 2G.

Outra informação relevante que pode ser extraída da Tabela 6.1 é o baixo rendimento de produção de etanol 2G a partir dos hidrolisados do material lignocelulósico em comparação com o obtido em ensaio de fermentação controle (com tampão e glicose) para a produção de etanol 1G. Este resultado é um indicativo de que possivelmente o teor de azida de sódio contida no tampão de hidrólise, na concentração de 0,1 % m/v de acordo com Pirota *et al.* (2014) tenha afetado a viabilidade levedura. Por este motivo, esta variável foi avaliada em diferentes concentrações na próxima etapa de experimentos.

Influência da concentração de azida de sódio na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol 2G

Nesta etapa, concentrações de azida de sódio de 0; 0,02; 0,04 e 0,07% m/v foram avaliadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BEx-lav). Devido à praticidade dos experimentos em menor escala, um reator de hidrólise com rotação de 360° foi utilizado para estes teste, com volume útil de 4 mL, contendo 5% m/v de sólidos. Nesta etapa, a carga de enzima comercial utilizada foi mais alta, de 54

mg_{proteínas}/g_{celulose}, diluída em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4.8 contendo diferentes concentrações de azida de sódio, para evitar contaminações durante a etapa de hidrólise enzimática.

Os resultados podem ser observados na Figura 6.1. Pode-se observar a baixa conversão enzimática nos experimentos conduzidos na ausência de azida de sódio, um forte indício de contaminação, e o aumento crescente da conversão de aproximadamente 92% com a adição de azida de sódio na concentração final de 0,07% m/v. A partir destes resultados, uma concentração mais alta de azida de sódio seria selecionada para os ensaios de hidrólise. No entanto, pode-se observar pela Figura 6.2 o impacto negativo da presença de azida de sódio na etapa de fermentação alcoólica.

Em testes preliminares de hidrólise enzimática seguido por fermentação alcoólica pôde-se observar que, nestas condições de ensaio, houve um comprometimento de desempenho de hidrólise e de fermentação devido à adição de azida de sódio para evitar contaminações na hidrólise enzimática, o que inibe o processo fermentativo pela levedura. Em face destes resultados, uma concentração baixa de azida de sódio, com efeito intermediário em ambas etapas foi selecionada, de 0,02 % m/v. Por este motivo, o tempo de hidrólise foi avaliado por ensaio cinético e observou-se não haver diferenças estatísticas significativas após 24 e 48 h de hidrólise, com conversões de $26,4 \pm 0,3$ e $27,2 \pm 1,6$ % após 24 e 48 h de reação, respectivamente.

Figura 6.1 Influência da concentração da azida de sódio no desempenho de conversão de hidrólise enzimática após 48 h de reação a 5% m/v de sólidos, 50 ° C e 200 rpm, utilizando 15 FPU / g de sólidos de extrato enzimático comercial.

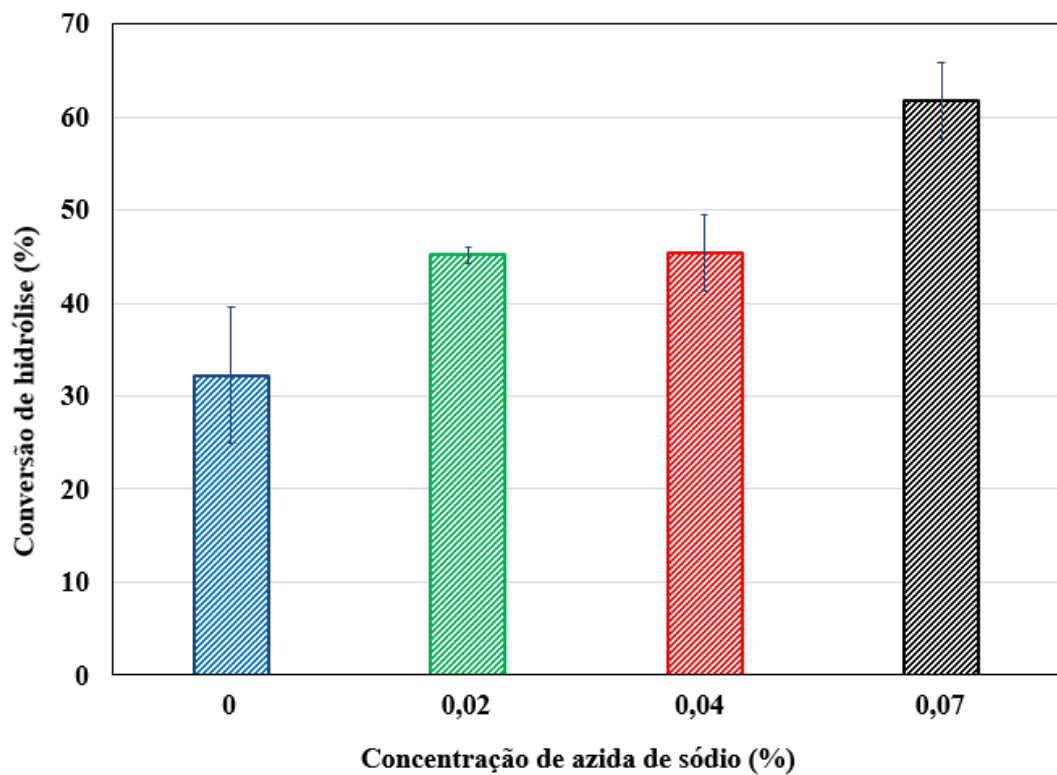
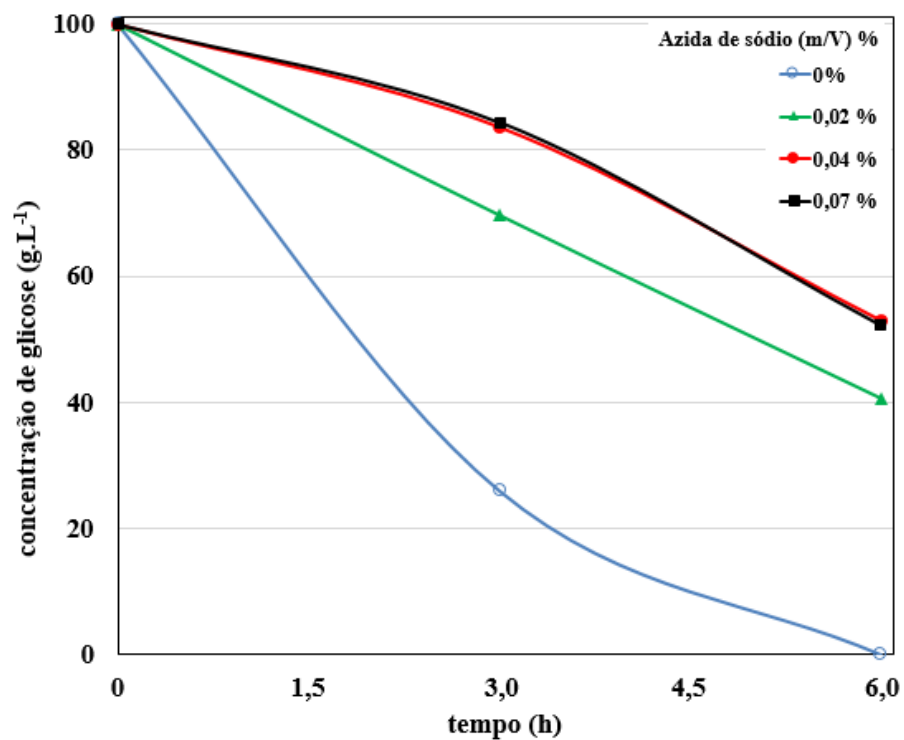


Figura 6.2 Influência da concentração da azida de sódio no consumo de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentação alcoólica conduzida com 25 g.L⁻¹ de leveduras (inicial), a 32 °C e 20 rpm.



6.3.2 Produção de extratos enzimáticos por diferentes métodos de cultivo para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol 2G

Devido as vantagens apresentadas na etapa adicional de lavagem com água quente após o tratamento com explosão a vapor, o substrato utilizado nesta etapa do trabalho, tanto em cultivos para a produção enzimática quanto como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração foi o BEX-lav.

Os dados de produção enzimática são apresentados na Tabela 6.2. Pode-se observar que as produções enzimáticas obtidas nos cultivos conduzidos pelo método de fermentação submersa convencional (FSm) e pelo método de fermentação sequencial (FSeq) evidenciam a grande vantagem de produção de endoglucanases e xilanases pelo método de fermentação sequencial, validando o BEx-Lav como um substrato adequado a este método de cultivo. Este resultado já era esperado, uma vez que o método FSeq resultou em maior produção de endoglucanases do que o método convencional (FSm) em estudos anteriores aplicando os substratos: farelo de soja, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor, como apresentado no Capítulo 4 da presente tese.

Os coquetéis enzimáticos foram então concentrados por ultrafiltração e os perfis dos extratos são apresentados na Tabela 6.2. Pode-se observar que embora os coquetéis enzimáticos tenham sido concentrados mantendo níveis próximos de concentração de proteínas, os coquetéis enzimáticos produzidos em FSeq apresentaram maiores atividades de todas enzimas avaliadas, com atividades de 14 a 23% mais altas.

Tabela 6.2 Perfis dos extratos enzimáticos brutos e concentrados produzidos por *Aspergillus niger* A12 pelos métodos de fermentação sequencial e fermentação submersa utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado (BEx-lav).

	Proteínas (mg.mL⁻¹)	Endoglucanase (UI.mL⁻¹)	Xilanase (UI.mL⁻¹)	β- glicosidase (UI.mL⁻¹)
<i>Extratos brutos</i>				
Fermentação sequencial - FSeq	0,089	1,19	1,66	3,07
Fermentação submersa - FSm	0,075	0,87	1,39	3,98
<i>Extratos concentrados</i>				
Fermentação sequencial - FSeq	0,831	17,57	17,32	20,24
Fermentação submersa - FSm	0,897	13,44	14,02	13,89

Os ensaios de hidrólise enzimática do BEx-lavado foram realizados em três condições distintas:

- (a) Hidrólise com a enzima comercial (EC), correspondendo a 54 mg_{proteínas}/g_{celulose};
- (b) Hidrólise com a enzima comercial (EC), correspondendo a 54 mg_{proteínas}/g_{celulose} suplementado com 1,1 mg_{proteínas}/g_{celulose} de coquetéis enzimáticos produzidos pelo método de fermentação submersa (EC+ extrato FSm);
- (c) Hidrólise com a enzima comercial (EC), correspondendo a 54 mg_{proteínas}/g_{celulose} suplementado 1,1 mg_{proteínas}/g_{celulose} de coquetéis enzimáticos produzidos pelo método de fermentação sequencial (EC+ extrato FSeq).

Os resultados são apresentados na forma de conversão relativa total de celulose em glicose (Figura 6.3). Pode-se observar que, embora volumes e cargas de proteínas similares tenham sido adicionadas dos extratos produzidos em FSeq e FSm, o extrato produzido pelo método de cultivo FSeq resulta em conversão total de hidrólise aproximadamente 10% maior.

Outro resultado que deve ser ressaltado é a de que a adição dos coquetéis enzimáticos produzidos por *A. niger* utilizando BEx-lav como substrato, numa proporção de 2% m/m da carga de proteínas da enzima comercial utilizada, resultou em um ganho percentual de hidrólise de 8 a 18%, com extratos produzidos por FSm e FSeq, respectivamente, destacando o potencial de aplicação de extratos (hemi)celulolíticos produzidos nas condições avaliadas para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Os hidrolisados gerados a partir das três condições de hidrólise avaliadas foram utilizados para a produção de etanol de segunda geração por uma cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. Os perfis de consumo de glicose durante as fermentações está apresentado na Figura 6.4 e os rendimentos e eficiência de produção de etanol de segunda geração são apresentados na Tabela 6.3.

Pode ser observado que o consumo de glicose nas fermentações dos hidrolisados provenientes das hidrólises com extratos de *A. niger* (EC+FSm e EC+FSeq) ocorreu de maneira mais rápida do que somente com o coquetel comercial. Uma vez que as enzimas produzidas por *A. niger* pelos diferentes métodos de cultivos não foram purificadas, provavelmente estes complexos enzimáticos continham alguns sais que favoreceram o crescimento da levedura. Estudos mais completos da composição dos hidrolisados pelos diferentes coquetéis enzimáticos deve ser realizada em pesquisas futuras para identificação destes efeitos.

