

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS PELO COCULTIVO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E
APLICAÇÃO DO MEIO INTEGRAL NA SACARIFICAÇÃO DA
BIOMASSA PARA OBTENÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

Larissa Maehara

Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de São
Carlos

Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Coorientador: Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M184p Maehara, Larissa
Produção de enzimas pelo cocultivo de fungos filamentosos por fermentação em estado sólido e aplicação do meio integral na sacarificação da biomassa para obtenção de etanol celulósico / Larissa Maehara. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
104 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Fermentação em estado sólido (FES). 3. Fungos filamentosos. 4. Hidrólise enzimática. 5. Fermentação alcoólica. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LARISSA MAEHARA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 01 DE MARÇO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Cristiane Sanchez Farinas
Orientadora, EMBRAPA



Adilson José da Silva
Coorientador, UFSCar



Fernanda Marisa da Cunha
EMBRAPA



Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá. ”

Ayrton Senna da Silva

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos concedidas em toda a minha vida, principalmente nesses dois anos de mestrado, com muito estudo e trabalho e a Nossa Senhora Aparecida, por me atender em todos os momentos de dificuldade;

À minha família que todos os dias me faz entender o sentido verdadeiro da palavra *amor*: meus pais Paulo e Elisa, que apesar da distância sempre estão me incentivando, apoiando e acreditando em meu sucesso, ao meu irmão William, por sempre me fazer rir, me acalmar e me fazer companhia nos momentos mais difíceis. Minha tia Tsuya, pelo amor, carinho, amizade e principalmente por ser minha segunda mãe e me aconselhar sempre;

Aos meus orientadores, Dra. Cristiane e Dr. Adilson, pelo apoio, pela orientação, compreensão, dedicação e paciência durante a elaboração deste trabalho;

À minha colaboradora e amiga, Dra. Sandra, pelo apoio, paciência e torcida pelo meu sucesso, em especial, pela amizade, por me incentivar a fazer o mestrado e por estar ao meu lado nos momentos decisivos, sempre disposta a compartilhar as alegrias, tristezas e conhecimento, me proporcionando segurança em todos os momentos, sempre;

Ao Michael, meu namorado e grande companheiro, pela paciência, pelo amor e carinho e pelo apoio incondicional;

Às minhas amigas queridas Thalita e Camila pela grande amizade e companheirismo, por estarem sempre presentes nos momentos difíceis e compartilharem comigo alegrias e tristezas;

Aos colegas de laboratório pela paciência e companheirismo.

À UFSCar, à Pós-graduação em Engenharia Química e à Embrapa pelo auxílio e contribuição à minha formação;

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro;

Aos professores que me proporcionaram ao longo desses anos todo o conhecimento e contribuíram de maneira indireta para que este trabalho fosse desenvolvido;

A todos que contribuíram para a realização de mais essa etapa na minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

A utilização de um bioprocesso consolidado simplificado para a conversão de biomassa usando enzimas produzidas *in-house* (integrada ao processo de conversão da biomassa lignocelulósica) pode possibilitar incrementos significativos na produção de bioetanol, sem a necessidade de expansão da área cultivada. Com esta motivação, o presente trabalho teve como objetivo o estudo das etapas de produção de (hemi)celulases por fermentação em estado sólido (FES) e a utilização do meio fermentado integral (MFI) para sacarificação da biomassa e posterior fermentação alcoólica, dentro do contexto de um bioprocesso consolidado para a produção de etanol 2G. Para este fim, primeiramente, foi estudada a seleção das condições de cultivo para a produção de enzimas usando diretamente o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) como substrato da FES. Assim, diferentes fungos foram cultivados de forma isolada e em cocultivo, incluindo o estudo de farelo de trigo e lactose como indutores na produção de enzimas. Para otimizar a etapa de hidrólise enzimática (HE) com o MFI da FES, avaliou-se a influência dos parâmetros operacionais e o uso de proteína de soja, Tween 80, PEG 1500 e albumina de soro bovino (BSA) como aditivos. Por fim, para a melhor condição foi realizada a etapa de fermentação alcoólica para a validação global deste bioprocesso. Os resultados obtidos para as condições que maximizam a produção de enzimas, utilizando o BEX como substrato, foram: inserção de lactose na concentração de 0,075 g/g de substrato e farelo de trigo na proporção 1:1 em massa em relação ao substrato, o que levou a um aumento de atividade de 73% para betaglicosidase, 67% para endoglucanase e 72% para xilanase, em relação à condição controle utilizando apenas BEX como substrato, sem a presença de lactose ou farelo. Os cultivos em FES seguidos pela etapa de HE com o MFI mostrou que os cocultivos foram, na maioria dos casos, melhores na conversão do BEX a açúcares fermentescíveis. O cocultivo que apresentou o melhor resultado quando comparado ao melhor cultivo isolado de *Aspergillus niger* foi o de *Trichoderma reesei* com *Aspergillus oryzae*, o qual promoveu um aumento de 47% na produção de glicose. A avaliação dos parâmetros operacionais (pH, temperatura e agitação) durante a etapa de hidrólise enzimática com o MFI da FES mostrou que o processo de sacarificação realizado sob a condição de pH 4,8, 200 rpm e 50 °C apresentou a melhor conversão da biomassa lignocelulósica. Essa condição operacional é a mesma já empregada no processo convencional de HE com extrato comercial de enzimas. A utilização de aditivos (proteína de soja e Tween 80) melhorou o processo de sacarificação, sendo que a adição da proteína de soja (0,5%, m/v) promoveu um aumento de 50% na liberação de glicose. Assim, realizou-se a fermentação alcoólica para a validação do processo global de integração para a melhor condição do conjunto cultivo/hidrólise, obtendo-se um rendimento de etanol de 83,5% do rendimento teórico e uma produtividade volumétrica de etanol (Q_P) de 4,77 g/L.h. Esses resultados permitiram a validação do bioprocesso consolidado proposto, indicando que todas as etapas podem ser realizadas sequencialmente no mesmo reator.

Palavras-chaves: Bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação em estado sólido (FES). Fungos filamentosos. Hidrólise enzimática. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The use of a simplified consolidated bioprocess for the conversion of biomass using enzymes produced *in-house* (integrated into the process of converting lignocellulosic biomass) may enable significant increases in the production of bioethanol, without the need for expansion of cultivated area. With this motivation, the present work had as objective the study of the steps of production of (hemi)cellulases by solid-state fermentation (SSF) and the use of whole fermentation medium (WFM) for saccharification of biomass and subsequent alcoholic fermentation within the context of a consolidated bioprocess for the 2G ethanol production. To this end, firstly, the selection of the cultivation conditions for the production of enzymes directly using the sugarcane bagasse pretreated by steam explosion (SEB) as SSF substrate was studied. Thus, different fungi were cultivated in isolation and in co-cultivation, including the study of the use of wheat bran and lactose as inducers in the production of enzymes. In order to optimize the enzymatic hydrolysis (EH) step with the WFM from SSF, it was evaluated the influence of the operating parameters and the use of soy protein, Tween 80, PEG 1500 and bovine serum albumin (BSA) as additives. Finally, the alcoholic fermentation step was performed for the selected condition for the overall validation of this bioprocess. The results obtained in the conditions which maximize the production of enzymes, using SEB as substrate, were: addition of lactose at 0.075 g/g of substrate and wheat bran in the mass ratio 1:1 relative to the substrate, which led to an increase of activity of 73% for beta-glucosidase, 67% for endoglucanase, and 72% for xylanase, compared to the control condition using SEB as the substrate, without the presence of lactose or wheat bran. Cultivations under SSF followed by the EH step with the WFM showed that the co-cultivation were, in most cases, better in the conversion of SEB into fermentable sugars. The co-cultivation that presented the best result when compared to the best-isolated cultivation of *Aspergillus niger* was the *Trichoderma reesei* with *Aspergillus oryzae*, which has promoted an increase of 47% in the glucose production. The evaluation of operating parameters (pH, temperature and stirring) during the enzymatic hydrolysis step with the WFM from SSF showed that the saccharification process performed under the condition of pH 4.8, 200 RPM and 50 °C presented the best conversion of lignocellulosic biomass. This operational condition is the same already used in the conventional process of enzymatic hydrolysis with commercial extract enzymes. The addition of additives (soy protein and Tween 80) improved the saccharification process, whereas the addition of soy protein (0.5% w/v) lead to a 50% increase in glucose release. The alcoholic fermentation carried out for validating the overall integration process at the best condition of cultivation /hydrolysis gave a yield of 83.5% of the theoretical yield and volumetric productivity of ethanol (Q_P) 4.77 g/L.h. These results show that all process steps can be performed sequentially in the same reactor, thus denoting the proposed consolidated bioprocess.

Keywords: Sugarcane bagasse. Solid-state fermentation (SSF). Filamentous fungi. Enzymatic hydrolysis. Alcoholic fermentation.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Sumário.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	x
Nomenclatura.....	xi
1- INTRODUÇÃO.....	12
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1- Etanol de segunda geração.....	14
2.1.1- Pré-tratamento.....	15
2.1.2- Hidrólise da biomassa vegetal.....	17
2.1.3- Fermentação.....	22
2.2- Enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal.....	23
2.3- Fermentação em estado sólido (FES).....	24
2.3.1- Indutores na produção de celulases.....	28
2.3.1.1. Lactose.....	28
2.3.1.2. Resíduos lignocelulósicos.....	31
2.3.1.3. Farelo de Trigo.....	35
2.3.1.4. Bagaço de cana-de-açúcar.....	36
2.4- Fungos filamentosos.....	38
2.5- Cocultivo de fungos filamentosos.....	39
2.6- Estratégias para simplificação do processo de produção de etanol 2G.....	40
3- OBJETIVOS.....	44
3.1- Objetivo Geral.....	44
3.2- Objetivos Específicos.....	44
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1- Substrato.....	44
4.2- Microrganismos.....	45
4.3- Meio de Mandels.....	45
4.4- Métodos.....	46
4.4.1- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX).....	46
4.4.2- Cultivo em fermentação em estado sólido (FES).....	48
4.4.3- Cultivo em FES seguido da hidrólise enzimática com meio integral.....	49
4.4.4- Avaliação da etapa de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI).....	50
4.4.5- Avaliação da etapa de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) e a adição de aditivos.....	51
4.4.6- Determinação de fenólicos.....	51
4.4.7- Atividades enzimáticas.....	52
4.4.8- Fermentação alcoólica.....	53

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado por explosão a vapor (BEX).....	55
5.2- Análise de fenólicos na água de lavagem do BEX.....	56
5.3- Seleção das melhores condições de cultivo em fermentação em estado sólido (FES).....	57
5.4- Perfil temporal da fermentação em estado sólido (FES)	60
5.5- Tempo de Aclimatização antes da hidrólise enzimática.....	62
5.6- Hidrólise enzimática com meio fermentado integral.....	63
5.7- Especificidade do substrato no cocultivo de <i>T. reesei</i> RUT-C30 com <i>A. oryzae</i> P6B2.....	75
5.8- Otimização da hidrólise enzimática com meio fermentado integral.....	78
5.9- Fermentação Alcólica.....	86
6- CONCLUSÕES.....	89
6.1- Conclusões.....	89
6.2- Propostas Futuras.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina provocadas pela etapa de pré-tratamento da biomassa vegetal	16
Figura 2	Processo de hidrólise enzimática da biomassa vegetal – perspectiva de integração	19
Figura 3	Processos que ocorrem em microescala durante a fermentação em estado sólido (FES)	26
Figura 4	Estrutura da parede celular de resíduos lignocelulósicos	32
Figura 5	Interação entre as moléculas de glicose nas microfibrilas de celulose cristalina	33
Figura 6	Molécula de hemicelulose e seus monômeros constituintes	34
Figura 7	Três álcoois precursores e seus respectivos monolignóis sintetizadores da lignina	35
Figura 8	Estrutura típica da biomassa da cana-de-açúcar	36
Figura 9	Composição geral da cana-de-açúcar	37
Figura 10	Ilustração esquemática proposta do processo simplificado de conversão de biomassa em etanol	43
Figura 11	Fluxograma das principais etapas realizadas	54
Figura 12	Concentração de fenólicos totais na água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor para diferentes valores de pH.	56
Figura 13	Valores de atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase após 72 horas de FES, com umidade de 70% e BEX _L , comparando-se as proporções em massa de BEX _L :FARELO.	57
Figura 14	Valores de atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase após 72 horas de FES, com umidade de 70% e BEX _L com farelo de trigo (1:1), comparando-se as concentrações de lactose (g/g de substrato).	59
Figura 15	Perfil temporal da fermentação em estado sólido (FES) realizada durante 72 horas de cultivo com umidade de 70%, com <i>A. niger</i> (A) e <i>T. reesei</i> (B), BEX _L e farelo de trigo na proporção em massa (1:1) utilizados como substratos.	61
Figura 16	Concentração de glicose liberada para os diferentes tempos de aclimatização (0 horas, 4 horas e 12 horas). Letras iguais em um mesmo conjunto de colunas indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância	62

Figura 17	Imagens registradas após 48 horas de fermentação em estado sólido (FES) realizada para dez combinações dos quatro fungos	63
Figura 18	Concentração de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática realizada por 36 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) para dez combinações cultivos isolados e em cocultivo (combinados dois a dois) e o controle contendo somente o BEX	64
Figura 19	Análise estatística realizada pelo Teste de Tukey com nível de confiança de 95% após 36 horas de Hidrólise Enzimática, comparando-se a concentração de glicose (A) e açúcares redutores (B). Letras iguais em um mesmo conjunto de colunas indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância	65
Figura 20	Valores de betaglicosidase (A), endoglucanase (B) e xilanase (C) após 48 horas de FES, com umidade de 70% e BEX _L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1), comparando-se cultivos e cocultivos	67
Figura 21	Atividade residual após 36 horas na temperatura de 50°C dos extratos enzimáticos dos cocultivos de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> e de <i>T. reesei</i> com <i>A. niger</i> para valores de betaglicosidase, endoglucanase, xilanase e proteínas	69
Figura 22	Perfis de produção de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de celulose pura (Celufloc) e BEX realizada por 36 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) comparando-se os cocultivos de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> e de <i>T. reesei</i> com <i>A. niger</i>	70
Figura 23	Concentração de glicose (A) e açúcares redutores (B) durante a hidrólise enzimática realizada por 36 horas utilizando os meios fermentados integrais (MFI) cocultivado e a combinação dos cultivos individuais, e o extrato enzimático (EE) cocultivado e a combinação dos cultivos individuais	72
Figura 24	Perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática do BEX realizada por 36 horas para o cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> comparando o meio fermentado integral (MFI), o extrato enzimático (EE) e a fração sólida restante da etapa de extração das enzimas	74
Figura 25	Atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase, após 48 horas de FES, com umidade de 70% e comparando-se os substratos: BEX _L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) com lactose, BEX _L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) sem lactose e apenas farelo de trigo	76

Figura 26	Perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática do BEX realizada por 36 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) com umidade de 70%, utilizando o cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> e comparando-se os substratos: BEX _L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) com lactose, BEX _L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) sem lactose e apenas farelo de trigo	77
Figura 27	Gráfico de Pareto avaliando as influências da agitação, pH e temperatura na etapa de sacarificação com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> através da concentração de glicose após 36 horas de hidrólise enzimática	80
Figura 28	Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática para todo os pontos do planejamento experimental	81
Figura 29	Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> na presença de aditivos	82
Figura 30	Ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> na presença de aditivos, para concentração de glicose (g/L) em relação ao BEX	82
Figura 31	Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática de celulose pura (Celufloc) com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> na presença de aditivos	84
Figura 32	Ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> na presença de aditivos, para concentração de glicose (g/L) em relação a celulose pura (Celufloc)	84
Figura 33	Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> na presença de aditivos	85
Figura 34	Ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> na presença de aditivos, para concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores em relação BEX	85
Figura 35	Perfil de concentração de glicose (g/L) e etanol (g/L) após 9 horas fermentação alcóolica utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i> após o processo de hidrólise enzimática otimizado	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Vantagens e desvantagens da fermentação em estado sólido (FES) em relação a fermentação submersa (FSm)	27
Tabela 2	Composição do Meio de Mandels (modificado pela adição de lactose)	45
Tabela 3	Composição da solução de sais	45
Tabela 4	Programação da rampa utilizada na mufla para calcinar as amostras	48
Tabela 5	Resumo das condições experimentais avaliadas	49
Tabela 6	Condições selecionadas para cada nível das variáveis experimentais agitação, pH e temperatura para avaliação da hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI)	51
Tabela 7	Composição físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado com água a 50 °C até pH 7 (BEX _L) e não lavado (BEX)	55
Tabela 8	Condições selecionadas para cada nível das variáveis experimentais de interesse (agitação, pH e temperatura), o ponto central utilizado e a matriz para o planejamento fatorial completo para a sacarificação da biomassa utilizando o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de <i>T. reesei</i> com <i>A. oryzae</i>	79
Tabela 9	Concentração de etanol após 9 horas e parâmetros calculados para o processo de fermentação alcoólica	87

NOMENCLATURA

2G	Segunda geração
AA	Atividades Auxiliares
BEX	Bagaço de cana-de-açúcar pré tratado por explosão a vapor
BEX_L	Bagaço de cana-de-açúcar pré tratado por explosão a vapor lavado a 50°C até pH 7,0
CBH	Celobiohidrolases
Celufloc	Celulose pura
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose ou Celulose Comercial
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
BPC	Bioprocesso Consolidado
EE	Extrato Enzimático
FES	Fermentação em Estado Sólido
F_{Sm}	Fermentação Submersa
HE	Hidrólise Enzimática
HFS	Hidrólise e Fermentação Separados
HSCF	Hidrólise Separada e Cofermentação
LPMO	Monooxigenases de Polissacarídeos Líticas
MFI	Meio Fermentado Integral
SFS	Sacarificação e Fermentação Simultâneos
SSCF	Sacarificação Simultânea e Cofermentação

1- INTRODUÇÃO

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos apresenta alguns obstáculos técnicos que necessitam ser superados para a utilização de todo o seu potencial produtivo, entre os quais se pode citar a hidrólise enzimática dos polissacarídeos presentes na biomassa, que é considerada uma tecnologia chave para a implementação desse bioprocessos (HORN *et al.*, 2012; SAINI *et al.*, 2015). Assim, o desenvolvimento de propostas de simplificação da conversão de biomassa em etanol de segunda geração (2G), utilizando enzimas produzidas *in-house* (integrada ao processo de conversão da biomassa lignocelulósica), pode gerar os avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável (PIROTA *et al.*, 2013a; PIROTA *et al.*, 2014).

Apesar dos consideráveis avanços alcançados, estudos recentes apontam que o custo de produção das enzimas é ainda significativo para o processo (KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012; SAINI *et al.*, 2015). A produção de enzimas *in-house* (integrada ao processo de conversão da biomassa lignocelulósica) é uma estratégia utilizada na redução dos custos, uma vez que possibilita a menor necessidade de estabilizar os preparados enzimáticos, evitando também os custos associados com o transporte e armazenamento em longo prazo (KOVACS *et al.*, 2009; SORENSEN *et al.*, 2011; DELABONA *et al.*, 2012a; SAINI *et al.*, 2015).

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar como indutor para a produção *in-house* de celulasas e hemicelulasas, que são as principais enzimas envolvidas na hidrólise da biomassa vegetal por linhagens fúngicas, apresenta vantagens em relação a outros tipos de indutores. Além de ser indutor de baixo custo para a produção enzimática, outro motivo faz com que seu aproveitamento seja atrativo: o fato de que a escolha do substrato indutor afeta as características do coquetel enzimático produzido. Portanto, quando se trata de cultivos cujo objetivo é produzir enzimas para aplicação específica na hidrólise do bagaço de cana na cadeia produtiva do etanol de segunda geração (2G), o mesmo usado como indutor tem o potencial de favorecer o direcionamento das características do coquetel enzimático (DELABONA *et al.*, 2012a).

A produção de celulasas por linhagens fúngicas é amplamente disseminada na natureza, incluindo uma variedade de gêneros, tais como *Trichoderma* e *Aspergillus* (IWASHITA, 2002). No entanto, as pesquisas relacionadas à descoberta de novas enzimas continuam a identificar oportunidades para melhorar a eficiência catalítica dos complexos enzimáticos pela suplementação com enzimas obtidas a partir de diferentes microrganismos

(SAINI *et al.*, 2015). De fato, uma estratégia potencial para melhorar a eficiência dos coquetéis enzimáticos é a combinação de extratos de diferentes espécies de fungos a fim de se obter formulações enzimáticas eficazes em termos de enzimas individuais necessárias para a degradação completa e eficiente da biomassa vegetal (PIROTA *et al.*, 2013a; KOLASA *et al.*, 2014). Outra estratégia é a utilização de substâncias indutoras como a lactose (MORIKAWA *et al.*, 1995; SEIBOTH *et al.*, 2007b; KUBICEK *et al.*, 2009; EL-SHISHTAWY *et al.*, 2015), bem como o cocultivo de fungos filamentosos (CASTILLO *et al.*, 1994; GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999; MASSADEH *et al.*, 2001; IKRAM UL *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2012; KOLASA *et al.*, 2014; SAINI *et al.*, 2015).

Atualmente, a produção das enzimas pode ser realizada pelo cultivo de fungos por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm). Cada um desses processos possui vantagens e desvantagens (SINGHANIA *et al.*, 2010). No entanto, o uso da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas industriais tem recebido uma atenção crescente nos últimos 20 anos, devido às suas vantagens inerentes (SINGHANIA *et al.*, 2010; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; YOON *et al.*, 2014). A FES é particularmente vantajosa para a produção de enzimas por fungos filamentosos. Do ponto de vista ambiental, o benefício da FES está relacionado com a utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, atuando como fontes de carbono e de energia (RAIMBAULT, 1998; JUN *et al.*, 2013). Vários estudos têm descrito o potencial do uso da FES para a produção das enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa vegetal (TENGERDY e SZAKACS, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2010).

No entanto, nos processos tradicionais da FES, após o período de cultivo dos microrganismos, as enzimas produzidas são extraídas do substrato sólido através de uma etapa de extração sólido-líquido convencional, seguida de uma etapa de filtração e/ou centrifugação. Os produtos finais dessa etapa constituem-se do sobrenadante líquido, que contém as enzimas de interesse, e uma fração sólida. Uma possível estratégia para eliminar o processo de separação e a geração desse resíduo sólido seria a utilização de todo o meio de fermentação, que contém as enzimas, os micélios (células fúngicas) e o substrato sólido residual, na etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica. Esses estudos inovadores demonstraram a possibilidade de utilização do meio fermentado integral para a sacarificação de biomassa lignocelulósica e produção de etanol 2G (PIROTA *et al.*, 2013a; PIROTA *et al.*, 2014).

Uma vez que os resultados obtidos até o presente momento para a simplificação do processo de conversão de biomassa usando enzimas produzidas *in-house* estão se mostrando

promissores, o presente trabalho objetivou dar continuidade a esta linha de pesquisa através do desenvolvimento de novas estratégias para a melhoria deste bioprocesso inovador para a produção de etanol lignocelulósico. Nesse sentido, a FES foi realizada por diferentes fungos cultivados de forma isolada e em cocultivo, visto que a competição ou antagonismo experimentado durante a cocultura é utilizado para aumentar significativamente a produção dos complexos enzimáticos que não são detectados em cultivos individuais (MARMANN *et al.*, 2014). Na etapa de hidrólise enzimática (HE) com o meio integral da FES, avaliou-se a influência dos parâmetros operacionais, pois é importante verificar se as condições da HE que já são conhecidas e amplamente utilizadas (SUN e CHENG, 2002; MOUTTA *et al.*, 2013; BUSSAMRA *et al.*, 2015) também são as condições ótimas para sacarificação utilizando-se o meio fermentado integral (MFI). Avaliou-se também o efeito da adição de aditivos, pois os mesmos podem mudar a natureza do substrato, aumentando a celulose disponível através da interação com a lignina, ou também podem reduzir a desnaturação das enzimas durante a hidrólise, gerando um efeito de aumento da estabilidade das mesmas (ERIKSSON *et al.*, 2002).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Etanol de segunda geração (2G)

A crescente preocupação com a escassez das reservas de petróleo, juntamente com a necessidade de preservar o meio ambiente, são as principais forças motrizes na busca por fontes alternativas renováveis e viáveis para a produção de combustíveis sustentáveis (PEREIRA *et al.*, 2015). Assim, a bioenergia e os biocombustíveis têm sido intensivamente pesquisados, produzidos e utilizados nos últimos 15 anos, o que deve continuar a acontecer, particularmente nos setores de bioetanol lignocelulósico e biogás. É esperado que em 2050 a bioenergia irá prover 30% da demanda energética mundial (GUO *et al.*, 2015). Logo, existe um consenso sobre a necessidade de mudança do cenário energético global e portanto, o etanol será, sem dúvida, um importante biocombustível (PEREIRA *et al.*, 2015).

Atualmente, produz-se eficientemente o etanol de primeira geração (SAINI *et al.*, 2015). Por outro lado, a atividade industrial brasileira de produção de etanol de segunda geração (ou etanol 2G) teve início no ano de 2014 com a implementação das plantas que processam biomassa lignocelulósica (Raízen e GranBio). Entre as fontes potenciais de bioenergia, a lignocelulose tem sido identificada como uma matéria-prima importante para a

produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado, contribuindo, assim, para o fornecimento de energia global. Nesse contexto, o Brasil tem feito progressos consideráveis no sentido de substituir os combustíveis fósseis por etanol lignocelulósico a partir da cana-de-açúcar, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de cana e junto com Estados Unidos lidera a produção mundial de etanol (BALAT, 2011; PEREIRA *et al.*, 2015).

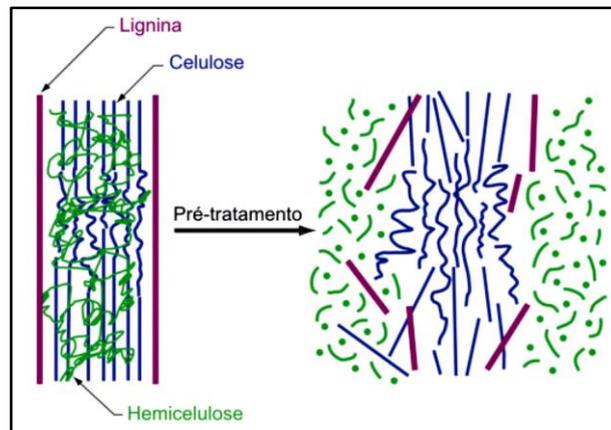
A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos através da via bioquímica (conversão bioquímica dos materiais lignocelulósicos através da sacarificação e fermentação) apresenta alguns obstáculos técnicos que necessitam ser superados para a utilização de todo seu potencial produtivo. Dentre esses obstáculos, os principais são: a recalcitrância e a inacessibilidade da biomassa lignocelulósica (HORN *et al.*, 2012), a variedade de açúcares que são liberados quando os polímeros de hemicelulose e celulose são hidrolisados, e a necessidade de encontrar microrganismos capazes de fermentar eficientemente estes dois açúcares ao mesmo tempo (hexoses e pentoses) (BALAT, 2011).

2.1.1- Pré-tratamento

A primeira etapa no processamento da biomassa para a produção de etanol é o pré-tratamento, que visa desconstruir a estrutura vegetal (Figura 1), de modo a permitir as operações posteriores (HAMELINCK *et al.*, 2005). A presença de hemicelulose e lignina envolvendo as cadeias de celulose também dificulta o acesso de catalisadores, sendo necessário um tratamento prévio para a modificação destes componentes, facilitando o acesso das enzimas à celulose (SANTOS *et al.*, 2012).

Estima-se que 18-20% do custo total para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos pode ser atribuído ao pré-tratamento. Esta etapa é realizada para melhorar a acessibilidade das enzimas ao substrato (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015). Várias tecnologias de pré-tratamento, tais como pré-tratamentos químicos (alcalino, ácido, organosolvente e líquidos iônicos), pré-tratamentos físicos (moagem, micro-ondas e extrusão), o pré-tratamento físico-químico (explosão a vapor, água quente, explosão da fibra com amônia, oxidação úmida e explosão com CO₂) e pré-tratamentos biológicos (utilizando microrganismos) têm sido desenvolvidas (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; CANILHA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; BISARIA e KONDO, 2014; SANTOS *et al.*, 2014).

Figura 1 – Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina provocadas pela etapa de pré-tratamento da biomassa vegetal



Fonte: Adaptado de Mosier *et al.*, (2005)

Embora cada método possua suas vantagens, não podem ser recomendados para todos os tipos de biomassa. Ou seja, cada método de pré-tratamento tem algumas desvantagens que limitam sua aplicação. Recentemente, diferentes metodologias combinadas foram desenvolvidas para superar os problemas associados com os métodos individuais. A utilização desses métodos resultou em aumento da eficiência da produção de açúcar, diminuição na formação de inibidores e tempo reduzido de processo. Estas estratégias de pré-tratamento combinado incluem a combinação de pré-tratamentos alcalino com ácido diluído (LU *et al.*, 2009), pré-tratamentos alcalino com líquidos iônicos (NGUYEN *et al.*, 2010), pré-tratamentos de ácido diluído com explosão a vapor (CHEN *et al.*, 2011), pré-tratamentos biológicos com organosolventes (MONRROY *et al.*, 2010), pré-tratamentos biológicos com ácido diluído (ZHANG *et al.*, 2007a; ZHANG *et al.*, 2007b), pré-tratamentos biológicos com explosão a vapor (TANIGUCHI *et al.*, 2010), entre outros. Além disso, várias ferramentas como a biologia sintética, sequenciamento de alto rendimento e engenharia genética vem sendo desenvolvidos recentemente e também são considerados como ferramentas promissoras para melhorar a eficiência dos processos de pré-tratamento e hidrólise para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015).

