

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

ROSANGELA DONIZETE PERPETUA BUZON PIROTA

**SIMPLIFICAÇÃO DO PROCESSO DE CONVERSÃO DE BIOMASSA A
ETANOL USANDO ENZIMAS DO MEIO FERMENTADO INTEGRAL
DE FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVADOS POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

São Carlos – SP
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

ROSANGELA DONIZETE PERPETUA BUZON PIROTA

**SIMPLIFICAÇÃO DO PROCESSO DE CONVERSÃO DE BIOMASSA A
ETANOL USANDO ENZIMAS DO MEIO FERMENTADO INTEGRAL
DE FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVADOS POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

São Carlos – SP
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

ROSANGELA DONIZETE PERPETUA BUZON PIROTA

**SIMPLIFICAÇÃO DO PROCESSO DE CONVERSÃO DE BIOMASSA A
ETANOL USANDO ENZIMAS DO MEIO FERMENTADO INTEGRAL
DE FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVADOS POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

Orientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários para obter o título de Doutor em Biotecnologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, Campus de São Carlos.

São Carlos – SP
2014

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

P672sp

Pirota, Rosangela Donizete Perpetua Buzon.

Simplificação do processo de conversão de biomassa a etanol usando enzimas do meio fermentado integral de fungos filamentosos cultivados por fermentação em estado sólido / Rosangela Donizete Perpetua Buzon Pirota. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

282 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Bagaço de cana. 3. Biorreator de coluna instrumentado. 4. Fermentação alcoólica. 5. Fungos filamentosos. 6. Hidrólise enzimática. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirota

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 20/09/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Cristiane Sanchez Farinas (Orientadora)
(EMBRAPA – Instrumentação)



Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
(EMBRAPA – Agroindústria Tropical)



Prof.^a Dr.^a Daniela Alonso Bocchini Martins
(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”/ Araraquara)



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof. Dr. Alberto Colli Baldino Júnior
(Universidade Federal de São Carlos)

Ao meu pai Adão Pirota (*em memória*),

Homem simples, humilde, honesto que não pode estudar mais que fez de tudo para que eu estudasse. Enquanto minhas mãos segurava uma caneta, um tubo de ensaio ou uma pipeta na dele segurava uma enxada, o volante de um trator ou de um caminhão. Um pai companheiro e atencioso, um PAI com letra maiúscula mesmo. Nada mais justo, e também não poderia ser de outra forma, do que todo meu trabalho de doutorado ser dedicado a ele, ao meu super-herói, meu amigo, meu irmão camarada, MEU PAI ADÃO PIROTA.

Amor eterno!

Agradecimentos

À Deus pelos momentos que me envolve com sua presença e espírito, e por que não, pelos problemas e aflições que me concedeu para edificar o meu caráter.

Aos meus pais Adão (*em memória*) e Maria, que trabalharam em dobro, sacrificando seus sonhos em favor dos meus; e não foram apenas pais, mais amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis.

Ao meu marido Alessandro por todo amor, companheirismo, incentivo, paciência e por estar sempre presente nos momentos difíceis, me amparando, me aconselhando e trazendo sempre alegrias. Obrigado meu amor. por ter se abdicado da minha atenção para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida. Te amo!

A minha sogra Aparecida e ao meu sogro Gumercindo que nunca me trataram como nora mais sim como filha. Sempre estiveram do meu lado me amparando, me aconselhando e me ajudando no que fosse preciso. Amo vocês, meus segundos pais!

À minha querida e inestimável orientadora, Dra. Cristiane Sanchez Farinas, pela oportunidade, pela excelente orientação e pela frase “Menos é mais”. Frase pequena, mas de grande valor para mim. Gostaria de dizer que te admiro muito como pessoa e como profissional, e que de algum tempo para cá tenho procurado me espelhar em você. Te adoro!

À minha querida amiga de todas as horas, Priscila, que conheci no laboratório de Microbiologia da UNESP em 2008 e que acabamos construindo uma grande amizade que tenho certeza perdurará por toda a vida.

Aos colegas de laboratório pela ajuda na realização deste trabalho: Úrsula, Camila, Sandra, Fernanda, Vanessa, Gabriela Rabelo, Caio, Maiara, Larissa e em especial a Mariana Tonelotto, ao Rafael Frederico e ao Flávio Baleeiro que estiveram completamente vinculados a este trabalho me ajudando e auxiliando sempre que preciso.

A secretária do programa da Pós-graduação em Biotecnologia, Claudia, e aos funcionários da Embrapa Instrumentação em especial a Silviane e a Joana pela ajuda constante, eficiência, atenção e disponibilidade.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

A Universidade Federal de São Carlos.

A Embrapa instrumentação – São Carlos, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigada !!!

“...Onde você quer chegar?

Ir alto.

Sonhe alto,

queira o melhor do melhor,

queira coisas boas para a vida.

pensamentos assim trazem para nós

aquilo que desejamos.

Se pensarmos pequeno,

coisas pequenas teremos.

*Já se desejarmos fortemente o melhor
e principalmente lutarmos pelo melhor,
o melhor vai se instalar na nossa vida...”*

(Paulo Roberto Gaefke)

Sumário

Resumo	xxi
Abstract	xxiii
Capítulo 1 – Introdução Geral.....	1
1.1. Revisão Geral.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Organização da tese.....	3
1.4. Produção Científica.....	5
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	9
2.1. Biodiversidade do solo Amazônico	9
2.2. Fungos filamentosos.....	11
2.2.1. Gênero <i>Aspergillus</i>	11
2.2.2. Gênero <i>Trichoderma</i>	17
2.3. Resíduos lignocelulósicos.....	23
2.3.1. Farelo de trigo	26
2.3.2. Bagaço de cana-de-açúcar	32
2.4. Fermentação em estado sólido (FES).....	36
2.5. Biorreatores de FES	42
2.6. Enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal.....	56
2.6.1. Celulases	56
2.6.2. Hemicelulases	61
2.7. Aplicação das celulases e hemicelulases	66
2.8. Produção de etanol de segunda geração	68
2.9. Referências	80
Capítulo 3 – Produção de enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal por fungos isolados do solo e de madeira em decomposição da Região Amazônica	119
Resumo.....	119
3.1. Introdução.....	119
3.2. Material e Métodos	122

3.2.1. Micro-organismos	122
3.2.2. Obtenção das enzimas por Fermentação em estado sólido.....	122
3.2.2.1. Substrato	122
3.2.2.2. Inóculo e condições de cultivo	123
3.2.2.3. Extração da solução enzimática	123
3.2.3. Determinação das atividades enzimáticas	123
3.2.3.1. Atividade de endoglucanase e xilanases.....	123
3.2.3.2. Atividade de β -glicosidase.....	124
3.2.3.3. Atividade de FPase.....	124
3.2.3.4. Atividade de poligalacturonase.....	124
3.3. Resultados e Discussão	124
3.3.1. Perfil de produção e produtividade de endoglucanase	125
3.3.2. Perfil de produção e produtividade de β -glicosidase	127
3.3.3. Perfil de produção e produtividade de FPase.....	129
3.3.4. Perfil de produção e produtividade de xilanase	131
3.3.5. Perfil de produção e produtividade de poligalacturonase.....	133
3.4. Conclusões.....	135
3.5. Referências	135

Capítulo 4 - Avaliação de uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P27C3A isolada do solo da Floresta Amazônica para produção de celulases e xilanases utilizando fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas..... 139

Resumo.....	139
4.1. Introdução.....	139
4.2. Material e Métodos	141
4.2.1. Biorreator de coluna instrumentado	141
4.2.2. Seleção do micro-organismo	142
4.2.3. Seleção das condições operacionais para o cultivo do fungo por FES	142
4.2.4. Perfil de produção de celulases e xilanase.....	143
4.2.5. Extração das enzimas	143
4.2.6. Análises respirométricas.....	143
4.2.7. Ensaio de atividade enzimática	144
4.2.8. Análise estatística.....	145

4.3. Resultados e Discussão	145
4.3.1. <i>Screening</i> das linhagens fúngicas produtoras de celulases.....	145
4.3.2. Efeito do teor de umidade inicial na produção de celulases e xilanases por <i>A. oryzae</i>	147
4.3.3. Efeito da temperatura sob a produção de celulases e xilanase por <i>A. oryzae</i>	151
4.3.4. Perfil de produção de celulases e xilanase por <i>A. oryzae</i> sob as condições selecionadas	154
4.3.5. Análise respirométrica.....	157
4.3.6. Conclusões	160
4.3.7. Referências.....	160

Capítulo 5 - Aumento da produção de xilanases por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2 isolado da Floresta Amazônica utilizando fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas..... 165

Resumo	165
5.1. Introdução	165
5.2. Material e Métodos	167
5.2.1. Biorreator de coluna instrumentado	167
5.2.2. Seleção do micro-organismo	169
5.2.3. Seleção das condições operacionais para o cultivo do fungo por FES	169
5.2.4. Perfil de produção de celulases e xilanases	170
5.2.5. Extração das enzimas	170
5.2.6. Análises respirométricas.....	177
5.2.7. Ensaio das atividades enzimáticas	171
5.2.8. Análise estatística.....	171
5.3. Resultados e discussão	172
5.3.1. <i>Screening</i> de linhagens fúngicas produtoras de xilanases	172
5.3.2. Efeito do teor de umidade inicial sob a produção de celulases e xilanase	174
5.3.3. Efeito da temperatura na produção de celulases e xilanase.....	177
5.3.4. Perfil de produção de celulases e xilanases por <i>A. oryzae</i> (P6B2) sob condições de aeração forçada e estática.....	182
5.3.5. Análises respirométricas.....	183
5.4. Conclusões.....	186

5.5. Referências	187
------------------------	-----

Capítulo 6 – Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar usando extrato enzimático e meio fermentado integral produzido por duas novas linhagens de *Aspergillus oryzae* isolados da Floresta Amazônica

192	192
Resumo	192
6.1. Introdução	193
6.2. Material e Métodos	196
6.2.1. Micro-organismos	196
6.2.2. Materiais lignocelulósicos	196
6.2.3. Condições de cultivo da fermentação em estado sólido	197
6.2.4. Hidrólise enzimática	198
6.2.5. Ensaio de atividade enzimática	198
6.2.6. Análise Estatística	199
6.3. Resultados e Discussão	199
6.3.1. Produção de celulasas e xilanases	199
6.3.2. Perfil temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX)	200
6.3.3. Hidrólise do BEX em termos de conversão total	205
6.4. Conclusão	209
6.5. Referências	209

Capítulo 7 – Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor usando extrato enzimático e meio fermentado integral das linhagens de *Aspergillus niger* 3T5B8 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 cultivadas por fermentação em estado sólido

216	216
Resumo	216
7.1. Introdução	216
7.2. Material e Métodos	219
7.2.1. Biorreator de coluna instrumentado	219
7.2.2. Micro-organismos	219
7.2.3. Materiais lignocelulósicos	219

7.2.4. Seleção das condições operacionais para o cultivo em FES.....	220
7.2.5. Perfil de produção de celulasas e xilanase.....	220
7.2.6. Extração das enzimas	221
7.2.7. Hidrólise enzimática.....	221
7.2.8. Ensaio de atividade enzimática	222
7.2.9. Análises respirométricas.....	222
7.2.10. Análise estatística.....	223
7.3. Resultados e discussão	223
7.3.1. Efeito do teor de umidade inicial na produção de celulasas e xilanases por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i>	223
7.3.2. Efeito da temperatura sob a produção de celulasas e xilanase por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i>	227
7.3.3. Perfil de produção enzimática por <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> sob as condições selecionadas	231
7.3.4. Análises respirométricas.....	235
7.3.5. Perfil temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado por explosão a vapor (BEX).....	237
7.3.6. Hidrólise do BEX em termos de conversão total.....	242
7.3.7. Conclusão	247
7.3.8. Referências.....	247
Capítulo 8 – Produção de bioetanol a partir do bagaço de cana hidrolisado por meio fermentado integral e extrato enzimático dos fungos <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8, <i>Aspergillus oryzae</i> (P6B2 e P27C3A) e <i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	253
Resumo.....	253
8.1. Introdução.....	254
8.2. Material e Métodos	257
8.2.1. Micro-organismos	257
8.2.2. Materiais lignocelulósicos	258
8.2.3. Condições de cultivo da fermentação em estado sólido	258
8.2.4. Hidrólise enzimática.....	259
8.2.5. Ativação da levedura liofilizada	259
8.2.6. Produção de etanol	259

8.2.7. Ensaio de atividade enzimática	259
8.2.8. Quantificação dos açúcares e etanol.....	260
8.2.9. Análise Estatística	260
8.3. Resultados e Discussão	261
8.3.1. Produção de celulasas e xilanases	261
8.3.2. Perfil temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor	262
8.3.3. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) em termos de conversão total.....	266
8.3.4. Fermentação alcoólica	268
8.4. Conclusão	273
7.5. Referências	273
Capítulo 9 – Conclusões e Perspectivas.....	279
9.1. Conclusões principais.....	279
9.2. Perspectivas	280
Anexos	282

Figuras

Figura 1 – “Pedigree” da linhagem <i>Hipocrea Jecorina</i> RUT C30 e sua relação com o tipo selvagem QM6a	18
Figura 2 – Estrutura da parede celular de resíduos agrícolas ou agroindustriais	23
Figura 3 – Esquema de interação entre as cadeias moleculares de celulose dentro da região de microfibrilas de celulose cristalina	24
Figura 4 – Monômeros que constituem a hemicelulose.....	25
Figura 5 – Alcoóis precursores das unidades fenilpropanóides (monolignóis).....	26
Figura 6 – Composição histológica do grão de trigo	28
Figura 7 – Morfologia da cana-de-açúcar	33
Figura 8 – Aspectos anatômicos da folha e do colmo da cana-de-açúcar usando técnicas microscópicas	34
Figura 9 – Esquema de alguns processos que ocorrem em microescala durante a FES	39
Figura 10 – Esquema de um biorreator de bandeja	43
Figura 11 – Esquema de um biorreator de leito empacotado	46
Figura 12 – Esquema de um biorreator de leito fluidizado com suportes para imobilização das células	47
Figura 13 – Esquema de um biorreator de tambor rotativo.....	48
Figura 14 – Esquema de um biorreator de coluna	50
Figura 15 – Esquema de um biorreator de coluna estéril.....	51
Figura 16 – Esquema de um biorreator Zymotis	52
Figura 17 – Esquema de um biorreator Growtek	53
Figura 18 – Fermentador de estado sólido contínuo.....	54
Figura 19 – Esquema de um biorreator Plafactor TM	55
Figura 20 – TaGH61, uma celulose ativa GH61 de <i>Thermoascus aurantiacus</i> (a); CBP21, uma quitina-ativa CBM33 de <i>Serratia marcescens</i> (b) e detalhes do sítio ativo destas duas enzimas (c) e (d), respectivamente	59
Figura 21 – Visão atual sobre a degradação da celulose pelas enzimas fúngicas	60

Figura 22 – Componentes estruturais encontrados na hemicelulose e as hemicelulases reponsáveis pela sua degradação	65
Figura 23 – Representação esquemática hipotética do ataque das enzimas hidrolíticas a parede celular do colmo e folha do bagaço de cana-de-açúcar	73
Figura 24 – Um esquema de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica com linhagens de leveduras recombinantes produtoras de celulases por BPC e suas vantagens ...	78
Figura 25 – Produção de endoglucanase pelos 40 fungos isolados da Floresta Amazônica..	126
Figura 26 – Produção de β -glicosidase pelos 40 fungos isolados da Floresta Amazônica...	128
Figura 27 – Produção de FPase pelos 40 fungos isolados da Floresta Amazônica	130
Figura 28 – Produção de xilanase pelos 40 fungos isolados da Floresta Amazônica	132
Figura 29 – Produção de poligalacturonase pelos 40 fungos isolados da Floresta Amazônica	134
Figura 30 – Biorreator de coluna instrumentado	141
Figura 31 – Produtividade de endoglucanase pelas 40 linhagens fúngicas isoladas da Amazônia e cultivadas em farelo de trigo por FES	146
Figura 32 – Efeito do teor de umidade inicial sob a produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanas por <i>A. oryzae</i> cultivado em FES sob aeração forçada e estática	148
Figura 33 – Efeito da temperatura sob a produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanase por <i>A. oryzae</i> cultivado em FES com aeração forçada e estática	153
Figura 34 – Perfil de produção de celulases e xilanase por <i>A.oryzae</i> cultivado sob FES por 120 horas	156
Figura 35 – Evolução do CO ₂ durante a produção de celulases e xilanas por <i>A.oryzae</i> cultivado sob diferentes teores de umidade iniciais, diferentes temperaturas e condição operacional selecionada	158
Figura 36 – Biorreator de coluna instrumentado	168
Figura 37 – Produtividade de xilanase pelas 40 linhagens fúngicas isoladas da Floresta Amazônica e cultivadas em farelo de trigo por FES	173
Figura 38 – Efeito do teor de umidade inicial na produção de celulases e xilanas por <i>A. oryzae</i> cultivado em FES com aeração forçada e estática.....	175
Figura 39 – Efeito da temperatura a produção de xilanase por <i>A. oryzae</i> cultivado em FES com aeração forçada e estática	179

Figura 40 – Perfil de produção de celulases e xilanases por <i>A.oryzae</i> cultivado sob FES por 120 horas	183
Figura 41 – Evolução de CO ₂ durante a produção de celulases e xilanases por <i>A.oryzae</i> cultivado sob diferentes teores de umidade iniciais, diferentes temperaturas e condição operacional selecionada	184
Figura 42 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), usando meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) de <i>A.oryzae</i> produzidas no Erlenmeyer ou biorreator	203
Figura 43 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizando o meio fermentado integral (MFI) e extratos enzimáticos (EE) de <i>A. oryzae</i> P6B2 e P27C3A obtidas em Erlenmeyer ou estas combinações com uma preparação de enzima comercial... ..	204
Figura 44 – Conversão depois de 72 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) utilizando MFI e/ou EE de <i>A. oryzae</i> P6B2 e P27C3A e diferentes combinações com enzima comercial	208
Figura 45 – Efeito do teor de umidade inicial sob a produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases por <i>A. niger</i> cultivado em FES sob aeração forçada e estática	224
Figura 46 – Efeito do teor de umidade inicial sob a produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases por <i>T. reesei</i> cultivado em FES sob aeração forçada e estática.. ..	225
Figura 47 – Efeito da temperatura sob a produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanase por <i>A. niger</i> cultivado em FES com aeração forçada e estática	228
Figura 48 – Efeito da temperatura sob a produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanase por <i>T.reesei</i> cultivado em FES com aeração forçada e estática	229
Figura 49 – Perfil de produção de celulases e xilanases por <i>A.niger</i> cultivado sob FES por 120 horas	232
Figura 50 – Perfil de produção de celulases e xilanases por <i>T. reesei</i> cultivado sob FES por 120 horas	233
Figura 51 – Evolução do CO ₂ durante a produção de celulases e xilanases pelo <i>A.niger</i> cultivado sob diferentes teores de umidade iniciais, diferentes temperaturas e condição operacional selecionada	236

Figura 52 – Evolução do CO ₂ durante a produção de celulases e xilanases pelo <i>T. reesei</i> cultivado sob (a) diferentes teores de umidade iniciais e (b) diferentes temperaturas	237
Figura 53 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), usando (a) o meio fermentado integral (MFI) de <i>A. niger</i> 3T5B8, <i>T. reesei</i> RUT-C30 e uma preparação comercial e enzimas do extrato enzimático (EE)	240
Figura 54 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizando o meio de fermentado integral (MFI), extratos enzimáticos (EE) e combinações de <i>A. niger</i> 3T5B8 e de <i>T. reesei</i> RUT-C30 obtidas em Erlenmeyer	241
Figura 55 – Conversão depois de 72 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) utilizando enzimas do extrato enzimático (EE) e meio fermentado integral (MFI) do <i>A. niger</i> 3T5B8 e do <i>T. reesei</i> Rut-C30 e diferentes combinações com enzima comercial	242
Figura 56 – Ilustração esquemática do processo simplificado de conversão da biomassa a etanol.....	257
Figura 57 – Perfis temporais de concentração da glicose e dos açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizando o meio fermentado integral (MFI) e extratos enzimáticos (EE) dos fungos <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> (P6B2 e P27C3A) e <i>T. reesei</i> obtidas em Erlenmeyer por FES	265
Figura 58 – Conversão final em 72 horas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) utilizando meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) de <i>A. niger</i> 3T5B8, <i>A. oryzae</i> (P6B2 e P27C3A) e de <i>T. reesei</i> Rut-C30...	267
Figura 59 – Consumo da glicose pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 em 8h de fermentação alcoólica	269
Figura 60 – Concentração de etanol pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1) utilizando o material hidrolisado pelos complexos enzimáticos de <i>A. oryzae</i> P6B2, <i>A. niger</i> 3T5B8 e <i>T. reesei</i> RUT C30.....	270
Figura 61 – Rendimento de etanol (%) pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1) utilizando o material hidrolisado pelos complexos enzimáticos de <i>A. oryzae</i> P6B2, <i>A. niger</i> 3T5B8 e <i>T. reesei</i> RUT C30.....	272

Tabelas

Tabela 1 – Produção de celulases e hemicelulases por <i>Aspergillus</i> ssp em FES utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos.	13
Tabela 2 – Produção de celulases e hemicelulases por <i>T. reesei</i> em FES utilizando resíduos lignocelulósicos	21
Tabela 3 – Lista de algumas enzimas produzidas por microrganismos utilizando farelo de trigo como fonte de carbono em bioprocessos	30
Tabela 4 – Vantagens e desvantagens da FES em relação a FSm	40
Tabela 5 – Classificação e diferença entre os biorreatores de escala de laboratório, piloto e industrial.....	44
Tabela 6 – Vantagens e desvantagens de vários processos de pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos	69
Tabela 7 – Comparação do desempenho e das condições dos três processos de hidrólise da celulose.....	72
Tabela 8 – Comparação entre as duas principais técnicas de fermentação	76
Tabela 9 – Efeito do teor de umidade inicial dos parâmetros de fermentação obtidas utilizando a equação logística.....	159
Tabela 10 – Efeito da temperatura sob os parâmetros de fermentação obtidos utilizando a equação logística	161
Tabela 11 – Efeito do teor de umidade inicial dos parâmetros de fermentação obtidas utilizando a equação logística.....	165
Tabela 12 – Efeito da temperatura sob os parâmetros de fermentação obtidos utilizando a equação logística.....	166
Tabela 13 – Produção de celulases e xilanases por <i>A. oryzae</i> (P6B2 e P27C3A) usando Erlenmeyer e biorreator de coluna instrumentado para FES	203
Tabela 14 – Atividade enzimática total dos extratos de <i>A. oryzae</i> P6B2 e P27C3A produzidos por FES em Erlenmeyer e biorreator e da preparação comercial usada para hidrólise do BEX..	210
Tabela 15 – Atividade enzimática total dos extratos de <i>A. niger</i> e <i>T. reesei</i> produzidos por FES em Erlenmeyer e biorreator e da preparação comercial usada para hidrólise do BEX	239

Tabela 16 – Produção de celulases e xilanases por <i>A. niger</i> 3T5B8, <i>A. oryzae</i> P6B2 e <i>T. reesei</i> RUT C30 por FES	261
Tabela 17 – Atividade enzimática total dos extratos de <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> (P6B2 e P27C3A) e <i>T. reesei</i> produzido por FES em erlenmeyer e usado para hidrólise do BEX	263

Quadro

Quadro 1 – Fungos isolados do solo e de madeira em decomposição da Floresta Amazônica
..... 122

Lista de abreviaturas

AN – Acelerador nuclear

BEX – Bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor

CAZy – *Carbohydrate Active Enzymes*

CBH – Celobiohidrolases

CBM – Módulo de Ligação dos Carboidratos

CDH – Celobiose-dehidrogenase

CE – Carboidrato Esterases

C1 – Carbono 1

C4 – Carbono 4

EE – Extrato Enzimático

EG – Endoglucanases

FES – Fermentação em Estado Sólido

GP – Grau de polimerização

His – Histidinas

INRA – Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica

IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

MFI – Meio Fermentado Integral

NTG – Nitrosoguanidina

OTA – *Office of Technology Assessment*

PCFR – Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição

R – Redutores

UV – Ultravioleta

5C – Cinco Carbonos

6C – Seis Carbonos

Resumo

A discussão dominante sobre a transformação da biomassa lignocelulósica a combustível líquido é a sua viabilidade econômica. Assim, a comercialização do etanol a partir de biomassa lignocelulósica é dificultada principalmente pelos custos proibitivos das preparações de celulases – enzimas usadas na sacarificação. Algumas estratégias que podem ser adotadas para a redução do custo das enzimas utilizadas na degradação da biomassa incluem a seleção de micro-organismos altamente produtores de celulases e hemicelulases, utilização de matéria-prima mais barata e estratégias de fermentação a um custo efetivo - como a fermentação em estado sólido (FES) e técnicas mais eficientes de sacarificação e fermentação alcoólica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do meio fermentado integral (MFI), contendo biomassa lignocelulósica, micélio fúngico e enzimas na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor para produção de etanol celulósico. Neste contexto, realizou-se a seleção de fungos filamentosos isolados do solo de madeira em decomposição da Região Amazônica produtores de celulases e hemicelulases, otimizou-se as condições operacionais, como umidade e temperatura para a produção de enzimas *in house* utilizando biorreator de coluna instrumentado e por fim, avaliou-se a eficiência do MFI e (EE) na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para produção de etanol celulósico. Entre os 40 fungos caracterizados quanto à produção de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose, duas linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) se destacaram em relação às demais. Além das linhagens de *A. oryzae* outras duas linhagens de fungos, uma de *A. niger* 3T5B8 e outra de *T. reesei* RUT C30 foram avaliadas neste trabalho, a fim de verificar a eficiência das linhagens isoladas do solo da Floresta Amazônica. A umidade inicial do substrato não influenciou na produção de celulases e xilanases pela linhagem de *A. oryzae* P27C3A, no entanto umidades elevadas foram melhores para a produção de enzimas pelas linhagens de *A. oryzae* P6B2 e *A. niger* e umidades baixas foram melhores para a produção de celulases e xilanases por *T. reesei* em ambos os sistemas de cultivo, forçado e estático. Com relação à temperatura de fermentação, 28°C foi melhor para a produção de xilanases por todas as linhagens fúngicas e temperaturas mais elevadas favoreceram a produção de celulases pelos fungos. A utilização do MFI de *A. niger* ou *T. reesei* obtido em biorreator de coluna instrumentado foram melhores na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) do que o EE, com uma conversão final de 41,3 e 24,9% do valor teórico, respectivamente. A combinação de MFI das linhagens de *A. oryzae* (P6B2 ou P27C3A) obtida em Erlenmeyer e ½ de enzima comercial também favoreceram a hidrólise do BEX (26,1 e 42,4% do valor teórico, respectivamente). No entanto, a combinação de MFI de *A. oryzae* P6B2 e EE de *A. niger* obtido em Erlenmeyer promoveram uma conversão final de 65% e um rendimento de etanol de 84% do valor teórico. Vale salientar que foi utilizado na fermentação alcoólica o meio hidrolisado na íntegra, contendo açúcares, enzimas, biomassa lignocelulósica e micélio fúngico. Como conclusões gerais, constatou-se que a utilização de MFI produzido pelos fungos por FES na hidrólise do BEX resultou em rendimentos semelhantes ou mais elevados quando comparado com a hidrólise do BEX utilizando EE, dando a clara indicação de que o passo de extração/filtração das enzimas pode ser eliminado; a utilização do complexo enzimático de *A. oryzae* P6B2 em combinação com o complexo enzimático de *A. niger* resultou em uma hidrólise mais eficiente do BEX quando comparado com outras combinações, mostrando a importância da seleção de micro-organismos produtores de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose, para que a produção de etanol celulósico possa se tornar economicamente viável; e por fim, a utilização de um único sistema de reator para a realização das etapas de produção de enzimas por FES, sacarificação e fermentação alcoólica pode ser realizada, evitando-se a necessidade de etapas de filtração.