Figura 6.3 Ganhos percentuais de hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar pré-tratado (BEx-lav) utilizando-se extratos enzimáticos comercial (EC) e combinações de extrato enzimático comercial com extratos produzidos por *A. niger* pelos métodos de fermentação submersa (EC+coquetel FSm) e sequencial (EC+coquetel FSeq).

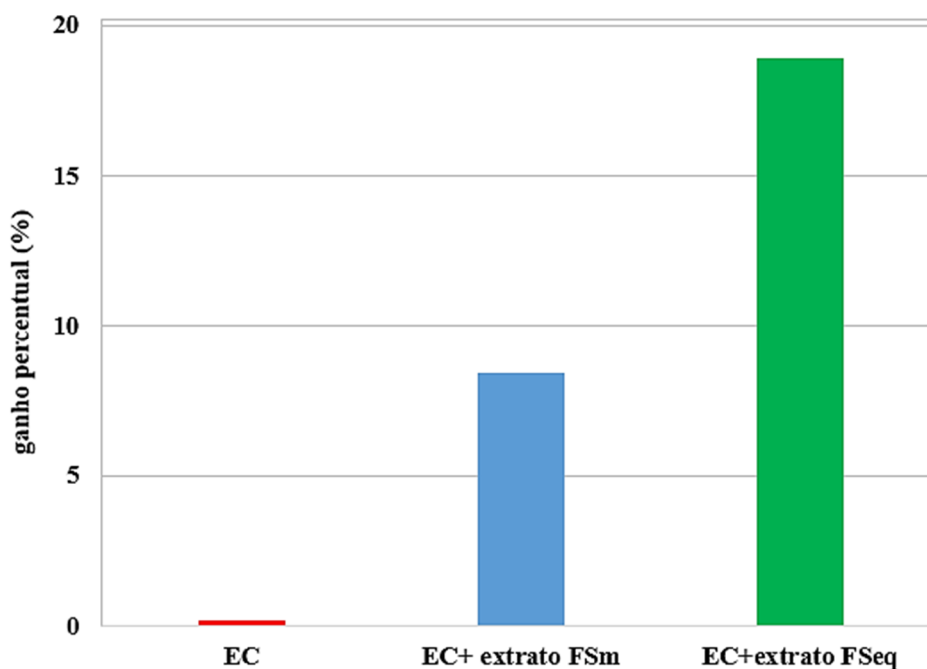


Figura 6.4 Concentração de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo do tempo de fermentação alcoólica de hidrolisados provenientes de experimentos conduzidos com diferentes coquetéis enzimáticos. Fermentação alcoólica conduzida com $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de *Saccharomyces cerevisiae* (inicial) a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ e 250 rpm.

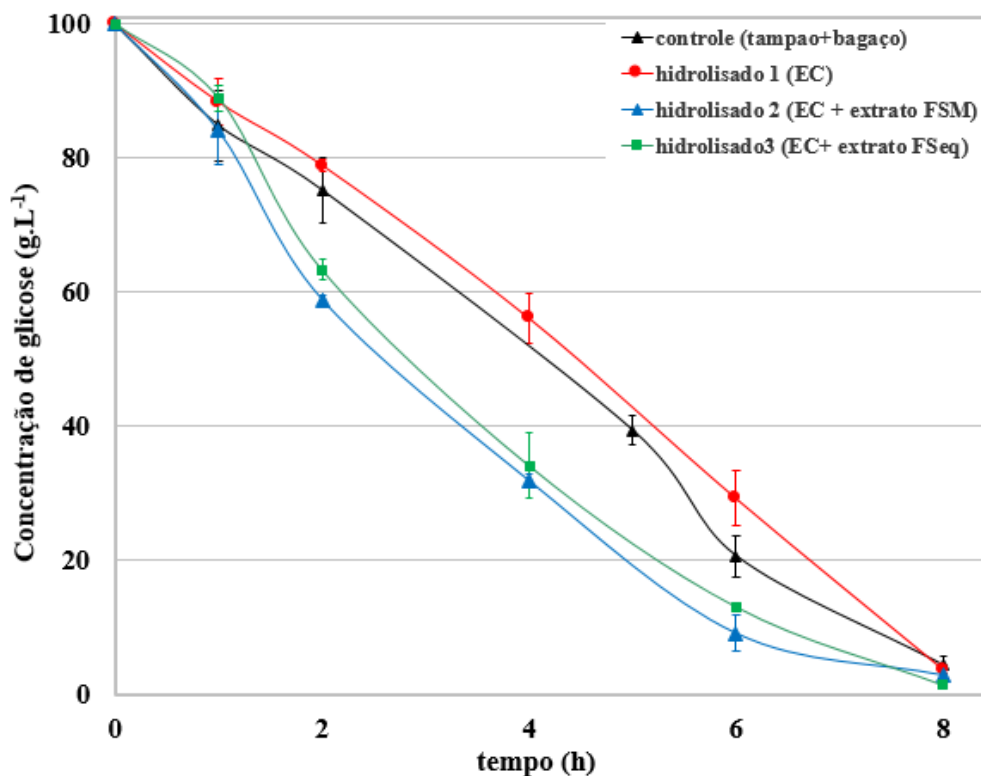


Tabela 6.3 Dados de produção de etanol de segunda geração utilizando a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar obtidos com extratos provenientes de diferentes métodos de cultivo.

Amostra	Concentração de etanol produzido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$Y_{P/S}$	Eficiência (%)
Hidrolisado Controle	$38,2 \pm 1,4$	0,40	78
Hidrolisado EC	$35,8 \pm 0,6$	0,38	74
Hidrolisado EC + FSm	$35,6 \pm 0,1$	0,36	71
Hidrolisado EC + Fseq	$39,6 \pm 0,6$	0,40	78

A partir da análise da Tabela 6.3 pode-se concluir que a produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com coquetéis enzimáticos produzidos por FSeq resultou em eficiência até 7% maior do que a produção de etanol a partir do bagaço hidrolisado por coquetéis produzidos por FSm. Os resultados obtidos validam que o método

de fermentação sequencial favorece a produção de coquetéis enzimáticos não somente com maiores atividades enzimáticas, mas também com melhor desempenho no processo de produção de etanol 2G.

6.4 Conclusões

Pode-se concluir que a adição de uma etapa de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor com água quente pode remover compostos inibidores à fermentação alcoólica por leveduras. Além disso, foi constatado que a adição de azida de sódio pode evitar a contaminação durante a reação e aumentar os rendimentos de hidrólise enzimáticas mas, ao mesmo tempo, a azida de sódio em concentrações tão baixas quanto 0,02 % m/v pode inibir a fermentação alcoólica por leveduras.

Com relação à cinética de hidrólise foi observado que não se obteve incrementos de hidrólise após 24 h de cultivo, sendo este tempo ideal para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nas condições avaliadas. O método de fermentação sequencial mostrou-se vantajoso em comparação com o método de fermentação submersa convencional, para a produção de coquetéis com maior atividade enzimática. A aplicação dos coquetéis enzimáticos produzidos pelo método sequencial na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar se mostrou promissora, sendo que a suplementação da enzima comercial em 2% m/v de carga total de proteínas utilizando este extrato enzimático de *A. niger* resultou em um ganho porcentual de hidrólise de 18%.

A produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado com coquetéis enzimáticos produzidos por FSeq resultou em eficiência até 7% maior do que a produção de etanol a partir do bagaço hidrolisado por coquetéis produzidos por FSm, evidenciando a vantagem do método de cultivo FSeq para a produção de coquetéis enzimáticos para aplicação na processo de produção de etanol 2G.

Capítulo 7

Conclusões gerais

7.1 Conclusões gerais

Pode-se concluir a partir dos resultados obtidos na presente pesquisa de doutorado que:

a) A interação fungo-substrato é parâmetro chave para o incremento da produção enzimática em biorreatores, o aumento desta interação pode ser proporcionada pelo ajuste de variáveis operacionais como a frequência de rotação, pelo tipo de impelidor utilizado e também pelas características do substrato, como condições de pré-tratamento e de tamanho de partícula, fatores os quais afetam a porosidade do material e podem favorecer o crescimento do microrganismo aderido à sua superfície;

b) O método de cultivo em fermentação sequencial no estado sólido e submerso pode ser aplicado com sucesso em biorreatores tipo tanque agitado e aerado, resultando nos mesmos níveis de produção de (hemi)celulases do que os obtidos em cultivos em biorreator pneumático do tipo coluna de bolhas, sendo possível se atingir a mesma produtividade volumétrica de endoglucanases em ambos biorreatores;

c) Foi encontrada uma relação entre a frequência de agitação a ser utilizada em cultivos em biorreatores tipo tanque agitado e aerado e as características do substrato sólido, fazendo-se necessária uma avaliação da frequência de agitação para cada bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos;

d) O tipo de impelidor empregado no biorreator tipo tanque agitado mostrou-se como uma variável capaz de elevar os níveis de produção enzimática, com vantagem de produção de endoglucanases em níveis até 70 % superiores em cultivos com o impelidor orelha de elefante de escoamento ascendente (*Elephant ear up-pumping- EEUP*) em relação ao impelidor convencional tipo turbina de Rushton;

e) O método de fermentação sequencial foi validado em cultivos com diferentes substratos lignocelulósicos e linhagens de microrganismos. Ensaio de eletroforese realizados em diferentes etapas do projeto demonstram que os extratos enzimáticos produzidos por *A. niger* apresentam características diferentes de acordo com o tipo de substrato utilizado e o método de cultivo, os quais podem desencadear na produção diferenciada de metabólitos;

f) O farelo de trigo se destacou como um substrato capaz de induzir alta produção enzimática de (hemi)celulases, com alto potencial para ser utilizado isoladamente ou combinado com o bagaço de cana-de-açúcar para a produção de coquetéis enzimáticos com aplicação na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar;

g) Pode-se afirmar que, entre os métodos de pré-tratamento da biomassa, por

explosão a vapor ou hidrotérmico, a produção de endoglucanase foi favorecida pelo pré-tratamento por explosão a vapor. No entanto, as produções de xilanase e de β -glicosidase foram maiores nos cultivos utilizando o bagaço de cana submetido ao pré-tratamento hidrotérmico. A condição mais favorável à produção enzimática foi alcançada com o *A. niger* A12 em cultivos com o bagaço hidrotérmico, resultando em 1,26; 26,25; 3,70 e 0,58 UI.mL⁻¹ de endoglucanase, xilanase, β -glicosidase e β -xilosidase respectivamente;

h) Sobre o desempenho dos coquetéis enzimáticos produzidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, pode-se afirmar que todos os extratos têm potencial de fornecer ganhos de hidrólise significativos, sobretudo na hidrólise do bagaço de cana tratado por explosão a vapor, que demonstrou melhores rendimentos de conversão de hidrólise. Em baixas concentrações enzimáticas, os extratos produzidos por *A. oryzae* P27C3 e *A. niger* 3T5B8 demonstraram apresentar desempenho de hidrólise mais alto do que a linhagem selvagem *A. niger* A12;

i) A escolha do procedimento de pré-tratamento do material lignocelulósico deve ser feita com cautela de acordo com cada bioprocessos, pois pode impactar todo o processo de produção de enzimas, sacarificação da biomassa e produção de etanol celulósico. Foi demonstrado que a adição de uma etapa de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar com água quente após o pré-tratamento por explosão a vapor pode favorecer tanto a produção enzimática quanto as reações de hidrólise enzimática;

j) Extratos enzimáticos produzidos pelos métodos de cultivo FSeq e FSm mostraram aplicação promissora na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar seguido por fermentação alcoólica para produção de etanol de segunda geração. Extratos enzimáticos produzidos pelo método de fermentação sequencial apresentaram ganhos percentuais de hidrólise de até 10 % maiores quando comparado ao desempenho do coquetel enzimático produzido pelo método de cultivo submerso convencional. Pode-se concluir, portanto, que o novo método de fermentação sequencial é vantajoso não somente na produção de coquetéis enzimáticos com maior atividade específica, mas também com maior potencial de aplicação no processo de produção do etanol de segunda geração.

7.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Desenvolvimento de um sistema de alimentação de materiais lignocelulósicos no biorreator para a realização de cultivos em batelada alimentada;
- Desenvolvimento de um projeto para controlar a distribuição de sólidos no biorreator durante os cultivos, para evitar a perda de substrato nas paredes do reator;
- Estudos para caracterização completa dos complexos enzimáticos produzidos a partir de diferentes resíduos agroindustriais, buscando-se a proporção entre as enzimas produzidas mais adequada à hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e à produção de etanol 2G;
- Caracterização dos complexos enzimáticos produzidos por diferentes tipos de pré-tratamento sem a etapa de lavagem e após a etapa de lavagem do substrato, a fim de se identificar quais compostos inibidores são liberados durante os pré-tratamentos e para a quantificação de seus efeitos inibidores na ação das celulases;
- Estudos de caracterização completa dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar por diferentes complexos enzimáticos para identificação dos componentes com impacto positivo e negativo na etapa de fermentação alcoólica por leveduras.