As estratégias de pré-tratamento eficazes incluem: atingir uma elevada recuperação de todos os carboidratos; possibilitar um elevado processamento da celulose no processo subsequente; resultar em uma elevada concentração de sólidos, além de uma elevada concentração de açúcares livres na fração líquida, exigir uma baixa demanda energética, evitar a formação de subprodutos, exigir baixo investimento e custo operacional (SANTOS *et*

al., 2012), o aumento do teor de celulose (COLEMAN *et al.*, 2009) e a redução da recalitrância da parede celular vegetal e da cristalinidade da celulose (FRY *et al.*, 2008). Espera-se que com o desenvolvimento destas tecnologias de pré-tratamento, os problemas usualmente encontrados nessa etapa (uma das mais impactantes em termos de custos), sejam superados em um futuro próximo. Assim, conclui-se que para a conversão eficiente da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis deve-se compreender os conceitos e tecnologias de pré-tratamento (individuais ou combinados) e também os tipos e composição das matérias-primas disponíveis (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015).

O pré-tratamento físico-químico por explosão a vapor é um dos mais utilizados para biomassa lignocelulósica. Trata-se de um procedimento hidrotérmico em que a biomassa é submetida a um vapor pressurizado durante um período de tempo que varia de segundos a minutos, combina forças mecânicas que são causadas devido à alta pressão pela qual as fibras são submetidas e os efeitos químicos que hidrolisam e solubilizam parcialmente a hemicelulose, redistribuem a lignina e expõem a celulose aumentando a acessibilidade das enzimas às microfibrilas de celulose. Os fatores mais importantes que afetam a eficácia deste pré-tratamento por explosão a vapor são o tamanho da partícula da biomassa, a temperatura, tempo de residência e o efeito combinado entre o tempo de residência e a temperatura (ALVIRA *et al.*, 2010). As vantagens deste pré-tratamento incluem a baixa necessidade de energia em comparação com os pré-tratamentos mecânicos que requerem 70% mais energia do que o método por explosão a vapor para se alcançar a mesma eficácia. Além disso, não há custos de reciclagem ou ambientais. Porém, suas limitações incluem a destruição de uma parte da fração de xilanas, o rompimento incompleto da lignina e a geração de compostos que podem ser inibitórios para as enzimas e os microrganismos utilizados nos processos seguintes. Logo, a biomassa precisa ser lavada com água para remover os compostos inibidores juntamente com a hemicelulose solúvel em água, mas essa lavagem diminui os rendimentos globais de sacarificação, devido à remoção de cerca de 20-25 % dos açúcares solúveis. (SUN e CHENG, 2002).

2.1.2- Hidrólise da biomassa vegetal

Na estrutura vegetal, a celulose é envolvida por uma camada composta de uma combinação de lignina e hemicelulose, que se desenvolveu para protegê-la de agentes externos. Grande parte da dificuldade de obtenção do álcool da celulose consiste, precisamente, em atingir objetivos que estão em contradição com a própria natureza evolutiva

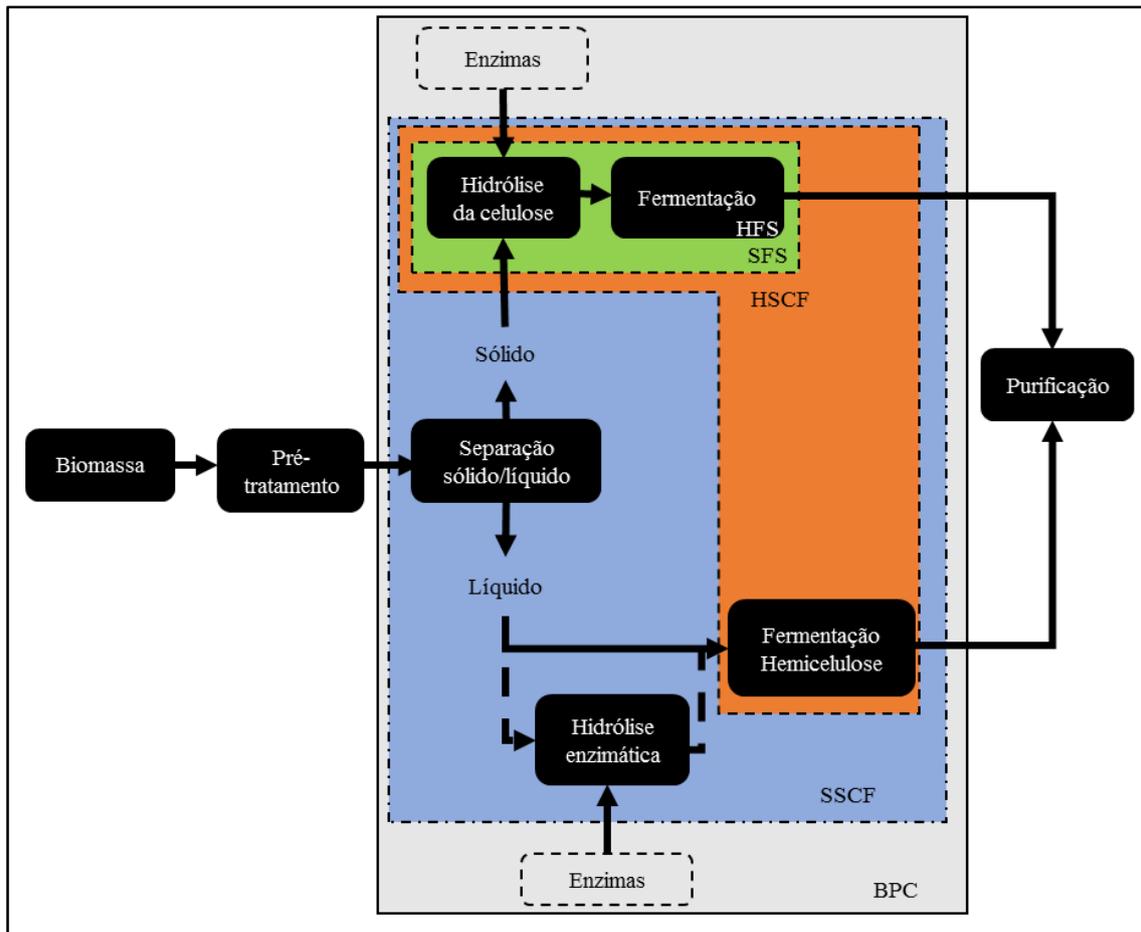
das plantas (SANTOS *et al.*, 2012). Após o pré-tratamento, os polímeros de carboidratos dos materiais lignocelulósicos são convertidos em monômeros de açúcar na etapa de hidrólise (BALAT e BALAT, 2009).

A obtenção de etanol de materiais lignocelulósicos envolve processos de elevada complexidade, que englobam diversas operações, entre as quais a hidrólise da celulose. Os processos, portanto, devem ser analisados em sua totalidade, levando em consideração as várias operações e seus níveis de integração, ou seja, as operações que são executadas simultaneamente. As principais configurações em desenvolvimento dos processos de hidrólise da biomassa são mencionadas a seguir (ROSA e GARCIA, 2009).

- **HFS – Hidrólise e Fermentação Separados**: A hidrólise da celulose ocorre separadamente da fermentação da glicose que é subsequente. São realizadas em reatores diferentes, sendo que a fermentação das pentoses ocorre em outro reator.
- **SFS – Sacarificação e Fermentação Simultâneas**: Como o nome indica, a hidrólise da celulose e a fermentação da glicose são realizadas no mesmo reator, sendo que a fermentação das pentoses, no entanto, continua se processando em reator separado.
- **HSCF – Hidrólise Separada e Cofermentação**: A hidrólise da celulose ocorre separadamente e a subsequente fermentação da glicose e das pentoses é realizada no mesmo reator.
- **SSCF – Sacarificação Simultânea e Cofermentação**: Representa um aumento da integração em relação ao SFS e ao HSCF, já que a fermentação das pentoses e da glicose passa a ser realizada em um mesmo reator.
- **BPC – Bioprocesso Consolidado**: O máximo de integração é atingido com essa rota, na qual todas as operações de caráter biológico – inclusive a produção de enzimas – são realizadas em um único reator.

Entre as diversas rotas tecnológicas possíveis empregadas para hidrolisar a celulose, destacam-se duas, que concentram a quase totalidade dos esforços de pesquisa e desenvolvimento: as realizadas pela rota química e as enzimáticas, analisadas a seguir. A Figura 2 permite visualizar as várias configurações descritas acima com perspectiva de integração do processo de hidrólise enzimática.

Figura 2 – Processo de hidrólise enzimática da biomassa vegetal – perspectiva de integração



Fonte: Adaptado de Geddes *et al.* (2011)

A hidrólise química envolve a exposição dos materiais lignocelulósicos a um produto químico por um período de tempo a uma determinada temperatura específica. Com esse processo, o pré-tratamento e a hidrólise podem ser realizados em um único passo. Os ácidos são predominantemente aplicados na hidrólise química, com dois tipos básicos de processos: a hidrólise com ácido diluído e com ácido concentrado (BALAT, 2011). Atualmente, os líquidos iônicos também vêm sendo utilizados no processo químico (BINDER e RAINES, 2010; CLOUGH *et al.*, 2015).

A hidrólise ácida (concentrada ou diluída) ocorre em dois estágios, devido às diferenças existentes entre a hemicelulose e a celulose. No primeiro estágio ocorre a hidrólise da hemicelulose (devido a sua estrutura amorfa). No segundo estágio, temperaturas mais altas são utilizadas para completar a hidrólise da celulose (devido a sua natureza cristalina) (RAHMAN *et al.*, 2007). O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempos de reação variando de segundos a minutos, o que facilita a sua utilização em

processos contínuos. Já os processos com ácidos concentrados são conduzidos em condições mais amenas, com tempos de reação tipicamente mais longos (DIPARDO, 2000).

Segundo Olivério & Soares (2007), as principais dificuldades relacionadas à hidrólise ácida são: a lignina que restringe o acesso à celulose e precisa ser removida antes do processo de hidrólise, as condições de remoção da lignina são severas e demoradas e o reagente utilizado na hidrólise ácida pode reagir com os açúcares formados, sendo estes degradados, reduzindo o rendimento da reação.

A hidrólise ácida, além de formar compostos inibidores para a levedura no processo de fermentação, também apresenta outros problemas, tais como, condições de manuseio severas (pH e temperatura), e o alto custo de manutenção devido os problemas de corrosão (MARTIN *et al.*, 2007).

A hidrólise enzimática é uma alternativa ambientalmente favorável que envolve o uso de enzimas degradantes (celulases e hemicelulases) para hidrolisar carboidratos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis (BALAT, 2011). As enzimas são utilizadas há algumas décadas como catalisadores biológicos para a produção de etanol por hidrólise de biomassa (LADISCH e SVARCZKOPF, 1991). A hidrólise da celulose, entretanto, é muito mais complexa, já que envolve a quebra de polímeros mais resistentes e que estão protegidos por outros materiais resistentes à degradação (lignina e hemicelulose) (SANTOS *et al.*, 2012).

As enzimas são proteínas, isto é, moléculas orgânicas complexas, sendo que as utilizadas em processos industriais são produzidas por microrganismos, como bactérias e fungos (BHAT e BHAT, 1997). A primeira etapa das pesquisas relacionadas à hidrólise enzimática da biomassa consiste, portanto, em selecionar os microrganismos capazes de produzir enzimas adequadas ao processo (DELABONA *et al.*, 2012b). Outro caminho, ainda mais complexo, seria produzir microrganismos com as características desejadas por meio de técnicas avançadas de manipulação genética (KING *et al.*, 2011; AMORE *et al.*, 2013).

O processo da hidrólise enzimática é conduzido em condições brandas (pH 4,8-5,0 e temperatura entre 45 e 50 °C). Além de permitir maiores rendimentos e possibilitar a fermentação simultânea à sacarificação, é um processo que apresenta baixo custo de manutenção mas um alto custo das enzimas (SUN e CHENG, 2002). Trata-se de uma reação heterogênea catalisada pelas celulases, composta por um substrato insolúvel (celulose) e um catalisador (enzimas). A completa hidrólise da celulose requer a ação combinada de múltiplas enzimas com diferentes especificidades ao substrato (KOVACS *et al.*, 2009).

No decorrer da etapa de hidrólise ocorre uma resistência à transferência de massa entre as moléculas de enzima e uma camada estagnada de filme líquido, que cerca as partículas sólidas de celulose, sendo que esta resistência determina a reação global. A velocidade da reação é determinada por três eventos sequenciais: a velocidade de transferência de massa da enzima, a velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e a velocidade de catálise da celulose (GAN *et al.*, 2003). Considerando as características estruturais da celulose, verifica-se que o modo de ação das enzimas influencia na velocidade de reação. A susceptibilidade da celulose ao ataque enzimático é determinada pela acessibilidade dos sítios de ligação a celulose, o que determina a subsequente adsorção da enzima no substrato sólido. Essa adsorção e a formação do complexo enzima/substrato são vistas como os passos cruciais na hidrólise enzimática de celulose (GAN *et al.*, 2003). Depois da primeira fase da hidrólise, a taxa de reação começa a depender da penetração da enzima ao interior do substrato sólido e, em consequência desta dependência, a catálise se torna mais lenta (ARO *et al.*, 2005).

No Brasil, as pesquisas sobre esse tema se encontram em pleno desenvolvimento. Estima-se que é possível atingir de 75 a 80% de eficiência na hidrólise enzimática da celulose operando em configuração HFS (Hidrólise e Fermentação Separados). Isso significa, por exemplo, que uma tonelada de bagaço seco (com 37% de celulose) permitiria a obtenção de 300 a 350 litros de etanol (considerando 90% de eficiência da fermentação da glicose) (ROSA e GARCIA, 2009).

Logo, o papel decisivo atribuído a alguns dos aspectos do processo de hidrólise enzimática é fato, em especial aqueles que dizem respeito às enzimas. A viabilização desse processo depende da disponibilidade de determinadas enzimas capazes de hidrolisar a celulose com alto rendimento e baixo custo. O principal esforço de pesquisa e desenvolvimento consistiria em selecionar o conjunto de enzimas mais adequado. A seleção das enzimas representa apenas uma etapa, embora importante e custosa, do desenvolvimento da tecnologia da hidrólise enzimática. Assim, métodos para aumentar a eficácia da ação enzimática também são importantes para a redução de custos. Muitas tentativas têm sido realizadas para determinar as características do substrato que leva à diminuição da taxa de hidrólise da celulose (MOONEY *et al.*, 1998). A área da superfície do substrato tem sido reconhecida como uma importante característica na determinação da velocidade inicial da hidrólise (THOMPSON *et al.*, 1992). Também tem sido demonstrado que a lignina presente em substratos complexos, pode ter um efeito negativo sobre a hidrólise (MOONEY *et al.*,

1998). Portanto, o aperfeiçoamento da hidrólise de celulose por adição de aditivos foi relatado por diversos autores (CASTANON e WILKE, 1981; ERIKSSON *et al.*, 2002; BÖRJESSON *et al.*, 2007). Diferentes mecanismos têm sido propostos para o efeito positivo da adição de aditivos na hidrólise enzimática, pois o mesmo pode mudar a natureza do substrato, aumentando a celulose disponível através da interação com a lignina ou também pode aumentar a estabilidade das enzimas e, assim, reduzir a desnaturação da enzima durante a hidrólise (ERIKSSON *et al.*, 2002).

2.1.3- Fermentação

A fermentação é um processo anaeróbio de bioconversão de açúcares para a produção de etanol e CO₂. Embora existam diversos métodos e processos para a obtenção de etanol a partir de biomassa, ainda encontra-se dificuldade em se obter etanol lignocelulósico de maneira econômica (GIESE *et al.*, 2011).

O microrganismo mais comumente utilizado na fermentação é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura pode metabolizar os açúcares simples, tal como a glicose, e também dissacarídeos, como a sacarose (LIN e TANAKA, 2006). Além disso, possui um sistema genético robusto, elevada resistência ao etanol, consome quantidades significativas de substrato em condições adversas (temperatura pode variar de 24 a 35 °C, tempo de incubação de 8 a 192 horas) e apresenta uma elevada resistência a inibidores presentes no meio de fermentação (HECTOR *et al.*, 2011). A xilose ainda é um desafio para o metabolismo dessa levedura, pois a mesma não possui genes necessários para a assimilação dessa pentose (CARDONA *et al.*, 2010). Neste sentido, muitos estudos têm sido desenvolvidos para obtenção de linhagens capazes de fermentar as pentoses.

A produção de etanol industrial é realizada de tal modo que é quase impossível manter as condições assépticas, e as contaminações podem resultar na redução do rendimento do processo de produção de etanol e também a formação de compostos inibidores. Por conseguinte, o processo deve ser operado em condições que minimizem qualquer risco de contaminação. Em geral, o uso combinado de pH baixo e altas concentrações de etanol é suficiente para manter as condições necessárias para o processo (VAN MARIS *et al.*, 2006).

Outros microrganismos já foram estudados para o processo de fermentação alcoólica, como é o caso da bactéria *Zymomonas mobilis* ou de linhagens geneticamente modificadas de *Escherichia coli* (LIN e TANAKA, 2006). Entretanto, devido às características de maior

resistência às condições adversas do processo apresentadas pela levedura *S. cerevisiae*, esta continua sendo o microrganismo mais empregado na produção industrial de etanol.

2.2- Enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal

As enzimas responsáveis pela degradação da parede celular vegetal são extensivamente estudadas, devido seu elevado potencial de aplicação biotecnológica (BHAT e BHAT, 1997). O uso de enzimas nos processos industriais é altamente atrativo, devido a sua especificidade biocatalítica, redução de bioprodutos indesejáveis e baixa toxicidade química (LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011). Entretanto, o custo de obtenção das enzimas ainda limita sua utilização em vários processos industriais, inclusive o de produção de etanol 2G (ZHANG *et al.*, 2009; BRIJWANI *et al.*, 2010).

As celulases constituem uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise do polímero insolúvel de celulose. O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose mais aceito descreve a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as betaglicosidase ou celobiasas (ZHANG e LYND, 2004). As endoglucanases são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise, causando mudança rápida no grau de polimerização por meio da hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose. Tais enzimas hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos (LYND *et al.*, 2002). Já as exoglucanases são as enzimas que atuam na porção cristalina da molécula de celulose e catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose, liberando celobiose das extremidades das cadeias. As exoglucanases são também conhecidas como celobiohidrolases (CBH). As CBH ainda podem ser divididas em dois tipos: enzima do tipo I (CBHI), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBHII) hidrolisa terminais não redutores. Estas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose). O terceiro grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas betaglicosidásicas, ou β -glucosídeo glucohidrolases (seu nome sistemático). As betaglicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com grau de polimerização menor que 7) em glicose. Assim como as celobiohidrolases, as β -glucosidases também sofrem inibição por seu produto de hidrólise (LYND *et al.*, 2002).

As hemicelulases constituem uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise da hemicelulose. São enzimas chave na degradação da biomassa vegetal (SHALLOM e

SHOHAM, 2003). A despolimerização da hemicelulose requer a ação sinérgica de várias enzimas, incluindo as endoxilanasas (endo-1,4- β -xilanasas), β -xilosidasas (xilana-1,4- β -xilosidase), α -glucoronidase (α -glucosiduronase), α -arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosidase), arabinanase (endo- α -L-arabinanase), β -mananases (endo-1,4-mananase), β -manosidase, α -1,4-galactosidase, β -1,4-galactosidase, acetil-xilano-esterase e feruloil xilano esterase (KUMAR *et al.*, 2008). Entre todas essas enzimas, as endoxilanasas e β -xilosidasas (coletivamente chamadas de xilanasas) são as mais estudadas, pois são as principais responsáveis pela degradação da xilana, maior componente das hemiceluloses da biomassa (JUTURU e WU, 2013).

Além disso, a descoberta recente do papel importante das monooxigenases de polissacarídeos líticas (LPMO) e outras proteínas acessórias no aumento da degradação da celulose resultou na inserção de uma nova categoria na base de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>), chamada de “atividades auxiliares” (AA), que integra um grupo de módulos catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal (LEVASSEUR *et al.*, 2013). Portanto, a descoberta dessas enzimas representa uma revolução no processamento enzimático de biomassa e sugere um novo paradigma para a degradação enzimática da celulose em que a ação das celulasas hidrolíticas clássica é facilitada pela ação dessas monooxigenases polissacarídeos líticas (HORN *et al.*, 2012).

2.3- Fermentação em estado sólido (FES)

Fermentação em estado sólido (FES) é definida como o processo que envolve o crescimento e metabolismo de um microrganismo na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas de um substrato sólido insolúvel. Esse processo é utilizado desde a antiguidade na produção alimentícia de países como Japão, China, Indonésia e Taiwan (PANDEY, 1992).

A seleção de um substrato apropriado é um fator chave para o sucesso da FES. Além de ter composição adequada para induzir o produto desejado, o tamanho de partícula também deve ser considerado. Pequenas partículas oferecem uma maior superfície de contato e uma maior acessibilidade aos nutrientes, entretanto, dependendo do nível de umidade e do tipo de substrato, pode ocorrer compactação do mesmo, dificultando a aeração do meio e a transferência de calor, o que limita o crescimento de microrganismos. Por outro lado, grandes partículas facilitam a aeração, porém podem dificultar o acesso dos microrganismos, limitando a superfície de contato e dificultando a transferência de calor (MARTINS *et al.*,

2011). Outros parâmetros também influenciam na eficiência dos processos fermentativos, como umidade inicial do substrato, pH, temperatura de incubação, quantidade de inóculo, suplementação do meio com nutrientes, extração e purificação do produto final (PANDEY, 2003).

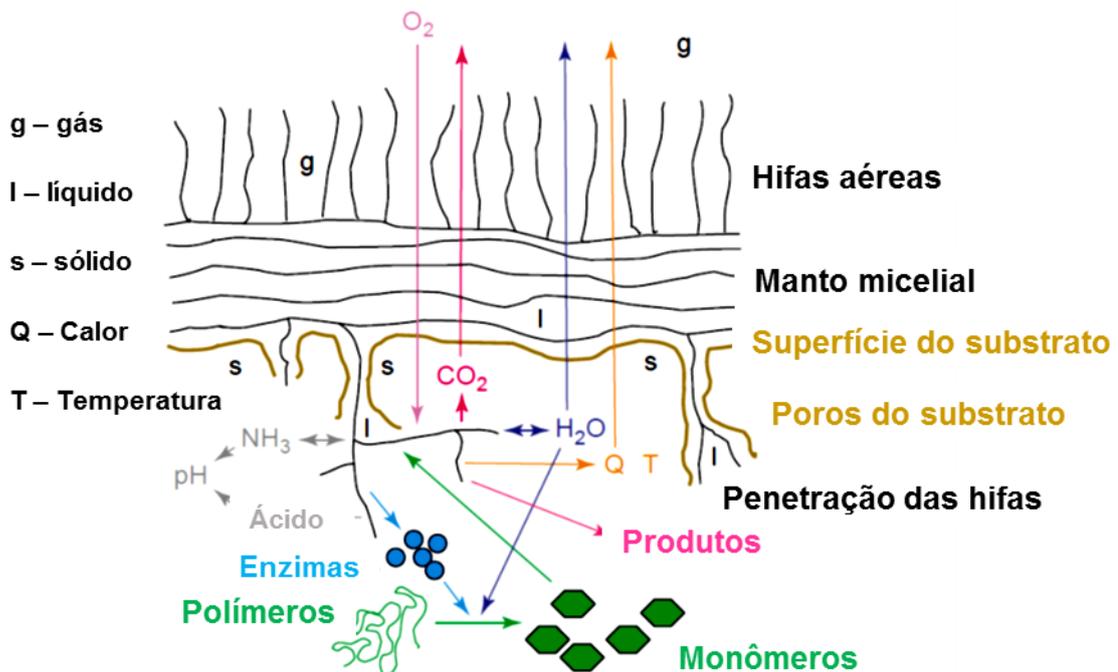
Atualmente, os processos biotecnológicos comerciais são baseados em fermentações submersas (FSm), mas a fermentação em estado sólido (FES) tem ganhado cada vez mais atenção nos últimos anos devido à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos para o crescimento de microrganismos (CASTILHO *et al.*, 2000). Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados para FES, visto que os substratos sólidos se assemelham ao habitat natural onde esses fungos normalmente se desenvolvem (TENGERDY e SZAKACS, 2003).

O Brasil por ser um excelente produtor agrícola, gera uma grande quantidade de resíduos agroindustriais que causam grandes problemas ambientais (PIROTA, 2014). A utilização desses resíduos em bioprocessos para o processo de produção de enzimas, aminoácidos, antibióticos, ácidos orgânicos, biocombustíveis e outros bioprodutos (BAILEY e POUTANEN, 1989; PANDEY, 1992; GOUKA *et al.*, 1997; PANDEY *et al.*, 1999; HÖLKER *et al.*, 2004; SUKUMARAN *et al.*, 2005; COUTO e SANROMÁN, 2006; DELABONA *et al.*, 2012b; PIROTA *et al.*, 2013b), auxilia na diminuição desses problemas e também transforma esses resíduos em produtos de alto valor agregado.

A Figura 3 mostra o processo de fermentação em estado sólido (FES), onde os fungos crescem, formando um tapete de micélio sobre a superfície das partículas do substrato sólido. As hifas aéreas se sobressaem entre os espaços gasosos e crescem penetrando nos poros. As regiões próximas à superfície do substrato e no interior dos poros são onde ocorre a maioria das atividades metabólicas. No entanto, nas regiões de micélio aéreo também podem ocorrer essas atividades metabólicas e há um transporte de substâncias a partir da penetração das hifas aéreas. Os fungos podem degradar macromoléculas em unidades menores que são absorvidas pelo micélio servindo como nutrientes ao produzir enzimas hidrolíticas que se difundem para a matriz sólida. Durante a fermentação, há consumo de O₂ e produção de CO₂, H₂O, outros produtos bioquímicos e calor. Assim, desenvolvem-se gradientes dentro do biofilme, que, por exemplo, servem de força motriz para o O₂ se difundir da fase gasosa para as regiões mais profundas do biofilme e o CO₂ a difundir a partir destas regiões para a fase gasosa. A geração de calor (Q) conduz a um aumento rápido na temperatura (T), que é uma dificuldade técnica determinante durante a realização da FES. O calor é removido do

substrato por condução e evaporação, que são parte complexa do equilíbrio de água no sistema. Esse equilíbrio inclui a absorção da água pelo micélio durante o crescimento, o consumo de água durante as reações de hidrólise e da produção de água através da respiração. Em adição, a liberação de ácidos orgânicos e amônia pode alterar o pH local. Os produtos bioquímicos de interesse são liberados no interior da matriz sólida e os espaços cheios de líquido durante a fermentação, podem ser absorvidos pelo sólido podendo ser necessário extrair o produto, no final do processo de FES (HÖLKER e LENZ, 2005).

Figura 3 – Processos que ocorrem em microescala durante a fermentação em estado sólido (FES)



Fonte: Adaptado de Hölker e Lenz (2005)

A utilização dos fungos filamentosos na FES apresenta vantagens em relação a fermentação submersa (FSm), tais como: simulação do seu ambiente natural, o que resulta numa melhor adaptação ao meio e elevadas produções de bioprodutos; redução da contaminação bacteriana devido à ausência de água livre; obtenção de enzimas mais concentradas, uma vez que os extratos enzimáticos podem ser extraídos com pequenas quantidades de água (BIANCHI *et al.*, 2001). Além disso, enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo substrato, possuindo uma maior estabilidade

a variações de temperatura e pH (HÖLKER *et al.*, 2004). A Tabela 1 mostra algumas vantagens e desvantagens da FES em relação a FSm.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da fermentação em estado sólido (FES) em relação a fermentação submersa (FSm)

Vantagens	Desvantagens
Maior rendimento de enzimas em curto período de tempo	Dificuldades da ampliação de escala
Melhor aeração	Difícil controle dos parâmetros do processo (pH, Temperatura, Umidade, etc.)
Semelhança ao habitat natural dos fungos filamentosos	Problemas com a transferência de calor
Maior concentração final de produtos	
Maior estabilidade do produto	
Possibilidade de cultivo misto com vários fungos	
Menor geração de efluentes	
Tecnologia simples	
Maior conversão de lignocelulose	

Fonte: PANDEY *et al.* (2000); HOLKER *et al.* (2004)

Diferentes condições de cultura (FES ou FSm) resultam em diferentes formas de crescimento de fungos e, conseqüentemente, afetam a produção de enzimas. A influência do pH e da temperatura, tipo de meio nutriente, cultivos de culturas mistas, e tipo de biorreator têm sido investigados (MAHESHWARI *et al.*, 1994; FARINAS *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2012; DELABONA *et al.*, 2012a; DELABONA *et al.*, 2012b; VITCOSQUE *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2013; REHMAN *et al.*, 2014; BUSSAMRA *et al.*, 2015; FLORENCIO *et al.*, 2015). Delabona *et al.* (2013) investigaram o complexo enzimático produzido por *Aspergillus fumigatus* utilizando uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo na proporção em massa (1:1) com 72 horas de cultivo, e foram obtidas as atividades de endoglucanase (112,6 UI/g), FPase (5,0 FPU/g), betaglicosidase (38,04 UI/g) e xilanase (821,52 UI/g). Em continuação no interesse de utilização dos resíduos lignocelulósicos para fermentação em estado sólido, El-Shishtawy *et al.* (2015) compararam a produção enzimática de quatro espécies de *Trichoderma sp.*, *T. reesei*, *T. viride*, *T. harzianum* e *T. virens*, utilizando farelo de trigo pré-tratado com NaOH e obtiveram o melhor resultado para *T. virens* com produção de endoglucanase, xilanase e FPase de 123,26, 348 e 49,3 UI/g de sólido. Levando em conta todos os resultados já apresentados, a FES mostra-se

como um bom processo de produção de enzimas e pode ser uma tecnologia promissora para reduzir o custo dos bioprocessos.