Palavras-chaves: bagaço de cana-de-açúcar; biorreator de coluna instrumentado; fermentação alcoólica; fungos filamentosos; hidrólise enzimática

Abstract

The main challenge on the conversion of lignocellulosic biomass into liquid fuels is the economic viability of this process. Thus, the commercialization of lignocellulosic ethanol is hindered mainly by the high costs of the enzyme preparations currently available cellulases - enzymes used in the saccharification step. Some strategies that can be adopted to reduce the enzymes costs include selecting microorganisms, use of cheaper raw materials and more efficient fermentation strategies such as the solid state fermentation (SSF) and efficient techniques for saccharification and fermentation. The aim this work was evaluate the use of the whole fermentation medium containing lignocellulosic biomass, fungal mycelium and enzymes in the hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion for cellulosic ethanol production. In this context, a selection of filamentous fungi highly producing cellulases and hemicellulases, optimization operating conditions, such as humidity and temperature, were carried out for in house enzyme production using an instrumented bioreactor. Then, the efficiency of the whole fermentation medium and enzyme extract in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for cellulosic ethanol production was evaluated. Among the 40 fungal strains evaluated, two strains of *A. oryzae* (P6B2 and P27C3A) stood out. In addition, one strain of *A. niger* 3T5B8 and another of *T. reesei* RUT C30 were also evaluated in this study. The influence of the substrate initial moisture content and temperature on efficiency of cellulase and xylanase production by strains of *A. oryzae*, *A. niger* and *T. reesei* grown in SSF under conditions of forced aeration and static were evaluated. The initial moisture content of the substrate did not affect the production of cellulases and xylanases by strain of *A. oryzae* P27C3A, however higher moisture was better for enzyme production by strains of *A. oryzae* P6B2 and *A. niger* and lower moisture were better for the production of cellulases and xylanases by *T. reesei* in both cultivate systems. Temperature 28°C was best for xylanase production by all the fungal strains, while higher temperatures was better cellulases production in both culture systems. The use of whole fermented medium of *A. niger* or *T. reesei* obtained in the bioreactor were better in the hydrolysis sugarcane bagasse pretreated by steam explosion (BPSE) than the enzymatic extract with a final conversion of 41.3 and 24.9% of theoretical, respectively. The combination of whole fermentation medium of strains of *A. oryzae* (P6B2 or P27C3A) obtained in flasks and ½ commercial enzyme hydrolysis also were efficient on BPSE hydrolysis (26.1 and 42.4% of theoretical, respectively). Nevertheless, the combination of whole fermented medium of *A. oryzae* P6B2 and enzymatic extract of *A. niger* obtained in flasks promoted a conversion of 65% and an ethanol yield of 84% of the theoretical value. As overall conclusion it was found that the use of whole fermented medium produced by fungi cultivated under solid state fermentation (SSF) in the BPSE hydrolysis resulted in similar or higher yields compared to the hydrolysis using the enzyme extract, giving clear indication that the extraction/filtration step of the enzyme can be eliminated. The use of the enzyme complex of *A. oryzae* P6B2 in combination with the enzymes of *A. niger* resulted in a BPSE hydrolysis more efficient when compared with other combinations, showing the importance of selecting microorganisms for high enzymes production. Moreover, the use of a single reactor system for performing enzyme production steps by SSF, saccharification and alcoholic fermentation may be performed, avoiding the need for steps separation.

Keywords: bagasse sugarcane, instrumented bioreactor, solid state fermentation, fungi, enzymatic hydrolysis

Capítulo 1 – Introdução Geral

1.1. Revisão Geral

O custo das enzimas celulases e hemicelulases é um dos fatores limitantes no processo de hidrólise enzimática para produção de etanol celulósico. Entretanto, o impacto do custo dessas enzimas pode ser reduzido a partir da seleção de micro-organismos produtores de celulases e hemicelulases, pela utilização de matéria-prima mais barata e estratégias de fermentação a um custo efetivo, como a fermentação em estado sólido (FES) e tecnologias mais eficientes para as etapas de sacarificação e fermentação alcoólica.

Os solos da floresta Amazônica supostamente abrigam elevada biodiversidade microbiana, visto que suportam através da ciclagem da serrapilheira um dos ecossistemas mais exuberantes do planeta. Os fungos juntamente com as bactérias são os principais micro-organismos responsáveis pela decomposição da serrapilheira. Milhares de espécies de fungos são isoladas do solo, no entanto, pelo menos um milhão de espécies ainda está à espera de serem descobertas. A caracterização de micro-organismos de interesse biotecnológico tem sido reportada, entretanto a produção de enzimas por fungos isolados do solo da Floresta Amazônica ainda é pouco descrita.

As enzimas podem ser produzidas pelos micro-organismos por FES, possibilitando a utilização de substratos mais baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais e, sobretudo a FES simula o habitat natural dos fungos filamentosos, proporcionando uma maior produção de enzimas quando comparada à fermentação submersa (FSm) que utiliza substratos líquidos que fluem livres, como melações e caldos. Apesar do potencial da FES para produção de produtos de alto valor comercial, por exemplo, enzimas, existem desafios tecnológicos a serem confrontados. Na literatura, há poucos designs viáveis de biorreatores operando em condições de estado sólido, devido a vários problemas encontrados principalmente no controle de temperatura e umidade no interior da FES, o que afeta o crescimento do micro-organismo, a formação de esporos, geminação e a formação de produtos. Dessa forma, o controle da temperatura, umidade, e troca de gases na FES são fundamentais para o crescimento microbiano e a consequente produção de metabólitos secundários. Entre os vários tipos de biorreatores de estado sólido, o biorreator de colunas instrumentado de escala de laboratório tem apresentado várias vantagens em relação a outros biorreatores de escala de bancada, com monitoramento e controle de umidade, temperatura,

biomassa e CO₂, fácil montagem e barato. Além disso, tem sido reportado na literatura como um biorreator de estado sólido eficiente na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (FARINAS et al., 2011; PIROTA et al., 2013; RODRIGUES-ZÚÑIGA et al., 2013).

Outros fatores importantes para redução do custo das enzimas e do processo de produção de etanol de segunda geração são: (1) o desenvolvimento de métodos de hidrólise que utilizem de maneira efetiva as enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas produzidas por micro-organismos e (2) técnicas de fermentação alcoólica que reduzam os custos energéticos e o tempo de processo de produção do bioetanol. Neste contexto, adição do meio fermentado integral à biomassa lignocelulósica que vai ser hidrolisada, bem como a utilização do material hidrolisado integral, contendo restos de biomassa lignocelulósica e micélio fúngico na fermentação alcoólica podem ser algumas alternativas promissoras na produção de etanol de segunda geração, visto que a utilização do material fermentado integral na hidrólise de biomassa pode aumentar o rendimento de hidrólise e/ou reduzir etapas do processo e, contornar os problemas de geração de resíduos sólidos decorrentes da extração das enzimas em FES. A utilização do material hidrolisado integral na fermentação alcoólica pode diminuir o tempo de processo e reduzir os custos energéticos de produção do etanol de segunda geração, se adequando ao conceito de biorrefinaria.

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência do meio fermentado integral, contendo biomassa lignocelulósica, micélio fúngico e enzimas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor para produção de etanol celulósico.

Especificamente, este trabalho foi focado: 1) na caracterização de 40 isolados de fungos filamentosos da Floresta Amazônica, com relação ao potencial de produção de celulases e hemicelulases; 2) na otimização das condições operacionais, como umidade e temperatura, utilizando biorreator de coluna instrumentado para produção de enzimas *in house* pelos fungos filamentosos selecionados como bons produtores de endoglucanase e xilanase; 3) comparação da eficiência do material fermentado integral em relação ao extrato enzimático na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor; 4) e por fim, avaliação da eficiência do meio hidrolisado integral na fermentação alcóolica pela levedura *S. cerevisiae* (CAT-01).

1.3. Organização da tese

Esta tese contém um capítulo de introdução geral, um capítulo de revisão bibliográfica, seis capítulos de pesquisa descritiva, resultados e discussão e um capítulo de conclusões gerais e perspectivas futuras, bem como as referências e os trabalhos publicados.

O corpo desta tese é dividido em nove capítulos.

O Capítulo 1 é uma introdução geral que inclui uma revisão geral, os objetivos e a organização desta tese.

O Capítulo 2 é composto por uma introdução e uma revisão bibliográfica descrevendo referências relevantes e atuais que dão uma visão geral dos principais temas como, biodiversidade do solo Amazônico, fungos filamentosos, resíduos lignocelulósicos, fermentação em estado sólido, biorreatores de estado sólido, enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, aplicações biotecnológicas das enzimas microbianas e produção de etanol de segunda geração.

O Capítulo 3 intitulado “Produção de enzimas envolvidas na conversão de biomassa vegetal por fungos isolados do solo e de madeira em decomposição da Região Amazônica” é um capítulo de pesquisa modificado e submetido em revista. Neste trabalho, quarenta linhagens de fungos isolados do solo e de troncos de madeira em decomposição da Floresta Amazônica foram avaliadas quanto à produção de enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal.

O Capítulo 4 intitulado “Avaliação de uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P27C3A isolada do solo da Floresta Amazônica para produção de celulasas e xilanases utilizando FES sob condições operacionais controladas” é um trabalho de pesquisa sobre a influência do teor de umidade inicial do substrato e da temperatura na eficiência da produção de celulasas (em termos de FPase, endoglucanase, e β -glucosidase) e xilanases por *A. oryzae* P27C3A cultivado por FES sob condições de aeração forçada (biorreator de coluna instrumentado) e aeração estática (Erlenmeyer). Os resultados permitiram a seleção de variáveis que foram ajustadas de modo a melhorar a produção de celulasas e xilanases por *A. oryzae* P27C3A. Este capítulo foi modificado e submetido em revista.

O Capítulo 5 intitulado “Aumento da produção de xilanases por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2 isolada do solo da Floresta Amazônica utilizando fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas” é um capítulo de pesquisa modificado a partir do artigo publicado na revista internacional *Industrial Crops and Products*, v.45, p. 465-471, 2013. Neste trabalho, a influência do teor de umidade inicial do

substrato e temperatura na produção de xilanases por *A. oryzae* P6B2 cultivado por FES foi avaliado e comparado com as condições de aeração forçada e estática.

O Capítulo 6 intitulado “Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar usando extrato enzimático e meio fermentado integral obtido por fermentação em estado sólido e produzido por duas novas linhagens de *Aspergillus oryzae* isoladas do solo da Floresta Amazônica” é um capítulo de pesquisa que compara a eficiência do meio fermentado integral (MFI), contendo farelo de trigo, micélio fúngico e enzimas com a eficiência do extrato enzimático (EE) e da enzima comercial na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX).

O Capítulo 7 intitulado “Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor usando extrato enzimático e meio fermentado integral das linhagens de *Aspergillus niger* 3T5B8 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 cultivadas por fermentação em estado sólido” é um capítulo de pesquisa modificado a partir do artigo publicado na revista internacional *Biotechnology Progress*, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013. Neste trabalho, foi comparado à eficiência do MFI (contendo farelo de trigo, micélio fúngico e enzimas) e do EE produzido pelos fungos *A. niger* e *T. reesei* sob condições selecionadas na hidrólise do BEX. A hidrólise do BEX utilizando MFI e/ou EE também foi comparada com a hidrólise utilizando enzima comercial.

O Capítulo 8 intitulado “Produção de bioetanol a partir do bagaço de cana hidrolisado por meio fermentado integral e extrato enzimático dos fungos *Aspergillus niger* (3T5B8), *Aspergillus oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *Trichoderma reesei* (RUT C30)” é um capítulo de pesquisa que avaliou diferentes combinações de MFI e EE dos fungos *Aspergillus niger* (3T5B8), *Aspergillus oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *Trichoderma reesei* (RUT C30) na hidrólise do BEX e a produção de etanol de segunda geração a partir do material hidrolisado integral (contendo restos de bagaço de cana, farelo de trigo, micélio fúngico e enzimas) pelas melhores combinações, estudadas neste trabalho. Este trabalho foi modificado e publicado na revista internacional *Bioenergy Research*, in press, 2014.

O capítulo 9 inclui as principais conclusões e perspectivas.

1.4. Produção Científica

Artigo publicado em revista internacional como autor principal

PIROTA, R. D. P. B.; MIOTTO, L. S.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, p. 117-123, 2013.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELADONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. 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, p. 465-471, 2013.

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, 2013.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S. Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation. *Bioenergy Research*, in press, 2014.

Artigos publicados em revista internacional como colaborador

DELABONA, P. S.; **PIROTA, R. D.P. B.;** CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A. FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, v.37, p. 243-250, 2012.

DELABONA, P. S.; **PIROTA, R. D. P. B.;** CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. 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, p. 236-242, 2013.

TONELOTTO, M.; **PIROTA, R. D. P. B.;** DELABONA, P. S.; BARROS, G. O. F.; GOLUBEV, A. M.; POLIKARPOV, I.; FARINAS, C. S. Isolation and characterization of a

β -galactosidase from a new Amazon forest strain of *Aspergillus niger* as a potential accessory enzyme for biomass conversion. *Biocatalysis and Biotransformation*, p. 1-10, 2013.

Artigos submetidos para publicação em revista internacional como autor principal

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELADONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Characterization of a newly Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* for cellulase production using solid-state fermentation under controlled operation conditions. *Biomass & Bioenergy*, 2012.

Artigo submetido para publicação em revista brasileira como autor principal

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Caracterização de fungos da Amazônia para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. *Ciência Rural*, 2012.

Artigo submetido para publicação em revista internacional como colaborador

RABELLO, G. C.; **PIROTA, R. D. P. B.**; BARROS, G. O. F.; FARINAS, C. S. Simultaneous biosynthesis of biomass-degrading enzymes using co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2012.

Apresentação de pôster em conferências nacionais e internacionais

DELABONA, P. S.; **PIROTA, R. D. P. B.**; SAAVEDRA, G. A. P.; FARINAS, C. S. Produção de celulasas e xilanases por duas linhagens de *Trichoderma* visando a aplicação na produção de etanol celulósico. In: *4º Congresso Internacional de Bioenergia e 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis*, Curitiba, 2009.

DELABONA, P. S.; **PIROTA, R. D. P. B.**; CODIMA, C. A.; RODRIGUES, A.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Production of cellulases by Amazon Forest fungi. In: *World Federation for Culture Collections*, Florianópolis – SC, 2010.

TONELOTTO, M.; **PIROTA, R. D. P. B.**; DELABONA, P. S.; POLIKARPOV, I.; FARINAS, C. S. Production of cellulases by fungi isolated from the Amazon region to application in the production of cellulosic ethanol. In: *3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia*, Fortaleza – CE, 2010.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; POLIKARPOV, I.; FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da Floresta Amazônica quanto à produção de xilanases pelos processos de fermentação em estado sólido e fermentação submersa. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos-2011*, Caxias do Sul, 2011.

BERTUCCI NETO, V.; FONSECA, R. F.; **PIROTA, R. D. P. B.**; FARINAS, C. S. Sistema automatizado para processos de fermentação em estado sólido: Produção de enzimas pelo fungo *Trichoderma harzianum*. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Caxias do Sul, 2011.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M. ; DELABONA, P. S. ; POLIKARPOV, I. ; FARINAS, C. S. Comparison of FPase and xylanase production between fungi isolated from Amazon Region and *Aspergillus niger* (F12). *In: 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia*, Fortaleza - CE, 2010.

PIROTA, R. D. P. B.; BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; FARINAS, C. S. Produção de celulases por uma espécie nova de *Aspergillus oryzae* isolado da região Amazônica usando biorreator de coluna instrumentado. *In: X Seminário Brasileiro de tecnologia Enzimática*, Blumenau, 2012.

BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. S.; **PIROTA, R. D. P. B.**; PRADELLA, J. G. C.; FARINAS, S, C. Seleção e cultivo de fungos amazônicos produtores de xilanase e feruloil Esterase. *In: X Seminário Brasileiro de tecnologia Enzimática*, Blumenau, 2012.

DELABONA, P. S.; **PIROTA, R. D. P. B.**; CODIMA, C. Al.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Effect of initial moisture content on two Amazon Rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agroindustrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization. *In: 34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, New Orleans, 2012.

RABELLO, G. C.; **PIROTA, R. D. P. B.**; FARINAS, C. S. Produção de hemi(celulases) em co-cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido. *In: X Seminário Brasileiro de tecnologia Enzimática*, Blumenau, 2012.

PIROTA, R. D. P. B.; FARINAS, C. S. Comparative enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse by supernatants and whole fermentation media of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* cultivated under solid-state fermentation. *In: 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Portland, 2013.

FONSECA, R. F.; BALEEIRO, F. C. F.; **PIROTA, R. D. P. B.;** BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S.; KWONG, H. W. Evaluating the effects of temperature on enzyme production in solid state fermentation process. *In: XIX SINAFERM-X SHEB*, Foz do Iguaçu, 2013.

BALEEIRO, F. C. F.; FONSECA, R. F.; **PIROTA, R. D. P. B.;** BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Estudo de um modelo cinético para a análise da temperatura na velocidade específica de crescimento de *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. *In: XIX SINAFERM-X SHEB*, Foz do Iguaçu, 2013.

Apresentação oral em conferências nacionais

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; POLIKARPOV, I.; FARINAS, C. S. Produção de carboximetilcelulase e poligalacturonase pelo fungo *Trichoderma polysporum* por fermentação em estado sólido, utilizando bagaço de laranja como substrato. *In: I Jornada Científica da Embrapa*, São Carlos, 2009.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Hidrólise enzimática comparativa do bagaço de cana-de-açúcar usando solução enzimática e meio fermentado por duas novas linhagens de *Aspergillus oryzae*. *In: XIX SINAFERM-X SHEB*, Foz do Iguaçu, 2013.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2.1. Biodiversidade do solo Amazônico

O conceito de biodiversidade mais utilizado é o formalizado pela Comissão de Ciência e Tecnologia do Congresso dos Estados Unidos da América (OTA – *Office of Technology Assessment*) em 1987 que se refere à variedade e variabilidade entre os organismos vivos e os ecossistemas nos quais eles interagem (OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT, 1987). Assim, biodiversidade ou diversidade biológica incluem todas as formas de vida, ecossistemas, espécies, genes e sua abundância relativa (OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT, 1987).

A floresta Amazônica é composta de vários ecossistemas contendo uma grande biodiversidade (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2011). No entanto, os ecossistemas amazônicos são caracterizados por solos altamente desgastados e pobres em nutrientes e altas taxas de rotatividade de matéria orgânica (GLASER; BIRK, 2012). Assim, a manutenção e produtividade desses ecossistemas dependem da biomassa microbiana do solo que tem a habilidade de transformar a matéria orgânica em nutrientes inorgânicos que serão posteriormente absorvidos pelas raízes das plantas (MARCHIORI JÚNIOR; MELO, 1999; DEVI; YADAVA, 2006). Neste contexto, os solos da floresta Amazônica supostamente abrigam elevada biodiversidade microbiana (CENCIANI et al., 2009), visto que suportam através da ciclagem da serrapilheira um dos ecossistemas mais exuberantes do planeta (CENCIANI, 2007).

Os fungos juntamente com as bactérias são os principais micro-organismos da biota do solo responsáveis pela decomposição da serrapilheira e respondem por 80-95% da biomassa total decomposta e respiração heterotrófica do solo (MACFADYEN, 1963; COLEMAN, 1985; CHAPIN; MATSON; MOONEY, 2002). Os fungos constituem a maior porção da biomassa do solo, com carbono igual ou superior ao carbono da biomassa da raiz das plantas (PAUL; CLARK, 1996). Sua biomassa no solo varia entre 1000 a 15000 kg/ha (NAIR, 2002).

Normalmente, os fungos apresentam filamentos ou hifas ramificadas ou não ramificadas com uma densa concentração de citoplasma, e, comumente multinucleadas. As hifas contêm mais vacúolos quando as fontes de nutrientes são escassas, o que permite aos fungos crescerem em novas áreas e explorarem outros substratos. Os fungos secretam enzimas

capazes de quebrar os componentes complexos da parede celular vegetal, tais como celulose e lignina, o que lhes permitem penetrar nas cutículas das folhas mortas ou no exterior das raízes e ter acesso aos compostos mais lábeis do interior da célula (LI; GONZÁLEZ, 2008). Nesse sentido, os micro-organismos isolados do solo são capazes de produzir um amplo espectro de enzimas lignocelulolíticas (BADHAN et al., 2007).

Como principais decompositores da matéria orgânica no solo, os fungos compreendem um diversificado grupo de micro-organismos. Milhares de espécies de fungos têm sido isolados do solo, representando 170 gêneros (NAIR, 2002). Os gêneros mais freqüentemente isolados do solo são: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Verticillium* (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1991). No entanto, pelo menos um milhão de espécies de fungos do solo ainda estão à espera de serem descobertos (NAIR, 2002).

O solo da Floresta Amazônica é uma fonte de elevada biodiversidade microbiana (CENCIANI et al., 2009). Particularmente, há poucos relatos sobre a diversidade microbiana do solo Amazônico (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997). Mais recentemente, a caracterização de micro-organismos de interesse biotecnológico foi reportada (BASTOS et al., 2000), entretanto a produção de enzimas por fungos isolados do solo da Floresta Amazônica ainda é pouco descrita.

Delabona et al. (2012) isolaram 100 espécies de fungos do solo e de madeira em decomposição da Floresta Amazônica, dentre essas espécies, 10 foram analisadas quanto à produção de enzimas e todas mostraram ser boas produtoras de xilanase e celulasas durante o cultivo em fermentação em estado sólido. Entretanto, a espécie de *Aspergillus fumigatus* se destacou em relação as demais com uma produção de 160,1 UI/g de endoglucanase, 5 UI/g de FPase, 105,8 UI/g de β -glicosidase e 1055,6 UI/g de xilanase. Garcia Medeiros, Hanada e Filho (2003) isolaram 10 espécies de fungos da Floresta Amazônica e avaliaram sua capacidade de produzir enzimas xilanases durante o crescimento em meio líquido. Souza, Oliveira e Andrade (2008) estudaram a produção de enzimas por linhagens de Basidiomicetos, oriundas de áreas de floresta da Amazônia, sendo possível detectar a produção de celulasas e proteases por todos os isolados, 40% produziram amilases, 50% produziram fenoloxidasas e 10% produziram pectinases. Duran et al. (1995) utilizaram a técnica de triagem em placas para avaliar a atividade de xilanase de 18 espécies de *Penicillium* e 10 espécies de *Aspergillus* isolados da Região Amazônica.

Esses resultados demonstram que os fungos isolados do solo da Região Amazônica são fonte potencial de enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas, provendo suporte para estudos relacionados com a utilização destes micro-organismos para obtenção de enzimas necessárias na conversão de biomassa.

2.2. Fungos filamentosos

Os fungos são um grupo de micro-organismos pertencentes ao reino *Eumycota* (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009). As espécies fúngicas variam de simples (organismos unicelulares) a muito complexas (organismos multicelulares). Os fungos são eucariotos heterotróficos e por isso dependem da disponibilidade de nutrientes orgânicos e ricos em energia. São organismos saprófitos obtendo seus alimentos a partir de matéria orgânica morta (OSIEWACZ, 2002). A maioria dos fungos é de vida livre e podem ser classificados em grupos tais como, fungos filamentosos, leveduras e cogumelos (OSIEWACZ, 2002; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009).

Os fungos filamentosos são os micro-organismos mais usados na produção de enzimas industriais e exibem características modelo para tal aplicação (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). Dentre algumas dessas características destacam-se a capacidade de cultivo, a produção de quantidades elevadas de enzimas extracelulares, a facilidade de cultivo e o baixo custo de produção em biorreatores de grande escala. Os fungos filamentosos freqüentemente usados na produção de enzimas industriais são os gêneros de *Aspergillus* e *Trichoderma* (DE VRIES; VISSER, 2001; ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

2.2.1. Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* inclui aproximadamente 150 espécies reconhecidas (BLUMENTHAL, 2004). O gênero foi subdividido em sete subgêneros por Samson (1994). *A. niger* pertence ao subgênero *Circumdati* seção *Nigri* (= grupo *A. niger*). A teleomorfia de *A. niger* é desconhecida. Dois padrões de polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição (PCFR) de DNA, padrão N e T, são atualmente encontrados nas linhagens de *A. niger*, indicando que *A. niger* pode ser possivelmente dividido em duas espécies geneticamente distintas baseado no padrão PCFR, *A. niger* e *A. tubigensis*, respectivamente (ACCENSI et al., 2001; ABARCA et al., 2004). *A. oryzae* pertence ao subgênero *Circumdati*, seção *Flavi* (= grupo *A. flavus*). A teleomorfia desta seção é *Petromyces* (FRISVAD; SAMSON, 2000). A seção *Flavi* contém poderosos produtores de micotoxinas bem como

linhagens utilizadas na indústria alimentícia (BLUMENTHAL, 2004). Ambos *A. flavus* e *A. parasiticus* pertencem a esse grupo, *A. oryzae* e *A. flavus* são tão estreitamente relacionados sendo proposto que *A. oryzae* é uma variante de *A. flavus* que provavelmente teve sua morfologia e fisiologia modificada (WICKLOW, 1984). Geiser et al. (2000) e Van Den Broek, Pittet e Hajjaj (2001) sugeriram a partir de dados genéticos e filogenéticos que *A. oryzae* derivou-se de um progenitor de *A. flavus* que não produzia aflatoxina. Desse modo, *A. oryzae* provavelmente surgiu a partir de um fungo domesticado que emergiu do ambiente de fermentação como, por exemplo, do molho de soja (BLUMENTHAL, 2004). *A. oryzae* é usado há milênios como fonte de bolor *Koji*, utilizado na produção de alimentos fermentados, incluindo o molho de soja, pasta de soja, missô, saquê de vinho e arroz (OLEMPSKA-BEER et al., 2006). As espécies de *A. oryzae* e *A. niger* apresentam um longo histórico como fontes de enzimas (OLEMPSKA-BEER et al., 2006) hemicelulolíticas/celulolíticas de caráter industrial (AMORE; FARACO, 2012).

Linhagens de *Aspergillus* ssp. são os maiores decompositores de hemicelulose/celulose e assim possuem a capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas (DE VRIES; VISSER, 2001). Vários estudos com *Aspergillus*, principalmente *A. nidulans*, *A. niger* e *A. oryzae* têm identificado enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas atuando na degradação da parede celular das plantas (AMORE; FARACO, 2012). Dessa forma, as enzimas produzidas por estes micro-organismos apresentam elevado potencial de aplicação no processo de produção de etanol de biomassa lignocelulósica. A Tabela 1 ilustra a produção de celulasas e hemicelulasas por algumas espécies de *Aspergillus*.

Tabela 1 – Produção de celulases e hemicelulases por *Aspergillus* ssp em FES utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos.

Micro-organismos	Fonte de carbono	Atividade enzimática (UI/g)				Referências
		Endoglucanase	FPase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>A. awamori</i>	Bagaço de uva: casca de laranja (1:1)	6,2	-	-	98	Diaz et al., (2012)
<i>A. awamori</i>	Bagaço de uva	-	-	-	40,4	Botella et al., (2005)
<i>A. awamori</i>	Bagaço de cana	-	-	-	1125	Lemos, Fontes e Pereira, (2001)
<i>A. foetidus</i>	Sabugo de milho	-	1,78	-	3065	Shah e Madamwar, (2005)
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo	57	5	105,8	1055,6	Delabona et al., (2012)
<i>A. fumigatus</i> Z5	Palha de trigo	526,3	144,6	-	-	Liu et al., (2011)
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo	20	0,7	99,4	1722	Soni, Nazir e Chadha, (2010)
<i>A. heteromorphus</i>	Casca de arroz	235,6	14,1	-	160,8	Singh et al., (2011)
<i>A. japonicus</i>	Mamona	191,6	953,4	88,3	-	Herculano et al., (2011)
<i>A. nidulans</i> MTCC344	Bagaço de cana pré-tratado	29	-	-	-	Jabasingh e Nachiyar, (2011)
<i>A. nidulans</i> SU04	Bagaço de cana pré-tratado	32	-	-	-	Jabasingh, (2011)
<i>A. niger</i> NS2	Farelo de trigo	310,6	16,8	33	-	Bansal et al., (2012)
	Bagaço de cana	5	1,5	3	-	
<i>A. niger</i>	Casca de batata	23	14	-	23	Dos Santos et al., (2012)
<i>A. niger</i>	Bagaço de maçã	-	-	-	3579	Dhillon et al., (2012)
<i>A. niger</i>	Palha de trigo: sabugo de milho (30%:70%)	-	-	-	2762	Jin et al., (2012)
<i>A. niger</i>	Semente <i>Jatropha curcas</i>	3974	-	-	6087	Ncube et al., (2012)

Tabela 1 – Continuação.

Micro-organismos	Fonte de carbono	Atividade enzimática (UI/g)				Referências
		Endoglucanase	FPase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>A. niger</i> HQ-1	Sabugo de milho: farelo de trigo (1:1)	305	42,4	159	-	Zhang, Sang e Zhang, (2012)
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	48,22	13,57	21,69	2604	Dhillon et al., (2011)
<i>A. niger</i>	Resíduos de manga	7,26	2,55	-	-	Santos et al., (2011)
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	-	-	305	-	Raza et al., (2011)
<i>A. niger</i> F3	Cascas de frutas cítricas	-	-	-	65	Rodriguez-Fernandez et al., (2011)
<i>A. niger</i> F12	Farelo de trigo	21	0,4	-	-	Rodriguez-Zuñiga et al., (2011)
<i>A. niger</i> DFR5	Farelo de trigo: casca de soja (70:30)	-	-	-	2596	Pal e Khanum, (2010)
<i>A. niger</i>	Sabugo de milho	-	-	-	80	Betini et al., (2009)
	Bagaço de cana	-	-	-	187,5	
	Farelo de trigo	-	-	-	652,2	
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	-	-	-	49,4	Kavya e Padmavathi, (2009)
<i>A. niger</i>	Bagaço de cana: farelo de soja (65%: 35%)	-	-	-	2327	Maciel et al., (2009)
<i>A. niger</i> MS82	Sabugo de milho	8,8	-	6	-	Sohail et al., (2009)
	Bagaço	7,8	-	7,8	-	
<i>A. niger</i> KK2	Palha de arroz	129	19,5	100	5070	Kang et al., (2004)
<i>A. niger</i> KK2	Palha de arroz	-	-	-	5071	Park et al., (2002)
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	-	-	-	100	Couri et al., (2000)
	Casca de manga	-	-	-	50,4	

Tabela 1 – Continuação.