Capítulo 8

Referências

ADSUL, M. G. *et al.* Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1467-1473, Mai 2007.

AGBOR, V. B. *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, Nov 2011.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5979-5987, Dez 2009.

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, Mai 2010.

AKIBA, S. *et al.* Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus-niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 125-130, 1995.

ALLEN, S. G. *et al.* A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 13, p. 2934-2941, Jun 2001.

ANDRIC, P. *et al.* Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 308-324, Mai 2010.

BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 5-10, Jan 1989.

BARRIOS-GONZALEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, Fev 2012.

BARTA, Z. *et al.* Process design and economics of on-site cellulase production on various carbon sources in a softwood-based ethanol plant. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 8, 2010.

BENSAID, S.; CONTI, R.; FINO, D. Direct liquefaction of ligno-cellulosic residues for liquid fuel production. **Fuel**, v. 94, n. 1, p. 324-332, Abr 2012.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. A kinetic model to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1063-1071, Mai 2006.

BOTELLA, C. *et al.* Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 98-101, Jan 2007.

BRAGA, C. M. P. *et al.*, Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316-324, Ago, 2014.

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

BUSTAMANTE, M. C. C. **Transferência de oxigênio e condições de cisalhamento em biorreator convencional com impelidores orelha de elefante**. 2013. 222 (Doutor). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92-100, Mar 7 2013.

CASEY, E. *et al.* Effect of salts on the Co-fermentation of glucose and xylose by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, Mai 2013.

CASTRO, A. M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. 212 (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CASTRO, A. M. *et al.* Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 151-158, 2010.

CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Oxygen transfer in three scales of concentric tube airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1-2, p. 40-47, Ago 15 2010.

CHANDEL, A. K. *et al.* The realm of cellulases in biorefinery development. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 187-202, Set 2012.

CHANDRA, R. P. *et al.* Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.108, p. 67-93, 2007.

CHINN, M. S.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Screening of thermophilic anaerobic bacteria for solid substrate cultivation on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 53-59, Jan-Feb 2006.

COURI, S.; DE FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista De Microbiologia**, v. 26, n. 4, p. 314-317, Out 1995.

COX, P. W.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology-Uk**, v. 144, p. 817-827, Abr 1998.

CUNHA, F.M. **Desenvolvimento de processo não-convencional para a produção de celulases por *Aspergillus niger* em biorreator pneumático na presença de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CUNHA, F. *et al.* Indirect method for quantification of cellular biomass in a solids-containing medium used as pre-culture for cellulase production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 1, p. 100-108, Feb 2012(a).

CUNHA, F. M. *et al.* Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, Mai 2012(b).

CUNHA, F. M. *et al.* Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 249-252, 2014.

DE ALBUQUERQUE WANDERLEY, M. C. *et al.* Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448-453, Jan 2013.

DE SOUZA, W. R. *et al.* Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, Out 18 2011.

DELABONA, P. D. *et al.* Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, Mar 2012.

DELABONA, P. D. *et al.* Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, Feb 2012.

DIEN, B. S. *et al.* Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, n. 10, p. 880-891, Out 2006.

DIEN, B. S. *et al.* Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 12, p. 5216-5225, Ago 2008.

DOMINGUES, F. C. *et al.* 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, Mar 2000.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, Mar 2003.

ESPERANCA, M. N. *et al.* Gas hold-up and oxygen mass transfer in three pneumatic bioreactors operating with sugarcane bagasse suspensions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 5, p. 805-812, Mai 2014.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª edição. Caxias do Sul: Educs, 2010. 638.

FARINAS, C. S. *et al.* **Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por Fermentação Semi-sólida**. Boletim de pesquisa e

desenvolvimento- Embrapa Instrumentação agropecuária. São Carlos: Embrapa Instrumentação agropecuária, 2008.

FLORENCIO, C. *et al.* Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1389-1402, Fev 2015.

FONTANA, R. C.; POLIDORO, T. A.; DA SILVEIRA, M. M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 19, p. 4493-4498, Out 2009.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803-816, Nov 2011.

FURLAN, F. F. *et al.* Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible? **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, Out 3 2013.

GABELLE, J. C. *et al.* Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 75, p. 408-417, Jun 18 2012.

GERLACH, S. R. *et al.*, Influence of reactor systems on the morphology of *Aspergillus awamori*. Application of neural network and cluster analysis for characterization of fungal morphology. **Process Biochemistry**, v. 33, n.6, p. 601-615, Jan 1998.

GHOSE, T. K. MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, Fev 1987.

HALTRICH, D. *et al.* Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137-161, Nov 1996.

HEINZELMAN, P. *et al.* A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5610-5615, Abr 7 2009.

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

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, Jun 2005.

HONG, Y. *et al.* Impact of cellulase production on environmental and financial metrics for lignocellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 7, n. 3, p. 303-313, Mai 2013.

HORN, S. J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, Jul 2 2012.

HOWARD, R. L. *et al.* Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, Dez 2003.

KANG, S. W. *et al.* Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2, p. 153-156, Jan 2004.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 63-67, Jan 1997.

KIM, Y. *et al.* Liquid Hot Water Pretreatment of Cellulosic Biomass. **Methods in Mol. Biol.**, v. 581, p. 93-102, 2009(a).

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Enzymatic Digestion of Liquid Hot Water Pretreated Hybrid Poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 340-348, Mar 2009(b).

KIM, Y. *et al.* Severity Factor Coefficients for Subcritical Liquid Hot Water Pretreatment of Hardwood Chips. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 254-263, Feb 2014.

KIM, Y. *et al.* Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4-5, p. 408-415, Abr 2011.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. *et al.* The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, Abr 2012.

KOVACS, K. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, Jul 6 2009.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, Jul 1999.

LADISCH, M. R. Bio-Inspired Innovation and National Security. In: (Ed.). **Bioenergy: Renewable Liquid Fuels**. National Defense University: Center for Technology and National Security Policy, p.119-138, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANE, J. GranBio starts cellulosic ethanol production at 21 million gallon plant in Alagoas, Brazil, **Biofuels Digest**, 24 set. 2014. Disponível em: <<http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/09/24/granbio-starts-cellulosic-ethanol-production-at-21-mgy-plant-in-brazil/>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

LASER, M. *et al.* A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, Jan 2002.

LAVENSON, D. M. *et al.* The effect of mixing on the liquefaction and saccharification of cellulosic fibers. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 240-247, Mai 2012.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, Ago 2012.

LIN, P.-J.; SCHOLZ, A.; KRULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 213-220, Abr 15 2010.

LUO, H.-P.; AL-DAHMAN, M. H. Local characteristics of hydrodynamics in draft tube airlift bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 11, p. 3057-3068, Jun 2008.

MACRELLI, S.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, Fev 21 2014.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, Abr 13 2012.

MAEDA, R. N. *et al.* Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, Mai 2011.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, n. 4, p. 267-286, 1976.

MEMBRILLO, I. *et al.* Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7842-7847, Nov 2008.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SORENSEN, H. R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 337-344, Nov 2009.

MICHELIN, M. *et al.* Influence of volumetric oxygen transfer coefficient ($k(L)a$) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 19-26, Nov 2013.

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

MIRRO, R.; VOLL, K. Which impeller is right for your cell line? A guide to impeller selection for stirred tank bioreactors. **Reprinted with permission from Bioprocess International**, v. 7, n. 1, p. 52-57, 2009.

MOSIER, N. S. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, Abr 2005(a).

MOSIER, N. S. *et al.* Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 77-97, Mai 2005(b).

NOVOZYMES. **World's first advanced biofuels facility opens**. 09 out. 2013. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/en/news/news-archive/Pages/World%E2%80%99s-first-advanced-biofuels-facility-opens.aspx>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

OSCAR, M. Do bagaço ao posto. **O Estado de S. Paulo**, São Paulo, 12 dez. 2012. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,do-bagaco-ao-posto-imp-,974591>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

PANDEY, A. *et al.* **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford, UK: Academic Press, 642, 2011.

PANDEY, A. *et al.* Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, Jul 10 1999.

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

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S. E.; FILER, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 319-326, Out 2001.

PEREZ, J. *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, June 2002.

PIMENOVA, N. V.; HANLEY, A. R. Effect of corn stover concentration on rheological characteristics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 347-360, 2004.

PIROTA, R.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 2, p. 744-752, Jun 2014.

POLIZELI, M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, Jun 2005.

PREVOT, V. *et al.* Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690-693, Fev 2013.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9624-9630, Dez 2010.

RIES, L. *et al.* Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. **Bmc Genomics**, v. 14, Ago 2013.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F. *et al.* *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, Ago 2011.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F. *et al.* Integrated Strategies to Enhance Cellulolytic Enzyme Production Using an Instrumented Bioreactor for Solid-State Fermentation of Sugarcane Bagasse. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 142-152, Mar 2013.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F. *et al.* Use of Spectroscopic and Imaging Techniques to Evaluate Pretreated Sugarcane Bagasse as a Substrate for Cellulase Production Under Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2348-2362, Mar 2014.

SALES, M. R. *et al.* Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 917-924, Dez 2011.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, Set 2008.

SCHMIDT, C. G.; FURLONG, E. B. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 36-41, Nov 2012.

SIEDENBERG, D. *et al.* Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on complex medium in stirred tank and airlift tower loop reactors. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 205-216, Ago 1997.

SINGH, R. *et al.* Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulase. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6679-6681, Dez 2009.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, Jun 7 2010.

SLUITER, A. *et al.* **Determination of Ash in Biomass and Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass** GOLDEN, CO, USA: National Renewable Energy Laboratory 2008a.

SLUITER, A. *et al.* **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. GOLDEN, CO, USA: National Renewable Energy Laboratory 2008b.

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

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

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p. 244-263, Jun 2012.

TAKAHASHI, Y.; HIROAKI, K.; SHUICHIRO, M. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. **SpringerPlus**, v. 2, p. 447-457, 2013

THOMASI, S. S.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Average shear rate in three pneumatic bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 8, p. 979-988, Out 2010.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, Nov 2012.

VILLENA, G. K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 231-237, Set 2007.

VITCOSQUE, G. L. *et al.* Production of Biomass-Degrading Multienzyme Complexes under Solid-State Fermentation of Soybean Meal Using a Bioreactor. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 8, 2012.

WANG, M. *et al.* Factors involved in the response to change of agitation rate during cellulase production from *Penicillium decumbens* JUA10-1. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 70, p. 1077-1082, Jul 2013.

WEBER, C. *et al.* Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1303-1315, Jul 2010.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-157, Abr 2007.

WYMAN, C. E. *et al.* Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11052-11062, Dez 2011.

XIMENES, E. *et al.* Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170-176, Mar 5 2010.

YOON, L. W.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Simultaneous production of cellulase and reducing sugar through modification of compositional and structural characteristic of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 4, p. 250-256, Sept 2013.

YU, L. *et al.* Hydrodynamic and kinetic study of cellulase production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1755-1768, Jul 2012.

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

ZNAMEROSKI, E. A.; GLASS, N. L. Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, Jan 22 2013.