2.3.1- Indutores na produção de celulases

Em vários estudos, celulose, lactose ou vários materiais lignocelulósicos foram utilizados no meio de cultivo como indutores para a produção de celulases e hemicelulases. A escolha do substrato indutor é um dos principais fatores que influenciam a produção dessas enzimas (SUKUMARAN *et al.*, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2010). Estudos de hidrólise enzimática da biomassa empregando diferentes coquetéis enzimáticos têm indicado que a utilização de substratos lignocelulósicos, em lugar de outros indutores comerciais, pode contribuir para a especificidade do coquetel enzimático e, com isso, melhorar a eficiência da hidrólise (DELABONA *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como indutor para a produção de celulases por linhagens fúngicas apresenta vantagens em relação a outros tipos de indutores. Além de serem indutores baratos para a produção enzimática, outro motivo faz com que a utilização de resíduos lignocelulósicos seja atrativa: o fato de que a escolha do substrato indutor afeta as características do coquetel enzimático produzido (DELABONA *et al.*, 2012b). Portanto, quando se trata de cultivos cujo objetivo é produzir enzimas para aplicação específica na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar na cadeia do etanol 2G, acredita-se que o uso do mesmo como substrato indutor irá favorecer o direcionamento das características do coquetel enzimático (YOON *et al.*, 2014).

Outra estratégia para aumentar a produção de enzimas é a utilização de substâncias indutoras para a produção de celulases. Celulose comercial amorfa (CMC) é considerada o melhor indutor para a produção de celulases, mas é um composto caro e também pode causar problemas operacionais e reológicos em biorreatores devido a sua viscosidade. A utilização de uma fonte de carbono solúvel, tal como lactose ou celobiose, permite menor custo de produção, maior controle da fermentação e simplifica a operação do processo (JANAS *et al.*, 2002).

2.3.1.1. Lactose

A lactose pode ser considerada como uma fonte de carbono renovável e, portanto, biotecnologicamente um importante substrato que é, principalmente, um subproduto da fabricação de queijo ou do processamento de soro de leite. Cerca de 300.000 toneladas de

lactose são produzidas por ano em todo o mundo, mas sua aplicação ainda é limitada em produtos alimentares (ROELFSEMA *et al.*, 2000), e grande parte do soro contendo lactose é descartada como resíduo, gerando graves problemas ambientais (SISO, 1996).

Alguns fungos filamentosos são capazes de metabolizar a lactose, e embora sua utilização seja lenta, processos industriais como a produção de penicilina pelo fungo *Penicillium chrysogenum* foram desenvolvidos empregando este açúcar (SWARTZ, 1985). Atualmente, a lactose é uma importante fonte de carbono para produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma reesei*, em processos onde se produz celulasas na concentração de até 100 g/L. O forte promotor das celulasas de *T. reesei*, induzido na presença de lactose, também tem sido usado para a produção de proteínas recombinantes (KUBICEK e HARMAN, 1998; PENTTILÄ *et al.*, 2004).

Apesar da lactose não estar presente no *habitat* natural de fungos produtores de celulasas, algumas espécies, como *T. reesei* por exemplo, são capazes de metabolizar esse açúcar e simultaneamente secretar celulasas. Segundo Ivanova e colegas (2013), a lactose deve mimetizar substâncias presentes no ambiente que sinalizam a disponibilidade de biomassa vegetal para o fungo. Outros mono e dissacarídeos, como sofrorose, xilobiore, D-xilose, e L-sorbose também são capazes de induzir a produção de celulasas (SEIBOTH *et al.*, 2005). Já a beta-galactosidase secretada por estes fungos, e que hidrolisa a lactose, deve na verdade ser produzida para hidrolisar os terminais não-redutores de resíduos de beta-D-galactose nos componentes da parede celular vegetal, incluindo hemiceluloses ou pectinas (GAMAUF *et al.*, 2007).

Nos fungos filamentosos, sabe-se que há duas vias possíveis para o catabolismo de lactose: (i) hidrólise extracelular e absorção subsequente dos monômeros resultantes; (ii) absorção do dissacarídeo e subsequente hidrólise intracelular (SEIBOTH *et al.*, 2007b). Já o mecanismo de indução da produção de celulasas pela lactose ainda não é bem compreendido. Sobre isso, os estudos encontram-se mais avançados para o fungo *Trichoderma reesei*, e para este microrganismo sabe-se por exemplo que, em cultivos com lactose, menores velocidades de crescimento (PAKULA *et al.*, 2005; KARAFFA *et al.*, 2006) e menores níveis de expressão de beta-galactosidase extracelular (SEIBOTH *et al.*, 2005) favorecem a produção de celulasas. Além disso, a atividade das enzimas galactoquinase (SEIBOTH *et al.*, 2004) e D-xilose redutase (SEIBOTH *et al.*, 2007a) também são importantes para a formação do indutor para expressão de celulasas. Mais recentemente foi identificada uma permease para lactose em *T. reesei* sem a qual o fungo não cresce em lactose e não produz celulasas,

sugerindo que a captação ou a presença intracelular e/ou metabolismo da lactose é essencial para a indução de celulases neste microrganismo (IVANOVA *et al.*, 2013).

Em *A. niger* ainda faltam estudos a esse respeito, já que o fungo não é capaz de se desenvolver utilizando apenas lactose como fonte de carbono. Entretanto, quando previamente cultivadas em outro substrato, as células de *A. niger* na forma de micélio são capazes de metabolizar lactose como fonte de carbono (FEKETE *et al.*, 2012a; FEKETE *et al.*, 2012b). Um fenótipo semelhante é observado para o caso da galactose, onde o fungo não se desenvolve porque o transportador de galactose é dependente do estágio de crescimento, não sendo produzido na fase de conidiósporo, mas sim na fase de micélio (FEKETE *et al.*, 2012a).

Na espécie relacionada *Aspergillus nidulans* foi identificada uma permease para lactose (*lacpA*) e uma beta-galactosidase intracelular (*bgaD*) (FEKETE *et al.*, 2012b). O *cluster* contendo os genes *bgaD/lacpA* foi perdido em *A. niger*, entretanto esta espécie produz uma beta-galactosidase extracelular (*lacA*) que lhe confere a capacidade de hidrolisar a lactose, e que inclusive já foi expressa em *S. cerevisiae* conferindo também às células recombinantes da levedura a capacidade de metabolizar esse açúcar (KUMAR *et al.*, 1992). Fekete e colaboradores (2012b) também detectaram a presença em *A. nidulans* de um mecanismo secundário de captação de lactose independente de *lacpA*, e também a capacidade de hidrolisar lactose em um mutante de *A. nidulans* cujo gene *bgaD* foi deletado, atribuindo essa capacidade a alguma outra enzima não identificada. Em *T. reesei* também não há genes para beta-galactosidase intracelular (família GH2), e especula-se que possa haver outra enzima com essa atividade ou que essa beta-galactosidase intracelular pertença a outra família (IVANOVA *et al.*, 2013). Dessa forma, verifica-se que o metabolismo da lactose ainda não está completamente elucidado em fungos filamentosos, mesmo para *T. reesei*, e no gênero *Aspergillus* trata-se ainda de um campo muito pouco estudado. Apesar disso, a capacidade dos micélios de *A. niger* crescerem em lactose, a presença de uma beta-galactosidase extracelular, e de todas as enzimas da via Leloir incluindo a galactoquinase (FEKETE *et al.*, 2012a), não excluem a possibilidade de que algum mecanismo de indução de celulases por lactose como o de *T. reesei* possa existir em *A. niger*. Além disso, o regulador XLNR da expressão de celulases em *A. niger* possui o análogo XYR1 em *T. reesei*, e para este último, verificou-se que o crescimento em lactose aumentou a expressão dos genes que codificam o XYR1 em 22 vezes (com relação ao crescimento em glicose), além de promover também a superexpressão de 63 genes de glicosil hidrolases e enzimas ou proteínas acessórias para a degradação de

biomassa vegetal (IVANOVA *et al.*, 2013), o que faz despertar o interesse sobre um possível efeito da lactose no regulador XLNR de *A. niger*, bem como no análogo AoXlnR de *A. oryzae*.

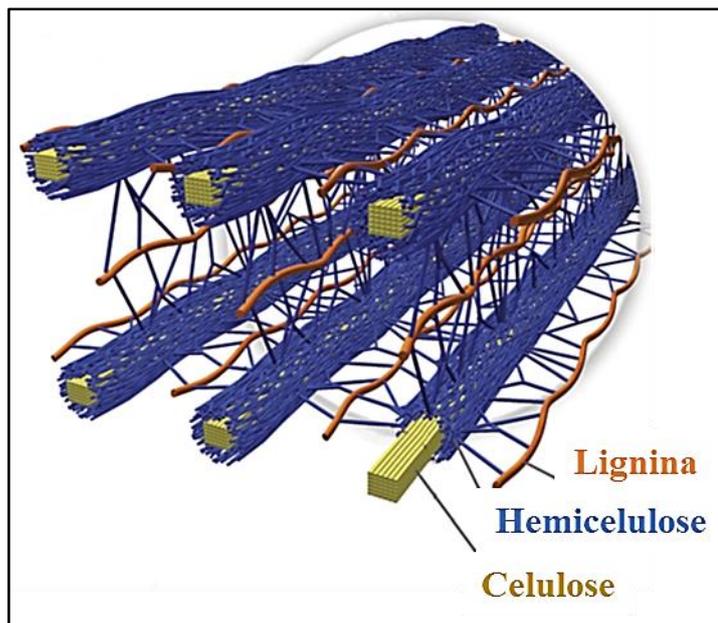
Para algumas espécies de fungos, bons resultados já foram obtidos a partir do uso da lactose como indutor de celulases: Morikawa *et al.* (1995) obtiveram resultados positivos para a indução da produção de celulases a partir da lactose para o *T. reesei* PC-3-7, onde foram medidas as atividades de endoglucanase de acordo com o consumo da lactose pelo fungo, e verificaram que a produção de endoglucanase aumentou significativamente após 24 horas, quando toda lactose foi consumida; El- Shishtawy e colaboradores (2015) também obtiveram um incremento na produção de enzimas utilizando lactose em cultivos realizados com *Trichoderma virens* em FES utilizando farelo de trigo como substrato; Fang *et al.* (2008) relataram que a lactose atua como um potente indutor de celulases em cultivos do fungo *Acremonium cellulolyticus*. Além destes exemplos, vale citar que o fungo *Trichoderma harzianum*, espécie utilizada neste trabalho, também é capaz de crescer em lactose e produzir celulases (MES-HARTREE *et al.*, 1988; HORTA *et al.*, 2014).

2.3.1.2. Resíduos lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, constituídos, essencialmente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre eles, destacam-se os materiais agroindustriais por possuírem características de resíduo, obtidos após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Os resíduos lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 4), mas, diferentes espécies de plantas produzem tipos de resíduos com diferenças nas proporções de suas composições, nos tipos de hemicelulose e as proporções de monômero na lignina (ZHAO *et al.*, 2012). Adicionalmente, são encontrados em diferentes graus, dependendo da origem, materiais como cinzas, proteínas e pectinas (SÁNCHEZ, 2009).

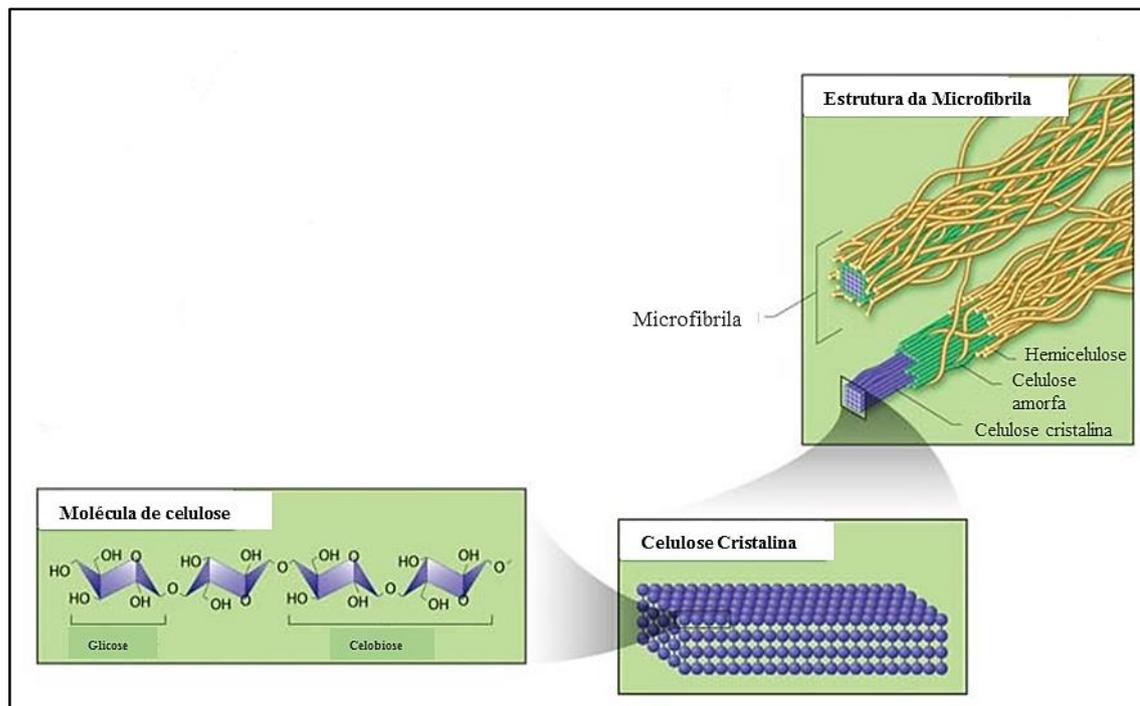
Figura 4 – Estrutura da parede celular de resíduos lignocelulósicos



Fonte: Adaptado de Brandt *et al.* (2013).

A celulose é o maior componente individual dos resíduos lignocelulósicos (BRANDT *et al.*, 2013) e é a molécula orgânica mais abundante na Terra (DASHTBAN *et al.*, 2009). Sua composição nesses resíduos encontra-se na faixa de 20 a 50% em base seca (CHUNDAWAT *et al.*, 2011). É um biopolímero linear constituído de centenas a milhares de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. As cadeias de celulose se agregam em microfibrilas por meio de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals. As microfibrilas de celulose cristalina são conectadas ordenadamente, são insolúveis e um desafio para a sacarificação enzimática (Figura 5) (HORN *et al.*, 2012). Mas, existem microfibrilas de celulose amorfas, ou seja, são menos ordenadas (ARANTES e SADDLER, 2011), menos resistentes a degradação, portanto mais susceptíveis a ação de enzimas celulolíticas quando comparadas às microfibrilas de celulose cristalina (MENON e RAO, 2012; GUTIERREZ-ROJAS *et al.*, 2015)

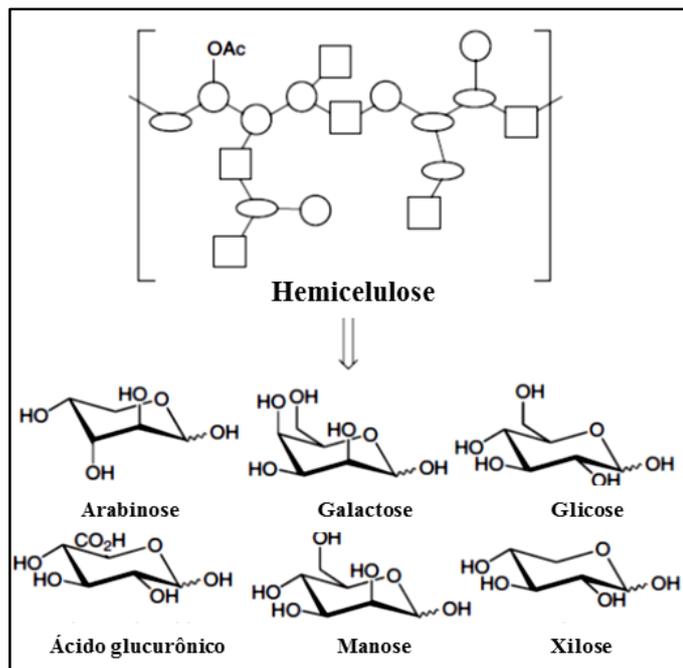
Figura 5 – Interação entre as moléculas de glicose nas microfibrilas de celulose cristalina



Fonte: Adaptado de U.S Department of Energy Genome Programs image gallery (2015)

A hemicelulose é o segundo maior componente individual dos resíduos lignocelulósicos, sendo formada por polímeros heterogêneos compostos por pentoses (5C – xilose e arabinose) e hexoses (6C – manose, glicose e galactose) e açúcares ácidos (monossacarídeos que possuem um grupo carboxila), como mostra a Figura 6 (SAHA, 2003; DASHTBAN *et al.*, 2009). Sua composição nesses resíduos encontra-se na faixa de 15 a 35% em base seca (CHUNDAWAT *et al.*, 2011). A hemicelulose é um polissacarídeo com menor massa molecular do que a celulose, altamente ramificado e seus açúcares são unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e/ou β -1,3 (SÁNCHEZ, 2009). Suas moléculas são hidrolisadas mais facilmente que a celulose devido às suas ramificações mas possuem algumas estruturas oligoméricas mais recalcitrantes (AGGER *et al.*, 2010). Logo, a presença de enzimas como a xilanase é importante no processo de sacarificação de materiais lignocelulósicos (HORN *et al.*, 2012).

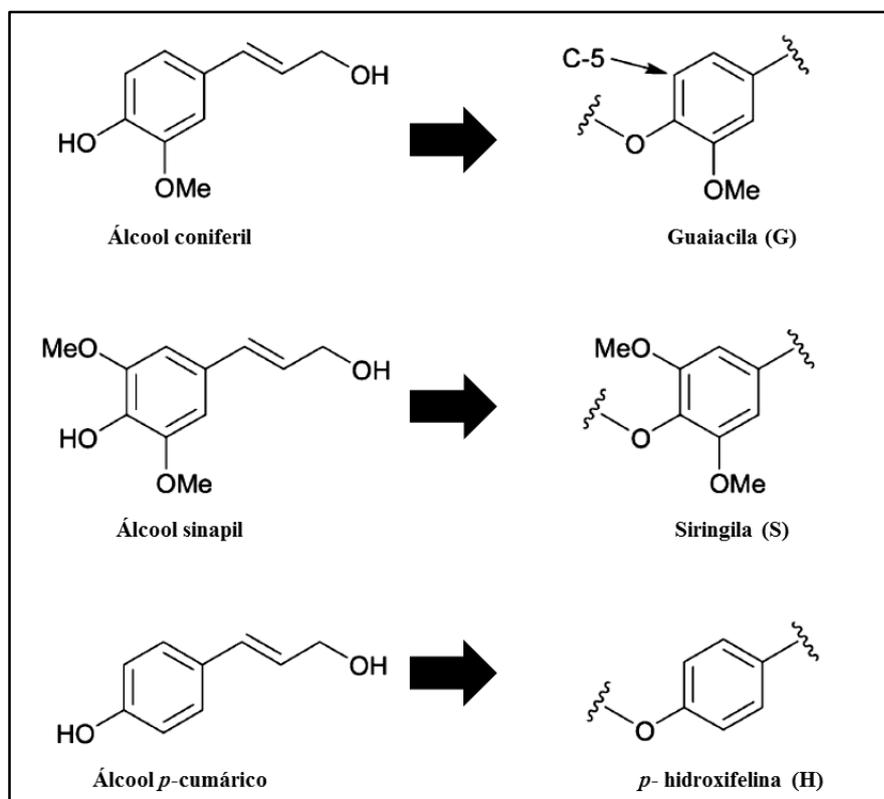
Figura 6 – Molécula de hemicelulose e seus monômeros constituintes



Fonte: Adaptado de Verendel, Church & Andersson (2011).

A lignina é o terceiro maior componente presente nos resíduos lignocelulósicos (DASHTBAN *et al.*, 2009). É um polímero heterogêneo, aromático e relativamente hidrofóbico composto por três monolignóis diferentes (álcool coniferil, sinapil e *p*-cumárico), como mostra a Figura 7. Esses monolignóis estão incorporados à lignina sob a forma de guaiacila (L), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H), respectivamente. A quantidade desses monolignóis varia dependendo da biomassa (SÁNCHEZ, 2009; HORN *et al.*, 2012). É a macromolécula mais recalcitrante entre os três maiores biopolímeros presentes nos resíduos lignocelulósicos devido a sua aromaticidade, heterogeneidade estrutural e extensas ligações cruzadas carbono-carbono (CHANG, 2007). Também pode produzir compostos inibidores (como por exemplo, ácido vanílico e o aldeído sinringila) da hidrólise enzimática e organismos fermentadores (BRANDT *et al.*, 2013). A lignina mantém a matriz lignocelulósica coesa ligando hemicelulose e celulose, e age como uma barreira resistente à degradação (DASHTBAN *et al.*, 2009). Logo, a conversão de resíduos lignocelulósicos depende de procedimentos eficazes e economicamente viáveis para remover ou modificar a lignina (MENON e RAO, 2012).

Figura 7 – Três álcoois precursores e seus respectivos monolignóis sintetizadores da lignina



Fonte: Adaptado de Brandt *et. al.* (2013)

2.3.1.3. Farelo de Trigo

O trigo é uma gramínea do gênero *Triticum* (ABITRIGO, 2015) e é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativo peso na economia agrícola global. Os principais resíduos do processamento do trigo são a palha de trigo e o farelo de trigo que é um subproduto da moagem dos grãos. Cada milhão de toneladas de grão de trigo moído gera 250 mil toneladas de farelo de trigo (KHAN e MUBEEN, 2012).

O farelo de trigo é rico em carboidratos (60%), proteínas (12%), gorduras (0,5%), minerais (2%), compostos bioativos e vitaminas. Este resíduo também contém vários compostos importantes, tais como ácidos fenólicos, carotenoides, lignanas, fitoesteróis, flavonoides, α -tocoferol e ácido fítico. É um coproduto agroindustrial de grande interesse nas indústrias de produtos biotecnológicos, pois é uma das alternativas mais atrativas para substituir os meios sintéticos nos processos fermentativos, devido sua boa dissipação de calor, facilidade de circulação de ar entre as partículas e uma efetiva penetração do micélio fúngico no meio, além de ser um substrato de baixo custo, o que torna elevado o seu potencial de uso. Além disso, atualmente o farelo de trigo tem sido utilizado como biorremediador para a

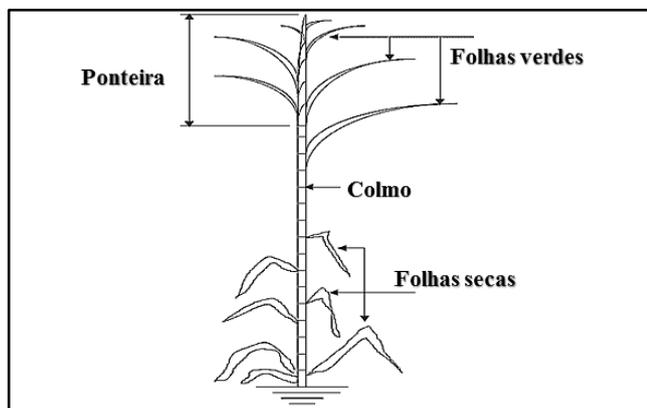
remoção de íons de metais pesados de zonas industriais para descontaminação e reabilitação de águas residuais industriais; e também como alimento e aditivos alimentares (JAVED *et al.*, 2012).

2.3.1.4. Bagaco de cana-de-açúcar

Um dos cultivos comerciais de maior importância em todo o mundo, a cana-de-açúcar ocupa mais de 26,9 milhões de hectares, nos quais foram produzidos mais de 1.900 milhões de toneladas em 2013 no mundo, com destaque para o Brasil, que, com uma área plantada de 8,9 milhões de hectares, respondeu por 42% do total produzido na safra mencionada (FAO, 2015). Espera-se um processamento de 655 milhões de toneladas em 2015/2016, o que irá resultar em uma produção de etanol de aproximadamente 29 bilhões de litros e uma produção de açúcar de aproximadamente 37 milhões de toneladas (CONAB, 2015). É importante notar que o ano açucareiro internacional começa em setembro e termina em agosto do ano seguinte.

A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas ponteiros e folhas (verdes e secas), que constituem o palhiço da cana-de-açúcar, como mostrado na Figura 8 (HASSUANI *et al.*, 2005). O colmo da cana é o caule da planta que é moído para obtenção de um suco que é posteriormente utilizado para a produção de açúcar (sacarose) ou de álcool (etanol). Bagaço é o resíduo que decorre após a extração do suco. Palhiço (ou também, simplesmente conhecido por palhada) é composto por folhas verdes, folhas secas e ponteiros. As folhas verdes estão junto com a ponteira, as folhas secas estão presentes na parte inferior da cana-de-açúcar e possuem cor amarelada ou marrom (TRIANA *et al.*, 1999).

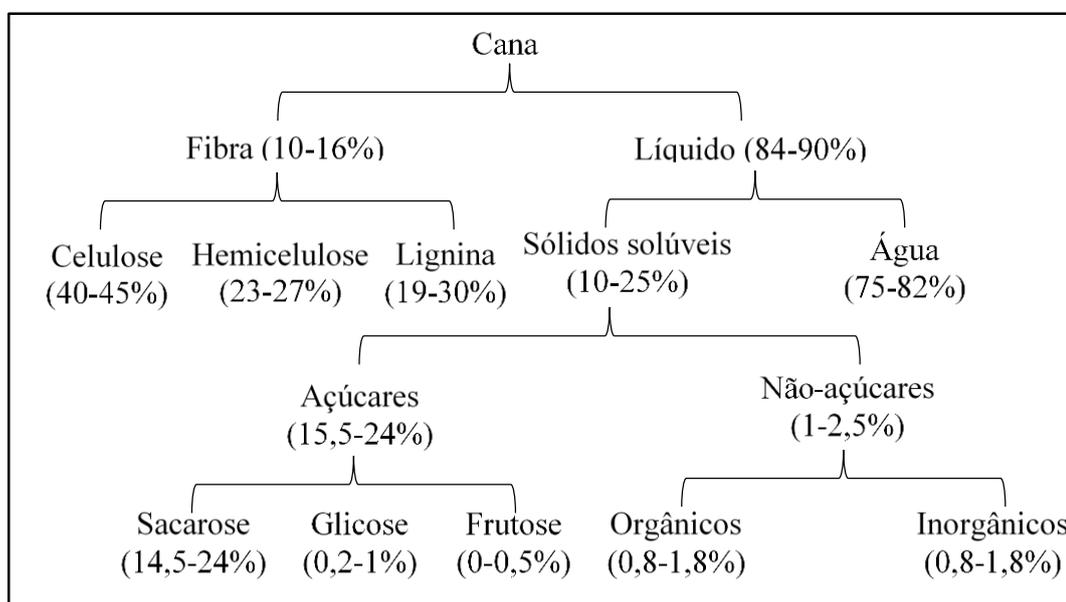
Figura 8 – Estrutura típica da biomassa da cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de Hassuani *et al.* (2005).

Fisicamente, a cana é constituída por quatro grandes frações: fibras, sólidos insolúveis, sólidos solúveis e água, como podem ser observados na Figura 9. A fibra é composta por todo o material orgânico presente na fração sólida (celulose, hemicelulose e lignina), e é caracterizada pela sua heterogeneidade. A fração de sólidos insolúveis é constituída principalmente por substâncias inorgânicas (pedras, solo e matérias estranhas), e é fortemente influenciada pelas condições de processamento da cana, tipos de corte e colheita. A fração de sólidos solúveis é composta principalmente de sacarose, bem como outros componentes químicos, em uma proporção menor (TRIANA *et al.*, 1999).

Figura 9 – Composição geral da cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de Canilha *et al.* (2012).

Na indústria de cana-de-açúcar, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos (bagaço e palhada) são gerados durante a produção de etanol e de açúcar. A moagem da cana para extrair o suco gera o bagaço. Neste processo, cada tonelada de cana processada gera 140 kg de bagaço em base seca. Em instalações mais modernas da indústria de cana, o bagaço é utilizado como combustível, isto é, ele é queimado em caldeiras para atender às demandas de energia da planta industrial, e a energia elétrica excedente pode ser vendida para a rede (PEREIRA *et al.*, 2015).

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido estudado para aplicações industriais diversas, incluindo a produção de etanol. Teoricamente, uma única tonelada de bagaço poderia produzir 300 L de etanol, mas a produção e rendimento de etanol pode variar dependendo das

condições utilizadas no processo (CERQUEIRA LEITE *et al.*, 2009). Além disso, o bagaço também vem sendo utilizado para a produção de enzimas industriais tais como xilanases e celulases por bactérias e fungos, empregando a fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm) (CHANDEL *et al.*, 2012).

O xilitol é uma pentose de alto valor agregado que pode ser produzido utilizando o bagaço de cana-de-açúcar para uma fermentação microbiana visando atender a alta demanda da indústria alimentícia e farmacêutica. O bagaço também tem sido utilizado para a produção de uma variedade de ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucônico, etc.) utilizando diferentes técnicas de cultivo e uma variedade de microorganismos. Além de etanol, enzimas, xilitol, e ácidos orgânicos, bagaço de cana-de-açúcar tem sido empregado para fabricação de outros produtos de alto valor agregado, tais como antibióticos, alimentos para animais, biohidrogênio, alcalóides, pigmentos e para a síntese de diversos materiais nanométricos (CHANDEL *et al.*, 2012).

2.4- Fungos filamentosos

Os fungos são microrganismos pertencentes ao filo *Eumycota* e podem ser classificados como fungos filamentosos, leveduras e cogumelos (HAGESKAL *et al.*, 2009). O reino *Fungi* é heterogêneo com um amplo potencial de aplicação em pesquisas de microbiologia aplicada. Os fungos são microrganismos eucariotos heterotróficos e dependem da disponibilidade de nutrientes em seu meio ambiente, podem viver como saprófitos, parasitas ou simbioses, e absorvem nutrientes a partir de substratos mortos ou de seres vivos. As espécies variam de simples (unicelulares - leveduras) a complexos (pluricelulares - fungos filamentosos) (OSIEWACZ, 2002).

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados na produção de enzimas industriais, apresentam potencial aplicação em indústrias alimentícias, têxteis, de papel, combustíveis entre outras e exibem características modelo para tais aplicações. Destacam-se, dentre essas características, a capacidade e facilidade de cultivo, a produção de grande quantidade de enzimas e o baixo custo de produção (IWASHITA, 2002; LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011). Os gêneros mais utilizados para essas aplicações são *Aspergillus* e *Trichoderma* (DE VRIES e VISSER, 2001; ARO *et al.*, 2005).