Micro-organismos	Fonte de carbono	Atividade enzimática (UI/g)				Referências
		Endoglucanase	FPase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>A. niger</i>	Resíduos da fabricação do malte	46,6	31,5	215,2	-	Fadel, (2000)
<i>A. niger</i>	Palha/farelo de trigo (9:1)	296	-	-	-	Jecu, (2000)
<i>A. niger</i>	Farelo de trigo	15,5	-	-	667,5	Gawande e Kamat, (1999)
	Bagaço de cana	12,5	-	-	450	
	Palha de arroz	14,3	-	-	295	
	Casca de soja	13,25	-	-	217,5	
<i>A. niger</i> 33/2/8	Farelo de trigo: polpa de beterraba (4:1)	23,4	1,2	-	216	WiąCek-Żychlińska, Czakaj e Sawicka-Żukowska, (1994)
<i>A. niger</i> 11042	CBS Palha/farelo de trigo pré-tratado (1:1)	-	-	-	2500	Deschamps e Huet, (1985)
<i>A. niveus</i>	Sabugo de milho	-	-	-	65,2	Betini et al. (2009)
	Bagaço de cana	-	-	-	6,5	
	Farelo de trigo	-	-	-	928	
<i>A. oryzae</i>	Farelo de trigo	-	-	875	-	Raza et al. (2011)
<i>A. oryzae</i>	Farelo de soja e trigo (4:1)	68,4	6,7	9,5	512,16	Brijwani, Oberoi e Vadlani, (2010)
<i>A. oryzae</i>	Palha/farelo de trigo (9:1)	-	2,31	-	-	Hui et al. (2010)
<i>A. oryzae</i>	Polpa de eucalipto	-	-	-	3200	Szendefy, Szakacs e Christopher, (2006)
	Bagaço de eucalipto	-	-	-	2675	
<i>A. oryzae</i>	Farelo de trigo	-	-	-	60	Yamane et al. (2002)

Tabela 1 – Continuação.

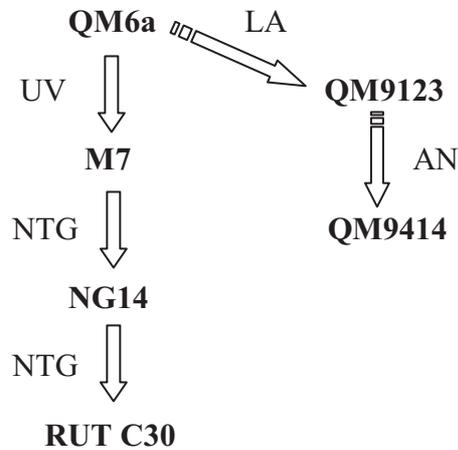
Micro-organismos	Fonte de carbono	Atividade enzimática (UI/g)				Referências
		Endoglucanase	FPase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>A. tamaritii</i>	Sabugo de milho	-	-	-	~780	Ferreira, Boer e Peralta, (1999)
	Bagaço de cana	-	-	-	~720	
	Farelo de trigo	-	-	-	~910	
<i>A. terreus</i>	Palha de arroz	-	11	-	-	Narra et al. (2012)
<i>A. terreus</i>	Farelo de trigo	12	-	-	530	Gawande e Kamat, (1999)
	Bagaço de cana	3,25	-	-	87,5	
	Palha de arroz	17,5	-	-	262,5	
	Casca de soja	12,8	-	-	155	
<i>A. tubingensis</i>	Palha de trigo				6887	Pandya e Gupte, (2012)
<i>A. ustus</i>	Palha de arroz	12,6	5,8	15,8	795	Shamala e Sreekantiah, (1986)
	Farelo de trigo	11,8	3,8	60	615	

2.2.2. Gênero *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma* pertencem ao reino *Fungi* no filo dos Ascomycota. *Trichoderma reesei* foi descoberto durante a Segunda Guerra Mundial (PETERSON; NEVALAINEN, 2012). A deterioração de fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos fabricados de algodão, chamou a atenção de soldados das forças armadas norte-americanas, instalados nas ilhas Solomon, no Pacífico Sul (DE CASTRO; PEREIRA, 2010; PETERSON; NEVALAINEN, 2012). Um grupo de trabalho, constituído por oito pesquisadores e liderado pelo Dr. Elwyn T. Reese passou a conduzir seus experimentos no laboratório das forças armadas, em Natick, Massachusetts, Estados Unidos (MANDELS; REESE, 1957). Como resultado das pesquisas, uma linhagem, codificada como QM6a, de um fungo filamentosos, identificado posteriormente como *Trichoderma viride*, foi isolado (Fig.1) (DE CASTRO; PEREIRA, 2010). Entretanto, mais tarde foi descoberto que *T. viride* QM6a era na realidade diferente de *T. viride* e foi nomeado como *Trichoderma reesei* em homenagem a Elwyn T. Reese (SIMMONS, 1977). *T. reesei* é o anamorfo de *Hypocrea jecorina* (teleomorfo) (KUHLS et al., 1996).

Existem muitos mutantes de *T. reesei* originado deste isolado, o QM6a (Fig. 1). A exposição do QM6a a luz ultravioleta e o “screening” de desrepressão catabólica levou ao isolamento da linhagem RUT M7 (LE CROM et al., 2009). A mutação da linhagem RUT M7 com N-nitroguanidina originou o mutante RUT NG14, uma linhagem parcialmente desreprimida catabolicamente, que produzia 20 vezes mais atividade de β -glicosidase e endoglucanase e cinco vezes mais atividade de FPU do que o mutante QM9414 (Fig. 1). A mutação do RUT NG 14 com radiação ultravioleta, “screening” das atividades de celulasas e desrepressão catabólica por resistência ao antimetabólico 2-deoxiglicose deu origem ao RUT C30 (Fig. 1) (MONTENECOURT; EVELEIGH, 1977). A linhagem RUT C30 é uma das mais poderosas e melhor caracterizadas, e tornou-se referência entre as linhagens de *T. reesei* produtoras de celulasas (LE CROM et al., 2009).

Figura 1 – “Pedigree” da linhagem *Hipocrea jecorina* RUT C30 e sua relação com o tipo selvagem QM6a.



Legenda:

UV – luz ultravioleta

NTG – nitrosoguanidina

AN – acelerador nuclear

Fonte: Seidl et al. (2008).

A origem exata das bases genéticas e as características de superprodução de celulases de RUT C30 permaneceram indeterminadas por mais de 20 anos. Entretanto, com o advento da cariotipagem eletroforética foi possível comparar o genoma de RUT C30 como o genoma do QM6a e de outras linhagens hiperceulolíticas e descobrir as mutações que ocorreram no RUT C30 (PETERSON; NEVALAINEN, 2012). Até o momento, três mutações em *T. reesei* RUT C30, comparado com a linhagem QM6a foram descritas: 1) mutação do gene *cre1*; 2) mutação da subunidade α da glicosidase II (α GII) do gene *gls2 α* e 3) deleção de 85 Kb fragmentos genômicos (LE CROM et al., 2009). A mutação do gene *cre1* originou uma linhagem de RUT C30 com desrepressão catabólica capaz de produzir elevadas quantidades de celulases e hemicelulases na presença de fontes de carbono facilmente metabolizáveis como a glicose, frutose, *D*-xilose (BISARIA; GHOSE, 1981; SEIDL et al., 2008). A subunidade α GII é a parte catalítica da enzima heterodimérica glicosidase II e está envolvida na modificação estrutural de oligossacarídeos *N*-ligados no interior do retículo

endoplasmático. O gene que codifica a α GII (*gls2 α*) na linhagem hipercelulolítica RUT C30 contém uma mutação *frameshift* que resulta em um gene truncado. Esse gene truncado permite que a glicosidase II hidrolise apenas o primeiro resíduo de glicose ligado a α -1,3 presentes na estrutura *N*-glucanas do retículo endoplasmático. Dessa forma, a mutação da subunidade α GII do gene *gls2 α* altera significativamente o perfil de glicosilação, aumentando a quantidade de estruturas monoglicosiladas e diminuindo a quantidade *N*-glicanos do tipo alta-manose (GEYSENS et al., 2005). A deleção de 85 Kb fragmentos genômicos engloba 29 genes que não estão presentes na linhagem de RUT C30. Esses genes ausentes codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo primário, transportes de proteínas, enzimas extracelulares e proteínas associadas com a destoxificação celular. Por exemplo, a falta do gene que codifica a maltose permease (um gene que faz parte da deleção dos 85 Kb) faz o *T. reesei* RUT C30 ser debilitado na assimilação de α -glucana e α -glicosídeo (PETERSON; NEVALAINEN, 2012). Entretanto, mesmo apresentando deficiência na produção de algumas enzimas, o sistema celulolítico de *T. reesei* é extensamente estudado em relação à degradação de celulose para produção de etanol de segunda geração (ANDRIC et al., 2010).

As celulasas de *T. reesei* são consideradas “padrão industrial” para hidrólise enzimática da lignocelulose (MERINO; CHERRY, 2007). As enzimas secretadas por *T. reesei* incluem 10 celulasas (8 endoglucanases e 2 celobiohidrolases) bem como xilanase e β -xilosidase (REESE; SIU; LEVINSON, 1950; MANDELS; REESE, 1957; SHOEMAKER et al., 1983; ROSGAARD et al., 2007). Contudo, entre as 10 celulasas produzidas por *T. reesei* apenas quatro são secretadas em grandes quantidades: CBH I (Cel7A), CBH II (Cel 6A), EG I (Cel7B) e EG II (Cel5A) (FOREMAN et al., 2003; MARKOV et al., 2005). Estas representam em torno 90-95% das proteínas totais secretadas, CBH I de 50-60% e CBH II aproximadamente 20% das celulasas totais (MARKOV et al., 2005; MERINO; CHERRY, 2007; MARGEOT et al., 2009). As enzimas EG III (Cel12A) e EG V (Cel45A) também são secretadas por *T. reesei*, porém em menores quantidades (MARKOV et al., 2005). *T. reesei* também produz 12 β -glicosidasas (FOREMAN et al., 2003; OUYANG et al., 2006), mas grande parte destas enzimas são encontradas no micélio do fungo e por isso não são totalmente recuperadas durante a produção de celulasas por *T. reesei* (ROSGAARD et al.,

2007). A produção de celulasas e hemicelulasas por *T. reesei* cultivado em FES utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono são sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Produção de celulases e hemicelulases por *T. reesei* em FES utilizando resíduos lignocelulósicos.

Micro-organismos	Fonte de carbono	Atividade enzimática (UI/g)				Referências
		Endoglucanase	FPase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>T. reesei</i>	Fibra de soja	-	1,7	-	61,1	Yang, Lio e Wang,(2012)
<i>T. reesei</i>	Sabugo de milho: farelo de trigo (2:3)	377,2	92,2	-	-	Guoweia et al., (2011)
<i>T. reesei</i>	Bagaço de cana: torta de dendê (1:1)	-	2,2	-	-	Lee, Darah e Ibrahim, (2011)
<i>T. reesei</i>	Farelo de trigo	26	19	-	615	Gomes et al., (2008)
<i>T. reesei</i> (ATCC 136331)	Fibras de soja	-	2,1	-	218	Lio e Wang, (2012)
<i>T. reesei</i> LM-UC4E1	Farelo de soja	-	13	-	1968	Gutierrez-Correa e Tengerdy, (1998)
<i>T. reesei</i> MCG77	Farelo de arroz	-	2,3	-	-	Latifian, Hamidi-Esfahani e Barzegar, (2007)
<i>T. reesei</i> MCG 80	Palha de trigo pré-tratada	-	247	-	-	Awafo, Chahal e Simpson, (2000)
<i>T. reesei</i> MTCC 164	Farelo de arroz: palha de milho (1:1)	-	193	218	-	Rajesh, Rajesh e Abachire, (2012)
<i>T. reesei</i> NCIM 992	Farelo de trigo	-	13,2	-	-	Maurya et al., (2012)
<i>T. reesei</i> NCIM 992	Palha de sorgo	-	30,7	-	-	Vimala Rodhe et al., (2011)
<i>T. reesei</i> QM 1914	Serragem	-	2	-	-	Neagu et al., (2012)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Casca de soja	45	4	0,6	-	Brijwani e Vadlani, (2011)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Farelo de arroz	94,2	11,6	-	-	Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani, (2010)

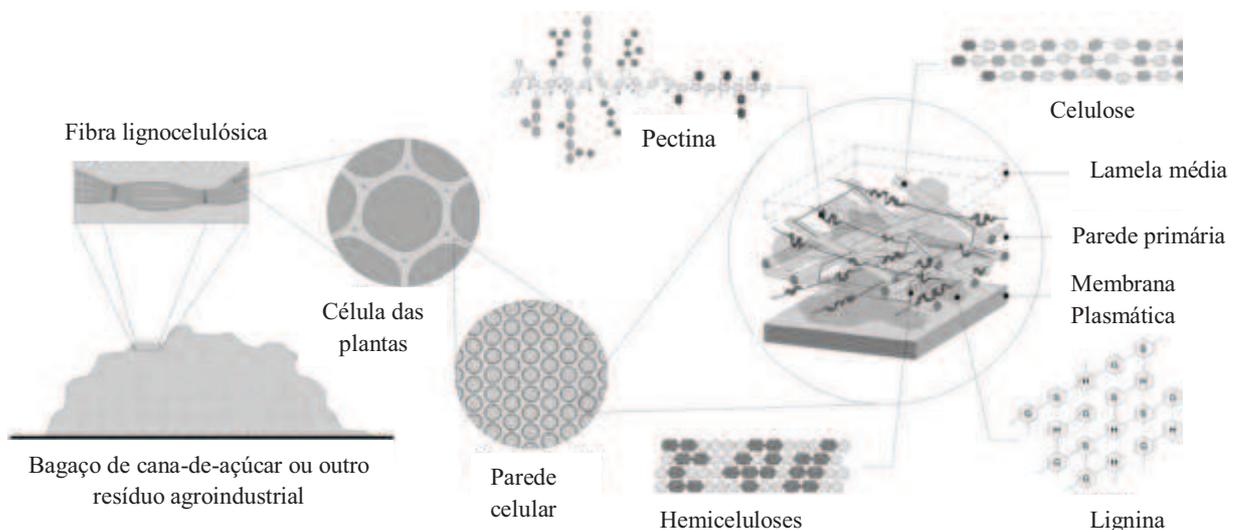
Tabela 2 – Continuação.

Micro-organismos	Fonte de carbono	Atividade enzimática (UI/g)				Referências
		Endoglucanase	FPase	β -glicosidase	Xilanase	
<i>T. reesei</i> QM9414	Aguapé: farelo de trigo (1:1)	12,8	3,7	5,2	-	Deshpande et al., (2008)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Farelo de arroz	-	1,2	-	-	Latifian, Hamidi-Esfahani e Barzegar, (2007)
<i>T. reesei</i> QM9414	Farelo de trigo	~22	-	-	~1100	Smits et al., (1996)
<i>T. reesei</i> QMY-1	Palha de trigo pré-tratada	-	247	-	-	Awafo, Chahal e Simpson, (2000)
<i>T. reesei</i> RUT C30	Bagaço de cana: farelo de trigo (1:1)	70,2	-	-	-	Florencio, Couri e Farinas, (2012)
<i>T. reesei</i> RUT C30	Palha de arroz	58,2	16,1	12,6	1298,7	Dhillon et al., (2011)
	Farelo de trigo	68,6	22,9	13,6	2467,5	
<i>T. reesei</i> RUT C30	Lascas de madeira	90,5	15	61,6	52,1	Xin e Geng, (2010)
<i>T. reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	299,6	22,8	4,5	-	Sukumaran et al., (2009)
<i>T. reesei</i> RUT C30	Bagaço de cana	-	25,6	-	-	Mekala et al., (2008)
<i>T. reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	-	3,8	-	-	Singhania et al., (2007)
<i>T. reesei</i> SAF3	Farelo de trigo	-	-	-	219	Kar et al., (2013)
<i>T. reesei</i> ZU-02	Sabugo de milho	-	128	-	-	Xia e Cen, (1999)

2.3. Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos compreendem os resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos florestais, urbanos, resíduos de angiospermas e gimnospermas. Dentre esses resíduos, os agrícolas e agroindustriais destacam-se por sua obtenção após o processamento da matéria-prima, pelo maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração. Os resíduos lignocelulósicos são constituídos principalmente por três frações poliméricas: celulose, hemiceluloses e lignina (Fig. 2) (DE CASTRO; PEREIRA, 2010). Em adição, pequenas quantidades de outros materiais como cinzas, proteínas e pectinas são encontradas em diferentes graus dependendo da origem (SANCHEZ, 2009). Por exemplo, os resíduos de gimnospermas (lenhosas) têm maiores quantidades de celulose e lignina do que os resíduos de angiospermas (folhosas) que apresentam maiores teores de hemiceluloses (principalmente xilana), extrativos e cinzas (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

Figura 2 – Estrutura da parede celular de resíduos agrícolas ou agroindustriais.

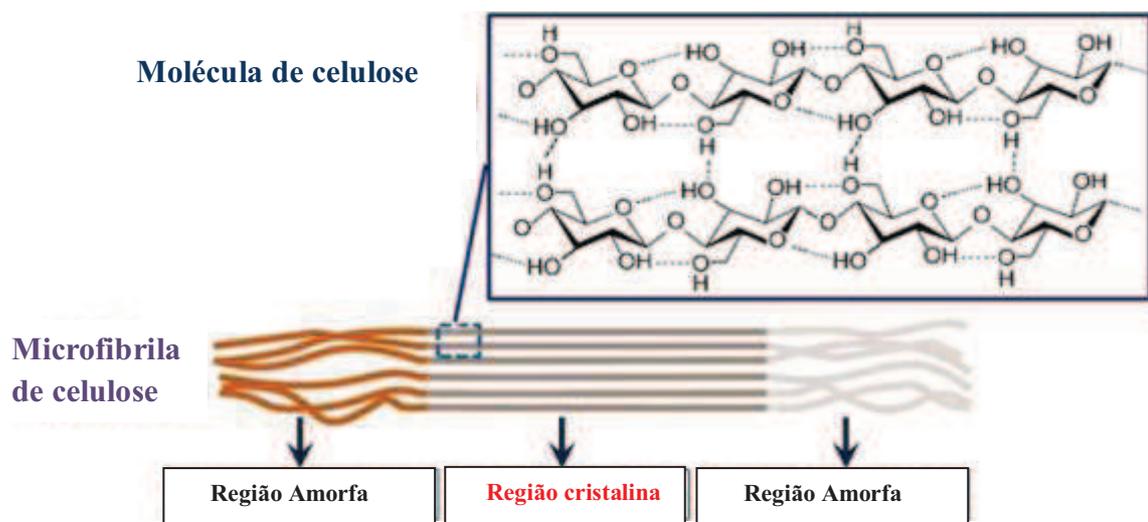


Fonte: Siqueira e Ferreira Filho (2010).

A celulose é o maior constituinte da parede celular das plantas e a molécula orgânica mais abundante na Terra (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). A celulose é um biopolímero linear homogêneo constituída de centenas a milhares de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β 1,4 (Fig. 3) (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; HORN et al., 2012). A molécula de celulose é orientada em paralelo e conectada por ligações de

hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waal's (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006), formando as chamadas microfibrilas de celulose (Fig. 3). As microfibrilas de celulose cristalina são conectadas de forma ordenada que não só as enzimas, mas até mesmo moléculas muito pequenas como a água não conseguem penetrar nesse complexo celulolítico. Por outro lado, algumas partes das microfibrilas de celulose são menos ordenadas, ou seja, estruturas não cristalinas referidas como regiões amorfas (Fig. 3) (ARANTES; SADDLER, 2011). As regiões amorfas são menos resistentes a degradação, portanto, mais susceptíveis a ação das enzimas celulolíticas do que as regiões cristalinas (MENON; RAO, 2012).

Figura 3 – Esquema de interação entre as cadeias moleculares de celulose dentro da região de microfibrilas de celulose cristalina.

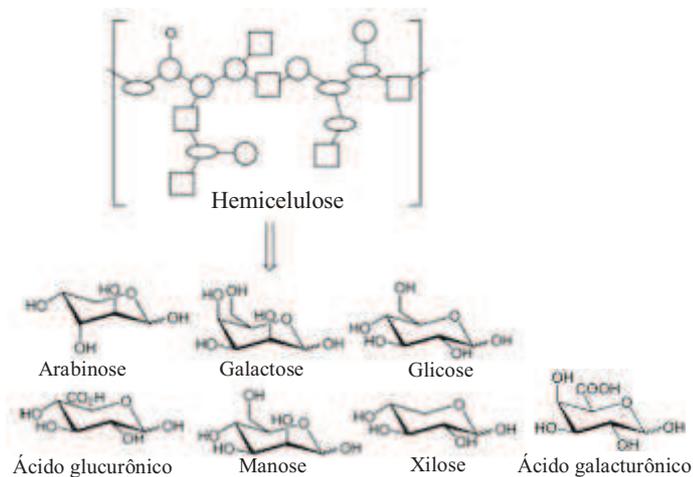


Fonte: Zhou e Wu (2012).

A hemicelulose é o segundo componente mais abundante da biomassa lignocelulósica. As hemiceluloses são polímeros heterogêneos de pentoses (5C), hexoses (6C) e açúcares ácidos (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009) altamente ramificados e unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e às vezes β -1,3 (RAGAUSKAS et al., 2006; SANCHEZ, 2009; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As pentoses são representadas pela xilose e arabinose, enquanto as hexoses são as manoses, glicose e galactose (Fig. 4). Os açúcares ácidos são representados pelo ácido galacturônico e ácido glucurônico (Fig. 4). A composição das hemiceluloses é muito variável e depende muito do tipo de planta (SAHA, 2003). Por

exemplo, em gramíneas e angiospermas (folhosas como bétula e álamo) o açúcar mais comum é a xilose e em gimnospermas (lenhosas como abetos e pinheiros) é a manose (HORN et al., 2012). As hemiceluloses são mais facilmente hidrolisadas do que a celulose (LEE et al., 2007), no entanto, certas estruturas oligoméricas das hemiceluloses são mais recalcitrantes do que as estruturas oligoméricas da celulose devido às ramificações e padrões de acetilação (AGGER; VIKSO-NIELSEN; MEYER, 2010). Assim, a estrutura das hemiceluloses pode adicionar recalcitrância à celulose. A presença de enzimas, tais como, xilanases são muito comuns em coquetéis enzimáticos comerciais para hidrólise da lignocelulose (VARNAI et al., 2011).

Figura 4 – Monômeros que constituem a hemicelulose.

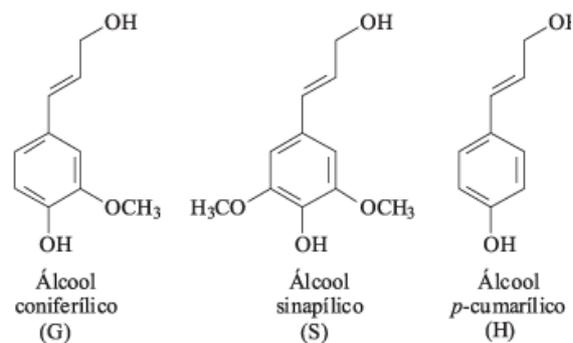


Fonte: Verendel, Church e Andersson (2011).

A lignina é o terceiro principal polímero heterogêneo presente nos resíduos lignocelulósicos (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). É uma macromolécula tridimensional amorfa insolúvel em água e opticamente inativa (BONINI et al., 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) que consiste de três unidades diferentes de monolignóis (álcool coniferil, sinapil e *p*-cumárico) que são unidos entre si por diferentes ligações não hidrolizáveis (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SANCHEZ, 2009). Esses monolignóis estão incorporados à lignina na forma de guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H), respectivamente (Fig. 5) (CHEN; DIXON, 2007). A quantidade de monolignóis varia entre os diferentes tipos de plantas, por exemplo, em madeira macia, o monolignol predominante é o G, enquanto que em madeira dura é uma mistura de G e S e em gramíneas os três tipos de

monolignóis (G, S e H) estão presentes (CHEN; DIXON, 2007; ZOIA; ORLANDI; ARGYROPOULOS, 2008). A qualidade estrutural complexa da lignina – aromaticidade, heterogenicidade e extensas ligações cruzadas entre carbono-carbono – a faz esta macromolécula a mais recalcitrante dos três maiores biopolímeros da biomassa vegetal (CHANG, 2007), atuando como uma cola que mantém a matriz lignocelulósica coesa e resistente à degradação (BADGER, 2002; RUBIN, 2008). Portanto, a bioconversão da lignocelulose depende de procedimentos eficazes e economicamente viáveis para remover ou modificar a lignina (MENON; RAO, 2012).

Figura 5 – Alcoóis precursores das unidades fenilpropanóides (monolignóis).



Legenda:

G – Guaiacila

S – Siringila (S)

H – *p*-hidroxifenila

Fonte: Barbosa et al., (2008).

2.3.1. Farelo de trigo

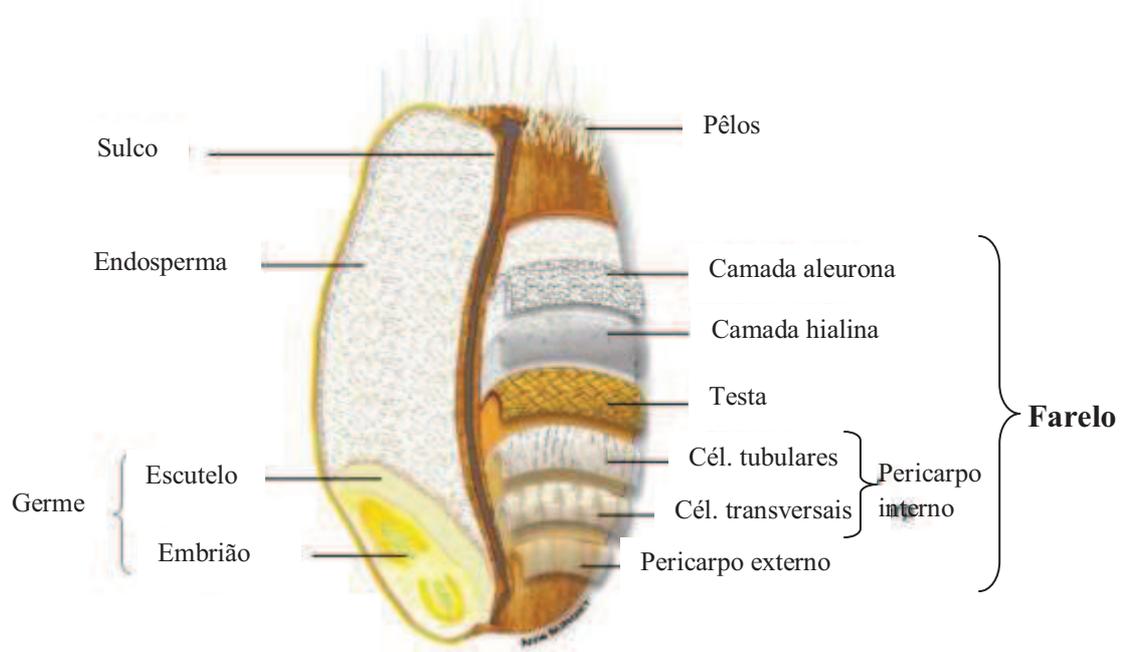
O trigo (*Triticum aestivum*) é considerado um dos grãos mais importantes no mundo (JAVED et al., 2012) e foi trazido para o Brasil no século XVI pelos colonizadores portugueses. As primeiras culturas foram cultivadas no estado de São Paulo, mas depois foram transferidos para o estado do Rio Grande do Sul e Paraná, onde o clima e o solo eram mais propícios (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Em 2011/2012, o Brasil produziu 5,8 milhões de toneladas trigo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013, p.29). Os principais resíduos do trigo são a palha e o farelo de trigo, este último é um

subproduto da moagem dos grãos de trigo. Cada milhão de tonelada de trigo moído pode gerar aproximadamente 0,25 milhão de toneladas de farelo de trigo (JAVED et al., 2012).