Apêndice A

Artigo: "Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method"



Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method



F.M Cunha^{a,b}, M.N Esperança^a, C. Florencio^{b,c}, V.M Vasconcellos^{a,b}, C.S Farinas^{a,b,c}, A.C Badino^{a,c,*}

^a Graduate Program of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, C.P. 676, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

^b Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970, São Carlos SP, Brazil

^c Graduate Program in Biotechnology, Federal University of São Carlos, C.P. 676, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2014

Accepted 3 February 2015

Available online 4 February 2015

Keywords:

Enzyme production

Cellulase

Filamentous fungi

Submerged culture

Xylanase

Sugarcane bagasse

ABSTRACT

The high cost of enzymes is one of the main bottlenecks affecting the industrial production of cellulosic ethanol, which therefore requires the development of improved bioprocesses for the manufacture of cellulases. The present work concerns the selection of operating parameters for enzyme production in three-phasic bioreactors, using sugarcane bagasse as substrate. The parameters considered included cultivation method, substrate particle size and pretreatment, agitation speed, and pH. For both shake flask and stirred tank bioreactor (STB), a new sequential cultivation method employing steam explosion pretreated sugarcane bagasse significantly improved enzyme production, compared to conventional submerged fermentation. Larger substrate particle size provided a better support for fungal growth in shake flasks, while smaller particles resulted in greater homogeneity in stirred tank bioreactors. Maximum endoglucanase and xylanase production in the STB were 1599 ± 66 and $4212 \pm 133 \text{ IU L}^{-1}$, respectively, under sequential cultivation using pretreated bagasse particles smaller than 0.5 mm, agitation speed of 700 rpm, and pH 5.0. The findings provide useful information concerning the influence of operational variables on (hemi) cellulases production in STB three-phasic cultivations, which should contribute to the development of bioprocesses using lignocellulosic materials in large-scale bioreactors.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Improvements in second generation (2G) ethanol production require consideration of environmental and economic issues, including the dependence on petroleum-based fuels and the addition of value to agricultural and industrial residues. A critical factor in many biorefining approaches for 2G ethanol production is the high cost of the enzymes required for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, which can have a significant impact on the price of 2G ethanol [1,2]. The development of improved bioprocesses for enzyme production is therefore needed in order to overcome this economic limitation.

The composition of lignocellulosic material favors its use as a renewable resource for the production of biofuels and enzymes. Vegetal biomass is mainly composed of three types of polymer: cellulose (35–50%), hemicellulose (15–35%), and lignin (10–20%). The relative proportions of these substances and the interaction among them vary according to plant species, which affects the recalcitrance of the biomass and its suitability for different purposes [3–5]. When lignocellulosic materials are used as substrates for enzyme production, a pretreatment step can increase cellulose availability. Each type of pretreatment has its advantages and disadvantages. The use of steam explosion helps to remove the hemicellulose fraction from the biomass, rendering the cellulose more available to biological and enzymatic attack. This procedure is widely used for sugarcane bagasse, because no chemicals are required (except water), energy inputs are low, and the technique is compatible with existing biorefinery systems [4,6,7].

Many microorganisms are able to degrade lignocellulosic materials by producing enzymatic complexes containing cellulases (cellobiohydrolases, endoglucanases, and β -glucosidases) and

* Corresponding author at: Graduate Program of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, C.P. 676, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3351 8001; fax: +55 16 3351 8266.

E-mail address: badinojr@ufscar.br (A.C. Badino).

Table 1
Chemical composition of untreated and pretreated sugarcane bagasse.

	Untreated sugarcane bagasse ¹	Steam explosion pretreated sugarcane bagasse ²
		
Glucan (%)	46.6	71.2
Pentosan (%)	26.5	0.5
Lignin (%)	21.7	27.8

¹ Rodriguez-Zuñiga et al. [23].

² Cunha et al. [24].

xylanases. Other accessory enzymes are also produced that can increase the accessibility of the cellulose and enhance the hydrolysis of lignocellulosic materials. These include lytic polysaccharide monoxygenases, pectinases, laccases, manganese peroxidase, and lignin peroxidase [3,8,9]. The most widely studied microorganisms are the filamentous fungi *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp., which are able to secrete enzymes at very high levels [10,11].

Cellulases and hemicellulases can be produced by two conventional fermentation methods: submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF). The submerged fermentation method has well-developed monitoring and control systems and is relatively simple to scale up, and has therefore been widely used industrially for cellulase production. On the other hand, solid-state fermentation has the advantage of being able to provide environments similar to the natural habitats of fungi, and close interaction between the microorganism and the inducer substrate can result in higher enzyme yields [12,13]. A new sequential fermentation (SF) method (SF) recently developed by Cunha et al. [14] combines the advantages of the solid-state and submerged cultivation techniques in a single process, and can potentially be used for cellulase production in either shake flasks or pneumatic bioreactors [15].

The bioreactors used for submerged enzyme production can be pneumatically agitated, as in bubble column bioreactors, or mechanically agitated, such as in stirred tank bioreactors (STB) [16,17]. The STB is currently the type of bioreactor most widely used in cellulase production bioprocesses. Although commercial substrates have often been used for cellulase production, there is increasing use of lignocellulosic materials for the production of cellulases and xylanases in bioreactors [15,18,19].

Fungal growth under different environmental conditions can result in differences in physiology and enzyme expression, as well as in the expression of enzymes with different characteristics in terms of molecular weight, kinetic parameters, and performance [13,20]. The influence of the lignocellulosic substrate particle size in solid-state fermentations for enzyme production has been reported recently [21,22]. However, no research has been found concerning the effect of the solid substrate particle size when employed as inducer substrate in submerged fermentation in

bioreactors.

Although there has been extensive research into enzyme production, further investigation is required of the influence of operational variables such as particle size, cultivation method, and agitation conditions in stirred tank bioreactors using sugarcane bagasse as substrate. These parameters are of key importance in the design of bioprocesses for large-scale enzyme production. In order to contribute to the development of bioprocess engineering for (hemi) cellulolytic enzymes production, the present work therefore investigates the influence of cultivation method (sequential solid-state and submerged), sugarcane bagasse pretreatment and particle size, agitation speed, and pH control on

(hemi) cellulases production by *Aspergillus niger* in a stirred tank bioreactor.

2. Materials and methods

2.1. Substrate

The inducer substrate used was sugarcane bagasse. The *in natura* untreated sugarcane bagasse (USB) was provided by Edra Ecosistemas (Ipeúna, Brazil) and the steam explosion pretreated sugarcane bagasse (PSB) was provided by CTC (Piracicaba, Brazil). Both samples originated from the same region in the State of Sao Paulo (Brazil), and the steam explosion pretreatment was conducted at 17×10^5 Pa and 205 °C for 20 min. Compositional analyses of the untreated and pretreated sugarcane bagasse samples were performed previously by Rodriguez-Zuniga et al. [23] and Cunha et al. [24], respectively. The chemical compositions of the samples are provided in Table 1. The sugarcane bagasse samples were milled and sieved, and particle sizes (described in terms of the characteristic diameter, d_p) were selected in the ranges $d_p \leq 0.5$, $0.5 \leq d_p \leq 1.0$, $1.0 \leq d_p \leq 2.0$, and $2.0 \leq d_p \leq 2.4$ mm.

2.2. Microorganism

The wild type *Aspergillus niger* A12 strain, isolated from black pepper, was obtained from the Embrapa Food Technology collection (Rio de Janeiro, Brazil) [25]. The strain was kept at -18 °C, and was activated by incubation in slants of potato dextrose agar medium for 7 days at 32 °C. Suspensions of spores were prepared by the addition of 10 mL of Tween-80 (0.3%, v/v), and the spore concentrations were determined using a Neubauer chamber.

2.3. Nutrient medium

The nutrient medium used for the pre-culture and enzyme production was adapted from Mandels and Sternberg [26] and contained (w/v): 0.14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.20% KH_2PO_4 , 0.03% CaCl_2 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50% peptone, 0.20% yeast extract, 0.03% urea, 0.10% Tween 80, and 0.10% of salt solution (5 mg L^{-1} $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg L^{-1} $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg L^{-1} $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, and 2.0 mg L^{-1} CoCl_2). The nutrient medium was supplemented with sugarcane bagasse according to the experimental conditions described in the next sections.

2.4. Experimental design strategies

Two experimental design approaches were carried out in order to investigate the effect of different operational and environmental conditions on enzyme production: statistical factorial design, followed by analysis of variance (ANOVA), and the one-variable-at-a-time (OVAT) method.

Table 2
Levels of independent variables used in the 2³ factorial design.

Factor	Levels	
Particle size (mm)	(-1) $d_p \leq 0.5$	(+1) $\leq d_p \leq 2.0$
Bagasse	Untreated sugarcane bagasse	Steam explosion pretreated sugarcane bagasse
Cultivation method	Submerged fermentation	Sequential solid-state and submerged fermentation

Where: d_p = characteristic particle diameter.

Table 3
Levels of the independent variables used in the 2² factorial design.

Factor	Levels	
Bagasse	(-1) Untreated sugarcane bagasse	(+1) Steam explosion pretreated sugarcane bagasse
Agitation speed (rpm)	400	700

In the preliminary set of experiments, performed in shake flasks, a 2³ full factorial design was initially used to evaluate the effects of the cultivation method, type of sugarcane bagasse (untreated and steam explosion pretreated), and substrate particle size range on the efficiency of endoglucanase production. For all conditions, experiments were carried out in duplicate, and the values/types of the independent variables and their coded levels were as shown in Table 2. Statsoft (v. 7.0) statistical software was employed to analyze the experimental data, using analysis of variance (ANOVA, 95% confidence level) and the construction of Pareto charts for identification of the factors that significantly affected endoglucanase production. An additional set of experiments using intermediate ($0.5 \leq d_p \leq 1.0$ mm) and larger ($2.0 \leq d_p \leq 2.4$ mm) substrate particle size ranges were also included in this part of the study, in order to further elucidate the effect of this variable on enzyme production.

Due to the operational complexity of the experiments performed in 4 L stirred tank bioreactors, a key set of preliminary experiments were designed using the OVAT approach in order to evaluate the effect of the cultivation method, type of sugarcane bagasse, agitation speed, pH, and particle size range during the cultivations. After this preliminary set of experiments using the STB, a 2² full factorial design was used to investigate the significance of the effects of the type of sugarcane bagasse and agitation speed on enzyme production. The values of the independent variables and their coded levels are given in Table 3. The data were analyzed using the Statsoft (v. 7.0) software, as described above.

2.5. Pre-culture conditions

2.5.1. Pre-culture for submerged fermentation (SmF)

In the conventional submerged fermentation experiments, the pre-culture was initiated with the addition of 10^7 spores per mL of nutrient medium enriched with 30 g L^{-1} of glucose. The incubation was carried out for 50 h in an orbital shaker incubator at 32 °C and 200 rpm. A portion of 10% (v/v) was then transferred to the culture medium in order to initiate enzyme production in a 4 L stirred tank bioreactor or in shake flasks.

2.5.2. Pre-culture for sequential fermentation (SF)

In the sequential fermentation experiments, the pre-culture was initiated as SSF, using sugarcane bagasse as substrate. Untreated (USB) or pretreated sugarcane bagasse (PSB) was used, according to each experimental condition. Portions of 5 g (dry basis) of sugarcane bagasse were added to 500 mL Erlenmeyer flasks, and the moisture content was then adjusted by the addition of 12 mL of nutrient medium. A volume of spore suspension resulting in a concentration of 10^7 spores per gram of dry bagasse was added, and cultivation was maintained as SSF under static conditions for 24 h

at 32 °C. After this period, a volume of nutrient medium enriched with 30 g L^{-1} of glucose was added (equivalent to 200 mL of nutrient medium per 5 g of dry sugarcane bagasse), and the cultivation was continued as SmF in an orbital shaker incubator for 48 h at 32 °C and 200 rpm. Finally, a volume of pre-culture suspension corresponding to 10% (v/v) was transferred to the culture medium to initiate enzyme production in a 4 L stirred tank bioreactor or in shake flasks.

2.5.3. Enzyme production

The culture medium used for endoglucanase and xylanase production was similar to that used for the pre-culture, except that it was supplemented with 10 g L^{-1} of glucose and 1% (w/v) of sugarcane bagasse. The effects of sugarcane bagasse particle size, sugarcane bagasse pretreatment (untreated (USB) and pretreated sugarcane bagasse (PSB)), and cultivation method (conventional submerged and the proposed sequential cultivation method) on enzyme production were first evaluated in shake flask cultures. The results obtained were then validated using stirred bioreactor cultures, in which the effects of agitation and pH were also studied. All experiments were carried out in duplicate, and the data were calculated as means \pm standard deviations.

The shake flask cultivations were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks, with working volumes of 100 mL, at 32 °C and 200 rpm for 72 h. Samples were collected at 24 h intervals, centrifuged at 11,000 rpm for 10 min at 4 °C, and the crude enzymatic extract was used for quantification of endoglucanase activity (CMCase), xylanase activity, and the concentration of reducing sugars. In the bioreactor cultivations, a stirred tank bioreactor with a 4 L working volume (Bioflo IIC, New Brunswick Scientific, USA) was equipped with two 6-blade Rushton turbine impellers, as well as dissolved oxygen and pH probes, as described previously [27]. The cultivations were carried out for 30 h at 400 and 700 rpm, 0.5 vvm, and 32 °C. In cultivations carried out with pH control, the pH was maintained at 5.0 by the addition of 1 mol L^{-1} HCl and 2 mol L^{-1} NaOH solutions. Samples were collected at 6 h intervals and centrifuged at 11,000 rpm for 10 min at 4 °C. The crude enzymatic extracts were then used for quantification of endoglucanase (CMCase) and xylanase activity. The reducing sugars concentration in the cultivation broth was determined in order to monitor fungal growth according to the consumption of glucose and other reducing sugars.