O gênero *Aspergillus* possui um grande número de espécies (BLUMENTHAL, 2004). Uma primeira classificação deste fungo foi proposta em 1926 descrevendo 11 grupos dentro do gênero. Reexaminando o gênero, identificou-se 14 grupos distintos. Alguns desses

grupos consistem de fungos patogênicos (por exemplo: *A. fumigatus*, *A. flavus*, e *A. parasiticus*), mas os mais importantes para aplicações industriais são os membros do grupo *Aspergilli* preto (*A. niger* e *A. tubingensis*). Esse gênero possui uma série de características que os fazem bons para aplicações industriais, tais como boa capacidade de fermentação e níveis elevados de secreção de proteínas (DE VRIES e VISSER, 2001).

O gênero *Trichoderma* é constituído por fungos de vida livre, sendo comuns em solos e raízes. Descobertas recentes revelaram que eles são microrganismos oportunistas, simbiontes de plantas e também parasitas de outros fungos. Pelo menos algumas cepas estabelecem colonizações robustas, de longa duração e de superfícies radiculares (HARMAN *et al.*, 2004). O *Trichoderma reesei* foi isolado pela primeira vez a partir de um tecido de algodão durante a Segunda Guerra Mundial (PETERSON e NEVALAINEN, 2012). Oito pesquisadores liderados pelo Dr. Reese, conduziram experimentos nas forças armadas dos Estados Unidos e obtiveram uma linhagem codificada como QM6a e posteriormente identificada como *Trichoderma viride* (MANDELS e REESE, 1957). Mais tarde, essa linhagem recebeu o nome de *Trichoderma reesei* em homenagem ao Dr. Reese. Existem inúmeros mutantes originados do *Trichoderma reesei* QM6a selvagem com alta produtividade de celulases (PETERSON e NEVALAINEN, 2012). O *Trichoderma reesei* mutante RUT-C30 é uma das cepas mais amplamente utilizadas para a produção de enzimas celulolíticas e proteínas recombinantes (LE CROM *et al.*, 2009; PETERSON e NEVALAINEN, 2012).

2.5- Cocultivo de fungos filamentosos

Fermentações de cultura mista ou cocultivos são aquelas em que o inóculo consiste em dois ou mais microrganismos e são amplamente utilizados em muitos processos, incluindo a produção de antibióticos, enzimas, vários tipos de alimentos fermentados, compostagem, bioconversão, destilaria e outros bioprodutos (CASTILLO *et al.*, 1994). A utilização dessa técnica tenta reproduzir a situação ecológica onde microrganismos sempre coexistem dentro de comunidades microbianas complexas. A competição ou antagonismo experimentado durante a cocultura é utilizado para aumentar significativamente a produção dos compostos constitutivamente presentes e/ou a um acúmulo de compostos críticos que não são detectados em monoculturas (MARMANN *et al.*, 2014). Assim, o cultivo misto de fungos celulolíticos é uma alternativa para a produção de celulases (MAHESHWARI *et al.*, 1994).

Ainda em relação às características das enzimas aplicadas na conversão da biomassa vegetal, uma estratégia potencial para melhorar a eficiência dos coquetéis enzimáticos é pela

combinação de extratos de diferentes espécies de fungos a fim de se obter formulações enzimáticas que não são deficientes em qualquer uma das enzimas individuais necessárias para a degradação completa e eficiente da biomassa vegetal. Nesse sentido, Castillo *et al.* (1994) produziram enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas utilizando fermentação em estado sólido e cocultivo de *Trichoderma reesei* LM-1 (inoculado 0 horas) e *Aspergillus niger* ATCC 10864 (inoculado após 48 horas de cultivo), onde atingiram 4 UI/g de celulasas e 180 UI/g após 120 horas de cultivo. Gutierrez-Correa *et al.* (1999) produziram enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas utilizando fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com farelo de soja ou com sulfato de amônio e ureia com cocultivo de *Trichoderma reesei* LM-UC4E1 e *Aspergillus niger* ATCC 10864, onde o cultivo misto produziu melhores resultados com o suplemento inorgânico, 66,8 UI/g de FPase, 586,4 UI/g de endoglucanase e 98,6 UI/g de betaglicosidase. O trabalho de Ikram-ul-Haq *et al.* (2006) descreveu a produção de enzimas celulolíticas (endoglucanase, FPase) e hemicelulolíticas (xilanase) utilizando farelo de trigo como substrato da fermentação submersa com cocultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*, e o cocultivo resultou em 30-50% maior produção de endoglucanase (2,79 UI/mL), FPase (1,75 UI/mL) e xilanase (189,7 UI/mL) em comparação com as monoculturas. Kolasa *et al.* (2014) realizaram cocultivos de *T. reesei* com *A. saccharolyticus*, *A. carbonarius* e *A. niger* em FES com farelo de trigo (25,6%) e esfagno (15,4%) como substrato e os extratos foram analisados pela eficiência na hidrólise de palha de trigo pré-tratados; coquetéis enzimáticos obtidos a partir de culturas mistas mostraram-se competitivos com os extratos misturados das monoculturas correspondentes.

2.6- Estratégias para simplificação do processo de produção de etanol 2G

Usualmente, o processo para a produção de etanol 2G começa com um pré-tratamento (termoquímico ou físico) para hidrolisar parte da hemicelulose da biomassa, é continuado por uma hidrólise enzimática, e, finalmente, a fermentação dos açúcares. Todas estas etapas são tecnologias em desenvolvimento, e por isso novas abordagens são sempre focadas para aumentar a eficiência e reduzir os custos correspondentes (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015).

Durante a produção de etanol lignocelulósico, além do pré-tratamento, tanto a sacarificação como também a fermentação são fatores principais e determinantes no processo (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015). Despolimerizar a biomassa lignocelulósica em açúcares simples é um processo complexo, que inclui a hidrólise da pectina, a degradação da

lignina, a despolimerização da hemicelulose e a hidrólise da celulose (HORN *et al.*, 2012). O custo do pré-tratamento e da hidrólise são responsáveis por cerca de dois terços do custo total da produção, sendo que a hidrólise enzimática pode custar ainda mais devido ao custo das enzimas (HIMMEL *et al.*, 2007). Esse problema poderia ser superado através da produção de enzimas *in-house*, uma vez que isso possibilita uma menor necessidade de estabilizar os preparados enzimáticos, evitando também os custos associados com o transporte e armazenamento em longo prazo (KOVACS *et al.*, 2009; SORENSEN *et al.*, 2011; DELABONA *et al.*, 2012a).

O sistema de bioprocessamento consolidado (BPC) é atualmente, a abordagem mais promissora para produção de etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica e tem sido investigado cada vez mais nos últimos anos. No entanto, encontra-se em fase inicial de implementação industrial. No BPC, todos os processos, incluindo a produção de enzimas, sacarificação enzimática e a fermentação dos açúcares acontecem simultaneamente (PARISUTHAM *et al.*, 2014). Durante a última década, vários tipos de microrganismos selvagens e geneticamente modificados têm sido propostos para aplicação no BPC (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015).

Embora a produção de etanol 2G encontre muitos desafios e ainda esteja em desenvolvimento, durante a última década algumas empresas produtoras de etanol têm focado na produção comercial de etanol a partir de materiais lignocelulósicos usando o bioprocessamento consolidado (BPC). Os pioneiros desta revolução foram as companhias Qteros e Mascoma. A Mascoma é atualmente a única grande indústria que utiliza a tecnologia BPC, mas uma série de outras empresas como a DSM POET, Abengoa e LanzaTech estão se esforçando para produzir quantidades comerciais de etanol 2G (JOUZANI e TAHERZADEH, 2015).

No Brasil, as empresas que possuem plantas produtoras de etanol lignocelulósico são a GranBio, o CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e a Raízen. A GranBio foi criada em junho de 2011 e opera a primeira planta em escala comercial de etanol 2G do hemisfério sul. A fábrica - batizada de Bioflex 1 - está em funcionamento desde setembro de 2014 em Alagoas, e a produção do biocombustível é feita com palha e bagaço de cana-de-açúcar. O CTC possui um projeto em desenvolvimento por meio de parceria com as empresas Novozymes e Andritz, sendo que a primeira planta em escala semi-industrial está funcionando desde 2014, com previsão para aumento de escala (produção comercial) até 2018. A Raízen

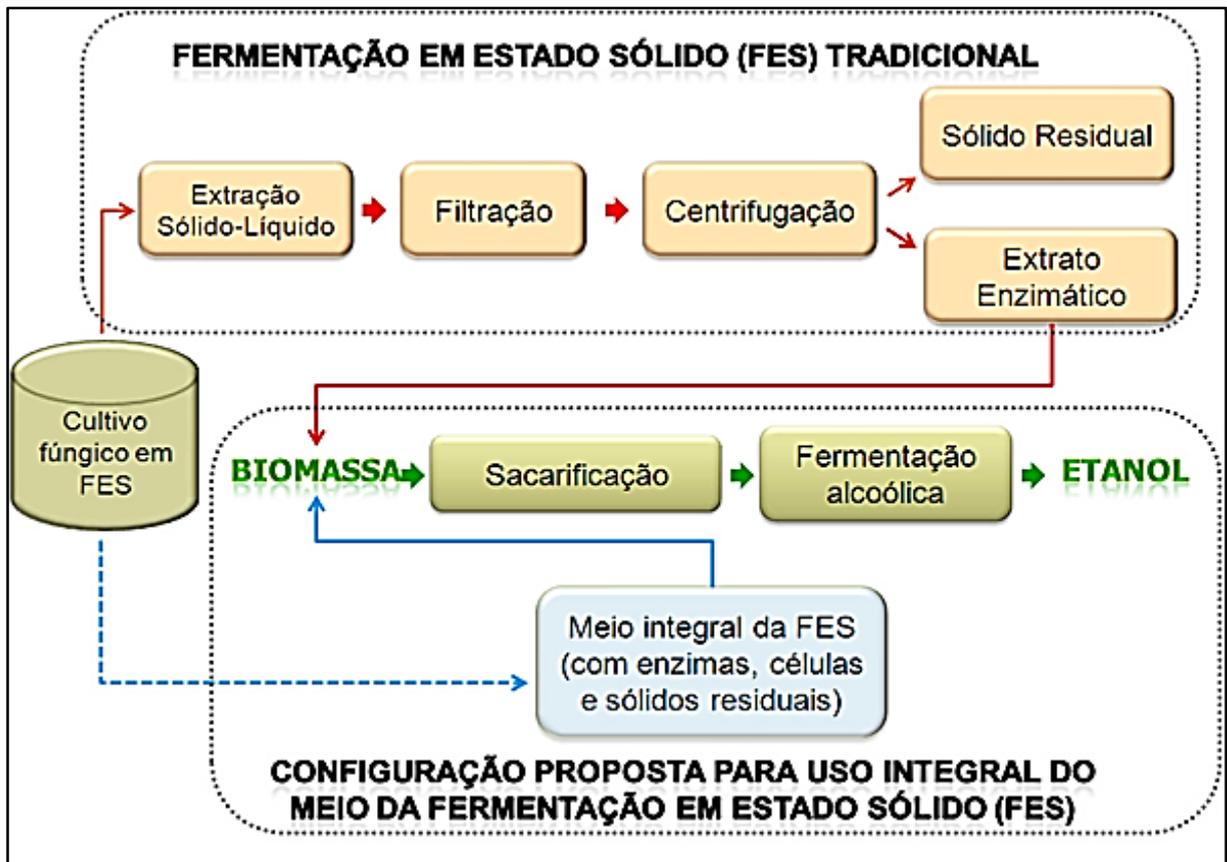
iniciou a operação da sua primeira planta industrial para a fabricação do biocombustível em escala comercial em novembro de 2014.

Tecnologias utilizadas no BPC como a melhoria da eficiência dos coquetéis enzimáticos pela combinação de extratos diferentes a fim de se obter formulações enzimáticas que não são deficientes em qualquer uma das enzimas individuais necessárias para a degradação completa e eficiente da biomassa vegetal vem sendo intensamente pesquisadas (PIROTA *et al.*, 2013a; KOLASA *et al.*, 2014; BUSSAMRA *et al.*, 2015). Outras estratégias também aplicadas são: a utilização de substâncias indutoras como a lactose (MORIKAWA *et al.*, 1995; SEIBOTH *et al.*, 2007b; KUBICEK *et al.*, 2009; EL-SHISHTAWY *et al.*, 2015) e o cocultivo de fungos filamentosos (CASTILLO *et al.*, 1994; GUTIERREZ-CORREA *et al.*, 1999; MASSADEH *et al.*, 2001; IKRAM UL *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2012; KOLASA *et al.*, 2014).

O uso da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas industriais tem recebido uma atenção intensa e crescente nos últimos 20 anos, pois pode ser facilmente incluída no bioprocessamento consolidado (BPC) e apresenta vantagens inerentes a este sistema de cultivo (SINGHANIA *et al.*, 2010; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; YOON *et al.*, 2014). Vários estudos têm descrito o potencial do uso da FES para a produção das enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa vegetal (TENGERDY e SZAKACS, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2010; SINGHANIA *et al.*, 2015). No entanto, esses processos ainda exigem que as enzimas produzidas sejam extraídas para a produção do extrato enzimático. Uma possível estratégia para diminuir custos de processo e evitar geração de resíduos seria a utilização de todo o meio de cultivo da FES, na etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica como mostra a Figura 10. Conceitualmente, este processo pode ser efetuado em um único reator, evitando a necessidade de etapas de separação adicionais (PIROTA, 2014; SINGHANIA *et al.*, 2015).

Essa estratégia inovadora para a simplificação do processo de conversão de biomassa já foi estudada e desenvolvida por pesquisadores do Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação em colaboração com a Universidade Federal de São Carlos e os resultados foram bastante promissores (PIROTA *et al.*, 2013a; PIROTA *et al.*, 2014). Assim, a utilização de um bioprocessamento consolidado simplificado para a conversão de biomassa usando enzimas produzidas *in-house* têm se mostrado potencialmente interessante.

Figura 10 – Ilustração esquemática proposta do processo simplificado de conversão de biomassa em etanol



Fonte: Pirota (2014)

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi o estudo das etapas de produção de (hemi)celulases por FES e sua utilização na forma de meio fermentado integral para sacarificação da biomassa e posterior fermentação, dentro do contexto de um bioprocessamento consolidado para produção de etanol 2G.

3.2- Objetivos Específicos

- Realizar o estudo da seleção das condições da FES: a adição de farelo de trigo e lactose (indutores) e o tempo de cultivo;
- Realizar os cultivos em FES seguidos da etapa de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral para os fungos (*Aspergillus niger* 3T5B8, *Aspergillus oryzae* P6B2, *Trichoderma reesei* RUT-C30 e *Trichoderma harzianum* P49P11) cultivados isolados e em cocultivo (perfazendo um total de dez combinações);
- Realizar a etapa de hidrólise com o meio integral da FES avaliando parâmetros operacionais (pH, temperatura e agitação) e a adição de aditivos;
- Avaliar a atuação dos aditivos na etapa de hidrólise com o MFI da FES;
- Realizar a fermentação alcoólica para avaliar o processo global de integração para a melhor condição do conjunto cultivo/hidrólise.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Substrato

O substrato sólido da fermentação é o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) cedido por usinas locais e lavado à temperatura de 50 °C até pH 7 (BEX_L). Estes mesmos materiais foram utilizados também na etapa de HE. Ainda, foi utilizado o farelo de trigo (adquirido na Claro Agropecuária, São Carlos-SP, Brasil) como indutor da FES em combinação com o bagaço de cana pré-tratado nas proporções em massa BEX_L:FARELO de (1:1).

4.2- Microrganismos

Os agentes dos cultivos para a produção das enzimas foram quatro microrganismos (*Aspergillus niger* 3T5B8, *Aspergillus oryzae* P6B2, *Trichoderma harzianum* P49P11) depositados na coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ) e uma linhagem de *Trichoderma reesei* RUT-C30 adquirida da CABI (NúmeroIMI: 345108). Na etapa de fermentação alcoólica foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento biológico seco instantâneo Fleischmann).

4.3- Meio de Mandels

O meio de Mandels está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do Meio de Mandels (modificado pela adição de lactose)

MEIO DE MANDELLS Substância	Concentração (g/L)
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1,4
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	2,0
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0,3
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,2
Peptona	5,0
Extrato de levedura	2,0
Ureia	0,3
Tween 80	1,0
Solução de sais	1,0
Lactose	5,0

A Solução de sais está descrita na Tabela 3

Tabela 3 – Composição da solução de sais

SOLUÇÃO DE SAIS Substância	Concentração (g/L)
Sulfato de zinco (ZnSO ₄)	0,0014
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,005
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,002
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .6H ₂ O)	0,0016

4.4- Métodos

4.4.1- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX)

A caracterização das biomassas (BEX_L e BEX) foi realizada de acordo com o procedimento validado por Gouveia *et al.* (2009). Pesou-se 1 grama em base seca da amostra pré-tratada em béquer de 100 mL, sendo posteriormente mantido em banho termostaticado a 45 °C. Adicionou-se 5 mL da solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 72% (m/m)) previamente termostaticado a 45 °C. Em seguida, procedeu-se uma agitação vigorosa por 7 minutos. A reação foi interrompida com 25 mL de água destilada à temperatura ambiente e a mistura foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, o béquer foi lavado com 100 mL de água destilada, de maneira a garantir que não tenha permanecido nenhum resíduo da amostra. A mesma foi imediatamente autoclavada a 121 °C por 30 minutos. A fração sólida foi separada da líquida por filtração. Uma alíquota da fração líquida foi retirada para análise de açúcares, ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, além de lignina solúvel. A fração do sólido residual foi exaustivamente lavada com água destilada para retirar qualquer resíduo ácido para posterior etapa de determinação de lignina insolúvel.

Determinação de lignina insolúvel na fração sólida:

O resíduo pós-lavagem completamente seco foi calcinado para a obtenção da massa de cinzas. O teor de lignina insolúvel na fração sólida foi determinado pela Equação 1.

$$L_i = \frac{M_k + M_c}{M_A} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde:

L_i = lignina insolúvel;

M_k = massa de resíduo insolúvel seco;

M_c = massa de cinzas;

M_A = massa da amostra seca.

Determinação de lignina solúvel na fração líquida:

Uma alíquota de 5 mL da fração líquida previamente armazenada foi transferida para um balão de 100 mL. Adicionou-se 6 gotas de NaOH 6,5 M e completou-se o volume do

balão. Efetuou-se a leitura da absorbância em 280 nm. O teor de lignina solúvel na fração líquida foi determinado pela Equação 2.

$$C_{lig} = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (2)$$

Onde:

C_{lig} = concentração de lignina solúvel;

A_T = absorbância da solução a 280 nm;

$A_{pd} = c_1\varepsilon_1 + c_2\varepsilon_2$, absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde $\varepsilon_1 = 146,85$ L/g.cm e $\varepsilon_2 = 114,00$ L/g.cm, são as absorvidades molares de furfural e HMF, respectivamente.

Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) na fração líquida

A determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Previamente, todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μ m. Para a construção da curva de calibração dos carboidratos, dos ácidos orgânicos e do etanol, foram utilizadas soluções contendo os padrões de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico e etanol. As condições de análise foram: coluna Varian Metacarbon 87H PNA 52 (300 x 7,8 mm); fase móvel: H₂SO₄, 0,005 mol.L⁻¹; fluxo de 0,6 mL.min⁻¹; temperatura do forno: 50 °C e detector de índice de refração em cromatógrafo líquido da Varian (Dual ProStar 210).

As análises de furfural e de hidroximetilfurfural também foram igualmente realizadas por CLAE. Previamente, todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μ m. Da mesma forma, para a construção das curvas de calibração de furfural e de HMF, foram injetadas soluções contendo estes dois compostos padrões. As condições das análises foram: coluna Varian Microsorb C-18 MV100-5 (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL.min⁻¹; detector UV/VIS a 274 nm; temperatura do forno a 25 °C, em cromatógrafo líquido (Dual ProStar 210).

Ao determinar carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF, é possível calcular os teores de celulose e de hemicelulose utilizando os seguintes fatores de conversão:

- Celulose = 0,90 x massa de glicose + 0,95 x massa de celobiose + 1,20 x massa de HMF + 3,09 x massa de ácido fórmico
- Hemicelulose = 0,88 x massa de xilose + 0,88 x massa de arabinose + 0,72 x massa de ácido acético + 1,37 x massa de furfural

Determinação de cinzas

O material seco foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado. Assim, calcinou-se a amostra lentamente até 300 °C e mais 2 horas a 800 °C em mufla (a rampa da mufla é mostrada na Tabela 4).

Tabela 4 – Programação da rampa utilizada na mufla para calcinar as amostras

T (°C)	V (°C/min)	t (min)
300	5	10
800	20	120
100	20	9000

O teor de cinzas totais foi determinado segundo a Equação 3.

$$\%cinzas = \frac{M_c}{M_a} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

% cinzas = percentual em massas de cinzas;

M_c = massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);

M_a = massa da amostra em base seca.

4.4.2- Cultivo em fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi inicialmente conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato sólido. Primeiramente foi avaliada a produção enzimática em BEX_L e combinações de bagaço e farelo de trigo (com proporções em massa (BEX_L:FARELO) de: (1:0), (1:3), (1:1), (3:1) e (0:1)) pelo fungo *A. niger* 3T5B8. O material devidamente esterilizado foi inoculado com 10⁷ esporos/g e após a inoculação dos esporos foi adicionada aos frascos a solução nutriente (Mandels & Weber, 1969) até a obtenção de uma umidade de 70% (Pirota et al., 2013). A incubação foi feita em estufa na temperatura de 32 °C por 72 horas. Uma

primeira etapa foi avaliar as proporções em massa do farelo de trigo como indutor: diferentes proporções em massa de (BEX_L:FARELO) de (0:1); (1:0); (1:1); (1:3) e (3:1) foram avaliadas sempre respeitando a massa final de substrato de 5 g. A segunda etapa do trabalho foi avaliar a adição de lactose em diferentes concentrações após a definição da melhor proporção em massa de (BEX_L:FARELO). A Tabela 5 mostra um resumo das condições experimentais.

Tabela 5 – Resumo das condições experimentais avaliadas

	Proporções em massa			Lactose (g/g de substrato)
	BEX _L	Farelo de trigo		
1ª ETAPA	0 (0,00 g)	1 (5,00 g)	2ª ETAPA	-
	1 (5,00 g)	0 (0,00 g)		-
	1 (2,50 g)	1 (2,50 g)		0/0,075/0,15/0,225
	1 (1,25g)	3 (3,75 g)		-
	3 (3,75 g)	1 (1,25 g)		-

Após o período correspondente, foram adicionados ao material fermentado 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, sendo o meio homogeneizado e posteriormente agitado por 40 minutos em mesa incubadora rotativa, a 32 °C e 120 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 rpm durante 20 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Uma vez selecionado a proporção em termos dos substratos sólidos (BEX_L:FARELO) que resultou em uma melhor produção enzimática, esse mesmo procedimento foi realizado com os outros três fungos (*A. oryzae* P6B2, *T. harzianum* P49P11 e *T. reesei* RUT-C30) em cultivos individuais e em cocultivos (perfazendo um total de dez combinações). Todos os experimentos de cultivo foram efetuados em triplicatas e os dados foram calculados como médias ± desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância para comparação das médias, empregando o software OriginPro 8.

4.4.3- Cultivo em FES seguido da hidrólise enzimática com meio fermentado integral (MFI)

O cultivo em FES nas condições pré-selecionadas proporções em massa (BEX_L:FARELO) de: (1:1) e adição de lactose 0,075 g/g, foi realizado para as dez combinações dos quatro fungos (*A. niger* 3T5B8, *A. oryzae* P6B2, *T. harzianum* P49P11 e *T. reesei* RUT-C30) em cocultivo (dois a dois) bem como para o cultivo de cada um dos fungos isoladamente. No entanto, nesta etapa, a extração foi eliminada e após o tempo de cultivo

selecionado de 48 horas, o meio fermentado integral foi adicionado ao material lignocelulósico (bagaço pré-tratado por explosão a vapor - BEX) que foi hidrolisado enzimaticamente, conforme descrito por Pirota *et al.* (2013a) e resumido a seguir. A etapa de hidrólise foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 5 g de BEX e 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 em câmara incubadora com agitação orbital. O BEX foi aclimatizado a 50 °C durante 12 h a 200 rpm com 90 mL de tampão. Após a aclimatização, o material fermentado foi adicionado ao BEX, adicionou-se mais 10 mL de tampão e estes foram incubados a 50 °C durante 36 h a 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 0, 6, 12, 24 e 36 horas para quantificação de glicose (Kit enzimático - Laborlab, São Paulo, Brasil) e açúcares redutores totais (Miller, 1959). Para todas as condições, foi realizado um controle contendo somente o BEX e outro contendo apenas o meio fermentado. Foi feita também a comparação de eficiência na hidrólise entre o extrato enzimático bruto extraído (50 mL) e o MFI da melhor condição de hidrólise obtida (cocultivo de *A. oryzae* P6B2 com *T. reesei* RUT-C30). Quando a hidrólise foi realizada com extrato enzimático bruto, apenas 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, foi adicionado ao BEX para aclimatização. Todos os experimentos de hidrólise foram realizados com adição de azida de sódio 0,1% (m/v), sendo efetuados em triplicatas e os dados foram calculados como médias \pm desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância para comparação das médias, empregando o software OriginPro 8.

4.4.4- Avaliação da etapa de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI)

O conjunto de fungo/substrato que resultou em melhor valor de conversão de biomassa (cocultivo de *T. reesei* RUT-C30 com *A. oryzae* P6B2) foi avaliado estatisticamente através de um planejamento fatorial completo, onde foram investigadas as influências das variáveis experimentais de interesse (agitação, pH e temperatura) e os efeitos de interação na resposta (concentração de glicose g/L) na etapa de sacarificação com o meio fermentado integral (MFI). Foram realizados 11 experimentos incluindo a triplicata do ponto central do planejamento em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis foi empregado. A Tabela 6 mostra as condições selecionadas para cada nível, bem como o ponto central utilizado.

Tabela 6 – Condições selecionadas para cada nível das variáveis experimentais agitação, pH e temperatura para avaliação da hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI)

	-1	C	+1
pH	4,3	4,8	5,3
T	45	50	55
rpm	150	200	250

4.4.5- Avaliação da etapa de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) e a adição de aditivos

Após o estudo das variáveis operacionais através do planejamento fatorial completo, foi avaliado também o efeito da presença de aditivos na hidrólise. Foram avaliados três aditivos: Tween 80 (0,1%), PEG 1500 (4%) e proteína de soja (4%) (OLSSON *et al.*, 2003; CANNELLA e JORGENSEN, 2014), na hidrólise do bagaço de cana. A etapa de hidrólise foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 5 g de BEX, 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 e adição do respectivo aditivo. O BEX foi aclimatizado a 50 °C durante 12 h a 200 rpm. Após a aclimatização, o material fermentado foi adicionado ao BEX e estes foram incubados a 50 °C durante 36 h a 200 rpm. Ao final de 36 horas foi quantificada a glicose (Kit enzimático - Laborlab, São Paulo, Brasil) e os açúcares redutores totais (Miller, 1959). Para todas as condições, foram realizados um controle contendo somente o BEX e outro contendo apenas o meio fermentado.

4.4.6- Determinação de fenólicos

Foi realizada a determinação de fenólicos totais na água de lavagem do BEX_L utilizando-se a metodologia com o reagente Folin-Ciocateu a fim de verificar a remoção destes compostos do substrato sólido. A calibração dos padrões foi feita com uma solução de ácido gálico. A quantidade de fenólicos totais foi medida em uma mistura de reação contendo 20 µl da água de lavagem, 1580 µl de água destilada e 100 µl do reagente Folin-Ciocateu. Essa mistura foi incubada no escuro por 3 minutos, depois foram adicionados 300 µl de uma solução de carbonato de cálcio (200 g/L). A mistura foi homogeneizada e incubada por mais 25 minutos. Feito isso, efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 765 nm (WROLSTAD, 2001).

4.4.7- Atividades enzimáticas

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de endoglucanase, betaglicosidase e xilanase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com os procedimentos padrões recomendados pela literatura (MILLER, 1959; GHOSE, 1987; BAILEY e POUTANEN, 1989). Também foi quantificada a proteína total dos extratos enzimáticos utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Atividade de endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi medida em uma mistura de reação contendo 0,5 mL da solução enzimática e 0,5 mL de uma solução de 4% de carboximetilcelulose (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos. Uma unidade de atividade de endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, utilizando uma curva padrão de glicose. O açúcar redutor foi quantificado pelo método DNS (MILLER, 1959).

Atividade de betaglicosidase

A atividade de betaglicosidase foi medida em uma mistura de reação contendo 1 mL da solução enzimática e 1 mL de uma solução 15 mM de celobiose (Sigma) em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos. Uma unidade de atividade de betaglicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições de ensaio. A glicose foi quantificada pelo kit enzimático (Laborlab, São Paulo, Brasil).

Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi medida em uma mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de uma solução de 1% de xilana (*Xilana Birchwood*, Sigma) em tampão acetato de sódio 0,2 mM e pH 5,0. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 5 minutos. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, utilizando uma curva padrão de glicose. O açúcar redutor foi quantificado pelo método DNS (MILLER, 1959).

4.4.8- Fermentação Alcoólica

A concentração de glicose presente ao final de 36 horas de hidrólise enzimática foi completada para 100 g/L, então, calculou-se a massa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* – Fermento biológico seco instantâneo Fleischmann) a ser inoculada seguindo a relação de 25 g de levedura por litro de hidrolisado (em base seca). Foi adicionado ao hidrolisado uma suplementação composta de: fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) (5,6 g/L), sulfato de magnésio (MgSO₄) (1,4 g/L), extrato de levedura (6,8 g/L), ureia (5,32 g/L) e o pH inicial da fermentação foi ajustado para 4,6 adicionando ácido clorídrico (1 M). Em seguida, os Erlenmeyers foram incubados em câmara incubadora com agitação orbital a 34 °C, 250 rpm durante 9 horas. Amostragens periódicas foram realizadas para monitorar o consumo de glicose e a produção de etanol. Esse monitoramento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Previamente, todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm. Para a construção da curva de calibração, foram utilizadas soluções contendo os padrões de glicose e etanol. As condições de análise foram: coluna SHODEX KS 802 (7 µm, 8 x 300 mm); fase móvel: água ultrapura; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹; temperatura do forno: 80 °C e detector de índice de refração em cromatógrafo líquido da Shimadzu.