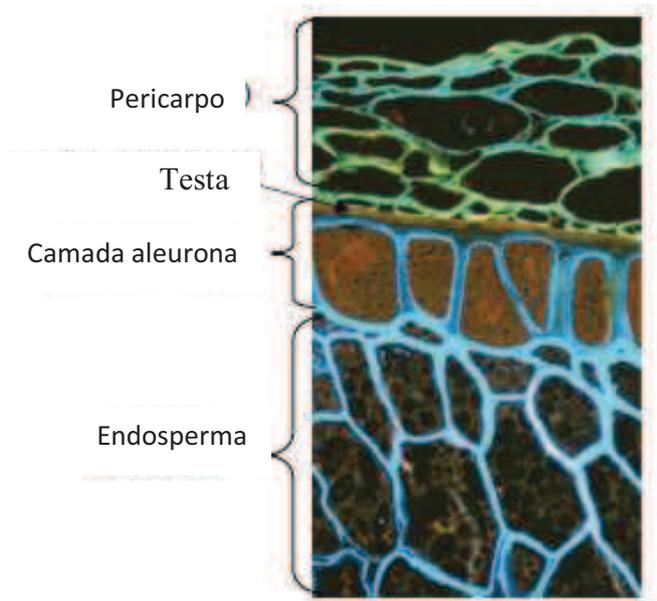
O farelo de trigo é um material compósito e representa 14-19% dos grãos de trigo. O farelo de trigo é constituído por três camadas de tecidos histológicos (ANTOINE et al., 2002): o pericarpo externo e interno, o tegumento ou testa e a camada hialina e aleurona (Fig. 6a) (JAVED et al., 2012). O pericarpo é composto de células intermediárias, tubulares e transversais (Fig 6b) compreendendo aproximadamente 5% do grão, sendo constituído de 20% de celulose, 6% de proteína, 2% de cinzas e 0,5% de gordura, além disso, é rico em xilana e fibras insolúveis (HEMERY et al., 2007; DELCOUR et al., 2010) e sua parede celular é lignificada (BECHTEL et al., 2009). O tegumento compreende 1% do grão e, é composto principalmente de arabinoxilanas e lignina. A quantidade de celulose é menor do que no pericarpo (HEMERY et al., 2007). A aleurona é uma camada espessa que cobre o endosperma e o germe do amido e representa apenas 7% do grão de trigo (Fig. 2 e 3) (MATEO ANSON et al., 2009) A aleurona contém elevado conteúdo de lignanas e ácidos fenólicos (BURI; REDING; GAVIN, 2004).

Figura 6 – Composição histológica do grão de trigo (a). Microestrutura do grão de trigo intacto (b).

a)



b)



Legenda:

Proteína – vermelho

Parede celular rica em β -glucana – azul

Parede celular lignificada da casca – marrom-amarelada

Fonte: Surget e Barron, (2005) e Kamal-Eldin et al. (2009).

O farelo de trigo é rico em carboidratos principalmente arabinosilanas (HILLE; SCHOONEVELD-BERGMANS, 2004). O farelo de trigo é constituído aproximadamente por 55% de arabinosilana, 9-12% de celulose, 3-5% de lignina e 2-3% β -glucanos ligados a frutanos (3-4%) (KAMAL-ELDIN et al., 2009). O farelo de trigo contém aproximadamente 15-17% de proteína, o que corresponde a 14% do total de proteínas do trigo. Os aminoácidos do farelo de trigo consistem principalmente em ácido glutâmico (18,6%) e ácido aspártico (7,2%) (SHEWRY et al., 2009). O farelo de trigo também contém ácido fenólico, principalmente ácido ferúlico. Normalmente, cerca de 80% do ácido ferúlico está ligado ao éster e a outros constituintes da parede celular, como por exemplo, arabinosilanas (GIET; ROISEUX; BLECKER, 2010). O farelo de trigo também contém de 6 a 7% de lipídios e de 5 a 6% de cinzas (KAMAL-ELDIN et al., 2009). O farelo de trigo contém cerca de 4 a 6% de di e trissacarídeos, principalmente sacarose e rafinose (HOSENEY, 1986).

O farelo de trigo é um coproduto agroindustrial de grande interesse nas indústrias de produtos biotecnológicos (JAVED et al., 2012). O farelo de trigo é considerado uma das alternativas mais atrativas para substituir o meio sintético nos processos fermentativos (PANDEY; ASHOK, 1992), devido sua boa dissipação de calor, melhor circulação de ar entre as partículas do farelo trigo e eficiente penetração do micélio fúngico em suas partículas, além disso, o farelo de trigo é um substrato de baixo custo o que o torna um resíduo com elevado potencial econômico na indústria de fermentação (MALATHI; CHAKRABORTI, 1991). Diferentes tipos de enzimas podem ser produzidas por micro-organismos por fermentação do farelo de trigo nos sistemas de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) (Tabela 3) (JAVED et al., 2012). O farelo de trigo é um coproduto agroindustrial com grande potencial na indústria de fermentação por causa das suas propriedades únicas como, elevada capacidade de retenção de água (CAVALCANTE et al., 2008), substrato complexo (ELLIAH et al., 2002), fonte de nitrogênio (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010), produção de metabólitos (FARZANA et al. 2005), biocombustível (PALMAROLA-ADRADOS et al., 2005) e biorremediação (DUPONT et al., 2003).

Tabela 3 – Lista de algumas enzimas produzidas por micro-organismos utilizando farelo de trigo como fonte de carbono em bioprocessos.

Enzimas	Atividade enzimática	Micro-organismos	Processo de produção	Referências
β-glicosidase	21,55 UI/g	<i>Chrysosporthe cubensis</i>	FES	Falkoski et al., (2013)
	105,8 UI/g	<i>A. fumigatus</i>	FES	Delabona et al., (2012)
	~1400 UI/mL	<i>A. niger</i>	FSm	Singhanian et al., (2011)
Endoglucanase	1,23 UI/mL	<i>A. flavus</i>	FSm	Gomathi et al., (2012)
	0,72 UI/mL	<i>A. niger</i>	FSm	Mrudula e Murugammal, (2011)
	299,6 UI/g	<i>T. reesei</i>	FES	Sukumaran et al., (2009)
Feruloil esterase	89 mU/mL	<i>Alternaria alternata</i>	FSm	Xiao, Bergeron e Lau (2012)
	3,8 mU/g	<i>A. niger</i>	FES	Ou et al., (2011)
Fitase	6,82 U/mL	<i>A. flavipes</i>	FSm	Mathew e Abraham, (2005)
	~62 mU/g	<i>Sporotrichum thermophile</i>	FES	Topakas et al., (2003)
Fitase	8090 UI/L	<i>A. niger</i>	FSm	Papagianni, Nokes e Filer, (1999)
FPase	2,52 UI/g	<i>Chrysosporthe cubensis</i>	FES	Falkoski et al., (2013)
	13,2 UI/g	<i>T. reesei</i>	FES	Maurya et al., (2012)
	0,76 FPU/mL	<i>T. viride</i> ATCC	FSm	Vintila et al., (2009)
	0,46 FPU/mL	<i>T. viride</i> CMGB1		
Glucoamilase	61,4 UI/g	<i>Fusarium solani</i>	FES	Bhatti et al., (2007)

Tabela 3 – Continuação.

Enzimas	Atividade enzimática	Micro-organismos	Processo de produção	Referências
Glucoamilase	247 UI/g	<i>Aspergillus</i> sp.	FES	Ellaiah et al., (2002)
Lipase	97,5 UI/g	<i>Penicillium camembertii</i>	FES	Malilas et al.,(2013)
	9,14 UI/g	<i>A. niger</i>	FES	Falony et al., (2006)
	340 UI/g	<i>A. niger</i>	FES	Mahadik et al., (2002)
Pectinase	9,6 UI/g	<i>A. awamori</i>	FES	Blandino et al., (2002)
	26 UI/g	<i>A. niger</i>	FSm	Taragano e Pilosof, (1999)
	5,5 UI/g		FES	
	480 UI/g	<i>A. carbonarius</i>	FES	Singh, Ramakrishna e Rao, (1999)
Protease	5120 UI/g	<i>A. flavus</i>	FES	Kranthi, Rao e Jaganmohan, (2012)
	280 UI/g	<i>Aspergillus</i> sp.	FES	Shivakumar, (2012)
	60 UI/g	<i>Rhizopus oryzae</i>	FES	Aikat e Bhattacharyya, (2000)

2.3.2. Bagaço de cana-de-açúcar

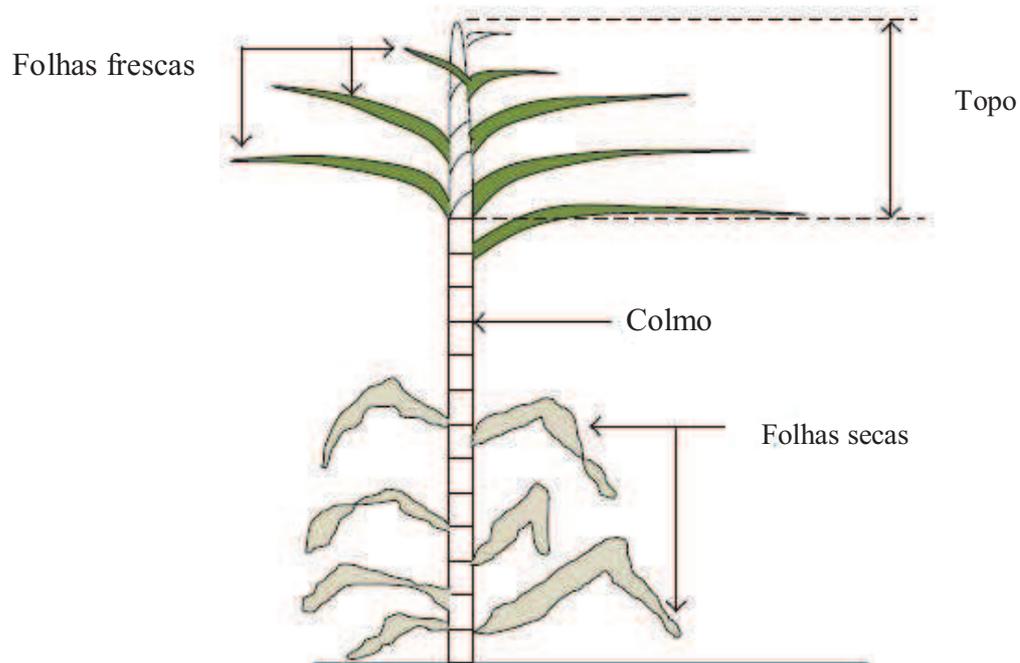
A cana-de-açúcar é qualquer uma das 6 a 37 espécies de gramíneas perenes do gênero *Saccharum* (família Poaceae, tribo Andropogoneae). A cana é nativa de clima temperado quente, comum nas regiões tropicais da Índia, África, Ásia e Brasil (CANILHA et al., 2012) sendo que o Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. Na safra de 2011/12, o Brasil produziu 560,36 milhões de toneladas de cana, gerando 36 milhões de toneladas de açúcar e 22 bilhões de litros de etanol (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012, p.8). Cada tonelada de cana processada pelas usinas gera aproximadamente 270-280 Kg de bagaço (RODRIGUES et al., 2003) e 140 kg de palha (LABAT; GONÇALVES, 2008). Assim, as usinas brasileiras produziram na safra de 2011/2012 aproximadamente 151-157 milhões de toneladas de bagaço de cana e 78 milhões de toneladas de palha.

Atualmente, grande parte desses resíduos ficam disponíveis no campo (palha) ou no pátio das usinas (bagaço). Parte da palha é utilizada como adubo, enquanto parte do bagaço de cana é utilizado para abastecer as caldeiras das usinas na geração direta de energia por combustão ou gaseificação. Entretanto, pesquisas vêm sendo realizadas para que o bagaço e a palha da cana-de-açúcar possam ser usados para produção de etanol de 2ª geração (HARTLEY; SHAMA, 1987; SUKUMARAN et al., 2009; DA SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011; MACRELLI; MOGENSEN; ZACCHI, 2012; CHANDEL et al., 2013). A implantação do aproveitamento do bagaço e da palha para produção de etanol no Brasil pode ser favorecido devido o processo de produção poder ser anexado as unidades de açúcar/etanol já em vigor, o que exigiria investimentos menores em infraestrutura, logística e fornecimento de energia (SOCCOL et al., 2010). Nesse cenário, mais etanol pode ser produzido sem aumentar a área plantada (CERQUEIRA LEITE et al., 2009). O rendimento de etanol por hectare de cana plantada é de 6000 litros, assim estima-se que essa produção possa chegar a 10.000 litros se apenas metade do bagaço de cana for aproveitado para produção de biocombustíveis (SOCCOL et al., 2010).

A cana-de-açúcar é constituída basicamente de colmo (tipo de caule das gramíneas) e palha (Fig. 7). A fração residual da moagem do colmo é chamada de bagaço. A palha da cana é dividida em três partes: folhas frescas, secas e topo (CANILHA et al. 2012). Todos esses três componentes apresentam basicamente a mesma composição em carbono (~45%), nitrogênio (~1%), hidrogênio (~6%), oxigênio (~43%) e enxofre (~0,1%) (NETO, 2005). As folhas (principal componente da palha) contêm pelo menos dez tipos de células ou

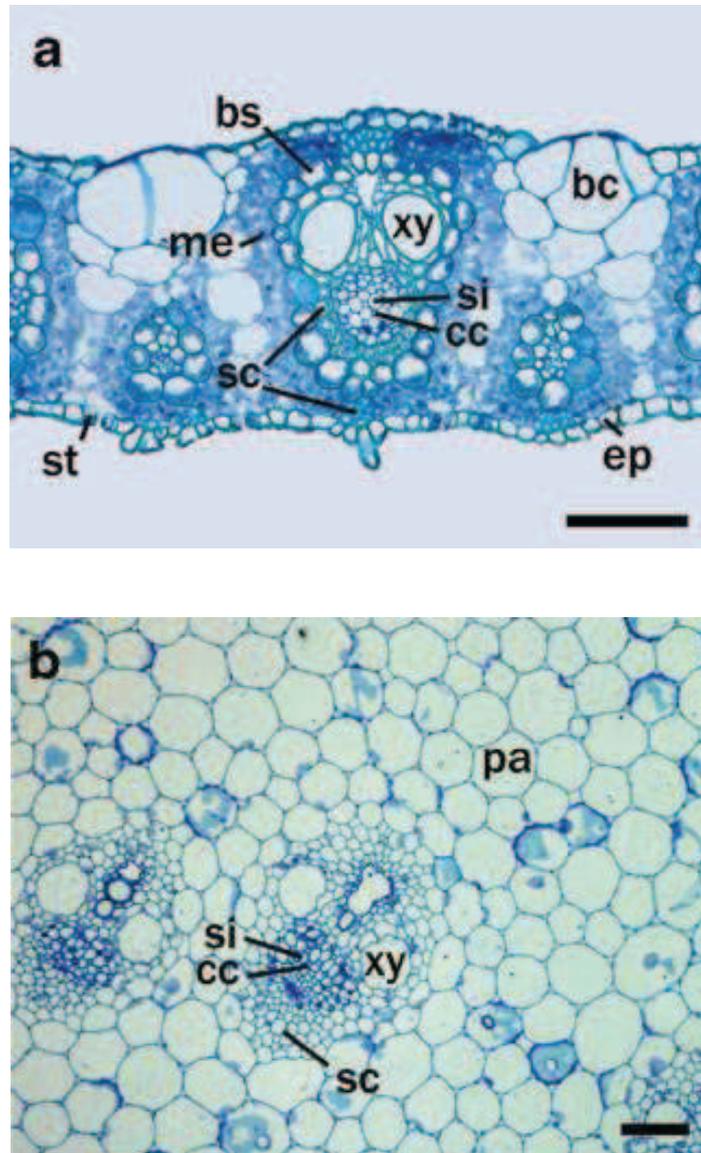
tecidos (metaxilema, traqueídes e elementos de vaso; floema, tubos crivados e células companheiras; células buliformes; epidermes; estômato; células mesofílicas; bainha do feixe; e esclerênquima), enquanto o colmo contém pelo menos sete tipos de células (metaxilema, traqueídes e elementos de vaso; floema, tubos crivados e células companheiras; parênquima; esclerênquima e epiderme) (Fig. 8) (SOUZA et al. 2012).

Figura 7 – Morfologia da cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Paes e Oliveira, (2005).

Figura 8 – Aspectos anatômicos da folha e do colmo da cana de açúcar usando técnicas microscópicas. (a) folhas e (b) colmo.



Legenda: xy – vaso de metaxilema; ph – floema; bc – células buliformes; ep – epiderme; st – estômatos; me – mesófilo; bs – bainha; sc – esclerênquima; pa – parênquima; px – protoxilema. Barras = 100 μ m.

Fonte: Souza et al. (2012).

Fisicamente, a cana-de-açúcar é constituída de quatro principais frações: fibras, sólidos solúveis e insolúveis e água. As fibras são compostas de uma fração sólida orgânica

encontrada no colmo da cana e caracterizada pela sua heterogeneidade. Os sólidos solúveis são compostos principalmente de sacarose, enquanto os sólidos insolúveis são constituídos por substâncias inorgânicas (sais minerais, silicatos, etc) (TRIANA et al., 1990). Quimicamente, o bagaço e a palha da cana são compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. O bagaço é quantitativamente composto de 38-46% celulose, 23-27% hemiceluloses, e 19-32% de lignina. Os componentes não estruturais da biomassa, chamado de cinzas (1-3%) e extrativos (5-9%) são as outras substâncias que fazem parte da composição química do bagaço (CANILHA et al., 2012). A palha é geralmente composta de 33-36% de celulose, 18-29% de hemiceluloses e 26-41% de lignina. Cinzas (2-12%) e extrativos (5-12%) também estão presentes na palha (COSTA et al., 2013). Nas folhas, a lignina está concentrada nas fibras da bainha vascular e, no colmo encontra-se espalhada por toda a parede celular. O conteúdo de lignina das folhas é duas vezes maior (4,9%) do que no colmo (2,5%). Por outro lado, a composição dos monossacarídeos (glicose e xilose) é similar e abundante em ambos os resíduos, aproximadamente 60% e 34%, respectivamente. Os monossacarídeos susceptíveis de se associarem com a pectina (arabinose, galactose e ácido urônico) também estão presentes em quantidades similares tanto nas folhas quanto no colmo (arabinose, 11% e 12%; galactose 16% e 15%; ácido urônico 19% e 16%, respectivamente). A quantidade de manose presente nas folhas e no colmo é de 4% e 5%, respectivamente (SOUZA et al., 2012).

A parede celular das folhas e do colmo da cana apresenta dois domínios, um que é de fácil acesso (solúvel em água) e outro que é composto por uma rede de polímeros emaranhados, formados principalmente por hemiceluloses, mas também incluem pectina e arabinogalactonas pécticas ligadas a celulose (SOUZA et al., 2012). A maior parte das β -glucanas da parede celular da cana-de-açúcar é facilmente solúvel, entretanto há uma pequena fração pouco solúvel, devido sua forte interação com a xilana, xiloglucana e celulose (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010). Na parede celular da cana-de-açúcar os polímeros pécticos homogalacturonana e ramnogalacturonana I encontram-se ramificados com arabinogalactana o que torna a pectina facilmente extraível (SOUZA et al., 2012). A pectina está ligada a compostos fenólicos, celulose e/ou lignina na parede celular (DICK-PEREZ et al., 2011; DICK-PEREZ et al., 2012). A lignina, por sua vez, está associada com os feixes vasculares (SOUZA et al., 2012) e faz ligações cruzadas com arabinogalactanas (MONRO; BAILEY; PENNY, 1972; SELVENDRAN; DAVIES; TIDDER, 1975).

As folhas da cana-de-açúcar contêm a maior parte das arabinoxilanas ramificadas. No entanto, a maioria das xilanas presentes tanto nas folhas como no colmo são:

1) não ramificadas, 2) acetiladas e 3) arabinosiladas. As xilanas arabinosiladas da cadeia lateral dos resíduos de arabinosil são esterificadas com compostos fenólicos, formando ligações diferúlicas e/ou lignina, o que torna difícil o acesso das enzimas às arabinoxilanas. Ao contrário das xilanas, as xiloglucanas estão presentes em pequenas quantidades na parede celular das folhas e do colmo da cana (SOUZA et al., 2012), isso se deve à localização limitada dos xiloglucanos nos tipos de células específicas (por exemplo, floema) em monocotiledôneas (BRENNAN; HARRIS, 2011). As β -glucanas apresentam comportamento diferente das outras duas hemiceluloses, arabinoxilanas e xiloglucanas. A maioria das β -glucanas é acessível às enzimas (liquenase). Entretanto, algumas β -glucanas são ligadas mais firmemente à parede celular das folhas e do colmo da cana não sendo imediatamente hidrolisadas pela liquenase (SOUZA et al., 2012).

A estrutura fina dos polissacarídeos, as interações polissacarídeos-polissacarídeos e as interações polissacarídeos-compostos fenólicos/lignina são fatores importantes que limitam a completa sacarificação dos carboidratos da parede celular na cana-de-açúcar. Dentre esses fatores dois desempenham papel importante na recalcitrância da parede celular da cana. O primeiro é a acetilação dos polissacarídeos da parede celular, em particular as xilanas em monocotiledôneas (cana-de-açúcar). O segundo é a ligação dos polissacarídeos a compostos fenólicos (por exemplo, feruloil éster ligado a terminais de açúcares de pectina, como galactose e arabinose e, ligados a cadeia lateral de resíduos de glicosil, como arabinose em arabinoxilana e galactose em xiloglucana) (SOUZA et al., 2012). Assim, o conhecimento dos polissacarídeos que estão presentes no bagaço de cana-de-açúcar e como eles estão arranjados na parede celular são muito importantes para uma conversão mais eficiente da biomassa lignocelulósica em etanol de segunda geração.

2.4. Fermentação em estado sólido (FES)

A economia agrícola brasileira é uma das mais importantes no mundo. O Brasil é considerado excelente produtor de café, cana-de-açúcar, trigo, soja, mandioca, frutas, etc. Quase todos os produtos são exportados, o que é definitivamente uma excelente contribuição para o desenvolvimento econômico do país (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). No entanto, esta grande produção é responsável pela elevada geração de resíduos agrícolas e agroindustriais que causam graves problemas ambientais (PANDEY; SOCCOL, 1998; PANDEY et al., 2000; GRAMINHA et al., 2008; AKINYELE; OLANIYI; AROTUPIN, 2011). A utilização desses resíduos em bioprocessos para produção de enzimas (DELABONA et

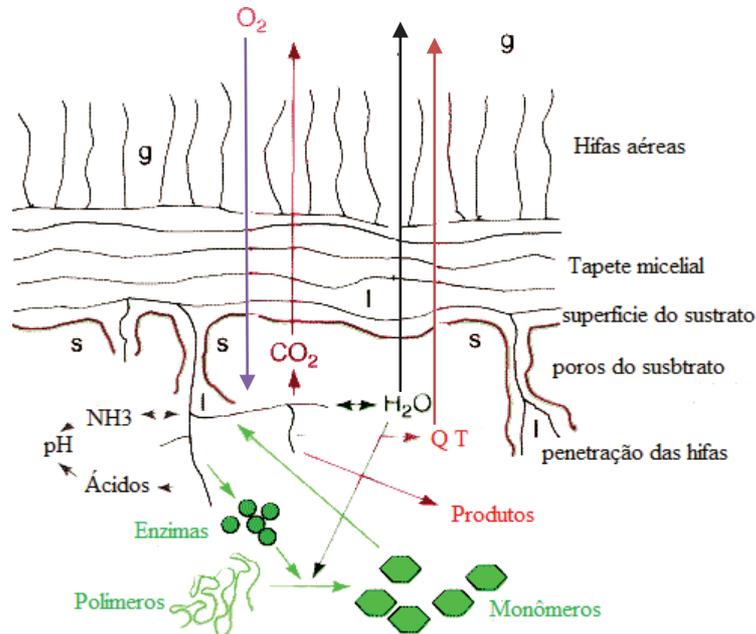
al., 2012; PIROTA et al., 2013), aminoácidos (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002), antibióticos (YANG et al., 1996; VASTRAD; NEELAGUND, 2011), ácidos orgânicos (KUMAR; BROEKHUIZEN; ABBATT, 2003; PHRUEKSAWAN et al., 2012; VAISHNAVI et al., 2012), biopesticidas (OOIJKAAS; TRAMPER; BUITELAAR, 1998; DALLA SANTA et al., 2004; EL-BENDARY, 2006; SHI; XU; ZHU, 2009), bioherbicidas (SINGH et al., 2010), biosurfactantes, (KRIEGER; NETO; MITCHELL, 2010), biocombustíveis (SUKUMARAN et al., 2009), compostos aromatizantes (SARHY-BAGNON et al., 2000; MEDEIROS et al., 2006; ROSSI et al., 2009) não apenas fornece substratos alternativos, como também ajudam a resolver os problemas de poluição ambiental. Dessa forma, os processos biotecnológicos, em especial a técnica de fermentação em estado sólido (FES) tem contribuído enormemente para tal utilização (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A FES é definida como um processo que envolve o crescimento e metabolismo de um micro-organismo na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas de um substrato sólido insolúvel (PANDEY, 1992). A seleção de um substrato apropriado é muito importante para o sucesso da FES. Além de o substrato ter que apresentar uma composição adequada para induzir o produto desejado, o tamanho da partícula também tem que ser considerada, uma vez que este é um fator que influencia muito na FES (BOCCHINI-MARTINS et al., 2011). Partículas pequenas oferecem uma maior superfície de contato, permitindo um maior acesso do micro-organismo aos nutrientes, no entanto, dependendo do tipo de substrato e o nível de umidade, o substrato pode ficar compactado, prejudicando a aeração e a disponibilidade de oxigênio, bem como a dissipação de calor, o que limita o crescimento microbiano. Por outro lado, partículas grandes podem facilitar o arejamento, no entanto, podem dificultar o acesso microbiano, limitando assim a superfície de contato do substrato e tornando difícil a transferência de calor (PALMA, 2003). Outros parâmetros que também influenciam na eficiência dos processos fermentativos são a umidade inicial do substrato, pH, temperatura de incubação, aeração, tamanho do inóculo, suplementação do meio com nutrientes, extração e purificação do produto final (MASANGKAY et al., 2000; PANDEY, 2003).

A FES é considerada um processo interessante para produção de enzimas lignocelulolíticas a baixo custo, devido à possibilidade de usar resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato para o crescimento microbiano (CASTILHO et al., 2000). Os fungos filamentosos são considerados os micro-organismos melhor adaptados para FES, uma vez que os substratos sólidos se assemelham aos meios naturais onde esses fungos se

desenvolvem (TENGERDY, SZAKACS, 2003). Durante o processo de FES, os fungos crescem formando um tapete de micélio sobre a superfície das partículas que constituem o substrato sólido. As hifas aéreas sobressaem entre os espaços gasosos e crescem penetrando nos poros cheios de líquido, exceto se a umidade do substrato estiver acima do nível apropriado, neste caso os espaços vazios entre as hifas aéreas são preenchidos com gás (g), enquanto que os espaços vazios no interior do tapete de micélio e dentro do substrato são preenchidos com líquido (l). 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 ocorrem metabolismo podendo haver um transporte de substâncias a partir da penetração das hifas aéreas. Ao produzir as enzimas hidrolíticas que se difundem para a matriz sólida, os fungos podem degradar macromoléculas em unidades menores que são absorvidas pelo micélio servindo como nutrientes. Durante a fermentação, há um consumo de O_2 e produção de CO_2 , H_2O , outros produtos bioquímicos e calor. Assim, os gradientes desenvolvem dentro do biofilme, que, por exemplo, força o O_2 a difundir da fase gasosa para as regiões mais profundas do biofilme e o CO_2 a difundir a partir destas regiões para a fase gasosa. O desenvolvimento do calor (Q) conduz a um aumento rápido na temperatura (T), que é um problema sério, durante a FES. O calor é removido do substrato por condução e evaporação, que são parte complexa do equilíbrio de água no sistema. O equilíbrio de água no sistema 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. A liberação de ácidos orgânicos e amônia pode alterar o pH local. Os produtos bioquímicos de interesse, por exemplo, as enzimas que são liberadas no interior da matriz sólida e os espaços cheios de líquido durante a fermentação, podem ser absorvidas pelo sólido podendo ser necessário extrair o produto, no final do processo de FES (Fig. 9) (HOLKER; LENZ, 2005).

Figura 9 – Esquema de alguns processos que ocorrem em microescala durante a FES.



Fonte: Holker e Lenz, (2005).