2.5.4. Analytical methods

Endoglucanase activity was assayed according to the standard method proposed by Ghose [28], in the presence of carboxymethyl cellulose (Sigma, USA). Xylanase activity was determined by the method described by Bailey and Poutanen [29], in the presence of oat spelt xylan. One unit of endoglucanase or xylanase activity was

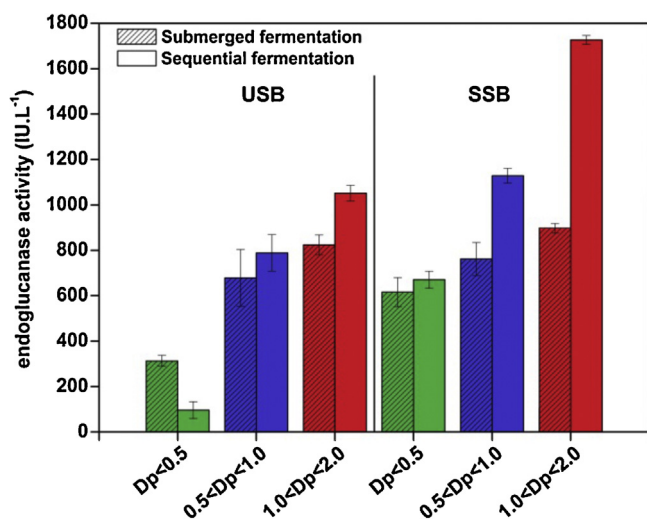


Fig. 1. Endoglucanase production after 72 h of cultivation in shake flasks using untreated sugarcane bagasse (USB) and steam-exploded sugarcane bagasse (PSB) with different particle size ranges (d_p), using the sequential fermentation (SF) or conventional submerged fermentation (SmF) methods. Results are presented as means \pm standard deviations.

defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of reducing sugar per minute, under the assay conditions. The reducing sugar concentrations were determined by the DNS method [30].

3. Results and discussion

In a first step, experiments were designed to evaluate the effects of sugarcane bagasse pretreatment, substrate particle size, and cultivation method on endoglucanase production in Erlenmeyer flask cultivations. In a second step, the effects of agitation speed and cultivation method on (hemi) cellulolytic enzymes production were evaluated in stirred tank bioreactor cultivations. The effects of biomass pretreatment and pH control were then evaluated in STB cultivations. Once the most suitable bioprocess parameters had been selected, the influence of biomass particle size on (hemi) cellulolytic enzymes production was also evaluated in STB cultivations. All experiments were replicated, and the results are presented as means \pm standard deviations.

3.1. Preliminary cultivations in Erlenmeyer flasks: Effect of cultivation method, sugarcane bagasse steam explosion pretreatment, and substrate particle size on enzyme production

The responses for the effects of sugarcane bagasse pretreatment, particle size (d_p), and cultivation method on endoglucanase production are shown in Fig. 1. Cultivations in shake flasks were carried out at 32 °C and 200 rpm, using untreated (USB) and steam explosion pretreated (PSB) sugarcane bagasse, with particle size ranges of $d_p \leq 0.5$ and $1.0 \leq d_p \leq 2.0$. The cultivation methods employed were conventional submerged fermentation (SmF) and the new sequential solid-state and submerged fermentation (SF). The combination of cultivation conditions investigated was planned according to a 2³ factorial design, with all experiments carried out in duplicate (Table 2).

The highest endoglucanase activity ($1727 \pm 19 \text{ IU.L}^{-1}$) in shake flask cultivations was obtained using the SF method with pretreated sugarcane bagasse and a particle size range from 1 to 2 mm, as presented in Fig. 1. After an analysis of variance (ANOVA) at $p \leq 0.05$, it can be seen in the Pareto chart (Fig. 2) that all three evaluated variables had statistically significant effects on endoglucanase production in the shake flask cultivations. As can be

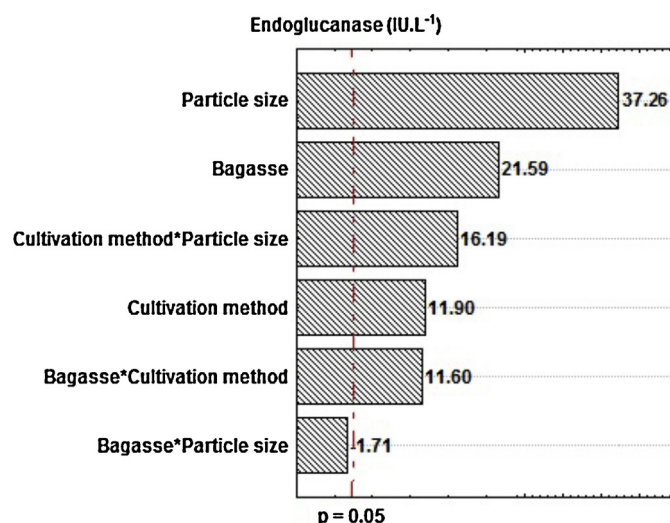


Fig. 2. Pareto chart showing the effects of sugarcane bagasse particle size, steam explosion pretreatment, and cultivation method on endoglucanase production after 72 h of cultivation in shake flasks.

seen, increase of the sugarcane bagasse particle size was the most significant variable for improved enzyme production, followed by the steam explosion pretreatment and the proposed sequential cultivation method.

Given the important effect of the sugarcane bagasse particle size, additional experiments using intermediate ($0.5 \leq d_p \leq 1.0$ mm) and larger ($2.0 \leq d_p \leq 2.4$ mm) particle size ranges were carried out in order to further investigate the effect of this variable, as presented in Fig. 1.

For this set of experiments using shake flask cultivations, it could be concluded that sugarcane bagasse particle sizes smaller than 0.5 mm hindered fungal growth, while increase in particle size up to 2 mm showed a positive effect on endoglucanase production. These results can be explained by the fact that although small particle sizes increase the substrate surface area, hence increasing the interaction between the filamentous fungus and the inducer substrate, reduced particle size can also result in agglomeration of the solid substrate, with consequent oxygen limitation restricting fungal growth [13,31,32]. This well-known important effect of particle size in solid-state fermentations was also shown to be valid in three-phasic cultivations employing different particle sizes of sugarcane bagasse in shake flask cultivations. It was observed that as the sugarcane bagasse particle size was increased up to 2 mm, the solid substrate acted as a suitable support for fungal growth, probably due to increased interaction between the fungus and the inducer substrate and, consequently, increased enzyme production. However, the increase of sugarcane bagasse particle size was not beneficial in cultivations using particle sizes larger than 2 mm, because the intense fungal growth resulted in dense fungus-substrate agglomerates (for both the conventional and the sequential fermentation methods), which compromised the homogeneity of the cultivation broth. Cultivations with particle sizes from 2.0 to 2.4 mm were therefore discarded.

Steam explosion pretreatment resulted in about 64% higher endoglucanase production, compared to cultivations using untreated sugarcane bagasse, in SF cultivations carried out using the $1.0 \leq d_p \leq 2.0$ mm sugarcane bagasse particle size range. This can probably be explained by the higher cellulose content of pretreated sugarcane bagasse, compared to untreated sugarcane bagasse (Table 1). In addition, steam explosion and other pretreatments increase the porosity of lignocellulosic materials by the removal of hemicellulose and/or lignin, rendering the cellulose fraction more accessible to fungi [3,7,33].

The influence of the pretreatment on endoglucanase production was greater for SF than for SmF, which could be explained by the fact that the germination of the fungi during the SF pre-culture occurred under solid-state conditions that provided greater contact between the microorganism and the inducer substrate. A statistically significant interaction between the sugarcane bagasse pretreatment and the cultivation method can be observed in the Pareto chart presented in Fig. 2, where the positive effect of steam explosion pretreatment and the use of the new SF method on endoglucanase production was shown to be significant (ANOVA, $p \leq 0.05$).

In cultivations with $1.0 \leq d_p \leq 2.0$ mm pretreated sugarcane bagasse, the sequential fermentation method increased the production of endoglucanase by up to 92%, compared to conventional submerged fermentation, demonstrating the impact of the pre-culture method on endoglucanase production. The influence of the spore germination environment, as well as the quality and size of inoculum, on the growth patterns of filamentous fungi and on submerged fermentation productivity have been reported previously [34–36].

After evaluation of the impact of sugarcane particle size and pretreatment, and identification of the advantages of the SF method for endoglucanase production in shake flask cultivations, the next step was to validate these results at a larger scale. The following section describes the production of (hemi) cellulolytic enzymes in stirred tank bioreactors (STB).

3.2. Effects of operational conditions in three-phasic STB cultivations

Following observation of the combined effects of the cultivation conditions in shake flasks, both untreated and pretreated sugarcane bagasse were used in three-phasic STB cultivations to further evaluate the influence of cultivation method, agitation speed, pH control, and sugarcane bagasse particle size on (hemi) cellulolytic enzymes production. A preliminary set of experiments were designed using the OVAT approach, due to the complexity of cultivation in the STB. After these preliminary experiments, a 2^2 full factorial design was used to investigate the significance of the effects of the type of sugarcane bagasse and agitation speed on enzyme production.

3.3. Effect of agitation speed and cultivation method on (hemi) cellulolytic enzymes production

The effects of agitation speed (400 and 700 rpm) and cultivation method (SF and SmF) on (hemi) cellulolytic enzymes production in STB cultivations were evaluated using untreated sugarcane bagasse with particles in the size range from 1 to 2 mm. The results (Fig. 3) showed that for SF cultivation, an agitation speed of 400 rpm was more suitable for enzyme production, since no significant fungal growth was observed at 700 rpm. This was evidenced by the dissolved oxygen level in the cultivation medium, which remained stable at about 85% and started to increase after a few hours of cultivation. At a constant agitation rate, this could be caused by low fungal growth and, consequently, low oxygen demand. This possibility was supported by the observed low viscosity of the cultivation broth, as well as by low enzyme production in cultivations conducted with agitation speed of 700 rpm. The negative impact of the higher agitation speed on enzymes production could also have been due to reduced contact between the fungus and the solid substrate. Changes in fungal growth related to the agitation speed were expected, since it is well known that the agitation speed affects mixing, transfer of heat and mass, and the shear stress to which the fungus is exposed, as well as the growth patterns of filamentous fungi and the production of metabolites [35,37,38].

Comparison was made between SmF and SF methods in terms of endoglucanase and xylanase production at the selected agitation

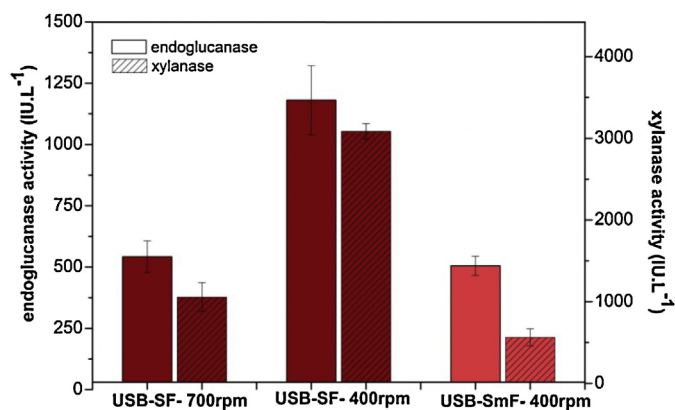


Fig. 3. Endoglucanase and xylanase production after 30 h of cultivation in stirred tank bioreactors using untreated sugarcane bagasse (USB) with $1.0 \leq d_p \leq 2.0$ mm particle size range and agitation speeds of 400 rpm and 700 rpm, using the sequential fermentation (SF) or the conventional submerged fermentation (SmF) methods, at pH 5.0. Results are presented as means \pm standard deviations.

speed (400 rpm). Production of the enzymes was 2.5-fold (endoglucanase) and 5.5-fold (xylanase) higher in SF than in SmF (Fig. 3). In both shake flask and stirred tank bioreactor cultivations, the pre-culture using solid-state fermentation resulted in fungal growth morphology characterized by the presence of dispersed hyphae, while fungal growth in the conventional submerged cultivations showed pellet-type morphology, which could possibly have hindered contact between the fungus and the solid inducer substrate. These results are supported by the findings of previous work carried out using SF and SmF in pneumatic bubble-column bioreactors with untreated sugarcane bagasse [14,15].