Cálculo de parâmetros da fermentação alcoólica

Foram calculados três parâmetros para o processo de fermentação alcoólica, o fator de rendimento de etanol (Y_{P/S}), descrito pela Equação 4, que foi utilizado para calcular o rendimento de etanol (% do rendimento teórico), de acordo com a Equação 5, e a produtividade volumétrica de etanol (Q_P, g/L.h), descrito pela Equação 6.

$$Y_{P/S} = \frac{C_{etanol}^{9h} - C_{etanol}^{0h}}{C_{glicose}^{0h} - C_{glicose}^{9h}} \quad (4)$$

Onde:

Y_{P/S} = rendimento de etanol;

C_{etanol}^{9h} = concentração final de etanol;

C_{etanol}^{0h} = concentração inicial de etanol;

C_{glicose}^{0h} = concentração inicial de glicose;

C_{glicose}^{9h} = concentração final de glicose;

$$\text{Rendimento de etanol (\%)} = \left(\frac{Y_{P/S}}{0,511} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = rendimento de etanol;

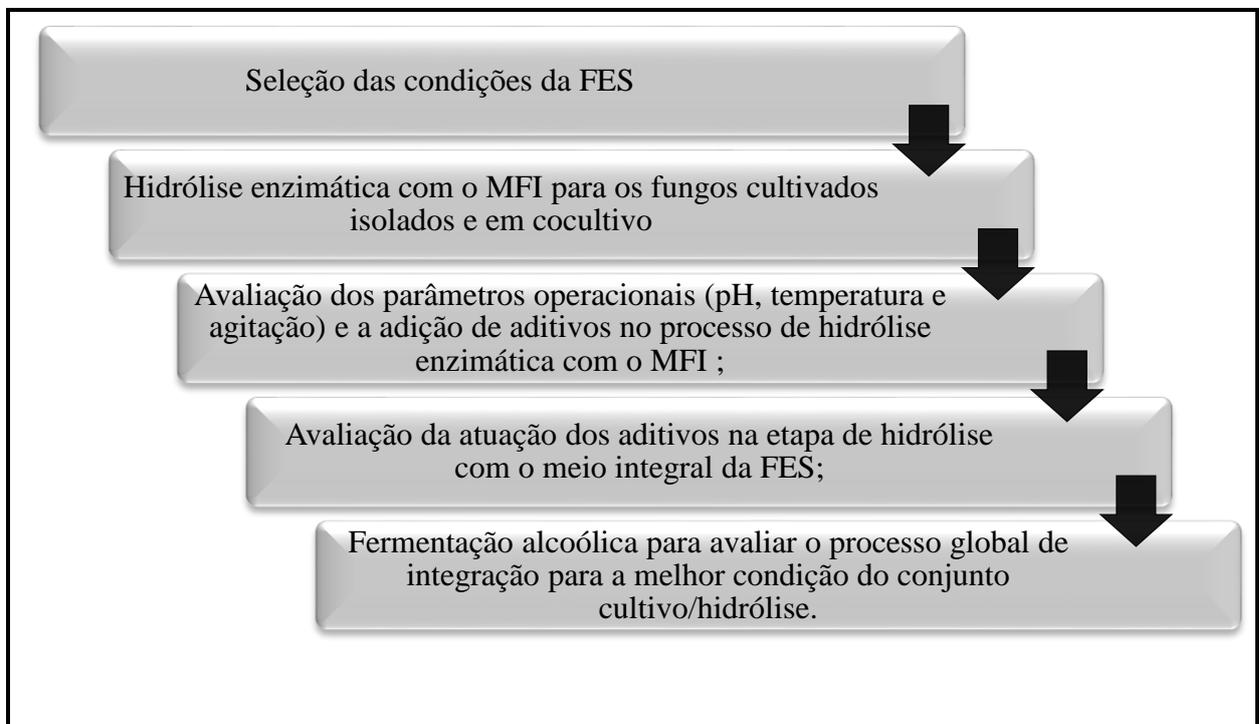
0,511 = rendimento teórico de etanol;

$$Q_P = \frac{C_{etanol}^{9h} - C_{etanol}^{0h}}{9h - 0h} \quad (6)$$

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou como foco principal a análise do processo de produção de enzimas celulolíticas *in-house* por FES e a posterior utilização do MFI da produção de enzimas para a etapa de hidrólise da biomassa, com o intuito de simplificar o processo de produção de etanol 2G segundo o conceito de bioprocessamento consolidado (BPC). A Figura 11 apresenta um fluxograma das principais etapas realizadas.

Figura 11 – Fluxograma das principais etapas realizadas



5.1- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado por explosão a vapor (BEX)

A caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizado tanto como substrato na fermentação em estado sólido (FES) como biomassa para produção de etanol lignocelulósico, possibilita a análise deste resíduo no que se refere, sobretudo, à susceptibilidade à degradação enzimática e à geração de possíveis inibidores das enzimas e dos microrganismos da fermentação (KLINKE *et al.*, 2004; XIMENES *et al.*, 2010; 2011). A Tabela 7 mostra a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado com água a 50 °C até pH 7 (BEX_L) e não lavado (BEX).

Tabela 7 – Composição físico-química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor lavado com água a 50 °C até pH 7 (BEX_L) e não lavado (BEX)

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	TOTAL (%)
BEX	39,1 ± 0,1	12,5 ± 0,1	33,3 ± 0,3	15,1 ± 10,1	100,0 ± 0,3
BEX_L	41,0 ± 0,1	12,1 ± 0,1	34,0 ± 0,2	12,9 ± 0,1	100,0 ± 0,2

O efeito do tratamento por explosão a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, sua susceptibilidade à hidrólise enzimática (GOUVEIA *et al.*, 2009), além de ser um pré-tratamento já utilizado e anexado por algumas plantas de usinas como da GranBio e da Raízen.

Estudos recentes mostram que um aumento de 5 °C nos processos de pré-tratamento por explosão a vapor e o tempo de pré-tratamento resultam em mudanças significativas na composição química dos materiais pré-tratados (SILVA *et al.*, 2010). Gouveia *et al.* (2009) obtiveram 47,7% de celulose, 8,9% de hemicelulose e 34,3% de lignina utilizando um pré-tratamento por explosão a vapor a 200 °C por 7 minutos em uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado na Usina Vale do Rosário (SP). Rocha *et al.* (2012) obtiveram 57,5% de celulose, 6,6% de hemicelulose e 31,2% de lignina utilizando um pré-tratamento por explosão a vapor a 190 °C por 15 minutos de bagaços em sua maioria recolhidos em usinas de açúcar e etanol do estado de São Paulo e do nordeste brasileiro. Não foram informadas as condições utilizadas no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar que foi cedido por usinas locais para o presente trabalho, mas os valores observados para a celulose estão um pouco abaixo da literatura, o que se deve possivelmente às condições de pré-tratamento utilizadas.

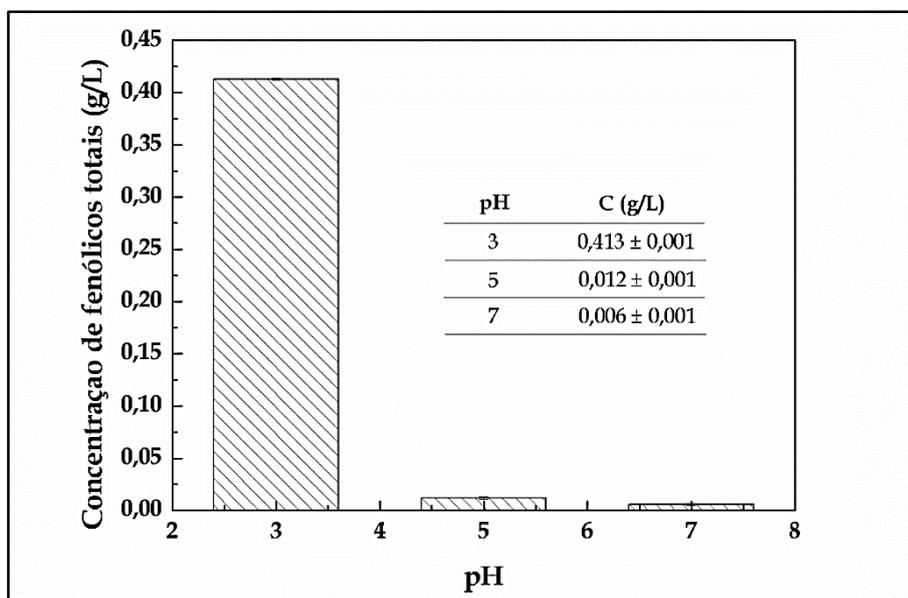
5.2- Análise de fenólicos na água de lavagem do BEX

Estudos reportados na literatura mostram que o pré-tratamento por explosão a vapor pode levar a geração de possíveis inibidores, chamados de compostos fenólicos, dos microrganismos produtores de enzimas, das próprias enzimas e até dos microrganismos utilizados na etapa de fermentação (KLINKE *et al.*, 2004; XIMENES *et al.*, 2010; 2011).

A fim de se remover esses compostos do BEX para que o mesmo fosse utilizado como substrato da fermentação em estado sólido (FES), lavou-se o mesmo com água a 50° C até que a água de lavagem atingisse pH 7. Foram coletadas amostras da água de lavagem com diferentes valores de pH e foram analisadas as concentrações de fenólicos totais. A Figura 13 mostra a concentração de fenólicos totais para diferentes valores de pH.

A partir da Figura 12, verifica-se que à medida que o pH da água de lavagem aumenta, diminui-se a concentração de fenólicos totais, e isso significa que a lavagem realmente promove uma remoção dos compostos fenólicos produzidos pelo pré tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor. Logo, a medida do pH da água de lavagem é um bom parâmetro para verificar a remoção de compostos fenólicos, como Chen *et al.* (2008) já haviam observado essa relação pH e quantidade de fenólicos totais. Por outro lado, a quantidade de água utilizada na lavagem é uma variável importante para o processo, pois pode significar um custo a mais. Uma alternativa para minimizar esse custo adicional seria a utilização de uma corrente de água de reuso dentro do próprio processo.

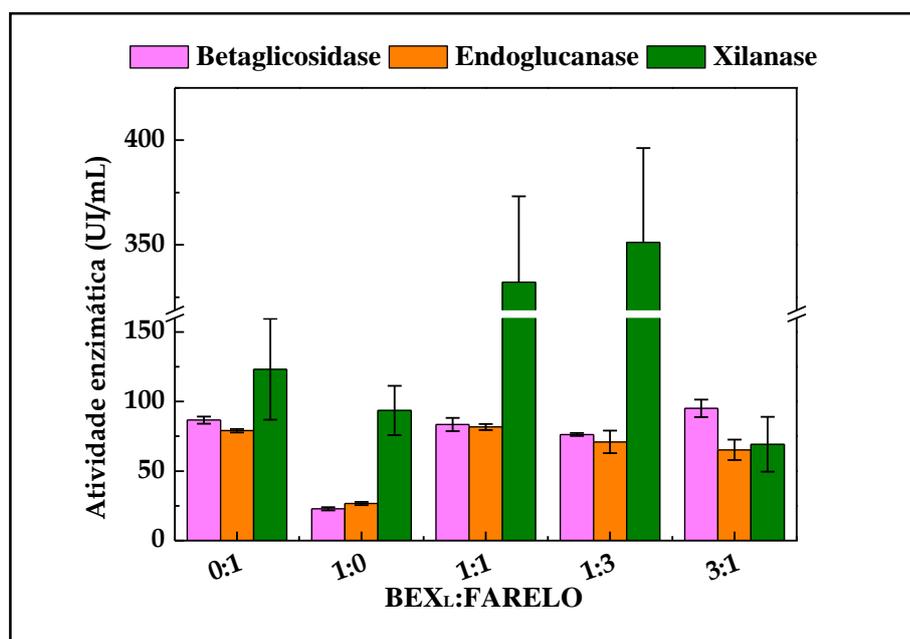
Figura 12 – Concentração de fenólicos totais na água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor para diferentes valores de pH



5.3- Seleção das condições de cultivo em fermentação em estado sólido (FES)

Visando à seleção das condições de cultivo para a fermentação em estado sólido (FES) a fim de melhorar a produção de enzimas diretamente em BEX_L, foi analisada a inserção e a proporção do farelo de trigo como potencial indutor. A Figura 13 apresenta os valores de atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase após 72 horas de FES, com umidade de 70%, com *A. niger* como microrganismo e diferentes proporções em massa de BEX_L:FARELO de (0:1); (1:0); (1:1); (1:3) e (3:1) respeitando a massa total de 5 g de substrato.

Figura 13 – Valores de atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase após 72 horas de FES, com *A. niger* 3T5B8 e BEX_L, comparando-se as proporções em massa de BEX_L:FARELO.



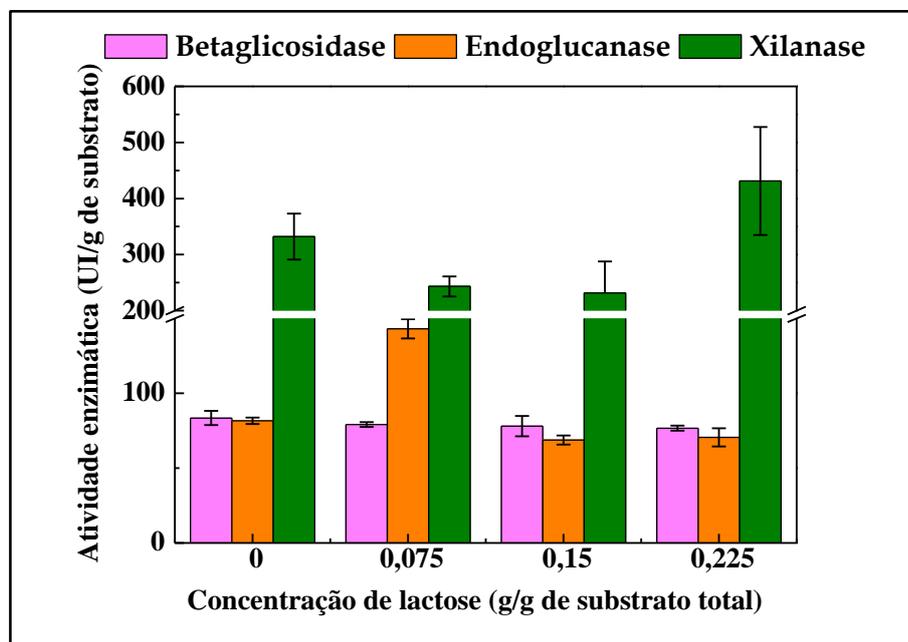
Observando-se a Figura 13, nota-se que a inserção do farelo de trigo ao BEX_L promoveu um aumento significativo na produção das enzimas analisadas com relação à utilização de apenas BEX_L (1:0), e que as melhores proporções de (BEX_L:FARELO) foram (1:1) e (1:3). Como a escolha do substrato indutor afeta as características do coquetel enzimático produzido (DELABONA *et al.*, 2012a), e neste trabalho o coquetel produzido deve ser utilizado na hidrólise do bagaço de cana na cadeia produtiva do etanol 2G, uma

maior quantidade de farelo desfavorece o propósito do projeto, e além disso, a inserção de uma menor quantidade de insumo é economicamente favorável ao processo. Logo, o uso da proporção (1:1) (BEX_L:FARELO) justifica-se. A proporção (1:1) produziu 83,5 UI/g de betaglicosidase, 81,7 UI/g de endoglucanase e 332,2 UI/g de xilanase, logo, comparando-se as proporções em massa de (BEX_L:FARELO) (1:1) e (1:0), a adição de farelo de trigo na proporção em massa de (1:1) promoveu um aumento de 73% na produção de betaglicosidase, 67% na produção de endoglucanase e 72% na produção de xilanase.

No que diz respeito à produção de enzimas *in-house*, encontram-se na literatura vários estudos empregando diversas condições de cultivo e microrganismos. Em um desses estudos, Farinas *et al.* (2011) obtiveram uma atividade de endoglucanase de 29,8 UI/g após 72 horas de cultivo por FES com *A. niger* F12 em farelo de trigo como substrato e 72% de umidade. Já Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) obtiveram uma atividade de endoglucanase de 5,5 UI/g após 72 horas de cultivo empregando o mesmo microrganismo sob FES e utilizando um substrato composto por 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja e 80% de umidade. Posteriormente, Pirota *et al.* (2014) obtiveram também sob FES, mas com *A. niger* 3T5B8, utilizando farelo de trigo como substrato e uma umidade de 80%, uma atividade de endoglucanase de 219,2 UI/g após 48 horas de cultivo a 28 °C.

A partir da seleção da proporção mássica BEX_L:FARELO de 1:1, também foi analisada a concentração de lactose a ser utilizada como indutor. A Figura 14 apresenta os valores de atividades após 72 horas de fermentação em estado sólido (FES) realizada com umidade de 70%, com *A. niger* como microrganismo, BEX_L e farelo de trigo na proporção em massa (1:1) utilizados como substratos, para os valores de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase, comparando-se as diferentes concentrações de lactose (0; 0,075; 0,15 e 0,225 g/g de substrato total).

Figura 14 – Valores de atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase após 72 horas de FES, com *A. niger* 3T5B8 e BEX_L com farelo de trigo (1:1), comparando-se as concentrações de lactose (g/g de substrato total).



Pode-se observar pela Figura 14 que a adição de lactose na concentração de 0,075 g/g de substrato total proporcionou uma produção de 143,1 UI/g de endoglucanase que significa um incremento na produção desta enzima de 48%. Observa-se também que não houve diferença significativa na quantidade de betaglicosidase nem na quantidade de xilanase produzidas na presença de lactose (considerando-se o desvio-padrão das medidas). O fenômeno de indução da produção de celulases por lactose já foi observado para outros fungos, como algumas espécies do gênero *Trichoderma* (SEIBOTH *et al.*, 2005; EL-SHISHTAWY *et al.*, 2015; HORTA *et al.*, 2014) e para *Acremonium cellulolyticus* (FANG *et al.*, 2008), porém ainda não há uma compreensão completa dos mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo (IVANOVA *et al.*, 2013). Neste trabalho verificou-se que a lactose também pode influenciar positivamente na produção de endoglucanase por *A. niger*, reforçando a hipótese de Ivanova *et al.* (2013) de que este açúcar pode induzir a produção de celulases por mimetizar outros compostos naturais do ambiente destes fungos e que sinalizam a disponibilidade de biomassa vegetal. Entretanto, os resultados obtidos sugerem que esse fenômeno deve ocorrer em uma faixa estreita de concentrações, visto que quantidades maiores de lactose não desencadearam a mesma resposta por parte do microrganismo. Uma condição semelhante foi proposta por Seiboth *et al.* (2005) quando estes autores sugeriram que a

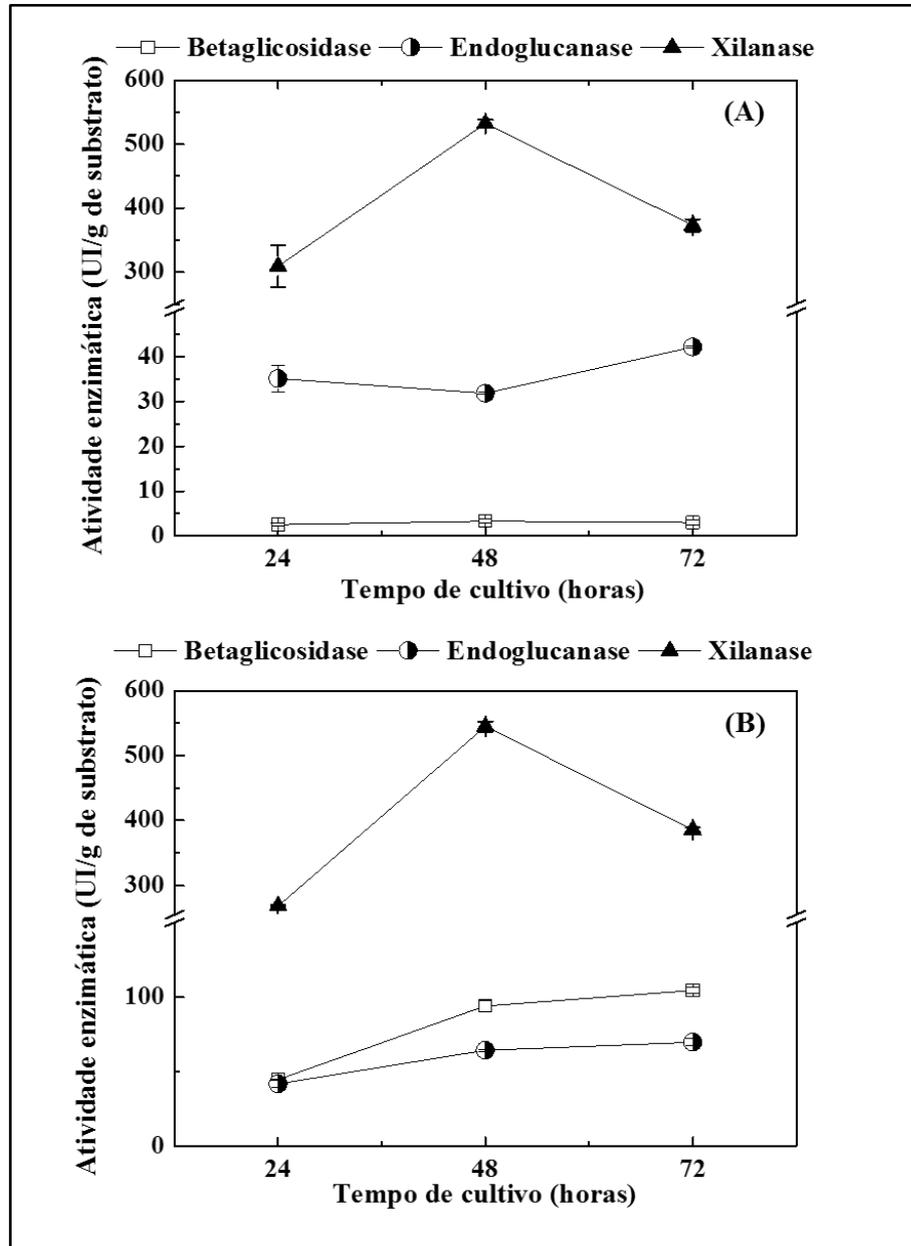
galactose-1-fosfato poderia ser o indutor das celulasas em *T. reesei*: o fenômeno de indução não era observado quando a beta-galactosidase do fungo era superexpressa, indicando que a assimilação de concentrações mais elevadas de galactose (acima de uma certa faixa) interrompia a indução das celulasas.

Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) obtiveram por FES com *A. niger* F12, em substrato composto por 90% de bagaço de cana-de-açúcar e 10% de farelo de soja, com 80% de umidade, após 72 horas de cultivo e utilizando uma solução nutriente (Mandels & Weber, 1969) suplementada com carboximetilcelulose uma atividade de endoglucanase de 21,0 UI/g. O presente trabalho obteve uma atividade de endoglucanase de 143,1 UI/g de substrato, mostrando que a lactose é um indutor eficiente. Além disso, Seiboth *et al.* (2007) afirmaram que os dissacarídeos são importantes indutores na formação de celulasas e que a lactose além de ser economicamente viável é metabolizada pelos fungos. Portanto, optou-se pela utilização da concentração de lactose de 0,075 g/g de substrato total pelo incremento significativo na produção de endoglucanase que é a enzima responsável por iniciar a hidrólise, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização.

5.4- Perfil temporal da fermentação em estado sólido (FES)

A Figura 15 apresenta os valores de atividades durante 72 horas de FES realizada com umidade de 70%, com *A. niger* (Figura 16A) e *T. reesei* (Figura 16B), BEX_L e farelo de trigo na proporção em massa (1:1) utilizados como substratos, e meio de Mandels suplementado com lactose 0,075 g/g.

Figura 15 – Perfil temporal da fermentação em estado sólido (FES) realizada durante 72 horas de cultivo com umidade de 70%, com *A. niger* (A) e *T. reesei* (B), BEX_L e farelo de trigo na proporção em massa (1:1) utilizados como substratos.



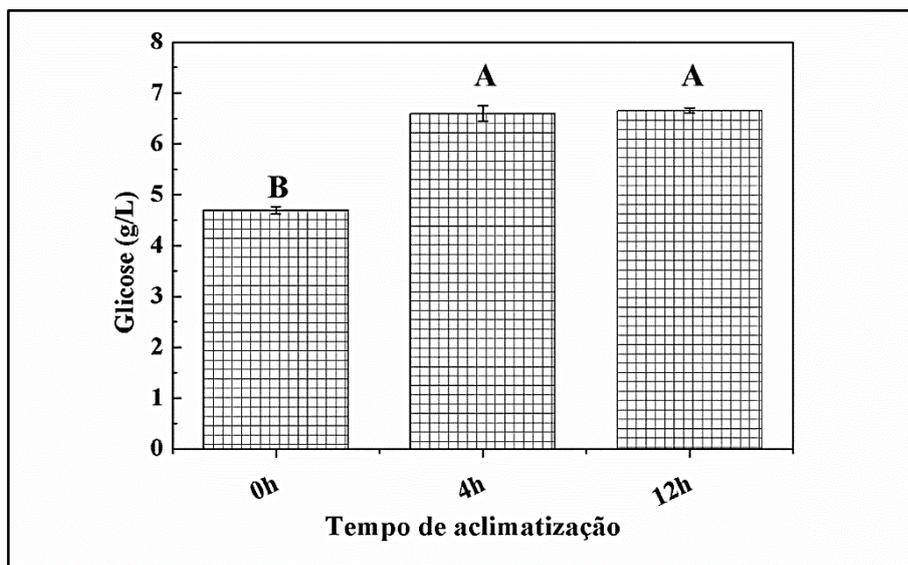
Pode-se observar que o pico de atividade enzimática para o cultivo de *A. niger* ocorreu em 48 horas de cultivo (Figura 16A), para o cultivo de *T. reesei* (Figura 16B), o pico de atividade enzimática também ocorreu em 48 horas, com exceção da atividade de endoglucanase. Logo, definiu-se o tempo de FES tanto para os cultivos individuais como para os cocultivos de 48 horas. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Pirota (2014) que também obteve pico de produção enzimática em 48 h de cultivo tanto para o *A. niger*

3T5B8 quanto para o *T. reesei* RUT-C30 com a fermentação em estado sólido realizada tanto em aeração estática (Erlenmeyer) quanto em aeração forçada (biorreator de coluna instrumentado) utilizando farelo de trigo como substrato.

5.5- Tempo de aclimatização antes da hidrólise enzimática

Antes da realização dos experimentos de hidrólise enzimática, avaliou-se a necessidade de aclimatização do substrato BEX para o processo, visto que o gasto de energia ao se aclimatizar pode gerar um custo a mais no final do processo. O BEX foi aclimatizado a 50 °C durante 12 h a 200 rpm, antes da realização da HE com o MFI do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae*. A Figura 16 mostra a concentração de glicose liberada para os diferentes tempos de aclimatização (0 horas, 4 horas e 12 horas).

Figura 16 – Concentração de glicose liberada para os diferentes tempos de aclimatização (0 horas, 4 horas e 12 horas). Letras iguais em um mesmo conjunto de colunas indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância



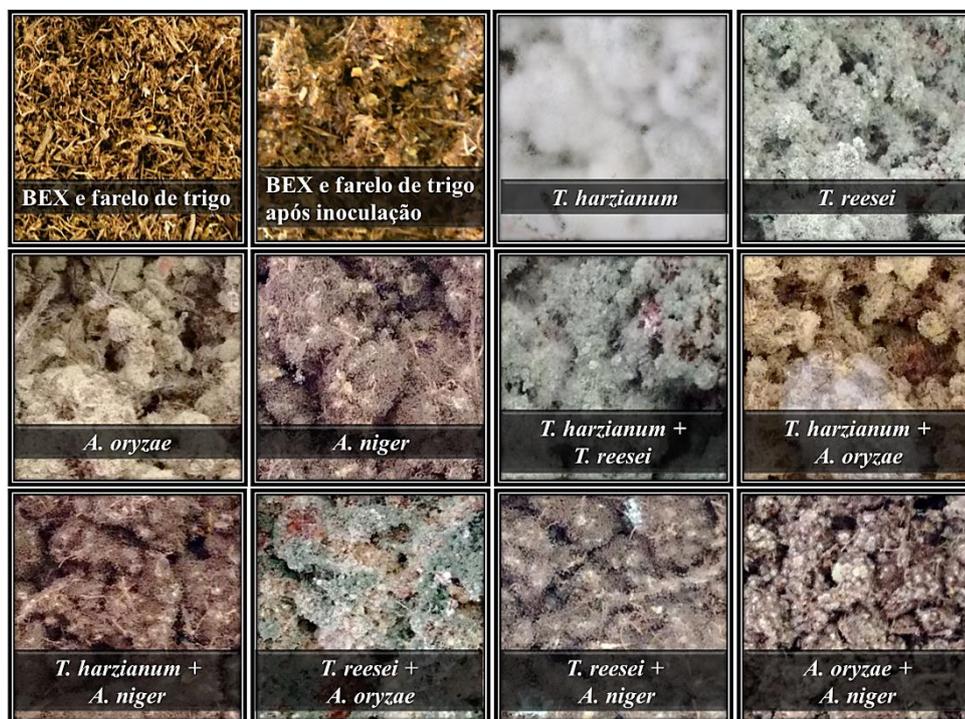
Comparando os tempos de aclimatização, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre o BEX sem aclimatização (0 horas), no qual se obteve uma concentração final de glicose de 4,69 g/L, comparando-se com o BEX aclimatizado: 4 ou 12 horas, no qual se obteve uma concentração de glicose de 6,59 e 6,66 g/L, respectivamente. Observou-se que entre os tempos de 4 e 12 horas não houve diferença significativa, e ambos alcançaram um ganho médio de 41,5% em relação ao BEX sem aclimatização. Logo, este

resultado indica que a aclimatização do BEX antes da HE favorece o processo, e isso deve-se possivelmente ao fato de que a aclimatização promove uma homogeneização da temperatura e do BEX dentro do erlenmeyer, favorecendo a dispersão do meio fermentado integral e das enzimas durante o processo de hidrólise. Outro resultado importante é a constatação de que o tempo de aclimatização pode ser reduzido de 12 para 4 horas, sem impacto no resultado da hidrólise nas condições empregadas, e com economia de energia na etapa de aclimatização.