A utilização da FES para cultivos dos fungos filamentosos apresentam muitas vantagens, tais como: simulação do seu ambiente natural, o que resulta numa melhor adaptação ao meio e elevadas produções enzimáticas; 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; MORAES; CAPALBO, 2001). Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo substrato, possuindo uma maior estabilidade a variações de temperatura e pH (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004). Os complexos enzimáticos da FES são sempre melhores na liberação de carboidratos do que os complexos enzimáticos da fermentação submersa (FSm). Neste contexto, os complexos enzimáticos da FES podem ser mais eficientes na conversão da lignocelulose do que os complexos enzimáticos da FSm (PRÉVOT et al., 2013).

A Tabela 4 mostra algumas vantagens e desvantagens da FES em relação a FSm.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens da FES em relação a FSm.

Vantagens	Desvantagens
Rendimentos mais elevados de enzimas em curto período de tempo	Dificuldades no aumento de escala
Melhor circulação de oxigênio	Difícil controle dos parâmetros de processo (pH, calor, umidade, etc.)
Assemelha-se ao habitat natural dos fungos filamentosos	Produtos com maior impureza, aumento do custo de recuperação do produto
Linhagens do tipo selvagem apresentam melhor desempenho em FES do que as linhagens geneticamente modificadas, reduzindo os custos e o requerimento de energia	Problemas com o acúmulo de calor
Maior concentração final de produtos	
Maior estabilidade do produto	
Menor repressão catabólica e pouca degradação de proteínas	
Cultivo misto com vários fungos	
Baixa demanda de esterilização, devido à baixa atividade de água	
Menor quantidade de água e conseqüentemente uma diminuição na geração de efluentes	
Menor requerimento de espaço e energia	
Tecnologia simples	
Maior conversão da lignocelulose	

Fonte: Pandey et al. (2000); Robinson, Singh e Nigam (2001); Viniegra-González et al. (2003); Holker, Hofer e Lenz, (2004).

Saqib et al. (2010) compararam a termoestabilidade da endoglucanase produzida por *A. fumigatus* sob FES e FSm quando crescido sob palha de trigo. A endoglucanase produzida por *A. fumigatus* em FES foi mais termoestável do que a

endoglucanase da FSm, evidenciada pela maior entalpia de ativação de desnaturação, 152 kJ mol^{-1} vs, 112 kJ mol^{-1} , a 50°C . A produção de endoglucanase por *A. fumigatus* em FES também foi maior (1044 UI/mL) comparada com a FSm (321 UI/mL). Kumar, Sharma e Sarkar (2011) compararam a produção de pectinase e celulasas por *A. niger* sob FES e FSm e observaram que a FES foi melhor para a produção de enzimas. A produção máxima de pectinases e celulasas por *A. niger* em FSm foi de 25,23 e 5,54 UI/g, enquanto que em FES foi de 179,83 e 10,81 UI/g, respectivamente. Prévot et al. (2013) compararam o desempenho de hidrólise de quatro complexos lignocelulósicos de origem comercial ou produzido no laboratório por *T. reesei* RUT C30 sob FES e FSm. O complexo enzimático produzido no laboratório por FES mostrou uma maior eficiência das celobiohidrolases sob a celulose e melhor capacidade de hidrólise do farelo de trigo. Esta comparação mostra que a FES pode ser uma tecnologia promissora para superar o problema de biomassa recalcitrante e reduzir o custo de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol celulósico.

Apesar das vantagens da FES em relação à submersa, existem desafios tecnológicos a serem confrontados. Há poucas configurações de biorreatores operando em condições de estado sólido. Isto se dá principalmente devido a dificuldades encontradas no controle de diferentes parâmetros como pH, temperatura, aeração, transferência de oxigênio e umidade do meio sólido e heterôgeneo (COUTO; SANROMÁN, 2006). Portanto, a FES carece de mecanismos de controle sofisticados que estão normalmente associados a FSm. O controle da temperatura e umidade no interior da FES é difícil de ser conseguido em biorreatores de estado sólido, o que afeta o crescimento do micro-organismo, a formação de esporos, geminação e a formação de produtos (PANDEY, 2003). Dessa forma, o controle da temperatura, umidade, pH, atividade de água e troca de gases na FES são fundamentais para o crescimento microbiano e a consequente produção de metabólitos secundários (GERVAIS; MOLIN, 2003; RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Neste contexto, o desenvolvimento de biorreatores de fermentação em estado sólido com parâmetros controlados seria um grande avanço no campo biotecnológico, principalmente para produção de enzimas a um custo mais acessível, o que contribuiria para a viabilidade econômica da hidrólise enzimática para produção de etanol celulósico, uma vez que o custo da enzima é um dos principais fatores para afetam tal aplicação.

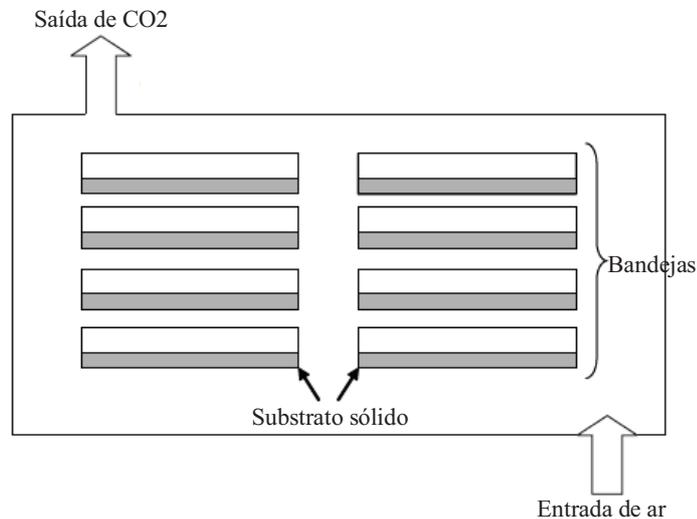
2.5. Biorreatores de FES

Durante as últimas décadas, aumentou-se o interesse pelo desenvolvimento de biorreatores de FES (PANDEY, 2003). Uma vez que, consideráveis inconvenientes como, elevadas concentrações gasosas e gradientes de calor gerados no interior do leito de substrato devido à resistência de transferência de massa são os principais obstáculos para o desenvolvimento de biorreatore de FES (GHILDYAL et al., 1992; LONSANE et al., 1992; SARGANTANIS et al., 1993). Em biorreatores com agitação contínua ou ocasional, a aeração forçada é uma forma eficiente de eliminar esses gradientes de calor, mas a agitação forçada provoca efeitos adversos sobre o substrato e também o rompimento do micélio fúngico. Por outro lado, os biorreatores de aeração estática apresentam problemas com relação à difusão de gás, assim, a porção das hifas fúngicas que penetram nas partículas do substrato sólido podem, portanto, ser privadas de oxigênio (LONSANE et al., 1992). O controle de temperatura em biorreatores de aeração estática também é um problema, devido à ausência de agitação e a fraca condutividade térmica do substrato sólido (SARGANTANIS et al., 1992). Assim, a aplicação de modelagem matemática para descrever os vários fenômenos físico-químicos e bioquímicos no âmbito do sistema (MITCHELL et al. 2000; HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2001) pode ser a chave para contornar os problemas de transferência de calor e de massa (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003) e deste modo, contribuir para o desenvolvimento de biorreatores de FES mais adequados.

Os biorreatores para o processo de FES são classificados em duas categorias: 1) escala de laboratório e 2) escala piloto ou industrial (Tabela 5). A primeira categoria utiliza substratos sólidos que vão de gramas até poucos quilos, enquanto que a segunda categoria utiliza de quilos até várias toneladas de substrato sólido (DURAND, 2003). Os biorreatores de FES comumente utilizados podem ser distinguidos pelo tipo de aeração (forçada ou estática) ou sistema de mistura empregada (com ou sem misturador) (ALI; ZULKALI, 2011).

Os biorreatores de bandeja, como o próprio nome diz é composto por várias bandejas, onde o meio sólido fermentado é colocado. Essas bandejas são mantidas em uma câmara com temperatura constante através do qual, o ar úmido é circulado (Fig. 10) (COUTO; SANROMÁN, 2006). Os biorreatores de bandejas podem, ou não, apresentar aeração forçada e podem ter leitos sem misturador ou com misturador manual (PANDEY, 2003).

Figura 10 – Esquema de um biorreator de bandeja.



Fonte: Couto e Sanromán, (2006).

Xia e Cen (1999) estudaram a produção de celulases por *T. reesei* ZU-02 em biorreator de bandeja utilizando sabugo de milho como substrato e obtiveram uma atividade de FPase de 158 UI/g em 6 dias de cultivo. Brijwani, Oberoi e Vadlani (2010) também estudaram a produção de FPase e β -glicosidase em biorreator de bandeja utilizando casca de soja e farelo de trigo como substrato. Em condições otimizadas a produção de FPase e β -glicosidase a partir do cocultivo de *T. reesei* e *A. oryzae* foi de 10,7 UI/g em 96 horas de cultivo para ambas as enzimas. Dhillon et al. (2011) avaliaram o potencial dos resíduos agrícolas para produção de celulases e hemicelulases em Erlenmeyer e biorreator de bandeja usando cultivos individuais e mistos de *T. reesei* e *A. niger*. As atividades mais elevadas de celulases e hemicelulases foram obtidas em biorreator de bandeja utilizando palha de arroz e farelo de trigo na proporção de 3:2 e cultivo misto dos fungos. As atividades de FPase, β -glicosidase, endoglucanase e xilanases foram de 35,8 UI/g (96h), 33,7 UI/g (96h), 131,3 UI/g (120h) e 3106,34UI/g (120h), respectivamente. Soni, Nazir e Chadha (2010) compararam a produção de celulases por *Aspergillus* sp. em Erlenmeyer e biorreator de bandeja e obtiveram resultados semelhantes entre as condições de fermentação utilizadas. As produções de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase no biorreator de bandeja (750g de farelo de trigo) foram de 51, 44 e 21 UI/g, respectivamente. Shahi et al. (2011) compararam a produção de xilanases por *A. niger* em Erlenmeyer e biorreator de bandeja. Em condições otimizadas a

produção de xilanases por *A. niger* em biorreator de bandeja utilizando palha e farelo de trigo como substrato foi de 1465 UI/g em 50h de cultivo. Embora a produção de enzimas em biorreator de bandejas seja expressiva, o elevado número de bandejas necessárias para o processo fermentativo, torna esse tipo de biorreator pouco atraente para a produção em larga escala (PANDEY et al., 2001).

Tabela 5 – Classificação e diferença entre os biorreatores de escala de laboratório, piloto e industrial.

Biorreator	Vantagens	Desvantagens
<i>Escala de Laboratório</i>		
Coluna	Econômico, fácil montagem, monitoramento e controle de umidade, temperatura, biomassa e CO ₂ . Conexão de várias colunas.	Canais preferenciais de O ₂ , dificuldade em coletar amostra e problemas na eliminação de calor.
Coluna Estéril	Controle de umidade e temperatura. Sistema de esterilização prévio a inoculação e coleta de amostra.	Formação de gradientes de concentração de O ₂ e nutrientes.
Tambor horizontal	Maior aeração e mistura do substrato. Melhor remoção de calor	Danos ao micélio. Dificuldade em controlar a umidade e temperatura. Pouco volume de substrato utilizado no tambor.
Zymotis	Melhor transferência de calor.	Problemas de asepsia no processo. Maior compactação do substrato.
Growtek	Facilidade em coletar amostra. Maior contato entre o meio de cultivo e o suporte sólido. Menor acúmulo de calor no meio sólido.	Sem aeração.
Processo contínuo	Menor tempo de residência (complexo micro-organismo-enzima-substrato). Melhora a mistura e crescimento fúngico. Maior asepsia.	Transferência não homogênea de calor. Aglomeração de células por rompimento do micélio.

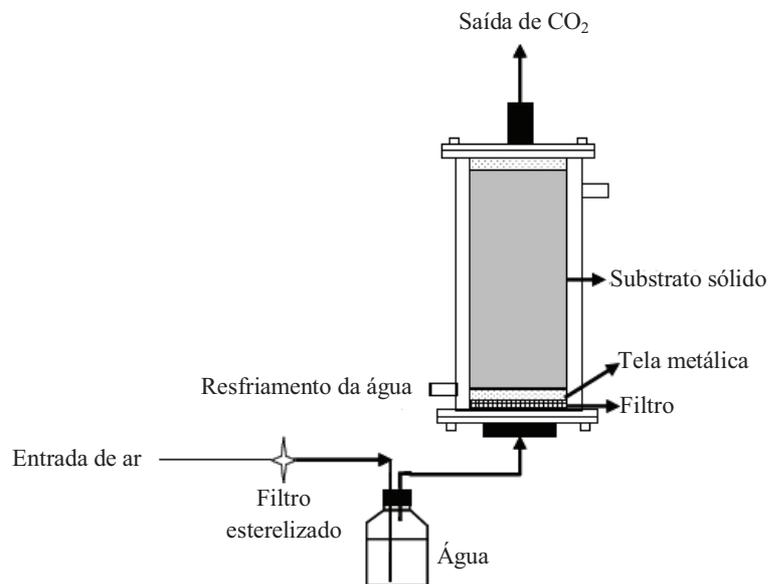
Tabela 5 – Continuação.

Biorreator	Vantagens	Desvantagens
<i>Escala piloto e industrial</i>		
Plafactor TM	Automatizado no controle das variáveis de estudo do crescimento microbiano. Altos níveis de asepsia. Equipamento compacto.	Dificuldade em coletar amostra. Rápida geração de calor exotérmico pelo crescimento microbiano.
Leito fluidizado	Operação de forma contínua. Menor aglomeração do substrato. Aumento na transferência de O ₂ e umidade.	Formação de alto cisalhamento que podem afetar o crescimento dos microrganismos e o rendimento do produto.

Fonte: Ruíz-Leza et al. (2007).

Os biorreatores de leito empacotado são compostos por uma coluna de vidro ou plástico com o substrato sólido retido sobre uma base perfurada (RAIMBAULT, 1998; RODRÍGUEZ COUTO et al., 2000; DURAND, 2003). O ar úmido é forçado através do leito de substrato, porém não possui misturador. Esse tipo de biorreator é apropriado para os processos de FES em que não seja desejável misturar todo o substrato, devido aos efeitos deletérios sobre o crescimento microbiano ou sobre a estrutura física do produto final (ALI; ZULKALI, 2011). O biorreator de leito empacotado pode ser revestido com uma “jaqueta” para a circulação da água e controle da temperatura durante a fermentação (Fig. 11). Entretanto, alguns inconvenientes estão associados a esse biorreator como dificuldades em se obter o produto desejado, como por exemplo, as enzimas, crescimento não uniforme do micro-organismo, baixa remoção de calor e dificuldades em se ampliar a escala (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Figura 11 – Esquema de um biorreator de leito empacotado.



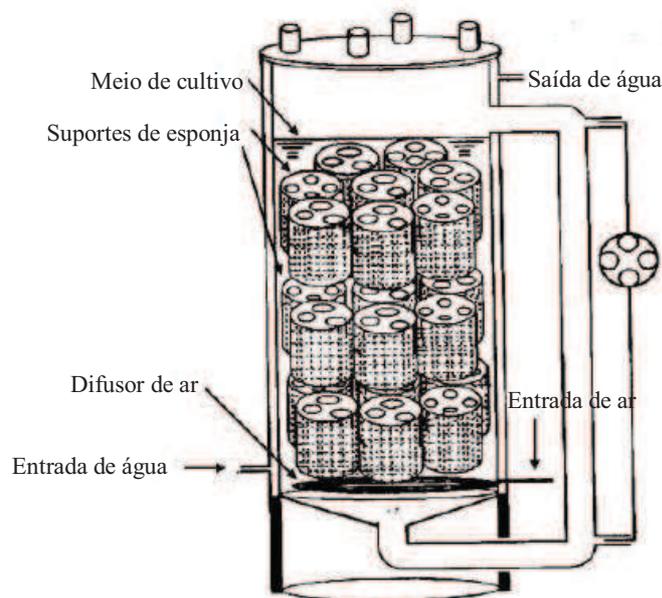
Fonte: Couto e Sanromán, (2006).

Zanelato et al. (2012) compararam a produção de endoglucanase por FES em sacos plásticos e biorreator de leito empacotado usando o fungo *Myceliophthora* sp. e farelo de trigo e bagaço de cana como meio de cultivo. A atividade de endoglucanase obtida em ambos os sistemas de cultivo foram semelhantes (878 e 800 UI/g, respectivamente). Abdeshahian et al. (2011) avaliaram o uso dos resíduos da torta de dendê na produção de endoglucanase pelo cultivo de *A. niger* em biorreator de leito empacotado por sete dias e o rendimento de endoglucanase em condições otimizadas foi de 244,53 UI/g. Assamoi et al. (2008) obtiveram uma produção de xilanase por *Penicilium canescens* de 10200 UI/g (7 dias) utilizando torta de óleo de soja como substrato para fermentação em biorreator de leito empacotado. A produção de enzimas utilizando este tipo de biorreator é elevada, entretanto o aumento de escala é ainda pouco viável devido a alguns inconvenientes já mencionados acima.

A fim de evitar a adesão e agregação das partículas de substrato, foi desenvolvido o biorreator de leito fluidizado que fornece uma mistura contínua com circulação de ar forçada para as partes do cilindro, através de uma bomba (COUTO; SANROMÁN, 2006). Nesse tipo de biorreator podem ser utilizados suportes como pedaços de esponja, bucha, polímeros sintéticos (esponja de poliuretano, poliestireno) e cestas de aço inoxidável com perfurações, para uma eficiente imobilização das células no meio de cultivo (Fig. 12) (RIVELA; COUTO; SANROMAN, 2000; OGBONNA; MASHIMA; TANAKA,

2001). O biorreator de leito fluidizado fornece aumento na transferência de calor, aeração e mistura do substrato, no entanto, o inóculo pode ser danificado por causa do cisalhamento gerado, além do que se formam gradientes de temperatura através da coluna que podem afetar o rendimento do produto final (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Figura 12 – Esquema de biorreator de leito fluidizado com suportes para imobilização das células.

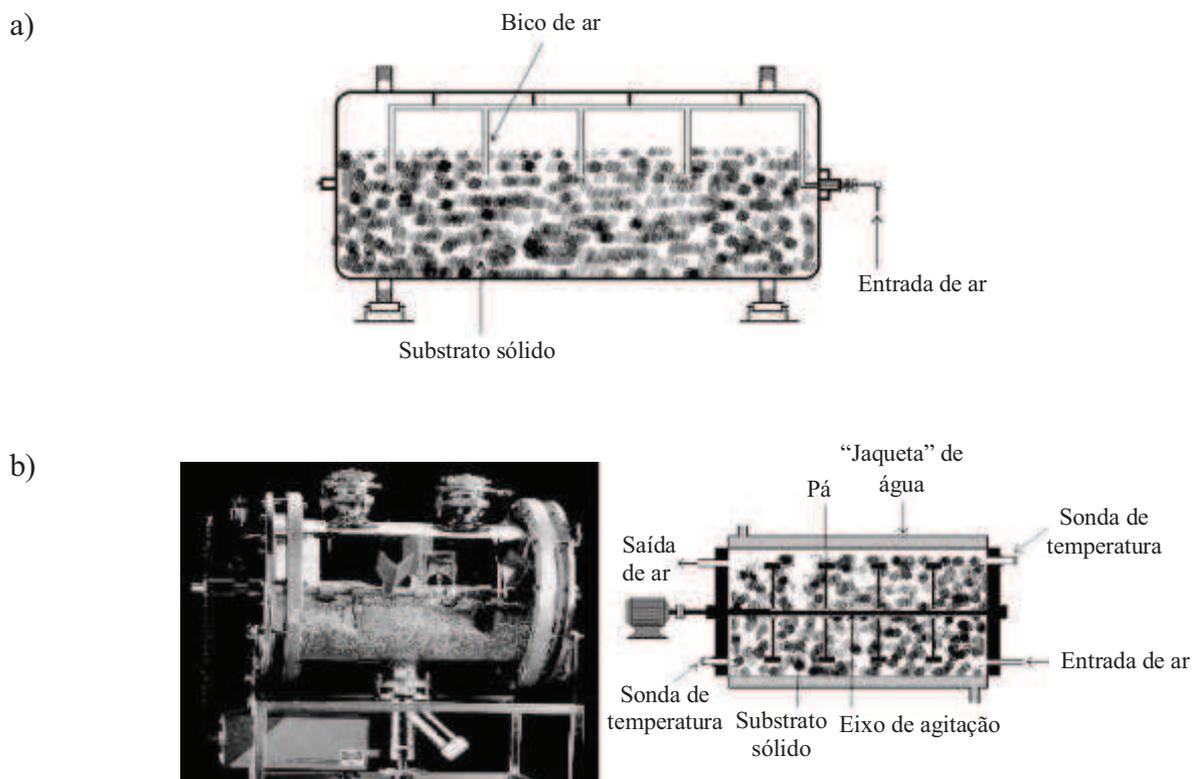


Fonte: Ogbonna, Mashima e Tanaka, (2001).

O biorreator de tambor horizontal pode ser projetado de várias formas: rotativo, perfurado ou com pá (DURAND, 2003). O tambor horizontal rotativo consiste de um cilindro, com ou sem “jaqueta” de água para controle de temperatura, que gira lentamente misturando o material fermentado auxiliado por defletores (perfurado ou não) na parede interna do tambor (MITCHELL et al., 1992). Entretanto, a mistura nesse tipo de reator é pouco eficiente, devido à aglomeração das partículas de substrato durante o crescimento do micélio, o que aumenta a dificuldade de regulação da temperatura do meio sólido (Fig. 13a) (DURAND, 2003). Por outro lado, o tambor rotativo com pá é mais eficiente na transferência de oxigênio e diminui a aglomeração de partículas de substrato durante o crescimento microbiano (Fig. 13b) (DURAND, 2003). Entretanto, a mistura contínua mesmo que suave pode modificar a estrutura do meio sólido para uma textura pastosa, pois dependendo da natureza da partícula, a mistura pode ser abrasiva e prejudicial para o micélio, principalmente se as hifas não

tiverem septos (DURAND, 2003). A principal desvantagem desse tipo de biorreator é que o tambor é cheio com apenas 30% da sua capacidade, de outro modo a mistura torna-se ineficiente (COUTO; SANROMÁN, 2006), devido à má transferência de calor em grandes volumes de substrato (NAGEL et al., 2001).

Figura 13 – Esquema de biorreator de tambor rotativo (a) e biorreator de tambor rotativo com pá (b).



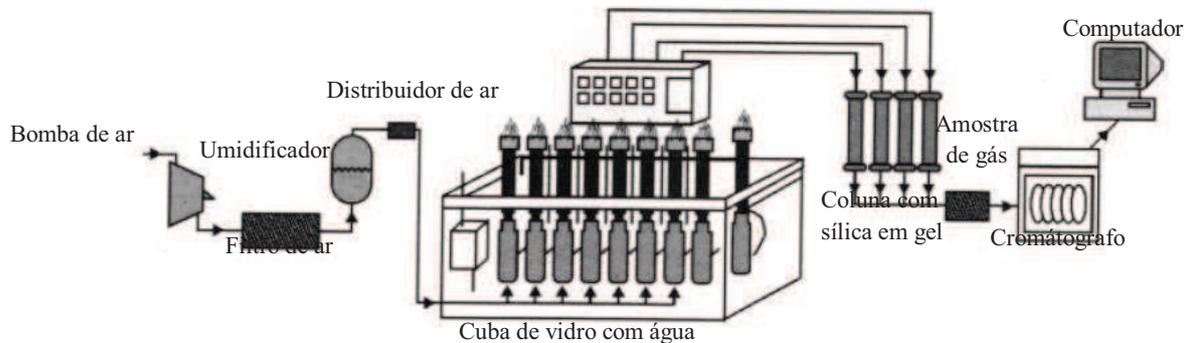
Fonte: Durand, (2003).

Kalogeris et al. (2003) estudaram a produção de celulases e hemicelulases pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em biorreator de tambor rotativo por FES da palha de trigo e obtiveram um rendimento de endoglucanase, celobiohidrolases, β -glicosidase, FPase, xilanase e β -xilosidase de 1709, 4, 79, 6, 4490 e 45 UI/g, respectivamente. Panagiotou et al. (2003) em condições otimizadas obtiveram um rendimento de endoglucanases, celobiohidrolases, β -glicosidases, xilanases e β -xilosidases de 304, 4,1, 0,141, 1840 e 0,141 UI/g, respectivamente, utilizando o fungo mesofílico *Fusarium oxysporum* sob FES do sabugo de milho em biorreator de tambor rotativo. Díaz, De Ory e Blandino (2009) avaliaram

o efeito do tipo de agitação (sem agitação, intermitente, com agitação) sob diferentes taxas de fluxo de ar (0,9, 120 e 200 mL/min) na produção de pectinases, xilanases e celulases por *A. awamori* em biorreator de tambor rotativo. A taxa de fluxo de ar influenciou na produção de xilanase, pectinase e endoglucanase pelo fungo e rendimentos mais elevados (54,42, 8,77 e 3,69 UI/g, respectivamente) foram obtidos a 120 mL/min. Esta aeração forneceu oxigênio suficiente para o metabolismo do fungo e, em consequência para a produção de enzimas sendo desnecessária a agitação do sistema. Sistemas com agitação freqüente podem provocar danos ao cultivo de fungo, devido a força de cisalhamento gerada durante a agitação (DÍAZ; DE ORY; BLANDINO, 2009).

Além dos biorreatores citados acima, outros tipos de biorreatores de FES, como os de coluna, coluna estéril, Zymotis, Growteck, processo contínuo e Biocon são descritos na literatura. O biorreator de coluna é um dos mais interessantes biorreatores de FES de escala de laboratório, e foi patenteado por um grupo de ORSTOM entre 1975 e 1980 (RAIMBAULT; GERMON, 1976). Esse biorreator é composto por pequenas colunas (em torno de 4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) nas quais é adicionado o meio inoculado e colocada em um banho de água regulado termostaticamente (Fig. 14). O ar saturado de água passa através de cada coluna. Esse biorreator é amplamente utilizado por muitos pesquisadores e oferece à possibilidade de aerar o cultivo e também analisar a respiração do micro-organismo, conectando um cromatógrafo de gás as colunas. Esse equipamento é conveniente para estudos de “screening”, otimização da composição do meio e medição do CO₂ produzido pelos micro-organismos sendo que a pequena quantidade de meio utilizada e a geometria da coluna de vidro é adequada para manter a temperatura no biorreator. No entanto, o “design” deste sistema não permite que pequenas quantidades de amostras sejam coletadas durante a fermentação, sendo necessário sacrificar uma coluna inteira para cada análise durante o processo (DURAND, 2003). Este tipo de biorreator com suas vantagens (aeração forçada, fácil de usar e relativamente barato) pode constituir um grande avanço na área da pesquisa relacionada à bioprocessos.

Figura 14 – Esquema de um biorreator de coluna.



Fonte: Medeiros et al., (2001).

Panagiotou, Granouillet e Olsson (2006) estudaram a produção de enzimas que degradam arabinosilana pelo fungo *Penicillium brasilianum* em biorreator de coluna de estado sólido utilizando resíduos de grão da cervejaria como meio de cultivo. Em condições otimizadas o rendimento mais elevado de xilanase foi de 709 UI/g, enquanto que para feruloil esterase e arabinofuranosidase foi de 1,54 e 3,57 mU/g, respectivamente. Farinas et al. (2011) avaliaram o efeito da taxa de fluxo de ar, umidade relativa do ar e umidade inicial do substrato (farelo de trigo) na produção de endoglucanase por *A. niger* em biorreator de coluna instrumentado. A produção de endoglucanase mais elevada (56,1 UI/g) foi obtida a uma umidade de substrato de 72%, umidade relativa do ar de 70% e taxa de fluxo de ar 20 mL/min. Rodríguez-Zúñiga et al. (2013) em condições otimizadas de taxa de fluxo de ar (30 mL/min) e umidade relativa do ar (80%) obtiveram uma produção de endoglucanase, FPase e xilanase por *A. niger* cultivado em bagaço de cana e farelo de soja de 21,8, 0,9 e 143,85 UI/g, respectivamente. Pirotta et al. (2013) compararam a produção de xilanase por *A. oryzae* em Erlenmeyer e biorreator de coluna em diferentes umidades de substrato e temperaturas de fermentação. Em condições otimizadas de umidade de substrato (80%) e temperatura (28°C) a produção de xilanase por *A. oryzae* no biorreator de coluna instrumentado foi mais elevada (2830,7 UI/g) comparado com o Erlenmeyer (1658,1 UI/g) depois de 24h de cultivo. Neste contexto o biorreator de coluna é um excelente equipamento de escala de laboratório para seleccionar as melhores condições operacionais de FES sob condições controladas.