A comparison between the results obtained for SF, using untreated sugarcane bagasse with 1 to 2 mm particle size in a stirred tank bioreactor, and those obtained in a previous study carried out by Cunha et al. [15] using a pneumatic bubble column (BC) bioreactor indicated that endoglucanase production occurred at the same level in both types of bioreactor. Values of 1181 ± 141 and 719 ± 85 IU.L⁻¹ were obtained for the STB and BC cultivations, respectively, with corresponding volumetric endoglucanase productivities of 57 ± 13 and 46 ± 3 IU.L⁻¹ h⁻¹, respectively. This should be highlighted as a very positive finding, because as both endoglucanase production and volumetric productivity were similar for the two types of bioreactor, the decision to use STB or BC for cellulase production can be based on the specific operational advantages of each type of bioreactor. While pneumatic bioreactors present the advantages of low power consumption and simple design and operation, stirred tank bioreactors are currently used for industrial enzyme production, due to the existence of well-developed control and monitoring systems, together with simple scale-up. For this reason, the STB bioreactor configuration was chosen to evaluate the effects of bioprocess operational variables in further studies of three-phasic cultivations with sugarcane bagasse.

3.4. Effect of biomass pretreatment, agitation speed, and pH control on (hemi) cellulolytic enzymes production

After selection of the sequential fermentation method (SF) as a potential alternative for enzymes production using sugarcane bagasse in a stirred tank bioreactor, the next step was to evaluate the effects of agitation speed (400 or 700 rpm) and pH control on enzymes production using the steam-exploded pretreated sugarcane bagasse (PSB) as inducer (Fig. 4).

An interesting finding was that in cultivations using pretreated sugarcane bagasse, higher endoglucanase and xylanase production occurred for an agitation speed of 700 rpm (Fig. 4), instead of the

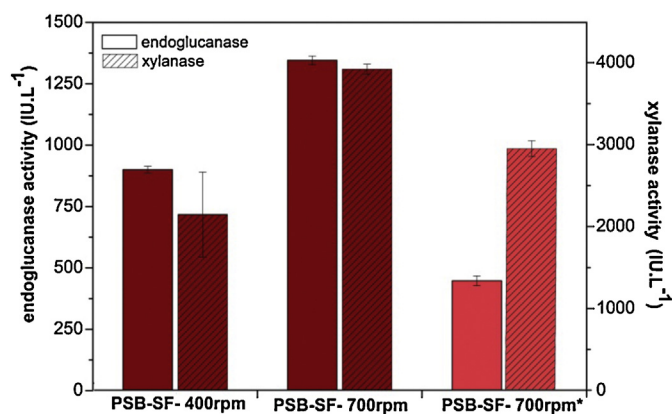


Fig. 4. Endoglucanase and xylanase production after 30 h of cultivation in stirred tank bioreactors using pretreated sugarcane bagasse (PSB) with $1.0 \leq d_p \leq 2.0$ mm particle size range and agitation speeds of 400 rpm and 700 rpm, at pH 5.0. The symbol * indicates a cultivation carried out without pH control. Results are presented as means \pm standard deviations.

400 rpm found for cultivations with untreated sugarcane bagasse (Fig. 3). It can be concluded that a relationship exists between the characteristics of the biomass and the ideal agitation speed for fungal growth, depending on the biomass type used as inducer and carbon source. This can be explained by faster fungal growth in cultivations using pretreated sugarcane bagasse, where the substrate was more accessible to the fungus, which increased the viscosity of the cultivation broth. Consequently, both homogeneity and mass transfer were adversely affected in the cultures performed using the lower agitation speed (400 rpm).

In order to further support these findings, the different cultivation conditions were also analyzed according to a 2^2 factorial design (Table 3) followed by analysis of variance (ANOVA, $p \leq 0.05$). The Pareto chart (Fig. 5) shows the effects of agitation and sugarcane bagasse pretreatment on endoglucanase production. It can be seen that there was a statistically significant interaction between the factors, and a positive effect of the use of pretreated sugarcane bagasse at higher agitation speed. These findings have important implications for the development of three-phasic cultivations with lignocellulosic materials, because it has been demonstrated here that the agitation speed must be evaluated for each type of substrate employed in the bioprocess.

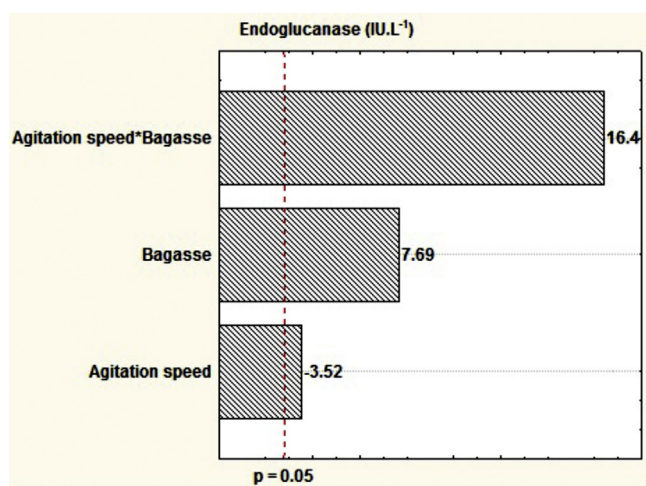


Fig. 5. Pareto chart showing the effects of sugarcane bagasse steam explosion pretreatment and agitation speed on endoglucanase production after 30 h of cultivation in a stirred tank bioreactor.

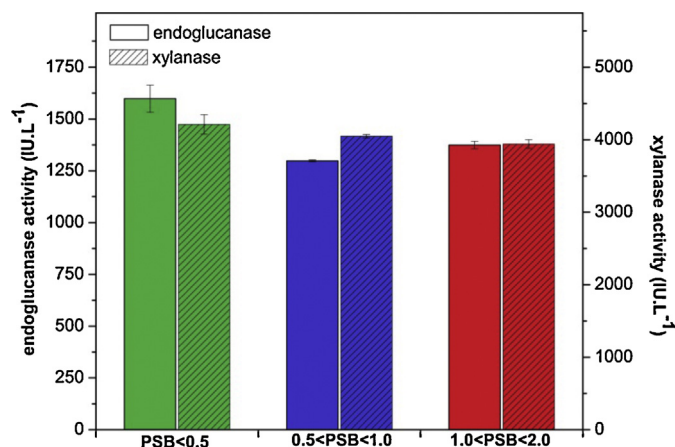


Fig. 6. Endoglucanase and xylanase production after 30 h of stirred tank bioreactor cultivation using steam-exploded sugarcane bagasse (PSB) with different particle size ranges, employing the sequential fermentation (SF) method, at pH 5.0. Results are presented as means \pm standard deviations.

Experiments were carried out without pH control in order to determine the effect of using simplified conditions that avoided the costs of the process control procedures required to maintain the cultivation pH at 5.0. It was observed that fungal growth in an environment without pH control resulted in a decrease in pH from 5.0 to 2.3 after 24 h of cultivation, due to the production of organic acids by the fungus. Although *A. niger* strains are known to be able to grow at low pH, this cultivation condition was not favorable for enzyme production. Decreases of around 2.9 and 1.3-fold were observed for endoglucanase and xylanase production, respectively, compared to cultivations performed at controlled pH 5.0.

Among the conditions evaluated in the present work, using sugarcane bagasse particle sizes from 1 to 2 mm, it could be concluded that the higher enzyme production was obtained using the SF method for fermentation of pretreated sugarcane bagasse (PSB), an agitation speed of 700 rpm, and pH 5.0. This resulted in 1374 ± 18 and 3940 ± 61 IU L⁻¹ of endoglucanase and xylanase, respectively. After the selection of the cultivation parameters, the next step was to evaluate the effect of sugarcane bagasse particle size on (hemi) cellulolytic enzymes production, because this variable had shown a strong effect in the preliminary study using shake flask cultivations.

3.5. Effect of sugarcane bagasse particle size on (hemi) cellulolytic enzymes production

The influence of particle size on endoglucanase and xylanase production was evaluated using pretreated sugarcane bagasse and the operating conditions selected in the previous steps: the sequential solid-state and submerged fermentation method (SF), agitation at 700 rpm, and pH fixed at 5.0. The particle diameter (d_p) ranges evaluated were $d_p \leq 0.5$, $0.5 \leq d_p \leq 1.0$, and $1.0 \leq d_p \leq 2.0$ mm (Fig. 6).

An interesting finding was that while an increase in particle size supported better fungal growth in shake flasks, smaller particles ($d_p \leq 0.5$) were advantageous in the stirred tank bioreactors because they provided greater system homogeneity. However, the production of xylanase was less affected by substrate particle size, and was higher for cultivations using particle size ranges of $d_p \leq 0.5$ and $0.5 \leq d_p \leq 1.0$ mm. This could be explained by the fact that the hemicellulose fraction is more easily accessed by the fungus during cultivation, compared to the cellulose fraction, because the hemicellulose surrounds the cellulose fibrils and may be partially soluble in the liquid medium. The hemicellulose is thermo-sensitive and consists of short and heterogeneous polymers that can be easily degraded [4]. The effects of agitation speed and sugarcane bagasse

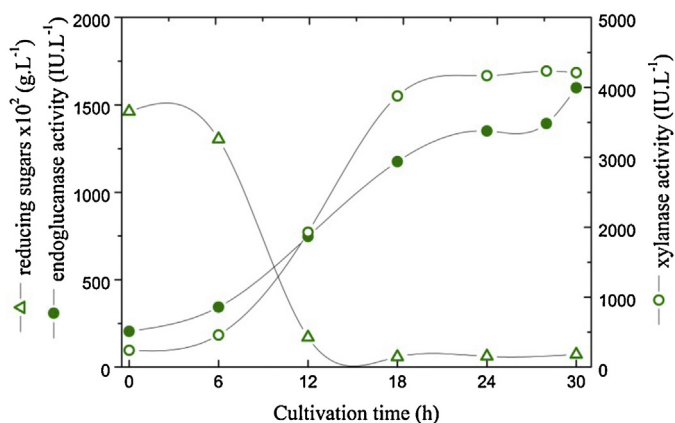


Fig. 7. Endoglucanase activity, xylanase activity, and reducing sugars concentration, as a function of time, for sequential fermentations in stirred tank bioreactors using pretreated sugarcane bagasse with particle size range smaller than 0.5 mm. Conditions: 32 °C; pH 5.0; 700 rpm agitation; 0.5 vvm aeration.

type on xylanase production in the different cultivations were also analyzed, and both variables showed effects similar to those observed for endoglucanase production (Fig. 5), with a statistically significant interaction between them (data not shown).

The bioprocess operating parameters and substrate type that resulted in highest (hemi) cellulolytic enzymes production by *A. niger* A12 were: sequential fermentation (method SF) using pretreated sugarcane bagasse (PSB) with particle size range smaller than 0.5 mm, an agitation speed of 700 rpm, and pH fixed at 5.0. The profiles obtained for enzyme production and reducing sugars consumption during cultivations under these conditions are shown in Fig. 7. It can be seen that there was a rapid decrease in the reducing sugars concentration, which was related to a rapid rate of glucose uptake at the beginning of the cultivation. The production of endoglucanase and xylanase started immediately following glucose exhaustion, which occurred after approximately 12 h of cultivation. This was expected, because the fungus began to assimilate the sugarcane bagasse as inducer substrate after the exhaustion of glucose, as also described by Cunha et al. [15]. The production of xylanase was more pronounced than that of endoglucanase, and stabilized after 18 h of cultivation, whereas endoglucanase production increased up to 30 h of cultivation. The highest total endoglucanase and xylanase productions, of 1599 ± 66 and 4212 ± 133 IU L⁻¹, respectively, were obtained after 30 h of cultivation. A comparison between production of endoglucanase in the shake flasks and in the STB bioreactor showed that although the titers were similar for both cultivation systems, the volumetric endoglucanase productivity was up to 2.2-fold higher in the STB cultivations, with values of 23.99 and 53.30 IU L⁻¹ h for the shake flasks and the STB bioreactor, respectively.

From the results described above, it could be concluded that use of the sequential cultivation method and sugarcane bagasse pretreatment improved the production of (hemi) cellulolytic enzymes in both shake flasks and a stirred tank bioreactor. In addition, pH control was essential for increasing endoglucanase production titers, while smaller substrate particle sizes provided better homogeneity during STB cultivations and consequently helped to increase enzyme production. The combined effects of agitation and substrate pretreatment can significantly impact the production of (hemi) cellulolytic enzymes, and should be considered during bioprocess engineering development.