5.6- Hidrólise enzimática com meio fermentado integral (MFI)

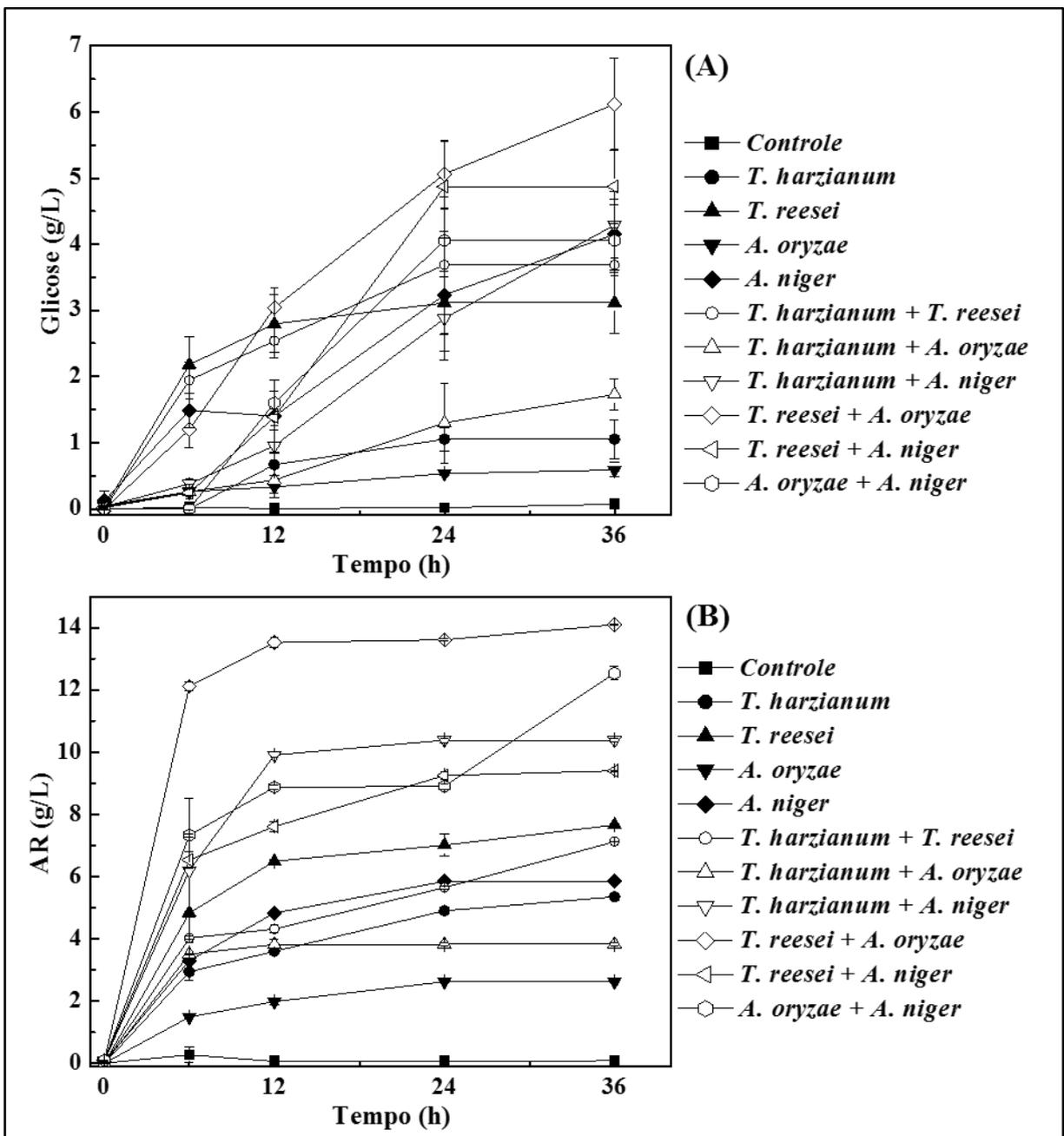
A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada nas condições pré-selecionadas para dez combinações dos quatro fungos: *A. niger*, *A. oryzae*, *T. harzianum* e *T. reesei* cultivados de forma isolada e em cocultivo (combinados dois a dois) (Figura 17). No entanto, após o tempo de cultivo selecionado, a etapa de extração foi eliminada e o meio fermentado integral (MFI) foi adicionado ao material lignocelulósico para a realização da etapa de hidrólise enzimática, conforme descrito por Pirota *et al.* (2013a).

Figura 17 – Imagens registradas após 48 horas de fermentação em estado sólido (FES) realizada para dez combinações dos quatro fungos



A Figura 18 apresenta os perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática do BEX para dez combinações dos quatro fungos cultivados isolados e em cocultivo.

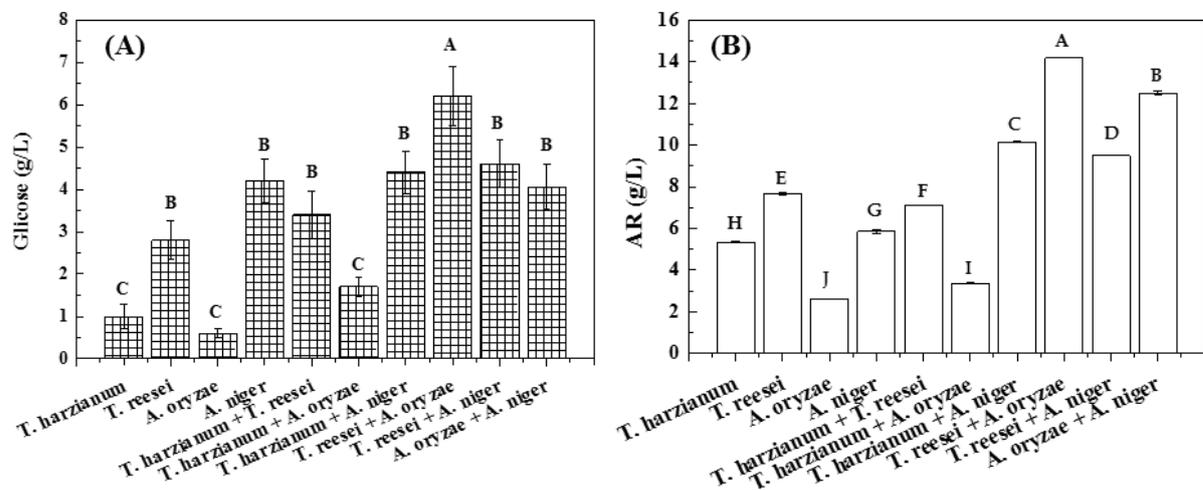
Figura 18 – Concentração de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática realizada por 36 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) para dez combinações cultivos isolados e em cocultivo (combinados dois a dois) e o controle contendo somente o BEX



Pode ser observado pela Figura 18 que as hidrólises enzimáticas utilizando o meio fermentado integral (MFI) apresentaram perfis similares, porém, com magnitudes distintas entre os diferentes cultivos individuais e cocultivos, com destaque para os cocultivos de *T. reesei* com *A. oryzae* e *T. reesei* com *A. niger* para produção de glicose (Figura 18A) e *T. reesei* com *A. oryzae* e *A. oryzae* com *A. niger* para a produção de açúcares redutores (Figura 18B). Também pode-se observar nitidamente que a combinação de microrganismos promoveu uma melhor produção de celulasas e hemicelulasas.

A fim de realizar comparações entre os diferentes cultivos e cocultivos, foi realizada uma análise estatística através do teste de Tukey com nível de confiança de 95% para os resultados obtidos no experimento de hidrólise com o MFI dos cultivos, conforme mostra a Figura 19.

Figura 19 – Análise estatística realizada pelo teste de Tukey com nível de confiança de 95% após 36 horas de hidrólise enzimática, comparando-se a concentração de glicose (A) e açúcares redutores (B). Letras iguais em um mesmo conjunto de colunas indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% de significância



Comparando os cultivos e cocultivos, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre eles. Tanto para a produção de glicose (Figura 19A) quanto para produção de açúcares redutores (Figura 19B) houve um destaque para o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae*, alcançando as maiores concentrações de glicose (6,2 g/L) e açúcares redutores (14,1 g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática. A concentração de glicose comparada ao melhor cultivo individual (*A. niger*) corresponde a um ganho de 48,8%. Logo, esta análise estatística

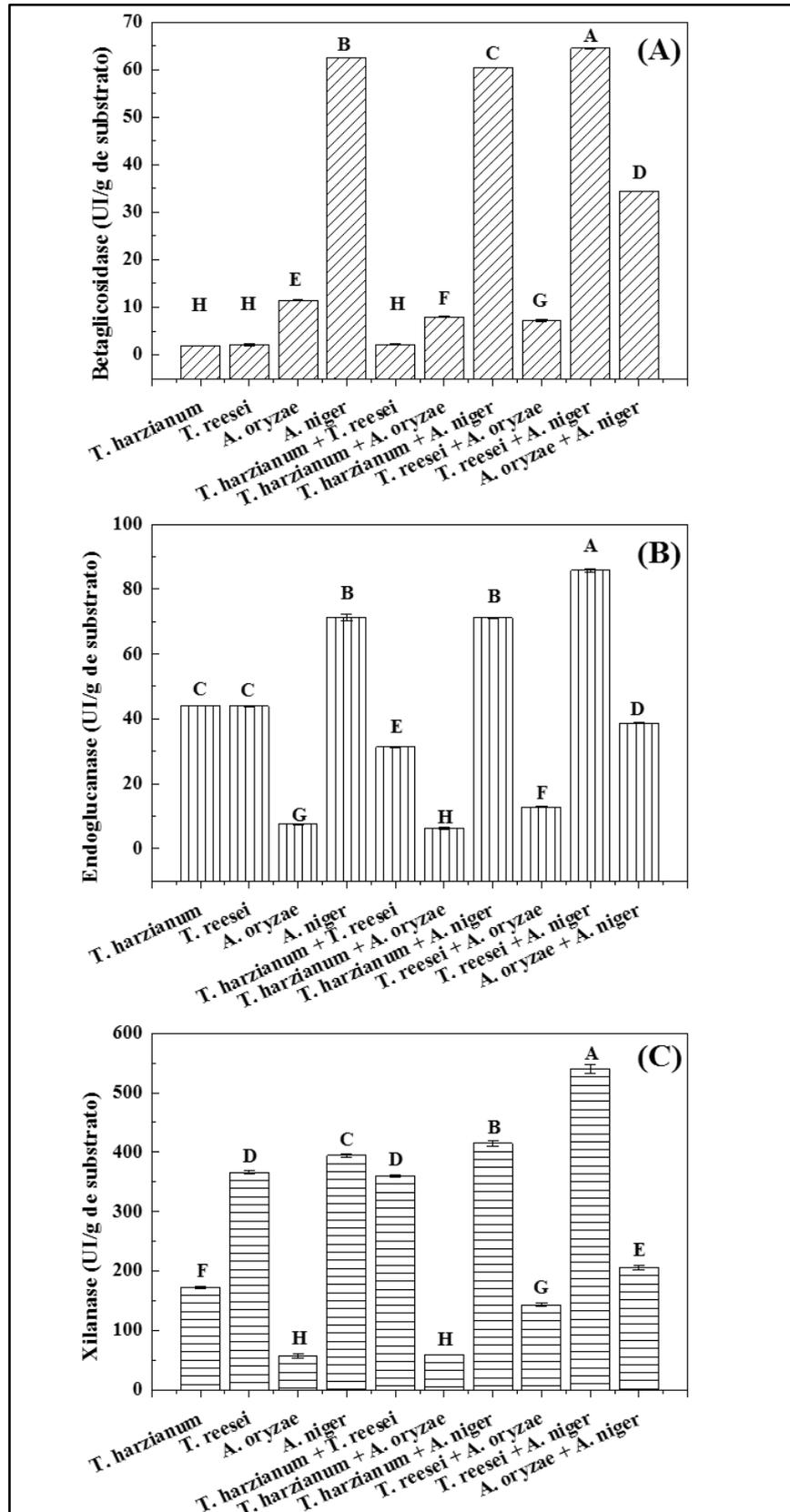
corroborar para que este cocultivo que apresentou melhor desempenho seja utilizado no presente processo-modelo de produção de etanol celulósico na etapa de produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES).

Fang *et al.* (2010) obtiveram a melhor eficiência (80.9%) na hidrólise de palha de milho pré-tratada por explosão a vapor utilizando extrato enzimático obtido por FSm e cocultivo de *T. reesei* com *A. niger*. Kolasa *et al.* (2014) obtiveram uma concentração de glicose de 19 g/L na hidrólise de palha de trigo pré-tratada utilizando extrato enzimático obtido por FES e cocultivo de *T. reesei* com *A. carbonarius*, alcançando uma eficiência de hidrólise de 78,0%. Resultados que corroboram os encontrados no presente trabalho.

Com o propósito de elucidar e fundamentar os resultados obtidos na HE foram medidas as atividades enzimáticas de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase, comparando-se cultivos e cocultivos após 48 horas de FES, com umidade de 70% e BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1). Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de confiança de 95 % e são apresentados na Figura 21.

Pode-se observar que o cocultivo de *T. reesei* com *A. niger* produziu as maiores quantidades de betaglicosidase (64,5 UI/g), endoglucanase (85,8 UI/g) e xilanase (539,7 UI/g). E o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* que obteve o melhor desempenho na HE produziu as menores quantidades de betaglicosidase (7,3 UI/g), endoglucanase (12,9 UI/g) e xilanase (143,0 UI/g) (Figura 20A, 20B e 20C). A diferença na quantidade de enzimas desses dois cocultivos é grande, os valores de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase do *T. reesei* com *A. niger* chegam a ser 783,6%, 565,1% e 277,4% a mais, respectivamente do que os encontrados no cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae*. Comparando o cocultivo de *T. reesei* com *A. niger* com o cultivo individual de *A. niger*, os valores de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase chegam a ser 2,4%, 22,6% e 35,0% a mais, respectivamente. Logo, o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* produziu quantidade menores que o cultivo individual de *A. niger*.

Figura 20 – Valores de betaglicosidase (A), endoglucanase (B) e xilanase (C) após 48 horas de FES, com umidade de 70% e BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1), comparando-se cultivos e cocultivos.

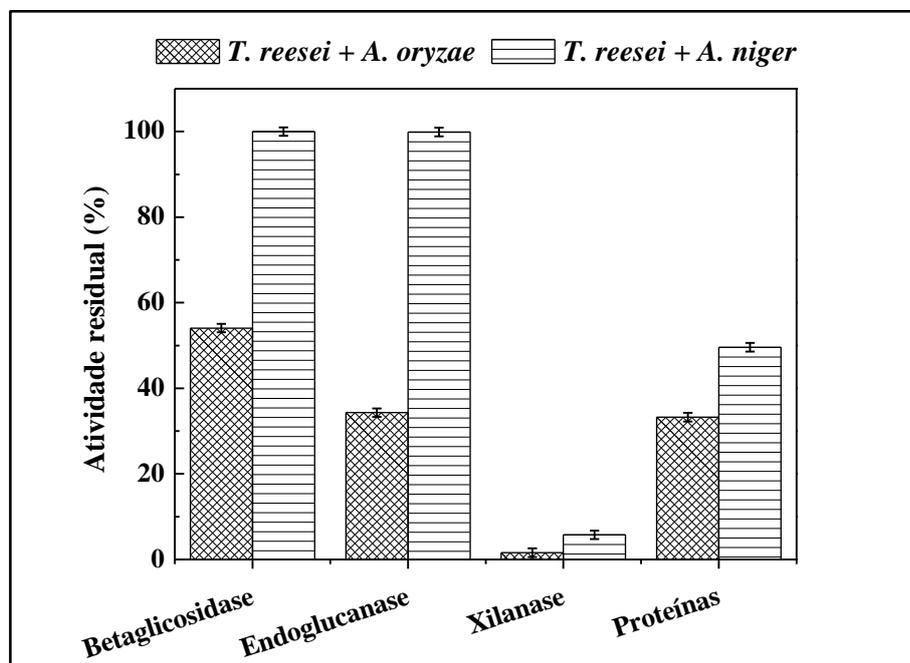


Gutierrez-Correa *et al.* (1999) utilizando FES com bagaço de cana-de-açúcar como substrato obtiveram 85,0% a mais de endoglucanase e 147,0% mais de betaglicosidase no cocultivo de *T. reesei* LM-UC4 com *A. niger* ATCC 10894 comparado com os cultivos individuais. Kolasa e colaboradores (2014) utilizando FES com farelo de trigo e esfagno como substrato, e utilizando os cocultivos de *T. reesei* com *A. saccharolyticus*, *T. reesei* com *A. carbonarius* e *T. reesei* com *A. niger* obtiveram como melhor o cocultivo de *T. reesei* com *A. saccharolyticus* que produziu 33,3%, 100,0% e 150,0% a mais de betaglicosidase que os cocultivos de *T. reesei* com *A. carbonarius*, *T. reesei* com *A. niger* e o cultivo individual de *A. niger*, respectivamente. Estes resultados demonstram os cocultivos tendem a produzir mais enzimas que os cultivos individuais.

Porém, no presente projeto, o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* produziu menores quantidades de enzimas até mesmo que alguns cultivos individuais (Figura 20) e mesmo assim, promoveu o melhor resultado na HE. Isso é possível desde que o coquetel produzido seja mais eficiente, mais estável e atue de maneira mais sinérgica que os outros, conforme reportado anteriormente por outros autores (HORN *et al.*, 2012; KOLASA *et al.*, 2014; SAINI *et al.*, 2015), também é importante ressaltar que o *A. oryzae* que produz uma família de betaglicosidasas, o GH1, com uma especificidade ao substrato e uma susceptibilidade a inibição diferenciadas (LANGSTON *et al.*, 2006; KUDO *et al.*, 2015). Além do que, as análises são realizadas no extrato enzimático bruto, e o processo de hidrólise enzimática é realizado utilizando-se todo o meio fermentado integral, que pode proporcionar uma liberação das enzimas que ficam adsorvidas no meio fermentado e que, possivelmente, não são extraídas quando se utiliza o extrato enzimático bruto.

Então, para buscar um melhor entendimento dos resultados obtidos do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na HE, foram realizados experimentos para analisar a estabilidade dos complexos enzimáticos a 50 °C durante o período de hidrólise enzimática (36 horas), com o intuito de saber se o extrato que possui menores atividades enzimáticas (*T. reesei* com *A. oryzae*) é mais estável do que o que possui maiores atividades enzimáticas (*T. reesei* com *A. niger*). Os resultados estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Atividade residual após 36 horas na temperatura de 50°C dos extratos enzimáticos dos cocultivos de *T. reesei* com *A. oryzae* e de *T. reesei* com *A. niger* para valores de betaglicosidase, endoglucanase, xilanase e proteínas

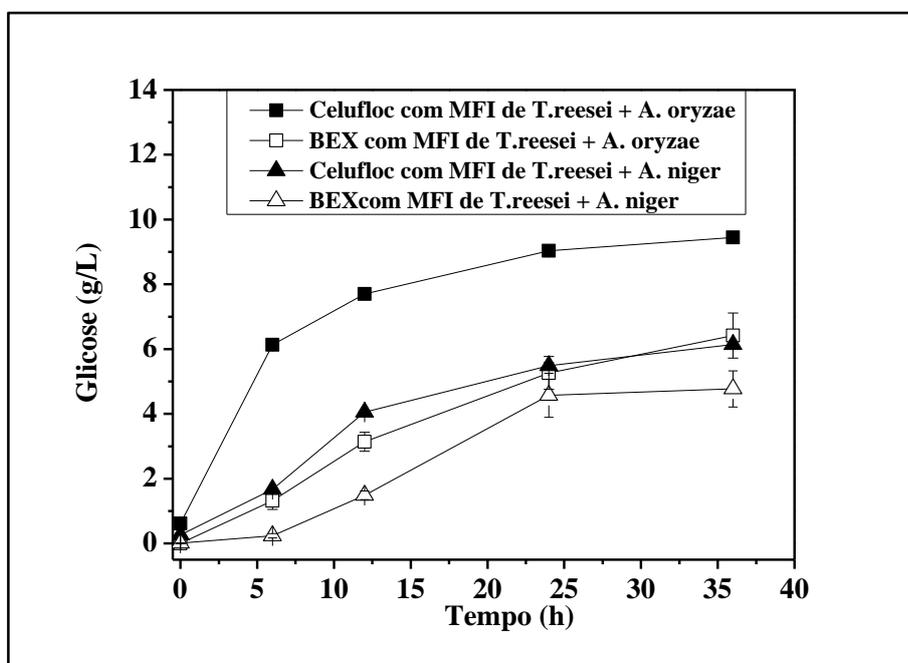


O extrato enzimático do *T. reesei* com *A. niger* mostrou-se mais estável à 50 °C durante 36 horas que o extrato do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* (Figura 21), não justificando, então, que a maior conversão na hidrólise utilizando o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* tenha ocorrido devido a uma maior estabilidade térmica do extrato enzimático.

Por isso outra hipótese foi levantada: a possibilidade de ocorrer com o tempo, durante a HE, a dessorção das enzimas que ficam adsorvidas no MFI e que não são extraídas quando se utiliza apenas o EE bruto. Este fato poderia proporcionar um maior sinergismo entre as enzimas apesar das mesmas estarem em menor quantidade. É possível também que os coquetéis enzimáticos avaliados tenham diferenças em termos de outras enzimas complementares ou acessórias que não estão sendo quantificadas e que são importantes para a hidrólise dos polissacarídeos (HORN *et al.*, 2012). Outra possibilidade seria que o coquetel enzimático produzido pelo cocultivo de *T. reesei* com *A. niger* por possuir uma maior quantidade de xilanase, estaria promovendo uma produção maior de xilo-oligossacarídeos os quais poderiam estar inibindo a ação das outras enzimas, conforme relatado na literatura (QING *et al.*, 2010; ZHANG e VIIKARI, 2012).

Para investigar se a produção de xilo-oligossacarídeos estaria realmente promovendo uma inibição do coquetel enzimático produzido pelo cocultivo de *T. reesei* com *A. niger* foi necessário a utilização de um substrato desprovido de hemicelulose e lignina. Por isso, foram realizados experimentos de HE da celulose pura (Celufloc) e do BEX, utilizando o MFI da FES comparando-se os cocultivos de *T. reesei* com *A. oryzae* e de *T. reesei* com *A. niger*. Os resultados são apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Perfis de produção de glicose liberada durante a hidrólise enzimática de celulose pura (Celufloc) e BEX realizada por 36 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) comparando-se os cocultivos de *T. reesei* com *A. oryzae* e de *T. reesei* com *A. niger*



Pode ser observado pela Figura 22 que as hidrólises enzimáticas da celulose pura (Celufloc) e do BEX utilizando o MFI apresentaram perfis similares, porém, com magnitudes distintas entre os diferentes cocultivos de *T. reesei* com *A. oryzae* e *T. reesei* com *A. niger* para produção de glicose (Figura 22).

Era esperado que o cocultivo de *T. reesei* com *A. niger* produzisse mais glicose na HE da celulose pura (Celufloc) por possuir uma maior quantidade de enzimas e porque a celulose pura não produz xilo-oligossacarídeos, os quais poderiam estar inibindo a ação dessas enzimas. Porém, o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae*, mesmo possuindo uma menor quantidade de enzimas, ainda produziu mais glicose, 9,4 g/L após as 36 horas de HE da

celulose pura (Celufloc). Essa concentração de glicose comparada ao cocultivo de *T. reesei* com *A. niger* corresponde a um ganho de 54,1%. Logo, a menor quantidade de xilanases não é responsável pelo cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* se destacar entre os demais.

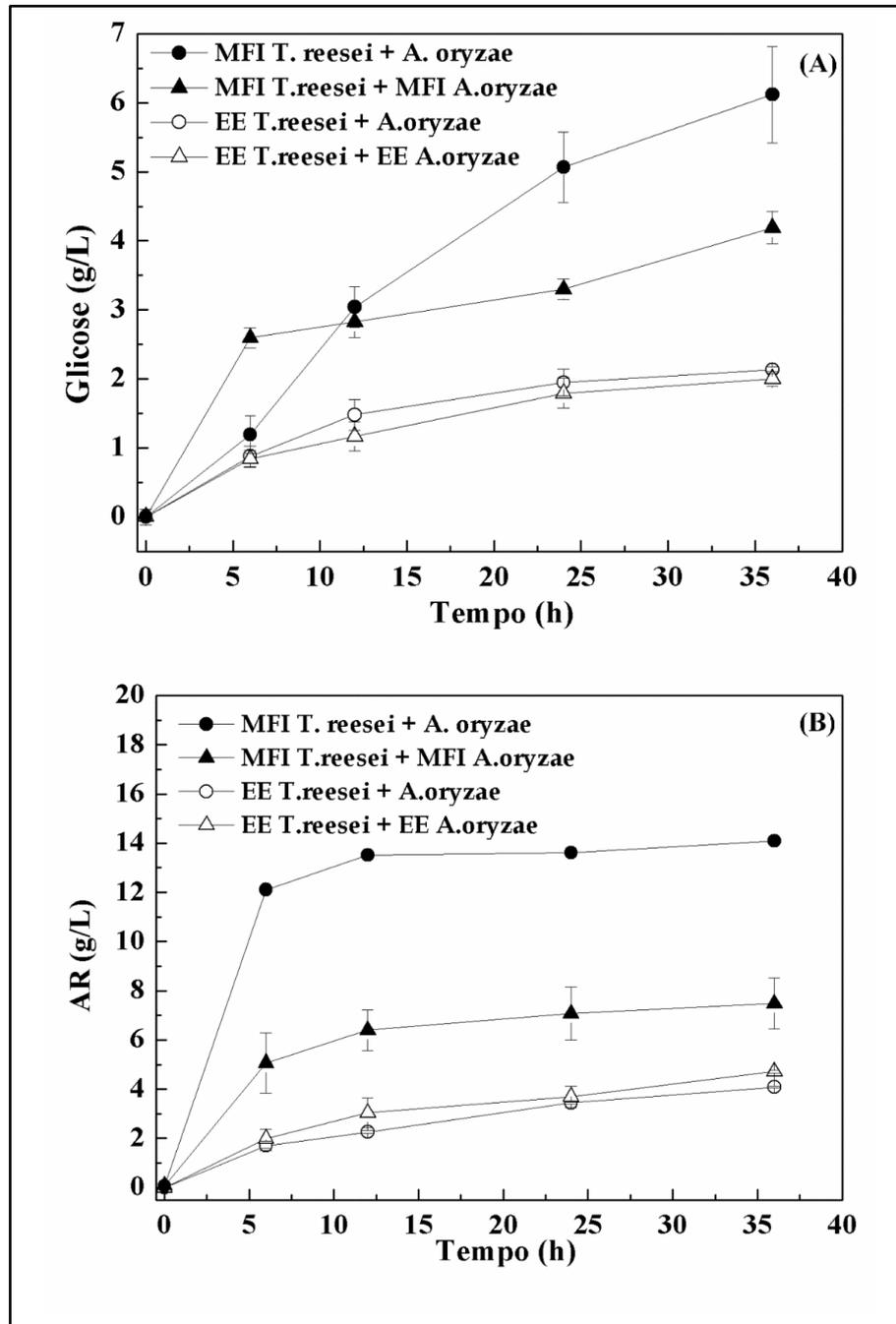
Neste sentido, é possível que o coquetel produzido pelo cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* seja mais eficiente, e atue de maneira mais sinérgica, ou seja, o crescimento dos fungos em um mesmo ambiente pode levar à produção de enzimas que não aparecem nas monoculturas.

A fim de se investigar a hipótese proposta de que a cocultura pode levar a uma produção significativa aumentada de compostos críticos que não são detectados em monoculturas, foram realizadas hidrólises enzimáticas (HE) para o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* comparando o meio fermentado integral (MFI) e o extrato enzimático (EE) da seguinte maneira, respeitando a proporção de massa de substrato e a quantidade de esporos inoculados:

- $MFI_{T. reesei + A. oryzae}$: Os microrganismos cresceram em cocultivo no mesmo Erlenmeyer e seguiu-se com o meio fermentado integral (MFI) para a hidrólise enzimática (HE);
- $MFI_{T. reesei} + MFI_{A. oryzae}$: Os microrganismos cresceram em cultivos individuais em Erlenmeyers separados e seguiu-se combinando-se os meios fermentados integrais (MFI) para a hidrólise enzimática (HE);
- $EE_{T. reesei + A. oryzae}$: Os microrganismos cresceram em cocultivo no mesmo Erlenmeyer e o extrato enzimático bruto seguiu para hidrólise enzimática (HE);
- $EE_{T. reesei} + EE_{A. oryzae}$: Combinação dos extratos enzimático dos cultivos individuais.

A Figura 23 apresenta os perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) durante a hidrólise enzimática das quatro condições testadas.

Figura 23 – Concentração de glicose (A) e açúcares redutores (B) durante a hidrólise enzimática realizada por 36 horas utilizando os meios fermentados integrais (MFI) cocultivado e a combinação dos cultivos individuais, e o extrato enzimático (EE) cocultivado e a combinação dos cultivos individuais



Pode ser observado pela Figura 23 que a hidrólise enzimática utilizando o meio fermentado integral (MFI) e os extratos enzimáticos (EE) apresentou perfis similares, porém, com magnitudes distintas entre as diferentes abordagens realizadas para o cocultivo de *T.*

reesei com *A. oryzae*, com destaque para a utilização do MFI tanto para a produção de glicose como de açúcares redutores. Analisando a concentração de glicose percebe-se nitidamente que a utilização do MFI_{*T. reesei* + *A. oryzae*} alcançou o maior valor (6,1 g/L). Este valor comparado ao EE_{*T. reesei* + *A. oryzae*} corresponde a um ganho de 190,5%.