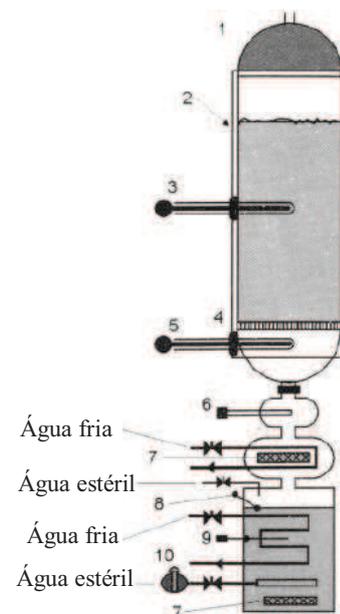
O biorreator de coluna estéril foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica (INRA) na França, tomando como base o biorreator de coluna (RUÍZ-LEZA et al., 2007). Esse biorreator trabalha com o volume de 1

litro, com uma sonda de umidade relativa, uma serpentina de resfriamento no circuito de ar e uma resistência de aquecimento (Fig. 15). Estas modificações melhoraram a regulação do conteúdo de água no processo fermentativo. Além disso, pequenas alíquotas podem ser retiradas abrindo a tampa na presença de uma chama, sem problemas de contaminação. Neste tipo de reator a temperatura e a quantidade de água do meio são monitoradas por meio da regulação da temperatura, umidade relativa e vazão de ar que passa direto pelas camadas de substrato. Diferentes perfis para a vazão de ar e temperatura podem ser elaborados, gerando informações úteis para estudos de aumento de escala (DURAND, 2003).

Figura 15 – Esquema de um biorreator de coluna estéril.

Legenda:

- 1) tampa de calefação;
- 2) substrato sólido;
- 3) termômetro
(medidor de temperatura da biomassa);
- 4) peneira de aço inoxidável;
- 5) termômetro
(medidor de temperatura do ar de entrada);
- 6) sonda de umidade relativa;
- 7) aquecedor;
- 8) sonda de nível;
- 9) termômetro
(medidor de temperatura da água);
- 10) medidor de vazão

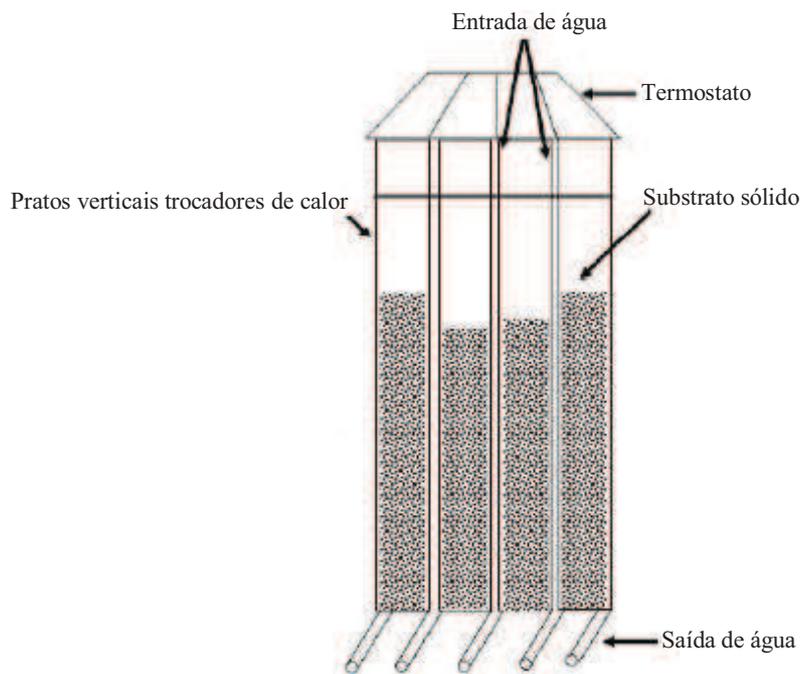


Fonte: Durand, (2003).

Em processos que o substrato pode permanecer estático o biorreator Zymotis é um equipamento interessante (MITCHELL; VON MEIEN, 2000). O Zymotis consiste de placas verticais por onde há transferência de calor interna devido à circulação de água fria (Fig. 16). O meio sólido previamente inoculado é colocado entre as placas verticais e o ar termostatzado é introduzido na parte inferior do sistema (RUÍZ-LEZA et al., 2007). Este sistema parece com o biorreator de bandeja com a diferença de que o substrato é disposto verticalmente, portanto é difícil trabalhar em condições assépticas. Além disso, uma

diminuição do volume de meio fermentado durante o crescimento do micélio provoca um menor contato das placas verticais com o meio, o que pode levar a uma menor transferência de calor e canalização do ar. Assim, o aumento de escala desse tipo de reator parece muito difícil (DURAND, 2003).

Figura 16 – Esquema de um biorreator Zymotis.



Fonte: Ruíz-Leza et al. (2007).

O biorreator Growteck foi desenvolvido para cultura de tecidos vegetais, porém mais tarde foi utilizado para FES. Esse biorreator consiste de um recipiente cilíndrico (11,3 cm de diâmetro e 16 cm de altura) com um bico tubular (2,6 cm de diâmetro e 8,5 cm de comprimento) inclinado (15°) na base. Tanto o recipiente quanto o bico tem tampa. Dentro do biorreator tem um flutuador cilíndrico (área de 72cm²) com base perfurada, onde é colocado o material fermentado. Este por sua vez é introduzido pelo bico inclinado. Esse tipo de biorreator permite medição da quantidade de água para manter a umidade adequada para o crescimento microbiano. Entretanto, não conta com um sistema de medição da variação da temperatura e não é possível coletar pequenas quantidades de amostras sem ter que descartar todo o substrato fermentado (Fig. 17) (KAR; BANERJEE; BHATTACHARYYA, 1999).

O Zymotis e o Growtek são biorreatores com aeração forçada e sem misturador.

Figura 17 – Esquema de um biorreator Growtek.



Fonte: Kar, Banerjee e Bhattacharyya (1999).

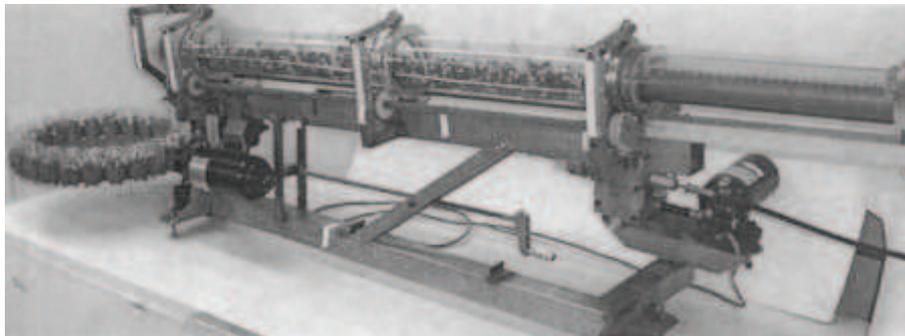
Roussos et al. (1991) estudaram a produção de celulases por *T. harzianum* cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (4:1) em biorreator Zymotis. O rendimento de endoglucanase e FPase foi de 74,2 e 8,1 UI/g em 48h de fermentação, respectivamente. Negi e Banerjee (2006) avaliaram a produção de amilase e protease por *A. awamori* em biorreator Growtek e obtiveram em condições otimizadas um rendimento de 9420,6 e 1930 UI/g, respectivamente. Bhanja et al. (2007) compararam a produção de α -amilase por *A. oryzae* em biorreator de bandeja e Growtek utilizando farelo de trigo como substrato. O rendimento de α -amilase no biorreator Growtek foi 1,3 vezes maior (19,66 UI/g) comparado com o biorreator de bandeja.

O trabalho de Van De Lagemaat e Pyle (2001) é um dos mais reportados na literatura que explora o design dos biorreatores contínuo de estado sólido em escala de laboratório (Fig. 18). O biorreator consiste de um cilindro rotativo inclinado com dois dispositivos, um de alimentação e outro de amostragem. O dispositivo de alimentação consiste de um parafuso de plástico preenchido com substrato para alimentação contínua do

biorreator, e o dispositivo de amostragem consiste de um disco rotativo com provetas para coleta das amostras.

Estudos de cultivo misto, crescimento fúngico e níveis de esporulação em biorreator de processo contínuo foram realizados com êxito, devido o tempo de residência do complexo micro-organismo-enzima-substrato ser menor que nos biorreatores convencionais e as condições de assepsia ser melhores (RUÍZ-LEZA et al., 2007).

Figura 18 – Fermentador de estado sólido contínuo.

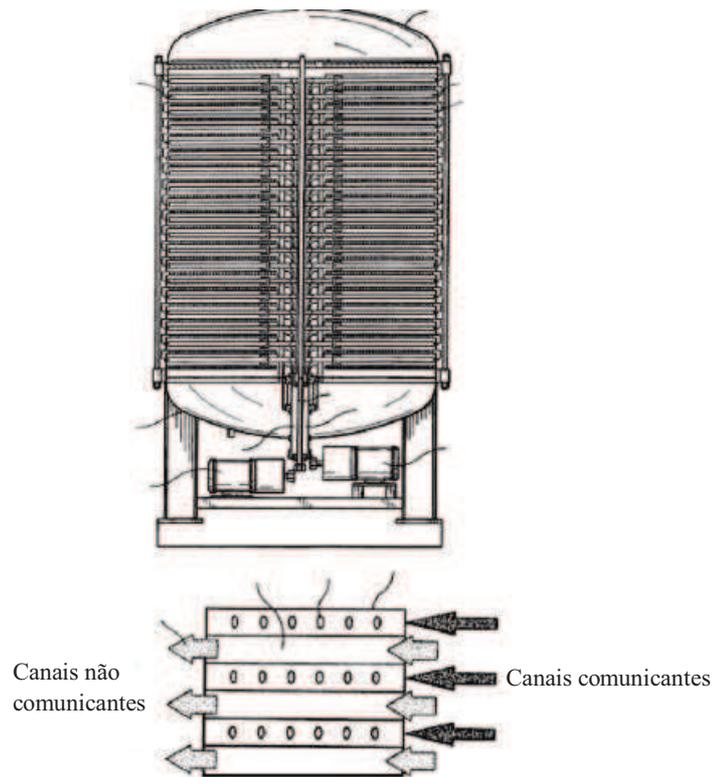


Fonte: Van De Lagemaat e Pyle, (2001).

O biorreator PlafactorTM patenteado por uma empresa Indiana, Biocon foi projetado e automatizado para o processo de cultivo em bandejas com o objetivo de substituir as salas de incubação por ambientes mais compactos. O equipamento PlafactorTM é utilizado nas indústrias no desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos, devido altas condições de assepsia e precisão (SURYANARAYAN; MAZUMDAR, 2000). Todas as operações do processo fermentativo, como esterilização, resfriamento, inoculação, controle e recuperação do produto e pós-esterilização são realizados em um único biorreator e controlados por um computador (SERMANNI; TISO, 2008). O biorreator é composto de bandejas seladas colocadas uma sobre as outras formando dois módulos unidos por um eixo central (Fig. 19). Cada módulo tem um braço misturador (que gira em torno do eixo central durante o processo fermentativo), canais comunicantes e não comunicantes. Os canais não comunicantes fornecem fluidos de resfriamento e aquecimento que controlam o calor metabólico, enquanto que os canais comunicantes fornecem fluidos para esterilizar, para ajustar o teor de umidade e oxigênio e para extrair os compostos de interesse durante o processo de cultivo. Assim, este tipo de biorreator mantém todas as vantagens da FES,

entretanto por ser um equipamento patenteado não se sabe como os resíduos do produto são descartados e nem como é feita a limpeza do reator que parece relativamente complicado (DURAND, 2003).

Figura 19 – Esquema de um biorreator PlafactorTM.



Fonte: Suryanarayan e Mazumdar (2000).

Como visto acima, a produção de enzimas em biorreatores de estado sólido são muito atrativas, entretanto todos os tipos de biorreatores sólidos até mesmo os patenteados apresentam algum tipo de problema de automação, o que dificulta o aumento de escala. Dessa forma, pesquisas voltadas para o desenvolvimento da instrumentação de biorreatores de fermentação em estado sólido se fazem necessários para um avanço significativo no campo biotecnológico.

2.6. Enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal

As enzimas que degradam a parede celular vegetal como as celulases, hemicelulases e pectinases são amplamente estudadas, devido seu elevado potencial de aplicação biotecnológica na indústria de alimentos, vinho, têxtil, papel, ração animal, combustível e outros (BHAT, 2000; LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). O uso de enzimas nos processos industriais exibe um aspecto atrativo, devido sua atividade elevada, especificidade biocatalítica, redução de bioprodutos indesejáveis e baixa toxicidade química (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). Entretanto, o custo da enzima ainda é o fator limitante de vários processos industriais, inclusive o de produção de etanol de segunda geração (ZHANG et al., 2009; BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010).

2.6.1. Celulases

O esquema clássico de degradação da celulose envolve a ação sinérgica de três classes de enzimas: 1) as endo-1,4- β -glucanases clivam aleatoriamente as ligações internas na cadeia de celulose. Estas enzimas podem ser processivas ou não processivas (as enzimas processivas são aquelas que fazem vários cortes consecutivos em uma única cadeia de polissacarídeo) (HORN et al., 2006; PAYNE et al., 2011; HORN et al., 2012); 2) as exo-1,4- β -glucanases atacam os terminais redutores e não redutores dos polímeros de celulose. As exo-1,4- β -glucanases processivas são referidas como celobiohidrolases e estão entre os componentes mais abundantes na natureza; 3) as β -glicosidases convertem celobiose (o principal produto das endo e exoglucanases) em glicose (HORN et al., 2012).

A endo-1,4- β -glucanase (EC 3.2.1.4) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da extremidade da molécula participa da ligação com a glicose adjacente) (LYND et al., 2002). A endoglucanase é responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (KLEMAN-LEYER et al., 1996).

As exo-1,4- β -glucanases são constituídas pelas glucanohidrolases e celobiohidrolases (CBH). A glucanohidrolase (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-glucanohidrolase, é pouco reportada na literatura, mas é de grande importância na

hidrólise da celulose, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero de celulose. A CBH (EC 3.2.1.91) cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase é definida pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) como catalisadora apenas da hidrólise dos terminais não-redutores da cadeia de celulose e oligossacarídeos com GP>3 em celobiose, no entanto, há relatos do ataque dessa enzima aos terminais redutores da cadeia de celulose (LYND et al., 2002). A CBH participa da hidrólise primária da celulose e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando a desestratificação das fibras de celulose, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-a mais exposta às celulasas (ZHANG; LYND, 2004). A CBH pode ainda ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (DE CASTRO; PEREIRA, 2010). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (DE CASTRO; PEREIRA, 2010).

A β -glicosidase, cujo nome sistemático é β -glicosídeo glucohidrolase (EC 3.2.1.21), tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose (LYND, et al., 2002; LYND; ZHANG, 2002). Assim como a CBH, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (DE CASTRO; PEREIRA, 2010).

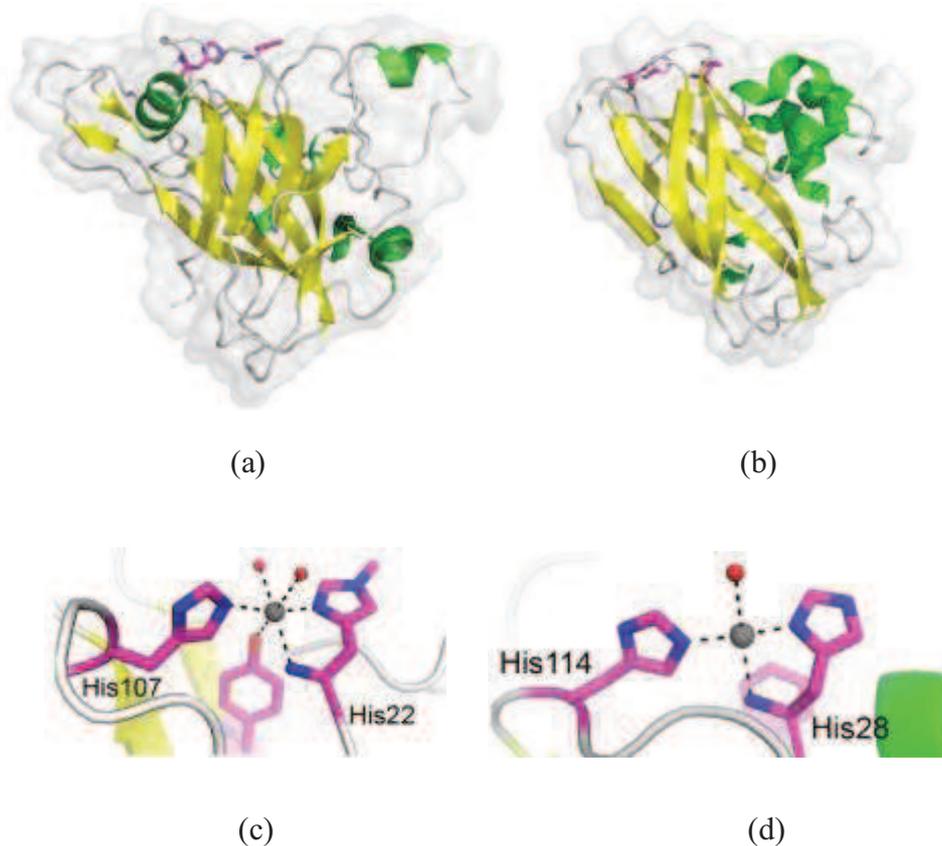
Quando atuam sinergisticamente, as celulasas apresentam um melhor rendimento do que quando atuam isoladamente umas das outras (DE CASTRO; PEREIRA, 2010). São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas: sinergia endo-exoglucanases - a endoglucanase, atua nas regiões amorfas da celulose, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação das CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia exo-exoglucanase - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados a partir da ação da endoglucanase; sinergias exoglucanase- β -glicosidase e endoglucanase- β -glicosidase - como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase (BHAT; BHAT, 1997; LYND et al., 2002). É importante notar que o sistema celulolítico natural normalmente contém a ação de enzimas exo e endo que podem ter preferência por diferentes formas de celulose (cristalina x amorfa) (WOOD; MCCRAE, 1979; WOOD; INGRAM, 1992; LEHTIO et al., 2003; KOSTYLEV;

WILSON, 2012). A variação na preferência por diferentes formas de celulose pode, em parte, ser uma consequência da variação na presença dos módulos de ligação dos carboidratos (CBMs) que estão covalentemente ligados a domínios catalíticos das enzimas em questão (LINDER; TEERI, 1997; CARRARD et al., 2000; BORASTON et al., 2004).

Todas as celulasas (endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases) são hidrolases processivas ou não processivas que clivam ligações glicosídicas pela adição de uma molécula de água (DAVIES; HENRISSAT, 1995). Processabilidade é provavelmente essencial para degradar eficientemente as partes mais cristalinas da celulose (HORN et al., 2012). No entanto, hidrolases glicosídicas processivas são intrinsecamente lentas e, portanto, a celulose com mais regiões amorfas, podem ser mais bem degradada com uma mistura de celulasas contendo menos enzimas processivas (EIJSSINK et al., 2008).

Reesei et al. (1950) sugeriram que a hidrólise da celulose exigia um componente não hidrolítico que interrompesse o empacotamento do polímero no substrato, aumentando assim a acessibilidade das enzimas hidrolíticas. No entanto, só foi Vaage-Koslud et al. (2005) que descobriram que uma bactéria produzia uma proteína (CBP21) que aumentava a acessibilidade ao substrato potencializando a ação das enzimas hidrolíticas. Essa proteína foi classificada como um módulo de ligação dos carboidratos da família 33 (CBM33) no banco de dados de *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZy) (CANTAREL et al., 2009). Os genes que codificam CBM33 são comuns em bactérias e vírus, mas raras em eucariotos (HORN et al., 2012). No entanto, fungos produzem proteínas atualmente classificadas como hidrolases glicosídicas da família 61 (GH61) que são estruturalmente e funcionalmente similares às proteínas CBM33 e que atuam sinergisticamente com as celulasas (HARRIS et al., 2010). A similaridade estrutural dessas enzimas é devido a um grupo amino (N-terminal) e duas histidinas (His 28/His22) que podem se ligar a um íon metálico (Fig. 20) (HORN et al., 2012). A similaridade funcional da CBM33 e GH61 é que ambas catalisam a clivagem oxidativa da celulose na presença de um doador de elétron externo, como por exemplo, o ácido gálico. A atividade dessas enzimas depende do cobre, assim a CBM33 e GH61 são monooxigenases polissacarídeos líticas dependentes de cobre (QUINLAN et al., 2011; VAAJE-KOLSTAD et al., 2012).

Figura 20 –TaGH61, uma celulose ativa de GH61 de *Thermoascus aurantiacus* (a), CBP21 uma quitina-ativa do CBM33 de *Serratia marcescens* (b) e detalhes do sítio ativo destas duas enzimas (c) e (d), respectivamente.



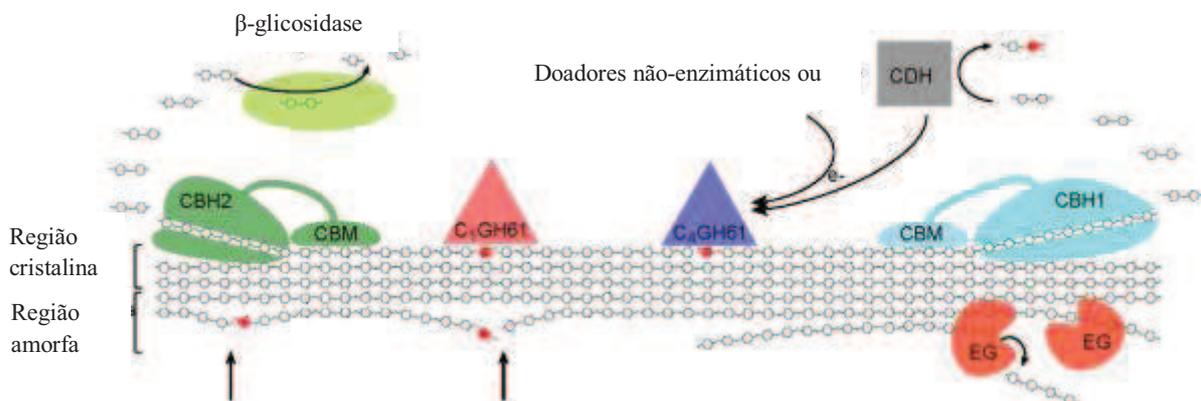
Legenda: As figuras (a) e (b) mostram desenhos das proteínas completas, as cadeias laterais das duas histidinas conservadas são mostradas nas figuras (c) e (d). As bolas cinza nas figuras (c) e (d) representam os íons metálicos e as esferas vermelhas as moléculas de água. As histidinas 22 e 28 são os resíduos N-terminal da proteína madura e o grupo amino N-terminal participa na coordenação do íon metálico. **Fonte:** Horn et al., (2012).

Um dos aspectos mais importantes das enzimas CBM33 e GH61 são seus sítios de ligação ao substrato, que parecem se encaixar perfeitamente nas regiões cristalinas, podendo romper o empacotamento e gerar acessibilidade não só através da introdução de um corte no polímero, mas também pela introdução de um grupo carregado. Assim, 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 celulases

hidrolíticas clássicas é facilitada pela ação dessas monooxigenases polissacarídeo líticas (HORN et al., 2012).

O sistema clássico de degradação da celulose envolve muitas EG e CBH que atuam em várias partes do substrato, por exemplo, em diferentes regiões cristalinas ou em partes que diferem em termos de cristalinidade e de acessibilidade. O sistema atual de degradação da celulose proposto por Horn et al. (2012) envolve além das celulasas clássicas outras enzimas, como as GH61 que oxida o carbono 1 (C1) e carbono 4 (C4), liberando extremidades não oxidadas para as CBH2 e CBH1, respectivamente (os açúcares oxidados estão representados em vermelho) (Fig. 21). As CBH2 atacam as extremidades não redutoras liberando celobiose que é convertida em glicose pela β -glicosidase. As CBH1 atacam às extremidades redutoras liberando celobiose que podem ser oxidada pela celobiose-dehidrogenase (CDH). A ação combinada das enzimas que oxidam o C1 e o C4 pode liberar celo-oligossacarídeos nativos, a partir do meio da cadeia de celulose. A ação da GH61 pode gerar novos pontos de ataque para as CBHs (indicado por setas na parte esquerda inferior da Figura 21) (HORN et al., 2012). As CDH podem fornecer elétrons a GH61, porém nem todos os organismos têm genes que codificam as duas enzimas em seu genoma (por exemplo, *Postia placenta* tem quatro genes que codificam a GH61, mas nenhum que codifica a CDH) (WYMELENBERG et al., 2010). Dessa forma, outros doadores não enzimáticos (doadores de elétrons), como glutatona redutase, ácido ascórbico e ácido gálico também podem induzir a atividade oxidativa (Fig. 21) (HORN et al., 2012).

Figura 21 – Visão atual sobre a degradação da celulose pelas enzimas fúngicas.



Fonte: Horn et al. (2012).

As novas enzimas CBM33 e GH61 fazem algo muito diferente para seus substratos do que as enzimas hidrolíticas conhecidas e sua implementação na conversão de biomassa podem ser muito vantajosa, pois essas enzimas podem lidar com substratos mais compactos e inacessíveis. Assim, a implementação dessas enzimas pode não apenas afetar o custo do passo de sacarificação enzimática, mas pode também aperfeiçoar o passo anterior ao pré-tratamento e o *design* do processo em geral (HORN et al., 2012).

2.6.2. Hemicelulases

As hemicelulases são enzimas chaves na degradação da biomassa vegetal e fluxo de carbono na natureza (SHALLOM; SHOHAM, 2003). A completa despolimerização das hemiceluloses requer a ação sinérgica de várias enzimas, incluindo as endoxilanases (endo-1,4- β -xilânase, EC 3.2.1.8), β -xilosidases (xilana-1,4- β -xilosidase, EC 3.2.1.37), α -glucuronidase (α -glucosiduronase, EC 3.2.1.139), α -arabinofuranosidase (α -L-arabinofuronosidase, EC 3.2.1.55), arabinanase (endo- α -L-arabinanase, EC 3.2.1.99), β -mananases (endo-1,4-mananase, EC 3.2.1.78), β -manosidases (EC 3.2.1.25), α -1,4-galactosidase (EC 3.2.1.22), β -1,4-galactosidase (EC 3.2.1.23), acetil-xilano-esterase (EC 3.1.1.72) e feruloil xilano esterase (EC 3.1.1.73) (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). Entre essas enzimas, as endoxilanases e β -xilosidases (coletivamente chamadas de xilanases) são as mais estudadas, devido ser as principais responsáveis pela degradação da xilana, maior componente das hemiceluloses de biomassas lenhosas e folhosas (KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010; JUTURU; WU, 2013).

As endoxilanases hidrolisam as ligações do tipo β -1,4 na cadeia principal de xilana, gerando xilo-oligossacarídeo curto (Fig. 22a). As endoxilanases mais conhecidas pertencem às famílias de hidrolases glicosídicas (GH) 10 e 11, mas existem endoxilanases distribuídas entre as famílias GH 5, 8 e 43 (SHALLOM; SHOHAM, 2003). As endoxilanases da família GH 10 e 11 diferem-se uma da outra, devido à especificidade pelo substrato (BIELY et al., 1997). As endoxilanases da família GH 10 apresentam uma maior especificidade pelo substrato do que as endoxilanases da família GH 11. Especificamente, as enzimas da família GH 10 são muito importantes para a degradação da xilana, pois não só degradam as cadeias lineares de xilose com ligações do tipo β -1,4 como também as cadeias principais de xilana com elevado grau de substituições e xilo-oligossacarídeos curtos (BIELY et al., 1997; VARDAKOU et al., 2003; POLLET; DELCOUR; COURTIN, 2010; BRINK;

VRIES, 2011). Embora, os genomas fúngicos não mostrem uma correlação clara entre a quantidade de enzimas da família GH 10 e número de enzimas acessórias necessárias para a degradação da hemicelulose, acredita-se que no início da hidrólise poucas enzimas acessórias sejam necessárias, em contraste, a grandes quantidades de endoxilanasas da família GH10 (BRINK; VRIES, 2011).

As β -xilosidases são glicosidases do tipo exo que hidrolisam xilooligossacarídeos curtos em xilose completando a ação das xilanases sobre a xilana (Fig. 22b). São encontradas nas famílias GH 3, 30, 39, 43, 52, 54, 116 e 120 (MAI; WIEGEL; LORENZ, 2000; LEE et al., 2003; DUMON et al., 2012). A similaridade espacial entre *D*-xilopiranosose e *L*-arabinofuranose tornam essas enzimas bifuncionais (xilosidase-arabinosidase) e são encontradas principalmente nas famílias GH 3, 43 e 54 (MAI; WIEGEL; LORENZ, 2000; LEE et al., 2003). A maioria das β -xilosidases opera via mecanismo de retenção, entretanto as enzimas da família GH43 são enzimas de inversão e o mecanismo associado a GH 120 não são conhecidos (DUMON et al., 2012). Esta informação é importante no que diz respeito a aplicações biotecnológicas, pois algumas enzimas de retenção possuem atividade de transglicosilação que pode ser desvantajosa quando o objetivo for à hidrólise e a produção de xaropes monoméricos (SMAALI; RÉMOND; O'DONOHUE, 2006; MUZARD et al., 2009; SMAALI et al., 2009).