4. Conclusions

Endoglucanase production in shake flasks was affected by the cultivation method, with highest production achieved using the

sequential fermentation method employing pretreated sugarcane bagasse with particle sizes up to 2 mm. In cultivations using a stirred tank bioreactor, the combined effects of biomass pretreatment and agitation conditions were shown to have a strong impact on (hemi) cellulolytic enzymes production, and the advantages of the SF method and biomass pretreatment were validated. Higher enzyme production was achieved with pH control, and smaller substrate particle sizes increased the homogeneity of three-phasic STB systems, which favored endoglucanase production. These findings concerning the effects of different operational variables and cultivation methods on (hemi) cellulolytic enzymes production in a stirred tank bioreactor should contribute to the development of three-phasic cultivation systems employing different types of lignocellulosic biomass in bioreactors.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, Process no. 2008/56246-0 and 2011/23807-1), the Brazilian Higher Education Foundation (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Embrapa. The authors would also like to thank Gabriela de Sá Azarias for technical assistance during the cultivation experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.004>.

References

- [1] S. Macrelli, M. Galbe, O. Wallberg, Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock, *Biotechnol. Biofuels* 7 (2014) 26–41.
- [2] D. Klein-Marcuschamer, P. Oleskowicz-Popiel, B.A. Simmons, H.W. Blanch, The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1083–1087.
- [3] J.S. Van Dyk, B.I. Pletschke, A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion, and synergy, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1458–1480.
- [4] V.B. Agbor, N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, D.B. Levin, Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 675–685.
- [5] A. Limayem, S.C. Ricke, Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives: potential issues and future prospects, *Prog. Energy Combust. Sci.* 38 (2012) 449–467.
- [6] M.C.A. Wanderley, C. Martin, G.J. de Moraes Rocha, E.R. Gouveia, Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 128 (2013) 448–453.
- [7] C.E. Wyman, V. Balan, B.E. Dale, R.T. Elander, M. Falls, B. Hames, M.T. Holtzapfle, M.R. Ladisch, Y.Y. Lee, N. Mosier, V.R. Pallapolu, J. Shi, S.R. Thomas, R.E. Warner, Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 11052–11062.
- [8] S.J. Horn, G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng, V.G.H. Eijsink, Novel enzymes for the degradation of cellulose, *Biotechnol. Biofuels* 5 (2012) 45–56.
- [9] E.A. Znameroski, N.L. Glass, Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction, *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013) 6–12.
- [10] W.R. de Souza, P.F. de Gouveia, M. Savoldi, I. Malavazi, L.A. de Souza Bernardes, M.H.S. Goldman, R.P. de Vries, J.V. de Castro Oliveira, G.H. Goldman, Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse, *Biotechnol. Biofuels* 4 (2011) 40–56.
- [11] L. Ries, S.T. Pullan, S. Delmas, S. Malla, M.J. Blythe, D.B. Archer, Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*, *BMC Genomics* 14 (2013) 541–552.
- [12] U.F. Rodriguez-Zuniga, S. Couri, V.B. Neto, S. Crestana, C.S. Farinas, Integrated strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse, *Bioenergy. Res.* 6 (2013) 142–152.
- [13] J. Barrios-Gonzalez, Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications, *Process. Biochem.* 47 (2012) 175–185.

- [14] F.M. Cunha, A. Bacchin, A. Horta, T.C. Zangirolami, A.C. Badino, C.S. Farinas, Indirect method for quantification of cellular biomass in a solids-containing medium used as pre-culture for cellulase production, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17 (2012) 100–108.
- [15] F.M. Cunha, M.N. Esperanca, T.C. Zangirolami, A.C. Badino, C.S. Farinas, Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase, *Bioresour. Technol.* 112 (2012) 270–274.
- [16] S.S. Thomasi, M.O. Cerri, A.C. Badino, Average shear rate in three pneumatic bioreactors, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33 (2010) 979–988.
- [17] A. Ahamed, P. Vermette, Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 379–387.
- [18] P.D. Delabona, C.S. Farinas, M.R. da Silva, S.F. Azzoni, J.G.D. Pradella, Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 517–521.
- [19] M. Michelin, A.M.D. Mota, M. Polizeli, D.P. da Silva, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, Influence of volumetric oxygen transfer coefficient ($k_L a$) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 80 (2013) 19–26.
- [20] M. Papagianni, S.E. Nokes, K. Filer, Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance, *Food Technol. Biotechnol.* 39 (2001) 319–326.
- [21] I. Membrillo, C. Sanchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera, Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 7842–7847.
- [22] C.G. Schmidt, E.B. Furlong, Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*, *Bioresour. Technol.* 123 (2012) 36–41.
- [23] U.F. Rodriguez-Zuniga, C.S. Farinas, V.B. Neto, S. Crestana, *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation, *Pesqui. Agropec. Bras.* 46 (2011) 912–919.
- [24] F.M. Cunha, T. Kreke, A.C. Badino, C.S. Farinas, E. Ximenes, M.R. Ladisch, Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production, *Bioresour. Technol.* 272 (2014) 249–252.
- [25] S. Couri, A.X. deFarias, Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes, *Rev. Microbiol.* 26 (1995) 314–317.
- [26] M. Mandels, D. Sternberg, Recent advances in cellulase technology, *J. Ferment. Technol.* 54 (1976) 267–286.
- [27] M.C.C. Bustamante, M.O. Cerri, A.C. Badino, Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers, *Chem. Eng. Sci.* 90 (2013) 92–100.
- [28] T.K. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 257–268.
- [29] M.J. Bailey, K. Poutanen, Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 (1989) 5–10.
- [30] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [31] M.N. Esperanca, F.M. Cunha, M.O. Cerri, T.C. Zangirolami, C.S. Farinas, A.C. Badino, Gas hold-up and oxygen mass transfer in three pneumatic bioreactors operating with sugarcane bagasse suspensions, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 37 (2014) 805–812.
- [32] A. Pandey, P. Selvakumar, C.R. Soccol, P. Nigam, Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Curr. Sci.* 77 (1999) 149–162.
- [33] Y. Sun, J.Y. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* 83 (2002) 1–11.
- [34] L. Yu, Y. Chao, P. Wensel, S. Chen, Hydrodynamic and kinetic study of cellulase production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1755–1768.
- [35] J.C. Gabelle, E. Jourdir, R.B. Licht, F. Ben Chaabane, I. Henaut, J. Morchain, F. Augier, Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors, *Chem. Eng. Sci.* 75 (2012) 408–417.
- [36] M. Bizukojc, S. Ledakowicz, A kinetic model to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture, *Process. Biochem.* 41 (2006) 1063–1071.
- [37] P.J. Lin, A. Scholz, R. Krull, Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 213–220.
- [38] M. Papagianni, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, *Biotechnol. Adv.* 22 (2004) 189–259.

Apêndice B

Artigo: "Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production"



Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production



F.M. Cunha^{a,b,c}, T. Kreke^a, A.C. Badino^b, C.S. Farinas^{b,c}, E. Ximenes^a, M.R. Ladisch^{a,*}

^a Laboratory of Renewable Resources Engineering and Department of Agricultural and Biological Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA

^b Graduate Program of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, C.P. 676, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

^c Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Submerged fermentation is made possible by liquefaction of biomass.
- Liquefaction gives a flowable slurry.
- Liquefied biomass is an effective fermentation media.
- Liquefied slurry gives 15× higher endoglucanase activity.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2014

Received in revised form 2 September 2014

Accepted 4 September 2014

Available online 16 September 2014

Keywords:

Liquefaction

Sugarcane bagasse

Cellulase production

Fermentation

Aspergillus niger

ABSTRACT

The objective of this paper is to report liquefaction of pretreated and sterilized sugarcane bagasse for enhancing endoglucanase production through submerged fermentation by *Aspergillus niger*. After initial solid state fermentation of steam pretreated bagasse solids by *A. niger*, fed-batch addition of the substrate to cellulase in buffer over a 12 h period, followed by 36 h reaction, resulted in a liquid slurry with a viscosity of 0.30 ± 0.07 Pa s at 30% (w/v) solids. Addition of *A. niger* for submerged fermentation of sterile liquefied bagasse at 23% w/v solids resulted in an enzyme titer of 2.5 IU mL⁻¹ or about 15× higher productivity than solid-state fermentation of non-liquefied bagasse (final activity of 0.17 IU mL⁻¹). Bagasse not treated by initial solid-state fermentation but liquefied with enzyme gave 2 IU mL⁻¹. These results show the utility of liquefied bagasse as a culture medium for enzyme production in submerged fermentations.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The industrial competitiveness of the 2G (cellulose) ethanol depends on achieving efficient production and use of cellulase enzymes. Cellulase production by filamentous fungi may be achieved through either solid-state fermentation (SSF) or submerged fermentation (SmF). Despite many advantages of SSF over SmF, enzyme production in large-scale SSF bioreactors is hindered by low solids loadings, or if high solids are used, by solids handling and mass and heat transfer gradients during the cultivation process (Barrios-Gonzalez, 2012; Cunha et al., 2012; Esperança et al., 2014). Submerged cultivations with high solids loadings remain challenging since mass transfer and gas hold-up limitations are

also compounded by viscosity increases that occur during the first hours of cultivation as a result of fungal growth.

Effects of the total solids loading on rheological behavior of cellulosic and lignocellulosic suspensions with the aim of improving the enzymatic hydrolysis of cellulose have been reported (Du et al., 2014; Jorgensen et al., 2007; Stickel et al., 2009). Rheological properties of sugarcane bagasse, specifically, were studied by Geddes et al. (2013) and Caldas Pereira et al. (2011), who demonstrated that a small amount of enzyme is able to decrease the viscosity of pretreated sugarcane bagasse slurries with improvements in hydrolysis coinciding with improved flow properties. Esperança et al. (2014) described hydrodynamic effects of carrying out microbial fermentation in a pneumatic bioreactor system at solids contents between 3% and 20% w/v. The current paper reports enzymatic and microbial liquefaction of steam exploded sugarcane bagasse in a fed-batch system followed by endoglucanase production at high solids loading by an *Aspergillus niger* wild type strain isolated from the Brazilian biome.

* Corresponding author. Tel.: +1 765 494 7022; fax: +1 765 494 7023.

E-mail address: ladisch@purdue.edu (M.R. Ladisch).

2. Methods

2.1. Material

The inducer substrate for endoglucanase production was steam exploded sugarcane bagasse (particle size of 1 to 2 mm) kindly donated by the Sugarcane Research Center (CTC, Brazil). The steam explosion was conducted at 1667 kPa and 205 °C for 20 min. Composition of the pretreated bagasse, determined by standard NREL protocol (Sluiter et al., 2008) was 71% (w/w) glucan, 0.5% pentosan, 27.8% lignin and 3% ash. Sugarcane bagasse, before pretreatment, has a composition of 39% cellulose (glucan), 27.7 pentosans (including acetyl), 24.8% lignin, 3.9% ash, and 5.7% extractives (Ladisch et al., 2013).

2.2. Microorganism

A. niger wild type A12 strain, from Embrapa Food Technology collection (Rio de Janeiro, Brazil), isolated from black pepper (Couri and deFarias, 1995) and maintained at –18 °C in a 20% (w/w) glycerol/water solution, was activated in potato dextrose agar medium slants for 4 days at 32 °C. The spores were suspended by adding 0.3% Tween 80 (v/v) to the slants and their concentration was determined by counting in a Neubauer chamber.

2.3. Nutrient medium

Mandels nutrient medium was adapted from Mandels and Sternberg (1976) according to Cunha et al. (2012) and contained (w/v): 0.14% (NH₄)₂SO₄, 0.20% KH₂PO₄, 0.03% CaCl₂, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.50% peptone, 0.20% yeast extract, 0.03% urea, 0.10% Tween 80 and 0.10% of salt solution (5 mg/L FeSO₄·7H₂O, 1.6 mg/L, MnSO₄·H₂O, 1.4 mg/L ZnSO₄·7H₂O, and 2.0 mg/L CoCl₂).

2.4. Solid state fermentation

The solid-state fermentation (SSF) cultivations were carried out for 72 h at static conditions and 32 °C in 250 mL Erlenmeyer flasks containing the steam exploded sugarcane bagasse to which 12 mL nutrient medium per 5 g bagasse (dry weight basis) was added. Enzymes were extracted at 35 °C by adding fermented solids at 1:10 (w/v) 50 mM sodium citrate buffer pH 4.8 and agitating at 120 rpm for 40 min. The extracts were vacuum filtered using Whatman glass microfiber filters and kept frozen at –20 °C until analysis. Runs were carried out in triplicate.