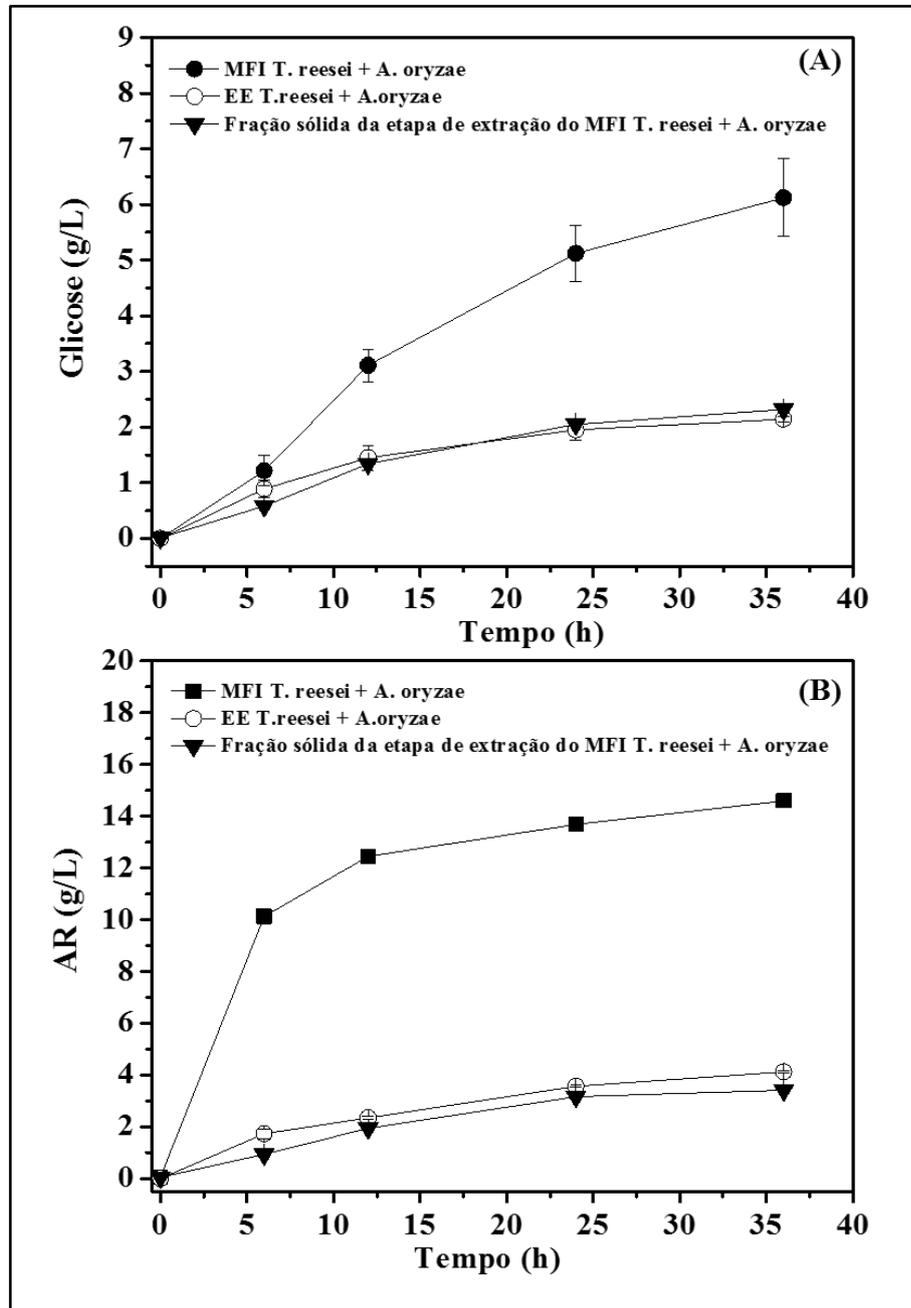
A constatação de que a utilização do MFI é melhor do que o EE já havia sido observado na literatura, sendo possível eliminar a etapa de extração e filtração das enzimas do processo global, oferecendo vantagens em termos de redução de custos do processo e evitando, além disso, a geração de efluentes (PIROTA *et al.*, 2013a; PIROTA *et al.*, 2014; SINGHANIA *et al.*, 2015).

Comparando-se o uso do MFI das coculturas e dos cultivos individuais, os resultados mostraram que houve diferença significativa entre elas. Tanto para a produção de glicose (Figura 23A) quanto de açúcares redutores (Figura 23B), houve um destaque para a utilização do MFI onde os microrganismos cresceram em cocultivo no mesmo frasco, alcançando os maiores valores de glicose (6,1 g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática. Este valor comparado com a utilização do MFI onde os microrganismos cresceram em cultivos individuais em Erlenmeyers separados corresponde a um ganho de 45,2%.

Os resultados indicam que na condição onde os microrganismos cresceram no mesmo frasco, a competição ou antagonismo experimentados durante a cocultura podem levar a uma produção significativa aumentada de compostos críticos que não são detectados em monoculturas, o que foi anteriormente descrito por Marmann *et al.* (2014). Com relação à comparação entre o uso do MFI ou dos extratos, os resultados indicam que pode estar ocorrendo uma dessorção das enzimas que ficam adsorvidas no meio fermentado e que são perdidas quando apenas utiliza-se o extrato enzimático. Logo, a utilização do MFI com cocultivo mostra-se mais eficiente que as demais condições testadas para o presente processo-modelo de produção de etanol celulósico na etapa de hidrólise enzimática (HE).

Para analisar essa hipótese de dessorção das enzimas que ficam adsorvidas no meio fermentado e que são perdidas quando apenas utiliza-se o extrato enzimático, foram realizadas hidrólises enzimáticas (HE) para o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* comparando o meio fermentado integral (MFI), o extrato enzimático (EE) e a fração sólida restante da etapa de extração das enzimas (resíduo sólido resultante após a etapa de filtração no processo de extração das enzimas para obtenção do extrato enzimático bruto), e os resultados são mostrados na Figura 24.

Figura 24 – Perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática do BEX realizada por 36 horas para o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* comparando o meio fermentado integral (MFI), o extrato enzimático (EE) e a fração sólida restante da etapa de extração das enzimas



Pode ser observado pela Figura 24 que a fração sólida resultante da etapa de extração apresenta uma quantidade significativa das enzimas produzidas, equivalente àquela extraída, já que nos ensaios de hidrólise a produção de glicose e de açúcares redutores é similar com a utilização extrato enzimático. Esse resultado corrobora a hipótese de que parte das enzimas

ficam adsorvidas no MFI, as quais são perdidas quando se utiliza apenas o EE. É possível ainda que haja inativação de parte das enzimas durante o processo de extração, já que a produção de glicose e AR na hidrólise com MFI supera a soma dos valores obtidos com a utilização do EE e da fração sólida resultante da extração das enzimas (Figura 24).

Tanto para a produção de glicose (Figura 24A) quanto de açúcares redutores (Figura 24B), houve um destaque para a utilização do MFI, o qual alcançou os maiores valores de glicose (6,1 g/L) e açúcares redutores (14,6g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática, quando comparado com a utilização do EE e da fração sólida resultante da etapa de extração das enzimas, que não apresentaram diferença significativa. Comparando a concentração de glicose, a utilização do MFI corresponde a um ganho de 177,3%. Esse fato corrobora que durante a utilização do MFI essas enzimas vão sendo gradativamente desorvidas e exercendo seu papel na hidrólise.

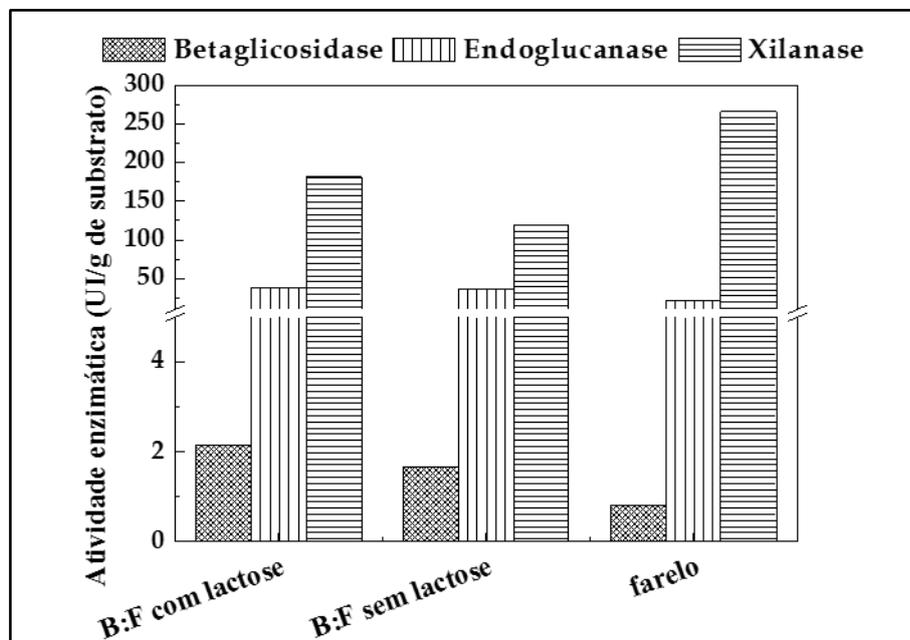
Logo, é possível e vantajoso eliminar a etapa de extração e filtração das enzimas do processo global, oferecendo vantagens em termos de redução de custos do processo e evitando, além disso, a geração de efluentes (PIROTA *et al.*, 2013a; PIROTA *et al.*, 2014; SINGHANIA *et al.*, 2015).

5.7- Especificidade do substrato no cocultivo de *T. reesei* RUT C-30 com

***A. oryzae* P6B2**

Para analisar a especificidade dos substratos, ou seja, quais combinações de substratos produzem mais enzimas e quais promovem uma melhor hidrólise do BEX, foi realizado um experimento de fermentação em estado sólido (FES) utilizando o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* durante 48 horas, com umidade de 70% e comparando-se os substratos: BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) com lactose, BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) sem lactose e apenas farelo de trigo. As atividades enzimáticas foram determinadas e, após a FES, o MFI foi utilizado no processo de hidrólise enzimática. Os resultados são apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Atividade enzimática de betaglicosidase, endoglucanase e xilanase, após 48 horas de FES, com umidade de 70% e comparando-se os substratos: BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) e lactose, BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) sem lactose e apenas farelo de trigo



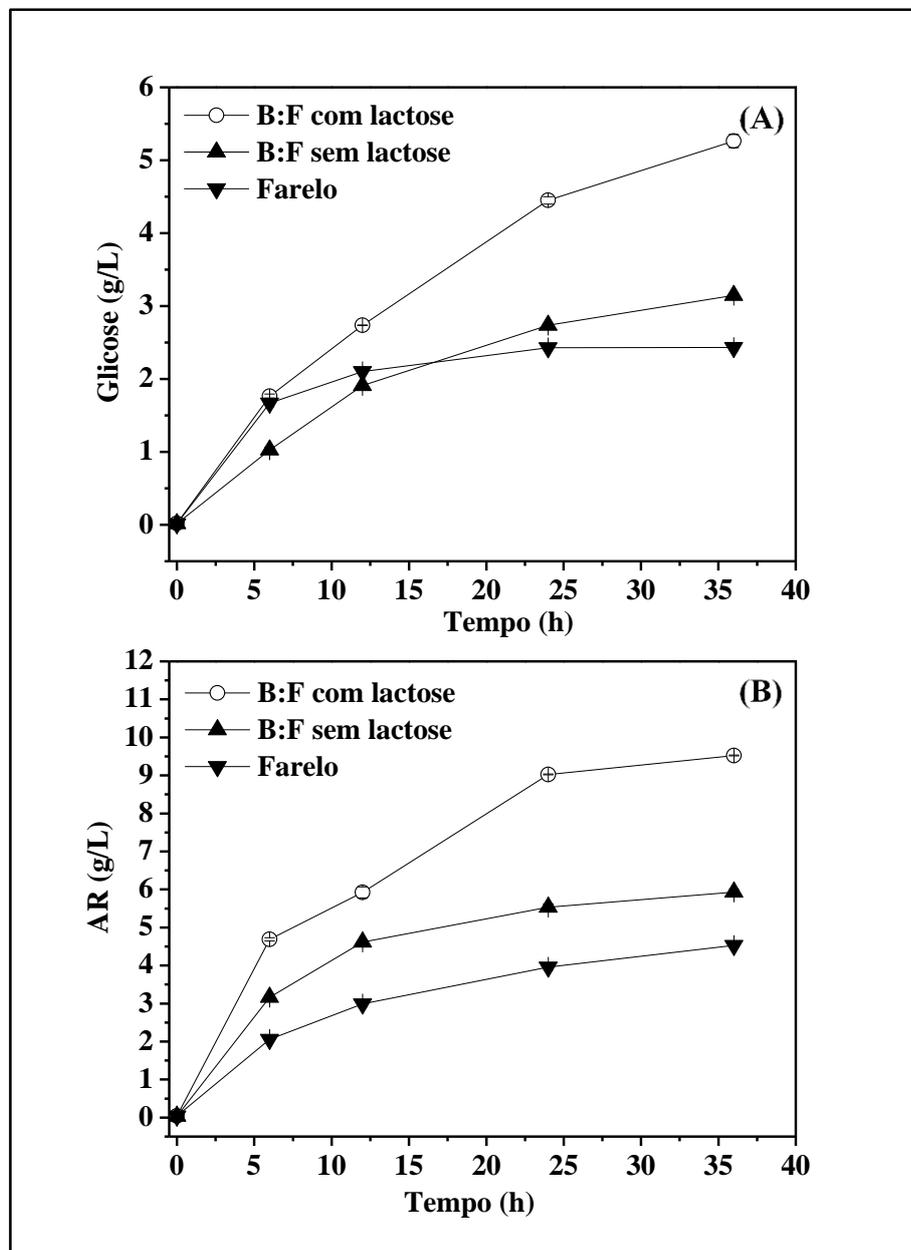
A partir da Figura 25, observa-se que a maior quantidade de betaglicosidase (2,1 UI/g) e de endoglucanase (37,3 UI/g) foi obtida ao utilizar-se como substrato BEX_L com farelo de trigo e lactose. E o substrato que produziu mais xilanase (266,3 UI/g) foi o farelo de trigo. Comparando a quantidade de betaglicosidase e endoglucanase obtidas da utilização do BEX_L com farelo de trigo e lactose com a quantidade obtida utilizando apenas farelo de trigo, obteve-se um ganho de 162,5% e 67,1%, respectivamente. Porém para a xilanase, obteve-se uma perda de 32,0%.

O aumento na produção de betaglicosidase é interessante pois é a principal enzima utilizada na conversão de celbiose em glicose, principal produto de interesse na produção de etanol. A maior quantidade de betaglicosidase obtida ao utilizar-se como substrato BEX_L com farelo de trigo com lactose é um bom indicativo da especificidade desse substrato para a produção de enzimas visando a hidrólise do BEX.

A fim de analisar as especificidades dos substratos, foi realizada após os cultivos o processo de HE e sua análise foi realizada a seguir.

A Figura 26 apresenta os perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática do BEX utilizando o MFI dos cultivos com diferentes substratos.

Figura 26 – Perfis de produção de glicose (A) e açúcares redutores (B) liberados durante a hidrólise enzimática do BEX realizada por 36 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) com umidade de 70%, utilizando o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* e comparando-se os substratos: BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) com lactose, BEX_L com farelo de trigo na proporção em massa (1:1) sem lactose e apenas farelo de trigo



Pode ser observado pela Figura 26 que as hidrólises enzimáticas do BEX utilizando os meios fermentados integrais do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* apresentaram perfis similares, porém, com magnitudes distintas quando foram utilizados os MFI de diferentes substratos. Houve um destaque para a utilização do MFI do cocultivo com o substrato BEX_L com farelo de trigo e lactose, tanto para a produção de glicose (5,3 g/L) quanto de açúcares redutores (9,5 g/L). Comparando a concentração de glicose da utilização do cocultivo com o substrato BEX_L com farelo de trigo e lactose com a utilização do cocultivo com farelo de trigo, foi obtido um ganho de 120,8%

Este resultado mostra que a especificidade do coquetel enzimático é favorecida com a presença de BEX_L no cultivo e a utilização da lactose induz a produção de enzimas. Van de Brink *et al.* (2014) já havia observado o direcionamento das características do coquetel enzimático, ou seja, o substrato sofria uma melhor HE quando o coquetel enzimático havia sido produzido utilizando o mesmo substrato. E a lactose é conhecida como um indutor eficiente para a produção de celulases por *T. reesei* (SEIBOTH *et al.*, 2007).

A utilização do mesmo material tanto como substrato para a produção de enzimas quanto para a hidrólise pode reduzir os custos da produção do etanol de segunda geração, uma vez que ambos os processos poderiam ser colocalizados e compartilharem da mesma infraestrutura. Além disso, a escolha do substrato indutor afeta as características do coquetel enzimático produzido (VAN DEN BRINK *et al.*, 2014). Logo, como o objetivo é produzir enzimas para aplicação específica na hidrólise do bagaço de cana na cadeia produtiva do etanol de segunda geração (2G), o mesmo usado como indutor tem o potencial de favorecer o direcionamento das características do coquetel enzimático (SORENSEN *et al.*, 2011; DELABONA *et al.*, 2012a).

5.8- Otimização da hidrólise enzimática com o meio fermentado integral

Para o cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* que resultou em melhor valor de conversão de biomassa em glicose, foi avaliado utilizando a metodologia estatística de planejamento experimental o efeito da manipulação das variáveis agitação, pH e temperatura na etapa de sacarificação com o meio integral. O objetivo era encontrar as condições ótimas para a sacarificação da biomassa utilizando o meio fermentado integral (MFI). A análise foi feita através de um planejamento fatorial completo 2³, pois o mesmo permitiu investigar as influências das variáveis experimentais de interesse (agitação, pH e temperatura) e os efeitos de interação na resposta (concentração de glicose em g/L) na etapa de sacarificação com o

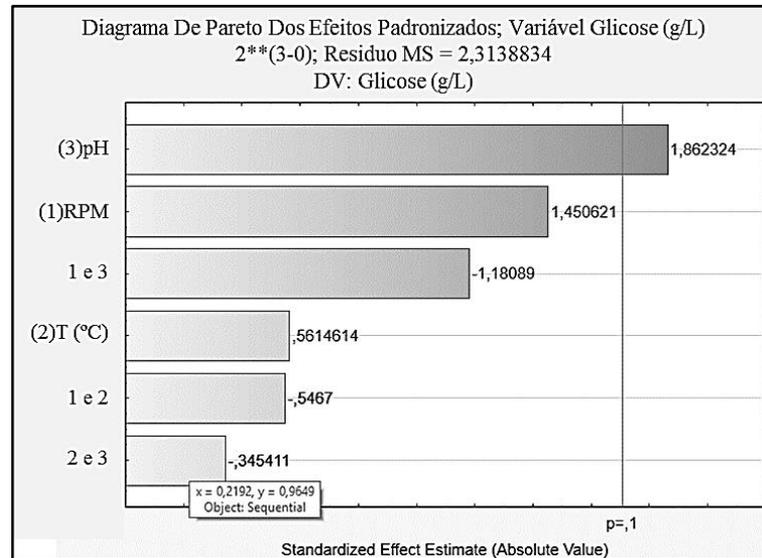
meio fermentado integral. Foram realizados 2³ experimentos e mais o ponto central do planejamento em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis foi empregado. A Tabela 8 mostra as condições selecionadas para cada nível, o ponto central utilizado e a matriz do planejamento fatorial completo.

Tabela 8 – Condições selecionadas para cada nível das variáveis experimentais de interesse (agitação, pH e temperatura), o ponto central utilizado e a matriz para o planejamento fatorial completo para a sacarificação da biomassa utilizando o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae*

	-1	C	+1	Ensaio	pH	T	RPM
				1	-1	-1	-1
				2	+1	-1	-1
				3	-1	+1	-1
				4	+1	+1	-1
pH	4,3	4,8	5,3	5	-1	-1	+1
T (°C)	45	50	55	6	+1	-1	+1
Agitação (RPM)	150	200	250	7	-1	+1	+1
				8	+1	+1	+1
				9	0	0	0
				10	0	0	0
				11	0	0	0

A Figura 27 mostra o gráfico de Pareto, resultado da avaliação das influências da agitação, pH e temperatura na etapa de sacarificação com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* através da concentração de glicose liberada após 36 horas de hidrólise enzimática com nível de confiança de 90% utilizando o programa Statistica 10.

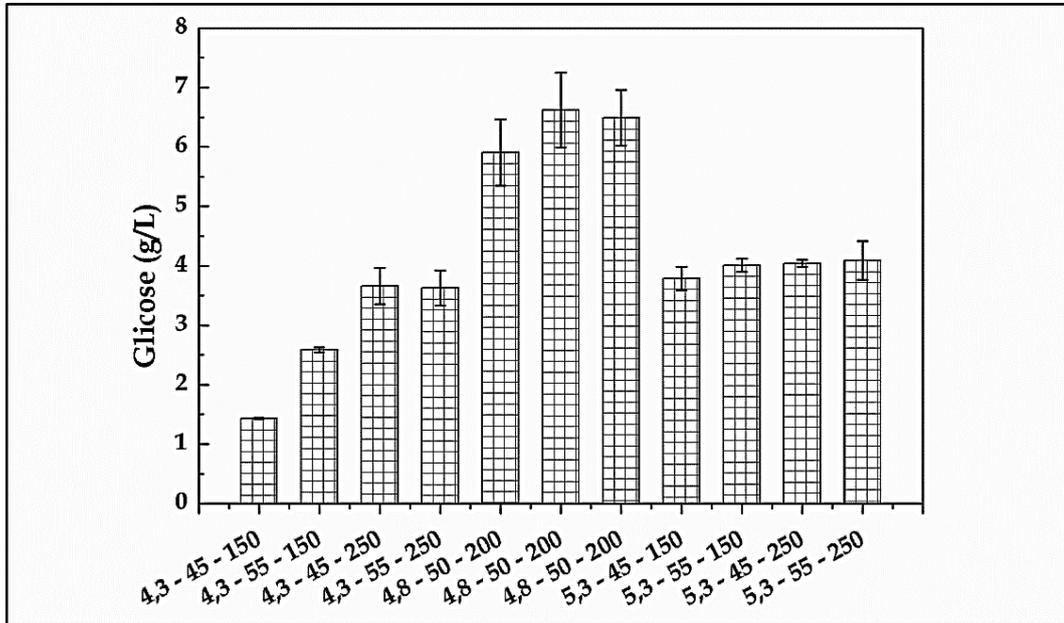
Figura 27 – Gráfico de Pareto avaliando as influências da agitação, pH e temperatura na etapa de sacarificação com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* através da concentração de glicose após 36 horas de hidrólise enzimática



Pode ser observado pela Figura 27, considerando-se um nível de confiança de 90 %, que somente a variável pH tem efeito significativo na hidrólise enzimática utilizando o meio fermentado integral (MFI) e não existe interações entre os diferentes fatores (pH, agitação (RPM) e temperatura) para a faixa de valores estudada.

A Figura 28 mostra a concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática (HE) para todos os ensaios do planejamento experimental. Pode-se observar que o processo de sacarificação realizado na condição do ponto central apresentou a melhor conversão da biomassa. Logo, essa condição de HE, já conhecida e amplamente utilizada (SUN e CHENG, 2002; MOUTTA *et al.*, 2013; BUSSAMRA *et al.*, 2015), também é a condição ótima para sacarificação utilizando-se o meio fermentado integral (MFI), como foi a condição adotada por alguns autores (PIROTA *et al.*, 2013a; PIROTA *et al.*, 2014; SINGHANIA *et al.*, 2015).

Figura 28 – Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática para todo os pontos do planejamento experimental



Após o estudo das variáveis operacionais, foi avaliado também o efeito da presença de aditivos na hidrólise. Foram avaliados três aditivos: Tween 80 (0,1%), PEG 1500 (4%) e proteína de soja (4%) (OLSSON *et al.*, 2003; CANNELLA e JORGENSEN, 2014), na hidrólise do BEX_L e BEX, nas condições definidas no ensaio descrito anteriormente.

A Figura 29 mostra a concentração de glicose após as 36 horas de hidrólise enzimática deste experimento e a Figura 30 mostra o ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos, para concentração de glicose em relação ao BEX.

Figura 29 – Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos

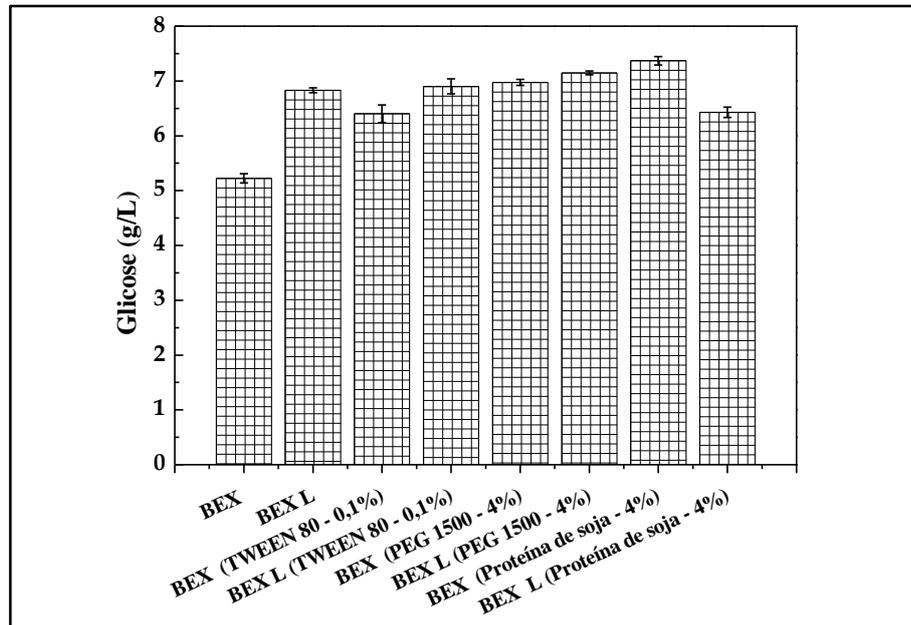
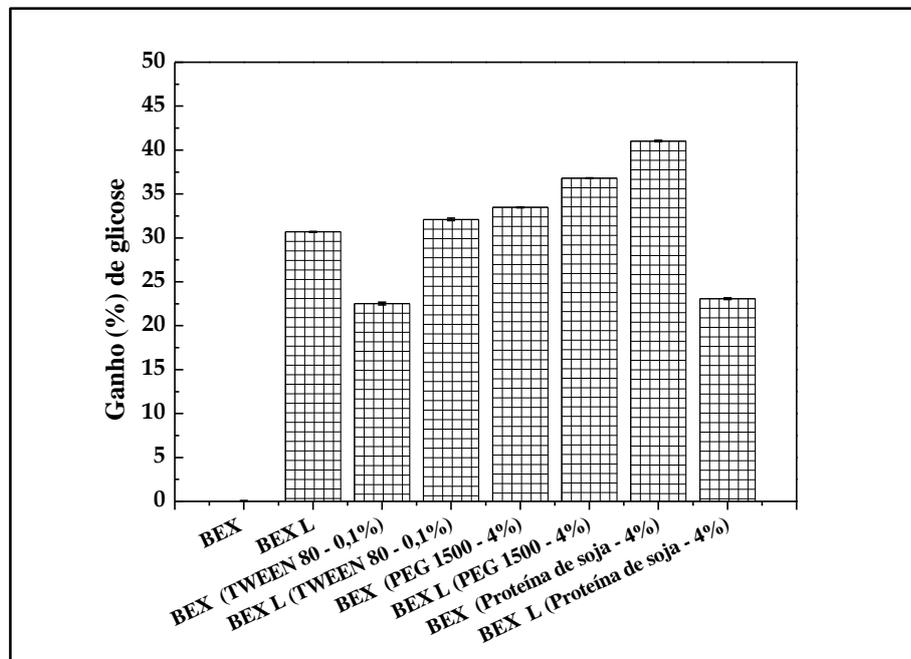


Figura 30 – Ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos, para concentração de glicose (g/L) em relação ao BEX



Observando-se as Figura 29 e 30, nota-se que após 36 horas de hidrólise enzimática a adição dos aditivos proporcionou ganhos comparando-se com a utilização do BEX sem aditivo, e para os experimentos com BEX o maior ganho de glicose foi obtido utilizando-se proteína de soja (4%) que promoveu um aumento de 41% na concentração de glicose. Observou-se também que a lavagem do BEX, por remover os compostos fenólicos que atuam como inibidores enzimáticos, tem um efeito positivo semelhante à adição de aditivos na hidrólise do BEX, isso deve-se ao fato de que os aditivos também interagem com os compostos fenólicos, aumentando a estabilidade das enzimas e, assim, reduzindo a desnaturação das mesmas durante a hidrólise.

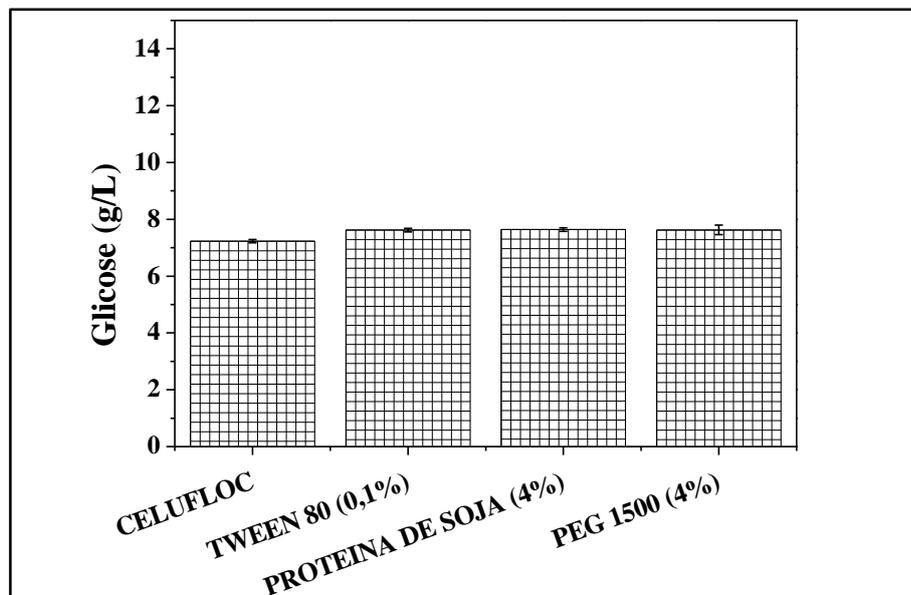
De forma geral, é perceptível que a presença dos aditivos melhorou, na maioria dos casos, o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica. Isso se deve ao fato de que a presença desse componente, pode melhorar a hidrólise de celulose (CASTANON e WILKE, 1981; ERIKSSON *et al.*, 2002; BÖRJESSON *et al.*, 2007).