As xilanases (endoxilanasas) e β -xilosidases são cada vez mais reconhecidas como sendo componentes importantes em coquetéis enzimáticos para a conversão da biomassa lignocelulósica (SAHA, 2003; DODD; CANN, 2009). Isto é particularmente verdadeiro para a conversão de resíduos de grãos cereais que são ricos em hemiceluloses (SØRENSEN et al., 2005; SØRENSEN et al., 2007) e para biomassa lignocelulósica submetidas à pré-tratamento alcalino (DUMON et al. 2012). Neste último caso, muito das xilanas permanecem na fração pré-tratada o que significa que enzimas que hidrolisam xilana são necessárias nos coquetéis celulolíticos, a fim de obter rendimentos melhores de açúcar (YANG; WYMAN, 2008; KUMAR; RAJEEV; WYMAN, 2009a). Infelizmente, muitos coquetéis celulolíticos disponíveis comercialmente faltam quantidades adequadas de β -glicosidase e xilanases (MCINTOSH; VANCOV, 2010). Além disso, é evidente que simplesmente aumentar a quantidade de atividade de xilanases nos coquetéis não é suficiente, já que os xilooligossacarídeos produzidos pelas xilanases são potentes inibidores de celulasas (HESPELL et al., 1997; KUMAR; RAJEEV; WYMAN, 2009a). Portanto, os coquetéis

devem ser suplementados com quantidades elevadas de atividade de β -xilosidase (KUMAR; RAJEEV; WYMAN, 2009b).

A α -D-glucuronidase é responsável por clivar as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 2) entre o substituinte ácido α (4-O-metil)-D-glucurônico e a cadeia principal de xilana liberando ácido urônico (Fig. 22a) (JUTURU; WU, 2013). A α -glucuronidase pertence à família GH 67 e a família recém-identificada GH115 (RYABOVA et al., 2009; CHONG et al., 2011). Como em muitas outras famílias de enzimas ativas a carboidratos, a diferença entre as α -glucuronidases está na especificidade pelo substrato (BRINK; VRIES, 2011). As α -glucuronidases da família GH 67 são ativas em oligossacarídeos curtos, enquanto que algumas GH 115 são ativas em regiões internas do polímero de xilana (RYABOVA et al., 2009; CHONG et al., 2011). Notavelmente as α -glucuronidases da família GH 67 estão presentes em Ascomycetos, enquanto as GH 115 estão presentes em Ascomycetos e Basidiomicetos (CHONG et al., 2011).

As α -L-arabinanases e α -L-arabinofuranosidases hidrolisam as cadeias laterais de arabinanas (ligadas à cadeia principal de xilana) a arabinose (Fig. 22a). As *exo*- α -L-arabinofuranosidases especificamente clivam ligações glicosídicas entre substituintes de arabinofuranosil e entre resíduos de xilopiranosil na cadeia principal de arabinoxilana (JUTURU; WU, 2013). As α -L-arabinanases mostram atividade de *endo*- α -L-arabinofuranosidases e clivam as ligações *endo*- α -1,5 na cadeia linear de arabinana (Fig. 22e) (SHALLOM; SHOHAM, 2003; JUTURU; WU, 2013). Essas enzimas estão presentes nas famílias GH 3, 43, 51, 54 e 62 (DUMON et al., 2012). As enzimas das famílias GH 3, 51 e 54 são enzimas de retenção, enquanto que as famílias GH 43 e 62 são enzimas de inversão. A respeito da especificidade de ligação, muitas arabinofuranosidases que atuam sobre arabinoxilanas são ativas sobre as ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,5 embora preferências por ligações em algumas enzimas sejam notadas (DEBECHE et al., 2000; SAHA, 2000).

A ação das arabinofuranosidases é importante na desconstrução da biomassa, porque as cadeias laterais de arabinosil podem tanto inibir a ação das xilanases (BEAUGRAND et al., 2004) quanto atuar como determinantes na especificidade pelo substrato (VARDAKOU et al., 2005). Assim, as arabinofuranosidases podem atuar em sinergismo com as xilanases, melhorando a liberação de xilose quando comparado com a xilanase sozinha (DE VRIES et al., 2000; NUMAN; BHOSLE, 2006), embora isso não seja uma regra geral para todas as arabinofuranosidases, já que algumas parecem ser mais ativas

sobre xilo-oligossacarídeos substituintes de arabinose solúveis que são os produtos finais da atividade de xilanase (RÉMOND et al., 2008). Fan et al. (2009) construíram uma xilanase-arabinofuranosidase que liberou 30% mais xilose a partir das arabinoxilanas do trigo do que uma mistura de xilanases e arabinofuranosidases. Este resultado destaca a importância do sinergismo entre xilanases e arabinofuranosidases para uma hidrólise eficiente da biomassa vegetal.

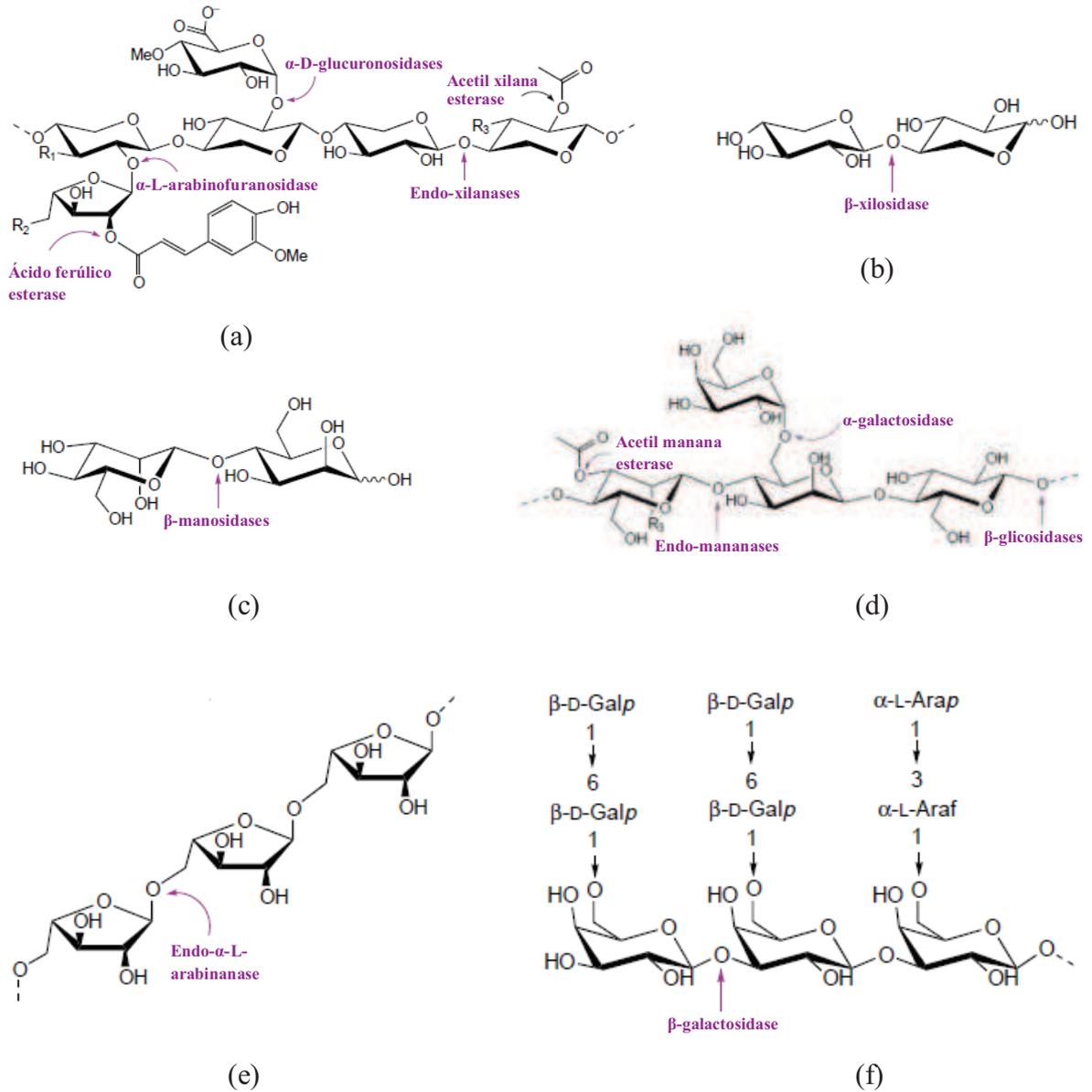
As endo-1,4-mananases hidrolisam as ligações entre as cadeias principais de mananas liberando oligômeros β -1,4-manana (Fig. 22d) que são ainda hidrolisados a manose pelas β -manosidases (Fig. 22c) (JUTURU; WU, 2013). As β -mananases são encontradas nas famílias GH 5 e 26 e a β -manosidases nas famílias GH1, 2 e 5.

As α -1,4 galactosidases (EC 3.2.1.22) clivam as ligações glicosídicas α -1,4 entre os resíduos de xilana e galactomanas liberando galactose (Fig. 22d) (BRINK; VRIES, 2011), e as β -galactosidases (EC 3.2.1.23) clivam as ligações glicosídicas β -1,4 entre os resíduos de xilana, xiloglucana e galactoglucomananas liberando galactose (Fig. 22f) (SIMS; CRAIK; BACIC, 1997). As α -galactosidases pertencem às famílias GH 27 e 36 (BRINK; VRIES, 2011) e as β -galactosidases pertencem às famílias GH 2 e 35 (SIMS, CRAIK; BACIC, 1997). As α -galactosidases GH 27 e 36 atuam via um mecanismo de deslocamento duplo e são consideradas como tendo uma origem evolutiva comum (RIGDEN, 2002). De Vries et al. (2000) preparando um coquetel enzimático, observaram um aumento na liberação de galactose da farinha de trigo quando suplementada com β -galactosidase de *A. niger*. Gamauf et al. (2007) mostraram que as β -galactosidases de *T. reesei* apresentam ampla especificidade pelo substrato como também atividade contra os polímeros de galactanas. No entanto, a maioria dos estudos sobre galactosidases estão focadas na sua atividade contra lactose (BRINK; VRIES, 2011).

A acetil-xilana-esterase é responsável por hidrolisar os substituintes *O*-acetil na posição C2 e C3 na cadeia lateral de xilana liberando ácido acético (Fig. 22a). Essas enzimas são classificadas como carboidratos esterases (CE) e pertencem as famílias GH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 e 16 (JUTURU; WU, 2013). As feruloil-xilana-esterases catalisam a hidrólise dos grupos metil éster dos ácidos hidroxicinâmicos (metil ferulato, metil sinapato, metil p-coumarato e metil cafeato) (CREPIN; FAULDS; CONNERTON, 2004) presentes na cadeia lateral de arabinose da cadeia principal de xilana liberando ácido ferúlico ou di-ferúlico (Fig. 22a) (BARTOLOMÉ et al., 1997; JUTURU; WU, 2013). Os grupos éster estão envolvidos no entrelaçamento da xilana com a lignina (SHALLOM; SHOHAM, 2003). Até o momento

todas as feruloil esterases são agrupadas na família CE1 no banco de dados CAZy (JUTURU; WU, 2013).

Figuras 22 – Componentes estruturais encontrados na hemicelulose e as hemicelulases responsáveis pela sua degradação.



Legenda: Xilana (a); Xilobiose (b); Manobiose (c); Galacto-glucomanana (d); α-1,5-L-arabinana; (e) Arabinogalactana. **Fonte:** Shallom e Shoham (2003).

Muitos CE são multi modular e frequentemente associados com um ou mais módulos de ligação dos carboidratos e/ou domínios catalíticos (BLUM et al., 2000; PAI et al.,

2010; YOSHIDA; MACKIE; CANN, 2010). No último caso, a proximidade física das esterases com outros módulos catalíticos favorece a ação sinérgica, que é claramente beneficiada com relação à desconstrução da biomassa lignocelulósica (LEVASSEUR et al., 2006). Faulds et al. (2003), demonstraram que as xilanases da família GH 11 trabalham melhor em parceria com a feruloil esterase do que com as xilanases da família GH 10, entretanto esta última é melhor para liberar ácido 5,5'-diferúlico. Quanto à acetil xilana esterases, Selig et al. (2008 e 2009) demonstraram que essas enzimas podem atuar em parceria com as celulases e/ou xilanases para alcançar a desconstrução da biomassa, especialmente em substratos tais como palha de milho, em que a acetilação das heteroxilanas é identificada como uma fonte de resistência à hidrólise apenas por xilanases. Agger, Vikso-Nielsen e Meyer (2010) investigaram a necessidade da acetil e feruloil esterases em coquetéis enzimáticos para a desconstrução de heretoxilanas em farelo de milho. De acordo com estes autores, o uso de acetil xilana esterase em farelo de milho insolúvel levou a liberação de grupos acetil, enquanto que feruloil esterase foi mais adequada para liberação de ácido ferúlico em arabinoxilana solúveis.

Além das celulases um coquetel enzimático precisa da ação sinérgica de várias endoxilanases, β -xilosidases, α -arabinofuranosidases e acetil esterases para uma hidrólise eficiente da biomassa lignocelulósica (KORMELINK et al., 1993; ALVIRA; NEGRO; BALLESTEROS, 2011; GAO et al., 2011). Uma mistura adequada de enzimas hidrolíticas também depende do método de pré-tratamento e do tipo de biomassa vegetal (ROSGAARD; PEDERSEN; MEYER, 2007; SAHA; COTTA, 2010). Assim, um melhor entendimento da degradação dos polissacarídeos das plantas podem ajudar a formular uma mistura de enzimas que possa eficientemente degradar uma vasta gama de substratos vegetais.

2.7. Aplicação das celulases e hemicelulases

As celulases e hemicelulases são aplicadas rotineiramente:

- a) Na alimentação animal (aves, suínos e ruminantes) melhorando a digestibilidade dos alimentos e, conseqüentemente, o desempenho dos ruminantes e animais monogástricos;
- b) Na indústria de polpa e papel, reduzindo a quantidade de cloro necessária para o branqueamento da polpa de celulose e, conseqüentemente, diminuindo a poluição ambiental (POLIZELI et al., 2005);

- c) Na produção de compostos biomédicos tais como, antiglicêmicos e agentes anticancerígenos;
- d) Na agricultura como, por exemplo, na germinação dos grãos de café;
- e) Na extração de óleos (VAN ZYL et al., 2010);
- f) Na indústria têxtil modificando as fibras de celulose de forma desejada e controlada sem danificar o tecido, e nas lavanderias melhorando a eficiência do sabão de modo que, pequenas fibras difusas a superfície do tecido sejam removidas e a aparência como brilho e cor melhorada (BHAT, 2000);
- g) Na formulação de vinho, vinagre e cerveja melhorando a qualidade, estabilidade, filtração, clarificação e aroma dos mesmos (GALANTE; DE CONTI; MONTEVERDI, 1998);
- h) Na produção de suco de frutas melhorando a estabilidade, textura e facilitando a concentração do néctar, além de diminuir sua viscosidade rapidamente (GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996);
- i) Na produção de probióticos;
- j) Na panificação melhorando o volume e a textura do miolo do pão (KULKARNI; SHENDYE E RAO, 1999) e;

Além dessas diferentes aplicações, as celulasas e hemicelulasas tem se destacado nos últimos anos como enzimas chave, na conversão enzimática de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, para produção de bioetanol. Assim, alguns relatos sobre a aplicação de celulasas e hemicelulasas na biorrefinaria de lignocelulose são reportados. Sukumaran et al. (2009) avaliaram a sacarificação de três diferentes tipos de biomassa (bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e aguapé) usando as enzimas celulolíticas produzidas por *T. reesei* e *A. niger*. O rendimento mais elevado de açúcar redutor (26,3 g/L) foi obtido a partir da palha de arroz seguido pelo bagaço de cana (17,79 g/L). O hidrolizado enzimático da palha de arroz foi utilizado como substrato para produção de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae*. O rendimento de etanol foi de 0,093g/g de palha de arroz. Gottschalk, Oliveira e Bon (2010) estudaram a produção de celulasas e hemicelulasas pela ação sinérgica de *T. reesei* e *A. awamori* na hidrólise do bagaço de cana. Este estudo mostrou a eficiência da mistura das enzimas produzidas pelos fungos na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado e explodido com rendimento de hidrólise de celulose e xilana de 81 e 91%, respectivamente. Sørensen et al. (2011) formularam um coquetel enzimático contendo α -L-arabinofuranosidasas de *Meripilus giganteus* (GH 51) e *H.insolens* (GH 43), β -

xilosidases de *T. reesei* e xilanases de *H.insolens* para hidrolisar vários substratos, como arabinoxilanas solúveis e insolúveis, vinhaça e palha de trigo. Os resultados obtidos utilizando uma mistura de 0,075 g de cada enzima/Kg de massa seca foram superiores ao conseguido pelas enzimas comerciais (Celluclast 1.5L e Ultraflo L), liberando açúcares xilose e arabinose nas proporções de 33-364% v/v e 12-109% v/v, respectivamente. Maeda et al. (2013) estudaram a produção de uma mistura de celulasas por *Penicillium funiculosum* e avaliaram a aplicação dessas enzimas no processo de sacarificação e fermentação simultânea para produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar. A concentração de etanol no final do processo (100g/L) correspondeu a uma eficiência de fermentação alcóolica de 78% do máximo obtido teoricamente. Os resultados experimentais conduziram a razão de 380L de etanol por tonelada de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar parcialmente deslignificado.

2.8. Produção de etanol de segunda geração

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de biomassa vegetal e isso pode ajudar a minimizar a queima de combustíveis fósseis e a produção de CO₂ na atmosfera (NAIK et al., 2010). Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa vegetal mitigam o aquecimento global, devido o CO₂ liberado na queima ser igual ao CO₂ utilizado pelas plantas durante a fotossíntese, o que, portanto, não faz aumentar o CO₂ líquido na atmosfera (STEVENS; VERHÉ, 2004).

A biomassa vegetal representa um dos mais abundantes e reutilizáveis recursos biológicos do planeta, e é vista como uma fonte promissora de biocombustíveis. No entanto, até o momento a produção de tais combustíveis não é rentável, devido a um número de obstáculos técnicos que necessitam ser superado antes do seu potencial poder ser utilizado no biorrefinamento (PAULY; KEEGSTRA, 2008). Um dos principais obstáculos para a produção econômica de bioetanol é a inacessibilidade e recalcitrância da biomassa lignocelulósica, que a torna ineficiente a degradação apenas por ação de enzimas (HORN et al., 2012). Dessa maneira, algum tipo de pré-tratamento precisa ser aplicado tanto para reduzir o grau de cristalinidade da celulose (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008), quanto para remover a lignina e assim, expor as moléculas de celulose e hemiceluloses à ação enzimática (OGEDA; PETRI, 2010). Comumente, a hidrólise da biomassa sem pré-tratamento apresenta um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que se uma etapa de pré-tratamento for utilizada o rendimento pode alcançar 90% (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Zhao et al. (2009) compararam a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento e tratado com várias concentrações de NaOH. O rendimento de hidrólise sem pré-tratamento foi de 5% enquanto que com pré-tratamento (10% NaOH) foi de até 92,0%. Buaban et al. (2010) obtiveram um rendimento de glicose e xilose de 89,2 e 77,2%, respectivamente a partir do pré-tratamento do bagaço de cana em moinho de bolas por 4h. Imam e Capareda (2012) reportaram que a eficiência de hidrólise enzimática de 89% foi alcançada a partir do pré-tratamento do sorgo sacarino com água quente e ultrassom. Benazzi et al. (2013) mostraram que o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com CO₂ aumentou a quantidade de açúcares fermentescíveis em 280% quando comparado com o bagaço não tratado, levando a uma eficiência de hidrólise (baseado na quantidade de celulose) de 74,2%.

Os pré-tratamentos físicos (moagem e trituração), físicos-químicos (explosão a vapor, auto-hidrólise, hidrotermólise), químicos (alcalino, ácido, agentes oxidantes e solventes orgânicos) e biológicos são usados na despolimerização da lignocelulose. No entanto, nem todos esses métodos são desenvolvidos o suficiente pra serem tecnicamente e economicamente viáveis para processos em grande escala (BALAT, 2011). Algumas vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são sumarizadas na Tabela 6 (KUMAR et al., 2009).

Tabela 6 – Vantagens e desvantagens de alguns processos de pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos.

Processos de pré-tratamentos	Vantagens	Limitações e desvantagens
Cominuição mecânica	Reduz a cristalinidade da celulose;	Consumo de energia geralmente maior do que a energia da biomassa inerente;
Explosão a vapor	Provoca a degradação da hemicelulose e transformação da lignina; rentável;	Destruição de uma parte da fração da xilana; rompimento incompleto da matriz de carboidrato-lignina; geração de compostos inibitórios para micro-organismos;
AFEX (<i>Amonia Fiber, Freezer Explosion</i>)	Aumenta a área de superfície acessível, remove a lignina e hemicelulose; não produz inibidores para processos “down-stream”;	Não é um processo eficiente para biomassa com alto teor de lignina;

Tabela 6 – Continuação.

Processos de pré-tratamentos	Vantagens	Limitações e desvantagens
Explosão por CO ₂	Aumenta a área de superfície acessível, custo-benefício; não forma compostos inibitórios;	Não modifica a lignina ou hemiceluloses;
Ozonólises	Reduz o conteúdo de lignina; não produz resíduos tóxicos;	Grande quantidade de ozônio requerido; caro;
Hidrólise ácida	Hidrolisa hemicelulose em xilose e outros açúcares; modifica a estrutura da lignina;	Alto custo; corrosão de equipamentos e formação de substâncias tóxicas;
Hidrólise alcalina	Remove hemiceluloses e lignina; aumenta a área de superfície acessível;	Necessários longos tempos de remoção; irre recuperáveis, os sais formados são incorporados à biomassa;
Organosolv	Hidrolisa lignina e hemiceluloses;	Os solventes devem ser drenados a partir do reator, evaporado, condensado e reciclado; custo elevado;
Pirólises	Produz gás e produtos líquidos;	Alta temperatura; produção de cinzas;
Campo elétrico pulsado	Condições ambientais; rompe células das plantas;	O processo precisa de mais pesquisas;
Biológicos	Equipamento simples degrada lignina e hemiceluloses; baixo requerimento de energia.	Rendimento de hidrólise é baixo.

Fonte: KUMAR et al. (2009).

Após o pré-tratamento, os polímeros de carboidratos dos materiais lignocelulósicos são convertidos em monômeros de açúcar (glicose, xilose, arabinose, galactose, manose) pelo processo de hidrólise (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b; BALAT; BALAT, 2009). A hidrólise de biomassa lignocelulósica pode ser realizada pela rota química ou enzimática (BALAT, 2011). A hidrólise química envolve a exposição de materiais lignocelulósicos a um produto químico por um período de tempo e a uma determinada

temperatura, e resulta em monômeros de açúcar a partir dos polímeros de celulose e hemiceluloses. Na hidrólise química o pré-tratamento e a hidrólise podem ser realizados em um único passo. Os ácidos são predominantemente aplicados na hidrólise química (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). Há dois tipos básicos de processo de hidrólise ácida: ácida diluída e ácida concentrada (BALAT, 2011). A hidrólise ácida diluída (1 a 3%) é a tecnologia mais antiga usada para converter biomassa celulósica em bioetanol (XIANG; LEE; TORGET, 2004). Este processo é conduzido em condições de temperatura (200 a 240°C) e pressão elevada e tempo de reação numa faixa de segundos ou minutos, o que facilita o processo contínuo (BADGER, 2002; XIANG; LEE; TORGET, 2004). O processo ácido diluído envolve uma solução de H₂SO₄ (1%) em um reator de fluxo contínuo e temperatura elevada. Muitos processos de ácido diluído estão limitados a uma eficiência de recuperação de açúcar de cerca de 50% (BADGER, 2002). O pré-tratamento ácido resulta em substratos reativos, quando o ácido é usado como um catalisador, assim a hidrólise ácida causa uma desidratação química dos monossacarídeos formados, de modo que os aldeídos e outros tipos de produtos de degradação são gerados (SUN; CHENG, 2002). Esta degradação pode ser evitada utilizando enzimas que favorecem em 100% a conversão seletiva da celulose em glicose (PIKE; SENGUPTA; HERTWIG, 2008). Quando a hidrólise é catalisada por tais enzimas, o processo é conhecido como hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é um processo muito lento, porque a hidrólise da celulose é dificultada pelos parâmetros estruturais do substrato, tais como o conteúdo de lignina e hemiceluloses, área de superfície, e cristalinidade da celulose (PAN; GILKES; SADDLER, 2006). O custo-utilidade da hidrólise enzimática é baixo comparado com a hidrólise ácida e alcalina, pois a hidrólise enzimática da celulose e hemiceluloses é geralmente conduzida em condições suaves de pH (4-5) e temperatura (45-50°C) não apresentando problemas de corrosão (SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007b). Além disso, vários compostos inibitórios são formados durante a hidrólise ácida e alcalina, enquanto que este problema não é tão grave para a hidrólise enzimática (FERREIRA et al., 2009). A hidrólise enzimática tem apresentado altos rendimentos (75-85%) e melhorias ainda está projetado (85-95%) até 2020, devido esse campo de pesquisa ainda ser recente (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Comparações do desempenho e das condições dos três processos de hidrólise da celulose são ilustradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação entre os desempenhos de três processos de hidrólise de celulose.

Hidrólise	Consumíveis	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento glicose	Disponível
Ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215	3 min	50-70%	Agora
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6h	90%	Agora
Enzimático	Celulases	50	1,5 dias	75-95%	Agora - 2020

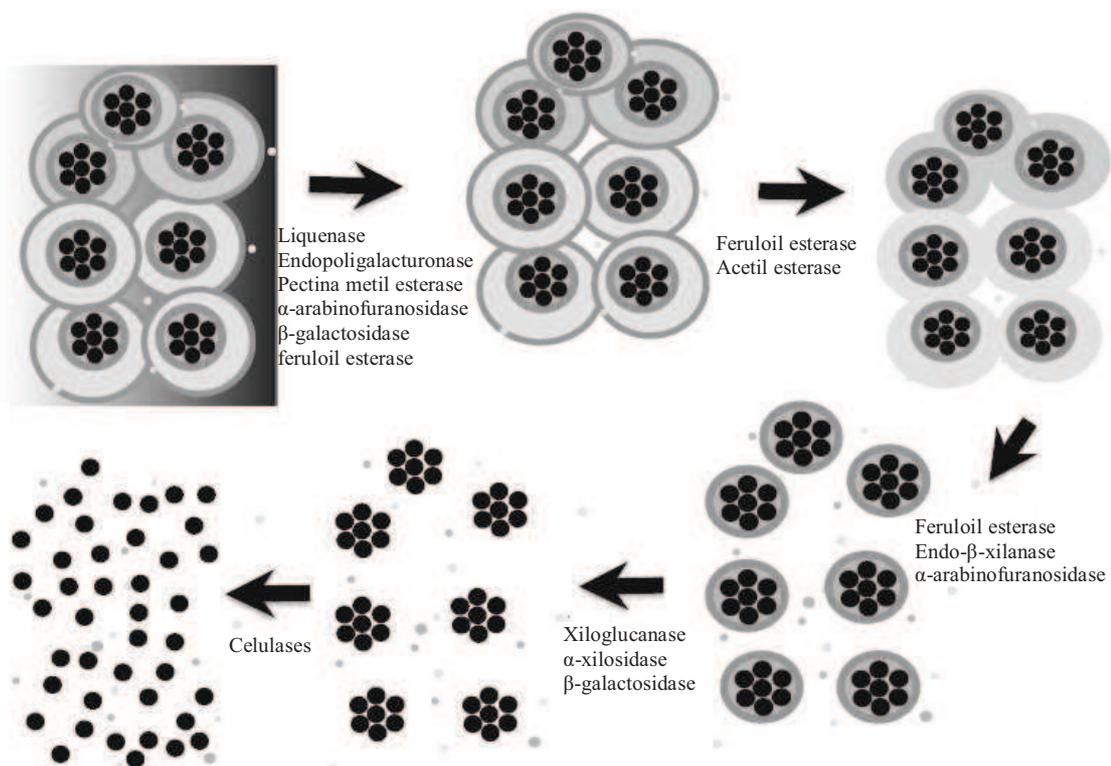
Fonte: Hamelinck, Hooijdonk e Faaij, (2005).

Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise enzimática, pesquisas tem focado na otimização dos processos de hidrólise e aumento da atividade de celulases. A taxa de hidrólise enzimática da celulose é dependente de vários aspectos estruturais da celulose. Os aspectos conhecidos que afetam a taxa de hidrólise são: 1) estrutura molecular da celulose, 2) cristalinidade da celulose, 3) área de superfície das fibras de celulose, 4) grau de intumescimento das fibras de celulose, 5) grau de polimerização e 6) associação à lignina ou outros materiais (DETROY; JULIAN, 1982).