2.5. Liquefaction of sugarcane bagasse

Endoglucanase C, (Genencor Division of Danisco, Rochester, NY), 25 mL enzyme in 70 mL buffer was loaded into a 250 mL Erlenmeyer flask that was capped with a stopper. Pretreated bagasse was added in 4 g increments (dry weight basis) at 0, 1, 2, 3, 6, and 9 h with an additional 6 g at 12 h until the solids concentration was 30% w/v in 100 mL of 50 mM sodium citrate buffer, pH 4.8. Agitation was at 290 rpm in a bench top mixer (IKA, Wilmington, DE) for 24 or 48 h at either 32 °C or 50 °C. Bagasse treated for 12 h in a solid state fermentation was also liquefied using the same procedure.

2.6. Submerged fermentation with liquefied sugarcane bagasse

After the liquefaction, the slurry was sterilized at 121 °C for 30 min. Modified Mandels nutrient medium (Section 2.3) was added and the fungus *A. niger* A12 was inoculated at 10⁷ spores per gram of dry biomass. Final solids concentration was 23% (w/v). The liquefied biomass was then fermented at 32 °C and

250 rpm for 72 h in an orbital shaker incubator (New Brunswick Innova 144). After fermentation, the remaining slurry was vacuum filtered using Whatman glass microfiber filters and kept frozen for analytical assays. Runs were carried out in triplicate.

2.7. Rheological measurements

Viscosity (μ_{app}) of the slurries was measured at 50 °C shear rates of 0.1 to 100 s⁻¹ in a model AR-G2 rheometer (TA Instruments, USA) using a starch pasting impeller and cup geometry.

2.8. Analytical assay

Endoglucanase activity was measured with 1% (w/v) carboxymethyl cellulose in 50 mM sodium citrate buffer pH 4.8 (IUPAC, Ghose, 1987). One unit of endoglucanase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of reducing sugar per min, using the DNS method.

3. Results and discussion

3.1. Liquefaction of sugarcane bagasse

The first liquefaction experiments used 30% solids, all added at $t = 0$. After 24 h of reaction, the stiffness of the sugarcane bagasse slurry was still so high that the measurement of the apparent viscosity was not possible. When the pretreated and fermented solids were added in a fed batch manner, the high initial enzyme to substrate ratio during the first hours of reaction allowed greater mixing and mass transfer. Bagasse in subsequent 4 g increments was added to a liquid slurry, thereby enabling mixing and mass transfer as the solids concentration increased and enzyme/solids ratio decreased over time. This approach was analogous to that of Rosgaard et al. (2007) for rice straw.

The resulting bagasse slurries showed non-Newtonian shear-thinning behavior. This is consistent with corn stover and 10% (w/v) sugarcane bagasse slurries (Du et al., 2014; Stickel et al., 2009; Caldas Pereira et al., 2011). The reduced viscosities are believed to reflect changes in structures of long-chain molecules and rearrangement of fibrous particles (Caldas Pereira et al., 2011; Du et al., 2014).

Liquefaction at 50 °C, which is optimal for enzyme activity, was compared to 32 °C which is suitable for *A. niger* A12 growth. The enzyme reaction results in a shear-thinning bagasse slurry (Fig. 1). *A. niger* growth caused additional production of enzyme due to the microorganism that was carried over from the solid state fermentation. The resulting slurry had an apparent viscosity of 0.87 Pa s at 100 s⁻¹ shear rate. Slopes of the data sets were similar at 24 and 48 h for both enzyme and combined microbial and enzyme liquefaction, respectively. However, after 24 h. of reaction time, the viscosity was still too high for an efficient fermentation (upper curve in Fig. 1). A longer reaction time (48 h) decreased viscosity further (lower curve in Fig. 1).

The viscosity profiles are similar at both 32 and 50 °C, although enzyme stability is 4× higher at 32 °C than at 50 °C. Overall, the preferred conditions are a total liquefaction time of 48 h at 32 °C for bagasse that is treated through a combination of 12 h solid state fermentation and 36 h enzyme assisted liquefaction. The final apparent viscosity is 0.30 Pa s at 100 s⁻¹ shear rate (Fig. 1). Liquefaction using bagasse treated with enzyme, only, corresponded to 0.48 Pa s at 100 s⁻¹ shear rate.

3.2. Endoglucanase production using liquefied sugarcane bagasse

Endoglucanase production by submerged fermentation at 32 °C for 72 h using sugarcane bagasse, liquefied either in the absence or

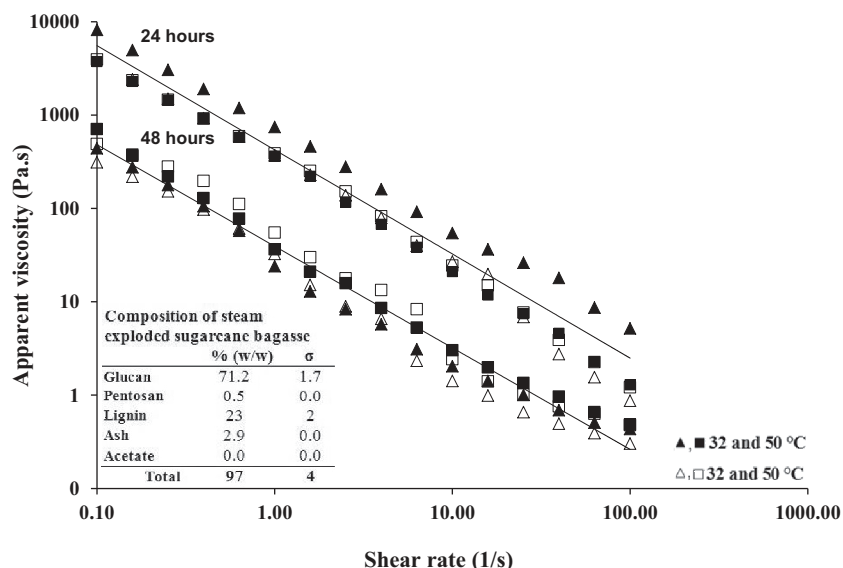


Fig. 1. Change in viscosity (η) as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$) after 24 and 48 h incubation with 301 IU endoglucanase per gram of dry bagasse. (\blacktriangle , \blacksquare) Enzyme liquefaction at 32 and 50 °C or (\triangle , \square) enzyme combined with microbial liquefaction; -trend lines. $\log \eta = c + A \log \dot{\gamma}$. $A_{24h} = -0.660$, $A_{48h} = -0.692$. Viscosity at $t = 0$ was not measurable due to solid characteristics of bagasse at 300 g/L. Initial composition of all samples as indicated in table (analysis by NREL standard procedure (Suiter et al., 2008)).

presence of *A. Niger* A12 corresponded to 2 to 2.5 IU mL⁻¹. Fermentation after liquefaction of this material resulted in endoglucanase activity of up to 15-fold higher than solid-state fermentation, with enzyme activities of 2.5 ± 0.3 IU mL⁻¹ and 0.17 ± 0.3 IU mL⁻¹ obtained in submerged and solid state cultivations, respectively.

The presence of *A. niger* A12 during liquefaction resulted in 22% higher endoglucanase titers compared to liquefaction in the absence of the fungus where endoglucanase titers were 2 IU mL⁻¹. In comparison, endoglucanase production on untreated bagasse obtained in this study was on the same order of that obtained by Delabona et al. (2012) after 96 h of solid-state fermentation of untreated sugarcane bagasse by an *A. fumigatus* strain isolated from the Amazon forest. Delabona's organism gave 0.167 IU mL⁻¹ endoglucanase production after 96 h of solid-state fermentation.

Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse followed by additional substrate washing with distilled water gave an enzyme yield of 0.75 IU mL⁻¹ which was higher than the 0.167 IU mL⁻¹ for untreated substrate of Delabona et al. (2012) and Rodriguez-Zuniga et al. (2014). Liquid hot water pretreatment cooks the lignocellulose in hot, pressurized water causing release of inhibitors into the water (Kim et al., 2013a,b). In this case, removal of microbial and enzyme inhibitors (for instance phenolic compounds) by washing may help to achieve both higher enzyme activity and enzyme production (Ximenes et al., 2010, 2011).

This study has demonstrated, for the first time, the potential application of enzyme production after liquefaction of sugarcane bagasse in order to obtain high lignocellulose concentrations. High solids loading in large-scale cultivations combine the advantages of high enzyme productivity for solid-state fermentation and the scalability of submerged fermentation.

4. Conclusions

Enzyme catalyzed liquefaction of sugarcane bagasse enables submerged fermentation of *A. niger* and production of endoglucanase at a 12-fold higher yield than solid state fermentation. When a combined enzymatic and biological liquefaction promoted by *A. niger* A12 is used, the viscosity of 0.30 ± 0.07 Pa s is lower than bagasse liquefied using enzyme alone (0.48 ± 0.08 Pa s, at 100 s⁻¹ shear rate). A 15-fold higher yield of endoglucanase is observed

when using bagasse, processed through combined enzymatic and biological liquefaction, as culture medium in submerged fermentation.

Acknowledgements

This research was supported by CAPES Foundation Scholarship Proc. 12470-12-0. Support was also provided by USDA Purdue University Agricultural Research Programs Hatch Projects 10677, 10646. The authors would like to thank to São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) - Proc. 2011/23807-1, Department of Agricultural and Biological Engineering at Purdue University, Dr. Abigail Engelberth and Daehwan Kim for review of this manuscript, and to Dr. Osvaldo H. Campanella at Purdue University, for assistance in measurement of viscosities.

References

- Barrios-Gonzalez, J., 2012. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochem.* 47, 175–185.
- Caldas Pereira, L.T., Sobral Teixeira, R.S., da Silva Bon, E.P., Freitas, S.P., 2011. Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: rheological data as criteria for impeller selection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 901–907.
- Couri, S., Defarias, A.X., 1995. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Rev. Microbiol.* 26, 314–317.
- Cunha, F.M., Esperança, M.N., Zangirolami, T.C., Badino, A.C., Farinas, C.S., 2012. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. *Bioresour. Technol.* 112, 270–274.
- Delabona, P.D., Pirota, R., Codima, C.A., Tremacoldi, C.R., Rodriguez, A., Farinas, C.S., 2012. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass Bioenergy* 37, 243–250.
- Du, J., Zhang, F., Li, Y., Zhang, H., Liang, J., Zheng, H., Huang, H., 2014. Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 173–181.
- Esperança, M.N., Cunha, F.M., Cerri, M.O., Zangirolami, T.C., Farinas, C.S., Badino, A.C., 2014. Gas hold-up and oxygen mass transfer in three pneumatic bioreactors operating with sugarcane bagasse suspensions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 805–812.
- Geddes, C.C., Mullinnix, M.T., Nieves, I.U., Hoffman, R.W., Sagues, W.J., York, S.W., Shanmugam, K.T., Erickson, J.E., Vermerris, W.E., Ingram, L.O., 2013. Seed train development for the fermentation of bagasse from sweet sorghum and sugarcane using a simplified fermentation process. *Bioresour. Technol.* 128, 716–724.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.

- Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 862–870.
- Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N., Ladisch, M., 2013a. Severity factor coefficients for subcritical liquid hot water pretreatment of hardwood chips. *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2), 254–263. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25009>.
- Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2013b. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresour. Technol.* 135, 30–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.130>.
- Ladisch, M.R., Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N.S., 2013. Biomass chemistry. In: Behrens, M., Dayte, A.K. (Eds.), *Catalysis for the Conversion of Biomass and its Derivatives*. Max Planck Research Library, Berlin, pp. 131–164.
- Mandels, M., Sternberg, D., 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* 54, 267–286.
- Rodríguez-Zuniga, U.F., Neto, V.B., Couri, S., Crestana, S., Farinas, C.S., 2014. Use of spectroscopic and imaging techniques to evaluate pretreated sugarcane bagasse as a substrate for cellulase production under solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (5), 2348–2362.
- Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., Meyer, A.S., 2007. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 27–40.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of Ash in Biomass and Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA.
- Stickel, J.J., Knutsen, J.S., Liberatore, M.W., Luu, W., Bousfield, D.W., Klingenberg, D.J., Scott, C.T., Root, T.W., Ehrhardt, M.R., Monz, T.O., 2009. Rheology measurements of a biomass slurry: an inter-laboratory study. *Rheol. Acta* 48, 1005–1015.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 54–60.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 170–176.