Diferentes mecanismos foram propostos para o efeito positivo dos aditivos na hidrólise enzimática, pois o mesmo pode mudar a natureza do substrato, aumentando a celulose disponível, ou através da interação com a lignina ou também pode aumentar a estabilidade das enzimas e, assim, reduzir a desnaturação das mesmas durante a hidrólise (HELLE *et al.*, 1993; ERIKSSON *et al.*, 2002). A proteína de soja mostrou-se um bom aditivo, e isso se deve ao fato de que ela é composta basicamente por aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) (KINSELLA, 1979) que auxiliam na redução da adsorção improdutiva pois ela se liga aos sítios hidrofóbicos da lignina (HELLE *et al.*, 1993).

A fim de entender melhor qual o mecanismo proposto para o efeito positivo na utilização de aditivos durante o processo de hidrólise enzimática, foram avaliados os mesmos três aditivos: Tween 80 (0,1%), PEG 1500 (4%) e proteína de soja (4%), na hidrólise de celulose pura (Celufloc), nas condições definidas no ensaio descrito anteriormente.

A Figura 31 mostra a concentração de glicose após 36 horas de experimento e a Figura 32 mostra o ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos, para concentração de glicose em relação a celulose pura (Celufloc).

Figura 31 – Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática de celulose pura (Celufloc) com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos. Ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos, para concentração de glicose (g/L) em relação a celulose pura (Celufloc)



Pode ser observado pelas Figuras 31 que após 36 horas de hidrólise enzimática, não houve diferença no ganho de glicose. A concentração final de glicose obtida foi igual para todos os aditivos quando comparado com a utilização da celulose pura (Celufloc) sem nenhum aditivo. Isso mostra que o mecanismo proposto para o efeito positivo na utilização de aditivos durante o processo de hidrólise enzimática é principalmente evitar a adsorção improdutiva das enzimas na lignina do BEX, como já observado em diversos trabalhos na literatura (HELLE *et al.*, 1993; ERIKSSON *et al.*, 2002; YANG e WYMAN, 2006; KO *et al.*, 2015).

Como a proteína de soja mostrou-se o melhor aditivo dos três testados, foram avaliadas diferentes concentrações de proteína de soja: 4%; 2%; 1%; e 0,5% m/v comparada com albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 1% e 0,5% m/v que são utilizadas na literatura (YANG e WYMAN, 2006; HUI *et al.*, 2015; KO *et al.*, 2015), na hidrólise de BEX. Os resultados são apresentados nas Figuras 32 e 33.

Figura 32 – Concentração de glicose (g/L) após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos

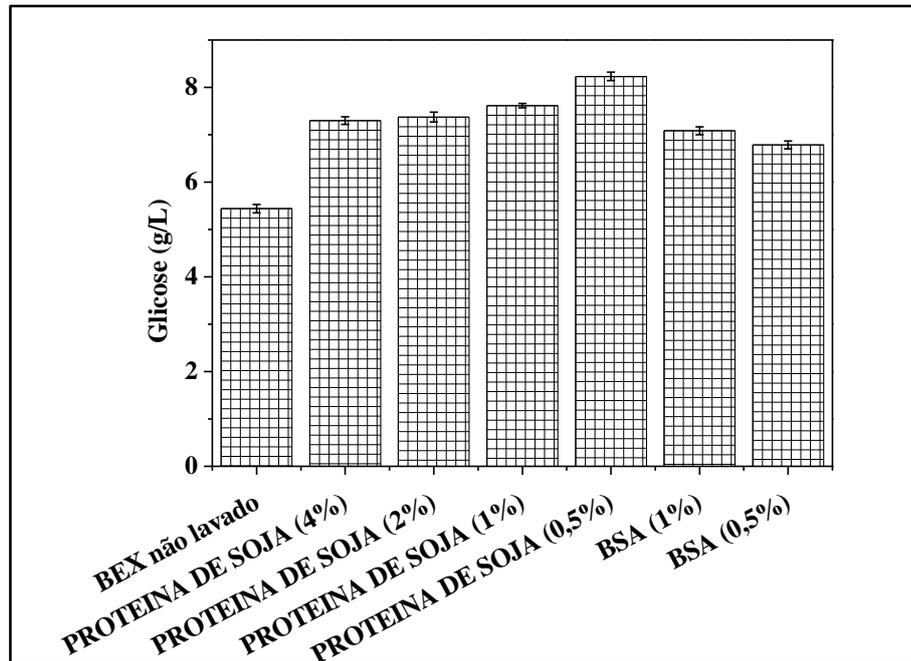
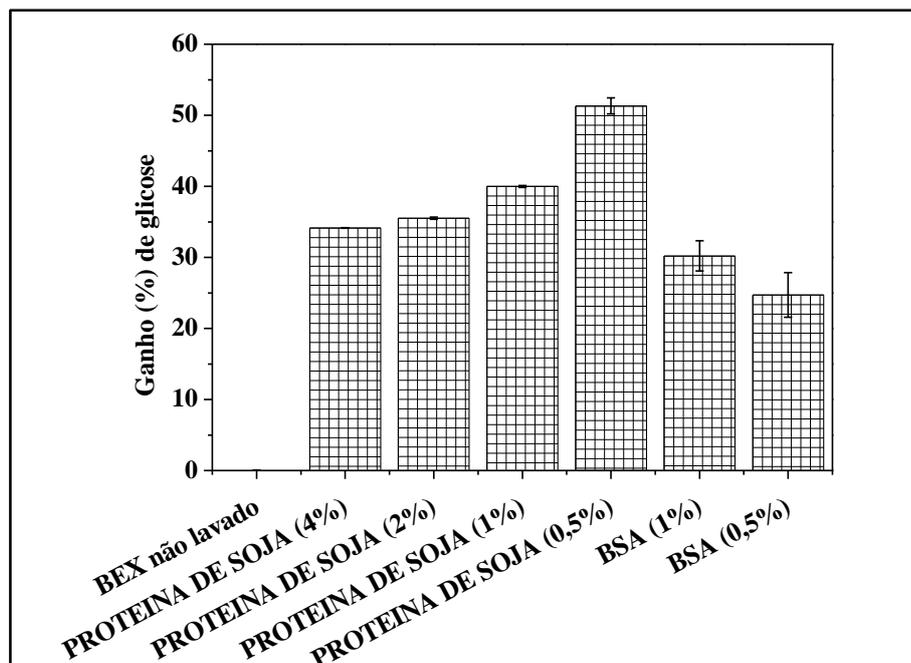


Figura 33 – Ganho em porcentagem após 36 horas de hidrólise enzimática com o meio fermentado integral (MFI) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* na presença de aditivos, para concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores em relação BEX



Observando as Figuras 32 e 33, nota-se que após 36 horas de hidrólise enzimática a adição tanto da proteína de soja como de BSA proporcionou ganhos comparando-se com a utilização do BEX sem aditivo, e o maior ganho de glicose foi obtido utilizando-se proteína de soja (0,5%) que promoveu um aumento de 50% na concentração de glicose. É perceptível que a presença dos aditivos melhorou o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica nestas condições ensaiadas.

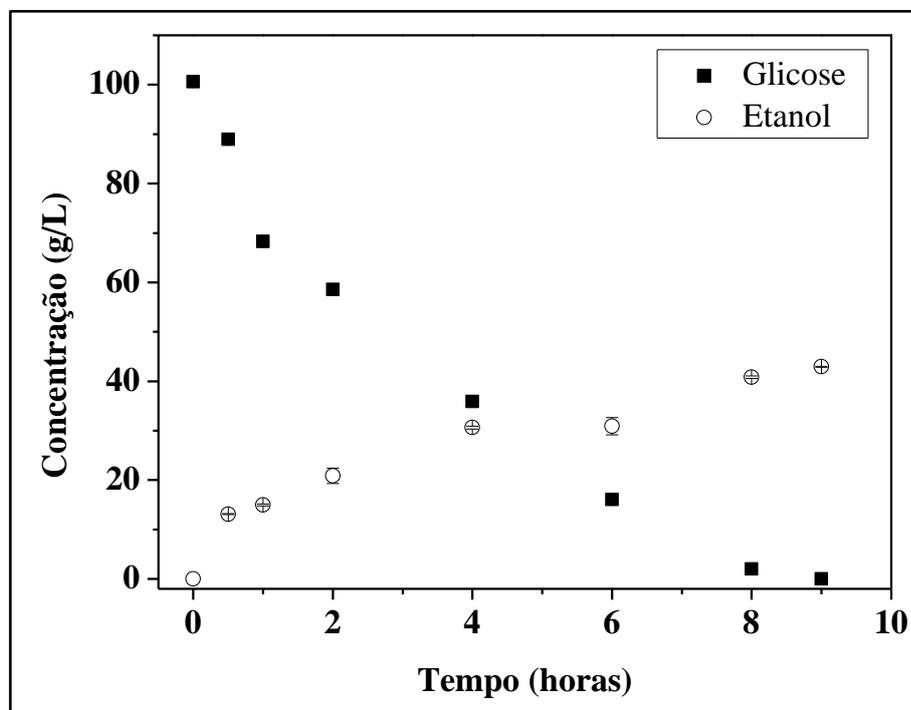
Yang *et al.* (2006) obtiveram um ganho de 20% na conversão da HE de palha de milho utilizando 1% de BSA como aditivo. Hui *et al.* (2015) obtiveram um ganho de 10% na concentração de glicose da HE de palha de arroz utilizando 1% de BSA. Já Ko *et al.* (2015) afirmaram que com a utilização de 0,5% de BSA na HE de lascas de madeiras pré-tratadas hidrotermicamente o rendimento de glicose pode ser aumentado até 71,9%. O resultado obtido no presente trabalho mostra-se promissor para o caso da HE de bagaço de cana, pois promoveu um aumento significativo na concentração de glicose com a utilização da proteína de soja, um insumo mais economicamente viável que a BSA.

5.9- Fermentação Alcólica

O meio fermentado integral do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* foi utilizado para o processo de hidrólise enzimática otimizado, onde utilizou-se as seguintes condições: pH 4,8, 50 °C e 200 rpm com a adição de proteína de soja (0,5% m/v). Em seguida deu-se início ao processo de fermentação alcólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, o material hidrolisado foi suplementado com glicose até 100 g/L pois tem sido sugerido que a produção de etanol de segunda geração pode ser agregada à produção de etanol de primeira geração, promovendo um aumento da produção de etanol sem aumentar a área de cana-de-açúcar plantada (SOCCOL *et al.*, 2010; PIROTA *et al.*, 2014)

A Figura 34 apresenta os perfis de consumo de glicose e a produção de etanol durante a fermentação alcólica realizada por 9 horas utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* após o processo de hidrólise enzimática otimizado, onde se utilizaram as seguintes condições: pH 4,8, 50 °C e 200 rpm com a adição de proteína de soja (0,5% m/v).

Figura 34 – Perfil de concentração de glicose (g/L) e etanol (g/L) após 9 horas fermentação alcoólica utilizando o meio fermentado integral da fermentação em estado sólido (FES) do cocultivo de *T. reesei* com *A. oryzae* após o processo de hidrólise enzimática otimizado



Observando-se a Figura 36 tem-se a validação do processo global de integração para a melhor condição do conjunto cultivo/hidrólise, e a obtenção desses valores permitiu o cálculo de três parâmetros (Tabela 9) para o processo de fermentação alcoólica: o fator de rendimento de etanol ($Y_{P/S}$), descrito pela Equação 4, que foi utilizado para calcular o rendimento de etanol (% do rendimento teórico), de acordo com a Equação 5, e a produtividade volumétrica de etanol (Q_p , g/L.h), descrito pela Equação 6.

Tabela 9 – Concentração de etanol após 9 horas e parâmetros calculados para o processo de fermentação alcoólica

C_{etanol} (g/L)	$42,9 \pm 0,1$
$Y_{P/S}$	$0,427 \pm 0,137$
Rendimento de etanol (% do rendimento teórico)	$83,5 \pm 0,2$
Q_p (g/L.h)	$4,77 \pm 0,06$

Pereira *et al* (2015) obtiveram um rendimento de etanol (% do rendimento teórico) de 56,3% e um Q_p de 2,5 g/L.h utilizando um hidrolisado de bagaço de cana pré tratado por ácido sulfúrico diluído com enzimas comerciais. Pirola *et al* (2014) obtiveram uma

concentração de etanol de 42,9 g/L utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) em 7 horas de fermentação alcoólica usando um material hidrolisado (contendo BEX, farelo de trigo, micélio fúngico de *A. oryzae* P6B2, enzimas de *A. niger* 3T5B8 e açúcares). Assim, os valores obtidos no presente trabalho corroboram e validam a simplificação do processo de conversão de biomassa a etanol por meio da integração da produção de enzimas *in-house*.

6- CONCLUSÕES E PROPOSTAS FUTURAS

6.1- Conclusões

- Etapa de produção das enzimas por FES;
 - A introdução de farelo de trigo na proporção mássica de 1:1 (BEX_L:FARELO) e de lactose na concentração de 0,075 g/g favoreceu a produção de (hemi)celulases ;
 - Aumento de atividade de 73% para betaglicosidase, 67% para endoglucanase e 72% para xilanase, em relação à condição controle (apenas BEX_L como substrato);
- Os cocultivos foram, na maioria dos casos, melhores na conversão do BEX à açúcares fermentescíveis;
 - O cocultivo que apresentou melhor resultado foi de *T. reesei* (Rut-C30) com *A. oryzae* (P6B2);
 - A concentração de glicose comparada ao melhor cultivo individual (*A. niger*) corresponde a um ganho de 48,8%.
- Somente o pH teve efeito significativo na HE utilizando o meio fermentado integral (MFI);
 - A condição de pH 4,8, 200 rpm e 50°C apresentou a melhor conversão da biomassa para a utilização do MFI;
- A utilização do MFI produziu resultados superiores a utilização do extrato enzimático;
 - Fenômeno de adsorção das enzimas no substrato sólido da FES, e as biomoléculas adsorvidas são perdidas e em parte inativadas durante o processo de extração
 - Eliminar uma operação extra de extração sólido-líquido, além de evitar a geração de correntes de efluentes
- A sacarificação da biomassa pode ainda ser otimizada em 50% pela adição de proteína de soja 0,5% (m/v) como aditivo;
- A fermentação alcoólica permitiu validar o sistema do BPC proposto, mostrando que todas as etapas do processo podem ser realizadas sequencialmente no mesmo reator.

6.2- Propostas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho proporcionaram avanços substanciais com relação ao desenvolvimento de um bioprocesso consolidado para produção de etanol 2G, os quais podem dar origem a diversos caminhos promitentes. Assim, estudos adicionais se fazem necessários para aumentar a produção das enzimas por FES e a conversão do BEX em açúcares fermentescíveis até que o escalonamento do processo proposto se torne viável.

Para estudos futuros, propõe-se o aperfeiçoamento deste trabalho, como descrito a seguir:

- i.** Investigar o efeito da variação nas condições da FES, tais como: temperatura e umidade do substrato para os cultivos e cocultivos, visando uma maior produção de enzimas;
- ii.** Avaliar a utilização de indutores economicamente viáveis que possam aumentar a produtividade enzimática;
- iii.** O desenvolvimento de um único reator para a realização das etapas de produção de enzimas por FES, sacarificação e fermentação alcoólica;
- iv.** Avaliar as variáveis operacionais necessárias visando a utilização do BPC proposto em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. <http://www.abitrigo.com.br>, 2015. Acesso em: 06 set. 2015.
- AGGER, J.; VIKSØ-NIELSEN, A.; MEYER, A. S. Enzymatic Xylose Release from Pretreated Corn Bran Arabinoxylan: Differential Effects of Deacetylation and Deferuloylation on Insoluble and Soluble Substrate Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6141-6148, 2010.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010. ISSN 0960-8524.
- AMORE, A. et al. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 339, n. 2, p. 93-101, 2013.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, p. 3, 2011.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. In: (Ed.). **FEMS Microbiol Rev**. Netherlands, v.29, 2005. p.719-39.
- BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. v. 30, n. 1, 1989.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.
- BERLIN, A. et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.
- BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blücher, 2001. cap. 2, p.247-276.
- BINDER, J. B.; RAINES, R. T. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4516-4521, 2010.

BISARIA, V. S.; KONDO, A. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**. Wiley Online Library, 2014.

BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 214-228, 2004.

BÖRJESSON, J. et al. Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1–2, p. 186-195, 7/2/ 2007. ISSN 0141-0229.

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

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120-128, 2010.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; DA COSTA, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173-181, 2015.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012 2012.

CANNELLA, D.; JORGENSEN, H. Do New Cellulolytic Enzyme Preparations Affect the Industrial Strategies for High Solids Lignocellulosic Ethanol Production? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 59-68, 2014.

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

CASTANON, M.; WILKE, C. R. Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 6, p. 1365-1372, 1981.

CASTILHO, L. R. et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CASTILLO, M. R. et al. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme-production. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 9, p. 967-972, 1994.

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

CERQUEIRA LEITE, R. C. D. et al. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, n. 5, p. 655-661, 5// 2009. ISSN 0360-5442.

CHANDEL, A. K. et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, Jan 2012. ISSN 0268-2575.

CHANG, M. C. Y. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 6, p. 677-684, 2007.

CHEN, W.-H. et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 2916-2924, 2011.

CHEN, Y. T.; KAO, W. T.; LIN, K. W. Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 250-257, 2008. ISSN 0308-8146.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, Vol 2**, v. 2, p. 121-145, 2011.

CLOUGH, M. T. et al. Ionic liquids: not always innocent solvents for cellulose. **Green Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 231-243, 2015.

COLEMAN, H. D.; YAN, J.; MANSFIELD, S. D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 13118-13123, 2009.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar**. Brasília: CONAB, 2013. 2 - Safra 2015/2016: 33 p. 2015.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

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, n. 0, p. 270-274, 2012.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. S. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

DELABONA, P. D. S. 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, n. 0, p. 517-521, 2012a.

DELABONA, P. D. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, n. 0, p. 243-250, 2012b.

DELABONA, P. D. S. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 0, p. 236-242, 2013.

DIPARDO, J. Outlook for biomass ethanol production and demand. **United States Department of Energy**, v. 24, 2000.

EL-SHISHTAWY, R. M. et al. Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. **Bmc Biotechnology**, v. 15, p. 13, 2015.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 353-364, 2002.

FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X.-Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource technology**, v. 101, n. 11, p. 4111-4119, 2010. ISSN 0960-8524.

FAO. FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. 2015. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> >. Acesso em: 07 set. 2015.

FARINAS, C. S. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, 2011.

FEKETE, E. et al. d-Galactose uptake is nonfunctional in the conidiospores of *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 329, n. 2, p. 198-203, 2012a. ISSN 1574-6968..

FEKETE, E. et al. Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 6, p. 415-425, 6// 2012b. ISSN 1087-1845.

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, 2015.

FRY, S. C. et al. Mixed-linkage β -glucan: xyloglucan endotransglucosylase, a novel wall-remodelling enzyme from Equisetum (horsetails) and charophytic algae. **The Plant Journal**, v. 55, n. 2, p. 240-252, 2008.

GAMAUF, C. et al. Characterization of the bga1-encoded glycoside hydrolase family 35 β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- β -d-galactanase activity. **FEBS Journal**, v. 274, n. 7, p. 1691-1700, 2007. ISSN 1742-4658.

GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 312-319, 2011.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. v. 59, 1987.

GIESE, E. et al. **Prospects for the bioethanol production from sugarcane feedstock: focus on Brazil**: Nova Science Publishers, New York, NY, USA 2011.

GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VANDENHONDEL, C. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: Progress, limitations and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1-11, 1997.

GOUVEIA, E. R. et al. Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GUO, M. X.; SONG, W. P.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712-725, 2015.

GUTIERREZ-CORREA, M. et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 2, p. 173-178, 1999.

GUTIERREZ-ROJAS, I.; MORENO-SARMIENTO, N.; MONTOYA, D. Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: Classical cases and new models. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2015.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological Research**, v. 113, n. 2, p. 165-172, 2009.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HASSUANI, S. J.; LEAL, M. R. L. V.; MACEDO, I. C. **Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash**. Piracicaba, SP: PNUD/CTC 2005.

HECTOR, R. E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast**, v. 28, n. 9, p. 645-660, 2011.

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

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

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

HORN, S. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2012.

HORTA, M. A. C. et al. Transcriptome Profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Induced by Sugarcane Bagasse. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88689, 2014.

HUI, W.; SHINICHI, K.; KAZUHIRO, M. Effect of non-enzymatic proteins on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of different lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 373-380, Aug 2015. ISSN 0960-8524.

IKRAM UL, H.; JAVED, M. M.; KHAN, T. S. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *trichoderma viride* MSK-10. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 8, p. 609-614, 2006.

IVANOVA, C. et al. Systems Analysis of Lactose Metabolism in *Trichoderma reesei* Identifies a Lactose Permease That Is Essential for Cellulase Induction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62631, 2013.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 530-535, 2002.

JANAS, P.; ZDZISLAW, T.; MLEKO, S. New inducers for cellulases production by *Trichoderma reesei* M-7. **Electronic J. Polish Agric. Univ**, p. 1505-0297, 2002.

JAVED, M. M. et al. Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 4, p. 724-733, 2012.

JOUZANI, G. S.; TAHERZADEH, M. J. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. 2015.

JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 191-201, 2013.

JUTURU, V.; WU, J. C. Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 353-363, 2013.

KARAFFA, L. et al. d-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. **Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 1507-1514, 2006.

KHAN, T. S.; MUBEEN, U. Wheat straw: A pragmatic overview. **Curr. Res. J. Biol. Sci**, v. 4, p. 673-675, 2012.

KING, B. et al. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for Biofuels**, 2011.

KINSELLA, J. E. Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 3, p. 242-258, 1979. ISSN 0003-021X.

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, 2012.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10-26, 2004.

KO, J. K. et al. Adsorption of Enzyme Onto Lignins of Liquid Hot Water Pretreated Hardwoods. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 447-456, Mar 2015. ISSN 0006-3592.

KOLASA, M. et al. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143-148, 2014.

KOVACS, K. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced *in-house* **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 1754-6834, n. 1, p. 14, 2009.

KUBICEK, C. et al. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 1754-6834, n. 1, p. 19, 2009.

KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. **Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics**. Taylor & Francis Ltd, 1998. ISBN 0748405720.

KUDO, K. et al. Purification and enzymatic characterization of secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl β -glucosidases screened from *Aspergillus oryzae* genome. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2015. ISSN 1389-1723.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

- KUMAR, V. et al. *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* beta-galactosidase grow on whey permeate. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 1, p. 82-5, Jan 1992.
- LADISCH, M. R.; SVARCZKOPF, J. A. Ethanol-production and the cost of fermentable sugars from biomass. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 83-95, 1991.
- LANGSTON, J.; SHEEHY, N.; XU, F. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 5, p. 972-978, 2006. ISSN 1570-9639.
- LARA-MÁRQUEZ, A. et al. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 5, p. 859-868, 2011.
- LE CROM, S. et al. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 38, p. 16151-16156, 2009.
- LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 41, 2013.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.
- LU, X.; ZHANG, Y.; ANGELIDAKI, I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. **Bioresource technology**, v. 100, n. 12, p. 3048-3053, 2009.
- LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- MAHESHWARI, D. K. et al. Paper-mill sludge as a potential source for cellulase production by *Trichoderma reesei* qm-9123 and *Aspergillus niger* using mixed cultivation. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, n. 3, p. 161-163, 1994.
- MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in trichoderma-*viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73, n. 2, p. 269-278, 1957.
- MARMANN, A. et al. Co-Cultivation-A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.
- MARTIN, C. et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International sugar journal**, v. 109, n. 1297, 2007.
- MARTINS, D. A. B. et al. **Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production.** INTECH Open Access Publisher, 2011.

MASSADEH, M. I. et al. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 21, p. 1771-1774, 2001.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 8// 2012. ISSN 0360-1285.

MES-HARTREE, M.; HOGAN, C. M.; SADDLER, J. N. Influence of growth substrate on production of cellulase enzymes by *Trichoderma harzianum* E58. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 7, p. 725-729, 1988. ISSN 1097-0290.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONRROY, M. et al. Bioorganosolv pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloephyllum trabeum*) and ethanolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 1, p. 11-16, 2010.

MOONEY, C. A. et al. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 113-119, May 1998. ISSN 0960-8524.

MORIKAWA, Y. et al. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 1-2, p. 106-111, 1995.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005. ISSN 0960-8524.

MOUTTA, R. D. O. et al. Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1: 1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 5, n. Special Issue (S12), p. S12-005, 2013.

NGUYEN, T. A. D. et al. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7432-7438, 2010.

OLIVÉRIO, J. L.; SOARES, P. A. Produção de álcool a partir do bagaço: o processo DHR. 16 set. 2015 2007. Disponível em: <
http://www.iea.usp.br/midiateca/apresentacao/etanolcelulosicoares.pdf/at_download/file>.

OLSSON, L. et al. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 612-619, 2003.

OSIEWACZ, H. D. Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 3, p. 425-442, 2002.

PAKULA, T. M. et al. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 135-143, 2005.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.

_____. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81-84, 2003.

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

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. **Bioresource technology**, v. 161, p. 431-440, 2014.

PARK, E.; NARUSE, K.; KATO, T. One-pot bioethanol production from cellulose by co-culture of *Acremonium cellulolyticus* and *Saccharomyces cerevisiae* **Biotechnology for Biofuels**, p. 64, 2012.

PENTTILÄ, M.; LIMÓN, C.; NEVALAINEN, H. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. **Mycology, Handbook of Fungal Biotechnology. Volume**, v. 20, 2004.

PEREIRA, S. C. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, Mar 2015.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. **Microbiology-Sgm**, v. 158, p. 58-68, 2012.

PIROTA, R. D. P. B. **Simplificação do processo de conversão de biomassa a etanol usando enzimas do meio fermentado integral de fungos filamentosos cultivados por fermentação em estado sólido**. 2014. 282 (Doutorado). Biotecnologia, UFSCar, São Carlos.

PIROTA, R. D. P. B.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013a.

PIROTA, R. D. P. B.; 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, 2014.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, n. 0, p. 465-471, 2013b.

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, 2010. ISSN 0960-8524.

RAHMAN, S. et al. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 554-559, 2007.

RAIMBAULT, M. U. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 26-27, 1998.

REHMAN, S. et al. Production of plant cell wall degrading enzymes by monoculture and co-culture of *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus* under SSF of banana peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1485-1492, 2014.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. 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, 2013.

ROELFSEMA, W. A. et al. Lactose and derivatives. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2000. ISSN 3527306730.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades**. Revista BNDES 2009.

SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SEIBOTH, B. et al. The d-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and d-galactose catabolism and necessary for β -galactosidase and cellulase induction by lactose. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 890-900, 2007a. ISSN 1365-2958.

SEIBOTH, B. et al. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1015-1025, Feb 2004. ISSN 0950-382X.

SEIBOTH, B. et al. Role of the bga1-Encoded Extracellular β -Galactosidase of *Hypocrea jecorina* in Cellulase Induction by Lactose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 851-857, 2005.

SEIBOTH, B. et al. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 42-48, 2007b.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SILVA, V. et al. Cellulosic hydrolysates fermentation obtained through sugarcane bagasse enzymatic saccharification pretreated by hydrothermal processing. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 37, p. 1476-5535, 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. An integrative process for bio-ethanol production employing SSF produced cellulase without extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 45-48, 2015.

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, 2010.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 7// 1996. ISSN 0960-8524.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 7// 2010. ISSN 0960-8524.

SORENSEN, A. et al. Onsite Enzyme Production During Bioethanol Production from Biomass: Screening for Suitable Fungal Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1058-1070, 2011.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, n. 11, p. 832-844, 2005.

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

SWARTZ, R. W. **Penicillins**. Oxford, United Kingdom: Current Commodity Products Pergamon Press, 1985.

TANIGUCHI, M. et al. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with *Pleurotus ostreatus* for the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 449-452, 2010.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 169-179, 2003.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H. C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface-area. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 155-163, 1992 1992. ISSN 0960-8524.

TRIANA, O. et al. **Atlas del bagazo de la caña de azúcar**. GEPLACEA, México DF 1999.

VAN DEN BRINK, J. et al. Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 10, p. 1329-1338, 2014.

VAN MARIS, A. J. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006. ISSN 0003-6072.

VERENDEL, J. J.; CHURCH, T. L.; ANDERSSON, P. G. Catalytic One-Pot Production of Small Organics from Polysaccharides. **Synthesis-Stuttgart**, n. 11, p. 1649-1677, 2011.

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. 9, 2012.

WROLSTAD, R. E. **Current protocols in food analytical chemistry**. Wiley, 2001. ISBN 0471325651.

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

_____. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54-60, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 611-617, Jul 5 2006. ISSN 0006-3592.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass & Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

ZHANG, J.; VIKARI, L. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 286-291, 2012. ISSN 0960-8524.

ZHANG, X.; XU, C.; WANG, H. Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 149-151, 2007a.

ZHANG, X. et al. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 3, p. 159-164, 2007b.

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

ZHANG, Z. B. et al. Ethanol, Corn, and Soybean Price Relations in a Volatile Vehicle-Fuels Market. **Energies**, v. 2, n. 2, p. 320-339, 2009.

ZHAO, X. B.; ZHANG, L. H.; LIU, D. H. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.