A hidrólise enzimática envolve a utilização de várias enzimas (pectinases, celulases e hemicelulases) na degradação dos carboidratos da lignocelulose em açúcares fermentescíveis (KESHWANI; CHENG, 2009; SOUZA et al., 2012). Souza et al. (2012) propuseram um modelo de hidrólise enzimática (Fig. 23) da cana-de-açúcar. Primeiramente, a parede celular da cana-de-açúcar deve ser tratada com pectinases (endopoligalacturonase, pectina-metil-esterase, α -arabinofuranosidase, e β -galactosidase) e liquenase para hidrolisar as β -glucanas. Talvez ainda nesta etapa seja necessária a enzima feruloil esterase para liberar todos os polímeros de pectina. Depois, a parede celular remanescente, consistindo primeiramente de celulose, interligada com arabinoxilana e xiloglucana, pode ser tratada com enzimas capazes de hidrolisar não apenas as cadeias principais, mas também as cadeias laterais de ambos os polímeros. Ao mesmo tempo, feruloil e acetil-esterases podem ser usadas para quebrar as ligações ferúlicas entre hemiceluloses e remover os grupos acetil que poderiam interferir na clivagem enzimática dos polissacarídeos (SOUZA et al., 2012). Depois destes dois passos de pré-tratamento enzimático, a celulose e hemiceluloses remanescentes provavelmente torna-se acessível ao ataque enzimático e pode ser usada como substrato pelas celulases (endo- β -glucanase, celobiohidrolases e β -glicosidases) e hemicelulases (endo- β -1,4-D-xilanases, α -L-arabinofuranosidases, endo- β -1,4-D-mananases, β -manosidases, acetil xilana esterases, ácido ferúlico esterase, α -glucoronidases e α -galactosidases) (SAHA, 2003;

SOUZA et al., 2012). A ação das celulases hidrolíticas pode ser facilitada pela ação das enzimas recentemente descobertas, CBM33 e GH61 que clivam as cadeias de celulose cristalina usando um mecanismo oxidativo, que depende da presença de íons metálicos divalentes e um doador de elétrons (HORN et al., 2012). Embora o número de enzimas requeridas para a hidrólise da xilana seja maior do que para a hidrólise da celulose, a acessibilidade ao substrato de xilana pelas enzimas xilanolíticas é mais fácil, devido a não formação de estruturas cristalinas no polímero de xilana (KESHWANI; CHENG, 2009).

Figura 23 – Representação esquemática hipotética do ataque das enzimas hidrolíticas a parede celular do colmo e folha do bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: Souza et al. (2012).

Vários estudos têm reportado a conversão de biomassa lignocelulósica a açúcares pela hidrólise enzimática. Kling et al. (1987) estudaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor a 50°C e pH 4,8 usando um complexo de celulases. A sacarificação foi de 36% quando o bagaço foi pré-tratado por explosão a vapor a temperatura de 190, 200 e 210°C. Prior e Day (2008) avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com amônia a partir de preparações de

celulases, β -glicosidase e hemicelulases comerciais e xilanases de *Termomyces lanuginosus* (ATCC 34626). O rendimento da hidrólise do bagaço pré-tratado com NH_4OH e AFEX utilizando enzimas comerciais foi de 55 e 73%, respectivamente, enquanto que utilizando preparações de enzimas de *T. lanuginosus* foi de 40 e 54%, respectivamente. Da Silva et al. (2010) reportaram que um coquetel de enzimas consistindo de 15 FPU/g de celulase (Meiji Seika Co, Japão) e 0,2% (v/v) Optimash™ β -xilosidase (Genencor International, EUA) proporcionou um rendimento de hidrólise de glicose e xilose no bagaço e palha de cana-de-açúcar pré-tratado no moinho de bolas de 78,7 e 72,1% e 77,6 e 56,8%, respectivamente. O rendimento máximo de glicose e xilose para bagaço e palha de cana usando moinho de discos foram de 49,3 e 36,7% e 68,0 e 44,9%, respectivamente. Martin, Klinke e Thomsen (2007) reportaram que a preparação comercial de celulases do *T. reesei* (Celluclast 1.5L) e β -glicosidase (Novozym 188) hidrolisaram 74,9% do bagaço de cana pré-tratado alcalino. O pré-tratamento do bagaço de cana com líquido iônico mostrou uma digestibilidade de celulose e hemiceluloses de 87,01 e 64,25%, respectivamente, depois da hidrólise enzimática com uma combinação de enzimas comerciais (Spezyme CP e Novozyme 188) (QIU; AITA; WALKER, 2012).

A biomassa hidrolisada é utilizada para fermentação por vários micro-organismos. Entretanto, a utilização da lignocelulose para produção de bioetanol é dificultada pela falta de micro-organismos que fermentem eficientemente ambos os açúcares, pentoses e hexoses, a etanol (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010). Para um método comercialmente viável de produção de etanol o micro-organismo ideal deve apresentar ampla utilização do substrato, produtividade e rendimentos elevados de etanol, ter a capacidade de resistir a elevadas concentrações de etanol e temperaturas altas, ser tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado e apresentar atividade celulolítica. A engenharia de micro-organismos ou micro-organismos geneticamente modificados é usada para alcançar uma utilização completa dos açúcares no hidrolisado e melhorar os benefícios de produção (SARKAR et al., 2012).

Os processos usualmente empregados na fermentação de biomassa lignocelulósica hidrolisada são a hidrólise e fermentação separada (HFS) e sacarificação e fermentação simultânea (SFS) (SARKAR et al., 2012). Na HFS, o produto hidrolizado pode ser fermentado a etanol em um processo separado, já na SFS a hidrólise enzimática do polímero de celulose a glicose e a fermentação alcoólica pela levedura ocorrem juntas em um mesmo recipiente (IKWEBE; HARVEY, 2011; BHATIA; JOHRI; AHMAD, 2012).

Convencionalmente e tradicionalmente o processo de HFS é o mais utilizado, entretanto SFS é mais vantajosa para a produção de etanol, uma vez que pode melhorar o rendimento de etanol removendo a inibição do produto final e eliminando a necessidade de reatores separados (SARKAR et al., 2012). O processo de SFS é também mais rentável, porém a diferença das condições ideais de temperatura para a hidrólise (45-50°C) e fermentação (30°C) apresenta algumas limitações (BJERRE et al., 1996; HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; DAS NEVES et al., 2007). Um estudo comparativo entre os dois processos é apresentado na Tabela 8.

Martín et al. (2002) avaliaram a produção de etanol a partir da HFS utilizando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e levedura recombinante que utiliza xilose *Saccharomyces cerevisiae*. A concentração máxima de etanol obtida foi de 11,9 g/L. Buaban et al. (2010) compararam a produção de etanol por HFS e SFS do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado no moinho de bolas. O rendimento final de etanol em HFS e SFS foi de 8,4 e 8,0 g/L, respectivamente utilizando a levedura *Pichia stipitis* na fermentação alcoólica. Rudolf et al. (2008) avaliaram a produção de etanol a partir da SFS do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor usando duas linhagens de levedura, uma recombinante que utiliza xilose (*S. cerevisiae*) e outra não-recombinante (*P. stipitis*). A *S. cerevisiae* consumiu toda a glicose e grande parte da xilose em SFS. A fermentação não ocorreu por *P. stipitis* em pH 5,0. No entanto, em pH 6,0 a glicose foi consumida e a conversão da xilose elevada (> 70%). Nessas condições a concentração final de etanol por *S. cerevisiae* e *P. stipitis* foi de 26,7 e 19,5g/L, respectivamente. Dos Santos et al. (2010) propuseram um design experimental estatístico para otimizar as condições de SFS. Em condições otimizadas, a concentração máxima de etanol foi 60g/L utilizando a linhagem de bactéria *Zymomonas mobilis*.

Tabela 8 – Comparação entre as técnicas de sacarificação e fermentação simultânea e sacarificação e fermentação separada.

Processo fermentativo	Aspecto e vantagens	Limitações	Referências
Sacarificação e fermentação simultânea	<p>Maiores rendimentos de etanol, devido à remoção imediata da glicose, que é o produto de inibição no passo de sacarificação;</p> <p>Menor requerimento de enzima;</p> <p>Maiores rendimentos de produtos;</p> <p>Baixo custo;</p> <p>Menor tempo de processo</p> <p>Redução no número de reatores necessários.</p>	<p>A temperatura ótima de hidrólise (50°C) e fermentação (35°C) é diferente.</p> <p>A levedura não pode ser reutilizada</p>	<p>Hari Krishna, Janardhan Reddy e Chowdary, (2001); Sun e Cheng, (2002).</p> <p>Olofsson, Bertilsson e Liden, (2008)</p>
Sacarificação e fermentação separada	<p>Cada passo pode ser processado nas condições ótimas de hidrólise e fermentação;</p> <p>As etapas separadas minimizam as interações entre as etapas.</p>	<p>Inibição do produto final minimiza o rendimento de etanol.</p> <p>Possibilidade de contaminação, devido a longos períodos de processo.</p>	<p>Das Neves et al., (2007); Balat, Balat e Öz, (2008); Sánchez e Cardona, (2008)</p>

Além da HFS e SFS, há a sacarificação simultânea e cofermentação (SSCF) e o Bioprocesso Consolidado (BPC). Na SSCF os micro-organismos têm que serem capazes de fermentar ambos os açúcares, hexoses e pentoses e serem compatíveis, em termos operacionais de pH e temperatura (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; CHANDRAKANT; BISARIA, 1998). Além do mais, problemas relacionados com a baixa taxa de crescimento de leveduras que fermentam pentoses, em comparação com leveduras que fermentam hexoses podem resultar em uma conversão mais elevada de hexoses do que de pentoses a etanol. Assim, uma variante da cofermentação, consistindo de um único micro-organismo capaz de assimilar ambas as pentoses e hexoses, parece ser uma integração

alternativa promissora. A utilização de leveduras ou bactérias geneticamente modificadas neste processo pode resultar em conversão e rendimento de etanol mais elevado, uma vez que todos os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica são utilizados. Os micro-organismos mais comumente modificados para este fim são as leveduras *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* e a bactéria etanológena *E. coli* (MANZANARES, 2010). Krishnan et al. (2010) investigaram o perfil de cofermentação etanólica da glicose e xilose derivada dos hidrolizados de bagaço e da folha da cana-de-açúcar pré-tratado com AFEX usando a levedura *S. cerevisiae*. A produção de etanol foi de 34-36 g/L de etanol com 92% de rendimento teórico. Nieves et al. (2011) estudaram a sacarificação simultânea e cofermentação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido fosfórico usando a bactéria etanológena *E. coli*. A glicose e celobiose foram rapidamente metabolizadas pela bactéria. A utilização da xilose foi melhorada com metabissulfito de sódio. O rendimento total de etanol pelo processo de SSCF foi de 250L de etanol/tonelada de bagaço seco.

Finalmente, o BPC também conhecido como conversão microbiana direta (CMD) em que a produção de celulasas, hidrólise da celulose/hemiceluloses e fermentação dos açúcares de 5 e 6C ocorre em um único passo usando apenas uma comunidade microbiana (Fig. 24) (MANZANARES, 2010; BHATIA; JOHRI; AHMAD, 2012). No BPC as linhagens microbianas são elevadamente engenheiradas e capazes de hidrolizar a biomassa com enzimas produzidas por si próprias e produzir elevados títulos de etanol (HASUNUMA; KONDO, 2012). Esse processo fornece menor custo de conversão biológica de biomassa celulósica em combustíveis e eficiência mais elevada do que os processos retratados anteriormente (HFS, SFS e SSCF) (LYND et al., 2005).

Figura 24 – Um esquema de produção de etanol direta a partir de biomassa lignocelulósica com linhagens de leveduras recombinantes produtoras de celulasas por BPC e suas vantagens



Vantagens do BPC:

- Redução do capital de investimentos;
- Eliminação de utilitários associado com a produção de enzimas;
- Redução de recipientes para sacarificação e fermentação;
- Redução de substâncias e matéria prima para reações;
- Processo operacional simplificado;
- Redução dos riscos de contaminação pela redução da glicose e produção de etanol;
- Melhoramento da eficiência da hidrólise por suavizar o produto de inibição das celulasas.

Fonte: Adaptado de Hasunuma e Kondo (2012).

Lin et al. (2010) estudaram a linhagem *Klebsiella oxytoca* na conversão direta do capim elefante (*Pennisetum Alopecoider* ou *Napiergrass*) a etanol e obtiveram um rendimento de 82g de etanol/Kg de capim. Anasontzis et al. (2011) com o intuito de aumentar a produtividade de etanol durante o BPC de materiais lignocelulósicos pelo *Fusarium oxysporum*, realizaram a superexpressão homóloga constitutiva de uma das principais enzimas chave no processo, ou seja, uma endo-xilanase. Doze transformantes de *F. oxysporum* foram obtidos a partir da superexpressão homóloga e dois foram selecionados para estudos mais aprofundados, devido sua elevada atividade de xilanase extracelular sob condições normalmente reprimidas (glicose como única fonte de carbono). O desempenho fermentativo dos transformantes foi comparado com o tipo selvagem em sistemas simples de BPC usando sabugo de milho e farelo de trigo como únicas fontes de carbono. Ambos transformantes produziram cerca de 60% mais etanol comparado com o tipo selvagem. Jin et al. (2011) avaliaram o desempenho de *Clostridium phytofermentans* em BPC para produção

de etanol usando palha de milho pré-tratada com AFEX. As condições de fermentação incluindo temperatura, tamanho do inóculo, nutrientes e pH inicial foram investigadas. Em condições otimizadas, uma conversão de glucana e xilana de 76 e 88,6%, respectivamente, foram alcançadas em 10 dias com um rendimento de etanol de 2,8 g/L. Sakamoto et al. (2012) construíram uma *S. cerevisiae* que não apenas hidrolisou hemiceluloses, mas que também assimilou xilose. A levedura recombinante produziu etanol com sucesso a partir do hidrolisado de palha de arroz sem exigir a adição de enzimas hidrolíticas. O rendimento de etanol foi de 0,41g de etanol/g de açúcares totais de palha de arroz hidrolisada, o que corresponde a 82% do rendimento teórico. Maehara et al. (2013) avaliaram a seletividade de açúcar e a capacidade de produção de etanol por *F. velutipes* a partir de concentrações elevadas de substrato requeridas para produção de etanol por BPC. *F. velutipes* produziu aproximadamente 40-60g/L de etanol a partir de 15% (m/v) de *D*-glucose, *D*-fructose, *D*-manose, sacarose, maltose, celobiose, com a maior taxa de conversão de 83% observada utilizando celobiose como fonte de carbono. Maehara et al. (2013) também tentaram a fermentação direta da celulose do bagaço de cana-de-açúcar por *F. velutipes* a etanol, entretanto uma pequena quantidade de enzima comercial (9mg/g) foi necessária para uma taxa de conversão de etanol de 69,6%. Assim, com o melhor de nosso conhecimento, até a presente data não foi encontrado na literatura nenhum relato de BPC para produção de etanol usando apenas bagaço de cana-de-açúcar como material lignocelulósico.

A produção de etanol celulósico já começou em algumas partes do mundo, no entanto pesquisas ainda são necessárias para tornar este processo viável economicamente. A redução dos custos de produção de etanol celulósico depende de pré-tratamentos mais eficientes da biomassa, melhoria da atividade específica e produtividade das celulasas, melhoria dos micro-organismos recombinantes para maior assimilação dos açúcares liberados durante o processo de pré-tratamento e de hidrólise, e desenvolvimento de sistemas de cogeração. Neste contexto, a engenharia genética e metabólica, bem como engenharia de bioprocessos são certamente tecnologias que implicam em uma melhoria qualitativa a produção industrial de etanol celulósico no futuro.

2.9. Referências

- ABDESHAHIAN, P. et al. Solid substrate fermentation for cellulase production using palm kernel cake as a renewable lignocellulosic source in packed-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 2, p. 238-244, 2011.
- ACCENSI, F. et al. Distribution of Ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, n. 3-4, p. 365-370, 2001.
- AGGER, J.; VIKSO-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.
- AIKAT, K.; BHATTACHARYYA, B. C. Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 907-914, 2000.
- AKINYELE, B. J.; OLANIYI, O. O.; AROTUPIN, D. J. Bioconversion of selected agricultural wastes and associated enzymes by *Volvarelliella volvacea*: An edible mushroom. **Research Journal Microbiology**, v. 6, p. 63-70, 2011.
- ALI, H. K. Q.; ZULKALI, M. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 25, n. 2, p. 255-266, 2011.
- ALVIRA, P.; NEGRO, M.; BALLESTEROS, M. Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. **Bioresource technology**, v. 102, n. 6, p. 4552-4558, 2011.
- AMORE, A.; FARACO, V. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3286-3301, 2012.
- ANASONTZIS, G. E. et al. Homologous overexpression of xylanase in *Fusarium oxysporum* increases ethanol productivity during consolidated bioprocessing (CBP) of lignocellulosics. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 1-2, p. 16-23, 2011.
- ANDRIC, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.

ANTOINE, C. et al. Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. **Science Alimentar**, v. 22, p. 545-556, 2002.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 2011.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

ASSAMOI, A. A. et al. Solid-state fermentation of xylanase from *Penicillium canescens* 10-10c in a multi-layer-packed bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 145, n. 1-3, p. 87-98, 2008.

AWAFO, V. A.; CHAHAL, D. S.; SIMPSON, B. K. Evaluation of combination treatments of sodium hydroxide and steam explosion for the production of cellulase-systems by two *T. reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 235-245, 2000.

BADGER, P. Ethanol from cellulose: A general review. Trends in new crops and new uses, p. 17-21, 2002.

BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.

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.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

- BANSAL, N. et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v. 32, n. 7, p. 1341-1346, 2012.
- BARBOSA, L. C. A. et al. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). **Química Nova**, v. 31, p. 2035-2041, 2008.
- BARTOLOMÉ, B. et al. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa esterase (XylD) release a 5-5' ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 208-12, 1997.
- BASTOS, A. E. R. et al. Phenol metabolism by two microorganisms isolated from Amazonian forest soil samples. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 403-409, 2000.
- BEAUGRAND, J. et al. Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2529-2540, 2004.
- BECHTEL, D. B. et al. Development, Structure, and Mechanical Properties of the Wheat Grain. In: **Wheat: Chemistry and Technology**. AACC International, p.51-95, 2009.
- BENAZZI, T. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4-5, p. 247-250, 2013.
- BETINI, J. H. A. et al. Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 6, p. 819-824, 2009.
- BHANJA, T. et al. Comparative profiles of alpha-amylase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 5, p. 369-376, 2007.
- BHAT, M.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology advances**, v. 15, n. 3, p. 583-620, 1997.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 65, 2012.

BHATTI, H. N. et al. Optimization of Media for Enhanced Glucoamylase Production in Solid-State Fermentation by *Fusarium solani* original scientific paper, v. 45, n. 1, p. 51-56, 2007.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: BLÜCHER, E. (Ed.). **Biociencia industrial**. São Paulo, cap. 2, p. 247-276, 2001.

BIELY, P. et al. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151-166, 1997.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials - substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p. 90-104, 1981.

BJERRE, A. B. et al. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 5, p. 568-577, 1996.

BLANDINO, A. et al. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 164-169, 2002.

BLUMENTHAL, C. 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.

BLUM, D. L. et al. Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1346-1351, 2000.

BOCCHINI-MARTINS, D. A. et al. Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. **Integrated Waste Management**, v. 2, 2011.

BONINI, C. et al. Characterization and degradation of lignin from steam explosion of pine and corn stalk of lignin: The role of superoxide ion and ozone. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 182-188, 2008.

BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, n. Pt 3, p. 769, 2004.

BOTELLA, C. et al. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, 2005.

BRENNAN, M.; HARRIS, P. J. Distribution of fucosylated xyloglucans among the walls of different cell types in monocotyledons determined by immunofluorescence microscopy. **Molecular plant**, v. 4, n. 1, p. 144-156, 2011.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.; VADLANI, P. 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.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P. V. Cellulolytic Enzymes Production via Solid-State Fermentation: Effect of Pretreatment Methods on Physicochemical Characteristics of Substrate. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 10, 2011.

BRINK, J.; VRIES, R. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, 2011.

BUABAN, B. et al. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 18-25, 2010.

BURI, R. C.; REDING, W.; GAVIN, M. H. Description and characterization of wheat aleurone. **Cereal foods world**, v. 49, n. 5, p. 274-278, 2004.

BURTON, R.; GIDLEY, M.; FINCHER, G. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, 2010.

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.

CANTAREL, B. L. et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-D238, 2009.

CAO, Y. et al. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 5, 2008.

CARRARD, G. et al. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10342-10347, 2000.

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.

CAVALCANTE, R. et al. Effect of Moisture on Trichoderma Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 100-104, 2008.

CENCIANI, K. Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 103, 2007.

CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 907-916, 2009.

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, 2009.

CHANDEL, A. K. et al. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 295-331, 1998.

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

CHAPIN, F. S.; MATSON, P. A.; MOONEY, H. A. **Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology**. 2nd. New York, USA: Springer-Verlag, p. 436, 2002.

CHAPLA, D. et al. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 361-369, 2010.

CHEN, F.; DIXON, R. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnololy**, v. 25, n. 7, p. 759-761, 2007.

CHONG, S. L. et al. The α -glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1323-1332, 2011.

CHRISTOV, L. P.; SZAKACS, G.; BALAKRISHNAN, H. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. v. 34, p. 511-517, 1999.

COLEMAN, D. C. Through a ped darkly: an ecological assessment of root-soil-microbial-faunal interactions. **Special publications series of the British Ecological Society**, n. 4, p. 1-21, 1985.

CONAB, Comphania Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Brasília: EQUIPE DA BIBLIOTECA DA CONAB. p. 4-18, 2012.

_____. Acompanhamento de safra brasileira: grãos. Brasília: p. 2-29, 2013.

COSTA, S. M. et al. Use of sugar cane straw as a source of cellulose for textile fiber production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 0, p. 189-194, 2013.

COURI, S. et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

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.

CREPIN, V.; FAULDS, C.; CONNERTON, I. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 647-652, 2004.

DA SILVA, A. S. A. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402-7409, 2010.

DALLA SANTA, H. S. et al. Conidia production of *Beauveria* sp by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. **Folia Microbiologica**, v. 49, n. 4, p. 418-422, 2004.

DAS NEVES, M. A. et al. State of the art and future trends of bioethanol production. **Dynamic Biochemistry Process Biotechnology Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2007.

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

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N., JR. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-208, 2010.

DE VRIES, R. P. et al. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 4, p. 401-410, 2000.

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.

DEBECHE, T. et al. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1734-1736, 2000.

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

DELCOUR, J. A.; ROSENEY, R. C. Structure of Cereals. In: **Principles of cereal science and technology**. Manhattan, Kansas, U.S.A: R&R Research Services: p. 1-22, 2010.

DESCHAMPS, F.; HUET, M. C. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 177-180, 1985.

DESHPANDE, S. et al. Production of cellulases and xylanases by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eihornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, p. 449-456, 2008.

DETROY, R. W.; ST JULIAN, G. Biomass conversion: fermentation chemicals and fuels. **Critical reviews in microbiology**, v. 10, n. 3, p. 203-228, 1982.

DEVI, N. B.; YADAVA, P. S. Seasonal dynamics in soil microbial biomass C, N and P in a mixed-oak forest ecosystem of Manipur, North-east India. **Applied Soil Ecology**, v. 31, n. 3, p. 220-227, 2006.

DHILLON, G. S. et al. Improved xylanase production using apple pomace waste by *Aspergillus niger* in koji fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 2, p. 198-208, 2012.

_____. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

DÍAZ, A. B. et al. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. C1, p. 72-78, 2012.

DÍAZ, A.; DE ORY, I.; BLANDINO, A. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. **Chemical Engineering**, v. 17, p. 1041, 2009.

DICK-PEREZ, M. et al. Multidimensional solid-state NMR studies of the structure and dynamics of pectic polysaccharides in uniformly C-13-labeled Arabidopsis primary cell walls. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 539-550, 2012.

_____. Structure and Interactions of Plant Cell-Wall Polysaccharides by Two- and Three-Dimensional Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. **Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 989-1000, 2011.

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2009.

DOS SANTOS, D. D. S. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 93-105, 2010.

DOS SANTOS, T. C. et al. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1299-1304, 2012.

DUMON, C. et al. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 346-357, 2012.

DUPONT, L. et al. Metal ions binding onto a lignocellulosic substrate extracted from wheat bran: a NICA–Donnan approach. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, n. 1, p. 35-41, 2003.

DURAN, N. et al. Amazonian lignocellulosic materials - Screening of xylanolytic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 155-162, 1995.

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

EIJSINK, V. G. et al. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 228-235, 2008.

EL-BENDARY, M. A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 158-170, 2006.

ELLALIAH, P. et al. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 615-620, 2002.

FADEL, M. Production physiology of cellulases and β -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. **Online Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 401-411, 2000.

FALKOSKI, D. L. et al. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.

FALONY, G. et al. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240, 2006.

FAN, Z. et al. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1754-1757, 2009.

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.

FARZANA, K. et al. Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 18, p. 55-57, 2005.

FAULDS, C. B. et al. Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 3, p. 281-288, 2003.

FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaritii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 2, p. 335-339, 1999.

- FERREIRA, S. M. et al. Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 8-9, 2009.
- FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65-76, 2010.
- FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- FOREMAN, P. K. et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31988-31997, 2003.
- FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1434-1440, 2011.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Neopetromyces* gen. Nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. **Studies in Mycology (Baarn)**, v. 45, p. 201-207, 2000.
- GALANTE, Y.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G.F.; KUBICEK, C.P. In: **Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, v. 2, p. 327-342, 1998.
- 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.
- GAO, D. et al. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, n. 5, 2011.
- GARCIA MEDEIROS, R.; HANADA, R.; FILHO, E. X. F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 2, p. 97-100, 2003.

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 511-519, 1999.

GEISER, D. M. et al. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 3, p. 169-179, 2000.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 85-101, 2003.

GEYSENS, S. et al. Cloning and characterization of the glucosidase II alpha subunit gene of *Trichoderma reesei*: a frameshift mutation results in the aberrant glycosylation profile of the hypercellulolytic strain Rut-C30. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2910-2924, 2005.

GHILDYAL, N. P. et al. Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors — Effect on yields and productivities. **Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 1-2, p. 67-72, 1992.

GIET, J.-M.; ROISEUX, O.; BLECKER, C. Enzymatic process development for the extraction of ferulic from wheat bran. **Biotechnology Agronomy and Society and Environment**, v. 14, n. 2, p. 539, 2010.

GLASER, B.; BIRK, J. J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 82, n. 0, p. 39-51, 2012.

GOMATHI, D. et al. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S67-S73, 2012.

GOMES, I. et al. Comparative Studies on Production of Cell Wall-Degrading Hydrolases by *Trichoderma reesei* and *T. viride* in Submerged and Solid-State Cultivations. 2008.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GRAMINHA, E. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. W. Industrial Enzymology. GODFREY, T. e WEST, S. UK: Macmillan: p. 226-234, 1996.

GUOWEIA, S. et al. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 357-361, 2011.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 45-47, 1998.

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.

HARDIN, M. T.; HOWES, T.; MITCHELL, D. A. Residence time distributions of gas flowing through rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 2, p. 145-153, 2001.

HARI KRISHNA, S.; JANARDHAN REDDY, T.; CHOWDARY, G. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource technology**, v. 77, n. 2, p. 193-196, 2001.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: **Structure and Function of a Large, Enigmatic Family**. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, 2010.

HARTLEY, B. S.; SHAMA, G. NOVEL ETHANOL FERMENTATIONS FROM SUGARCANE AND STRAW. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 555-568, 1987.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1287-1294, 2012.

HEMERY, Y. et al. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 327-347, 2007.

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

HERCULANO, P. N. et al. Cellulase Production by *Aspergillus japonicus* URM5620 Using Waste from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) Under Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 1057-1067, 2011.

HESPELL, R. B. et al. Hydrolysis by commercial enzyme mixtures of AFEX-treated corn fiber and isolated xylans'. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 87-97, 1997.

HILLE, J. D. R.; SCHOONEVELD-BERGMANS, M. E. F. Hemicellulases and their synergism in breadmaking. **Cereal foods world**, v. 49, n. 5, p. 283-286, 2004.

HOLKER, U.; HOFER, 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.

HOLKER, 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. J. et al. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18089-18094, 2006.

_____. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

HOSENEY, R. Principles of cereal science and technology. St. Paul, Minnesota, USA American Association of Cereal Chemists, 1986.

HUI, L. et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556-7562, 2010.

IKWEBE, J.; HARVEY, A. P. Intensification of bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) in an oscillatory baffled reactor (OBR). Sweden: **Bioenergy technology**, v.1: 381-388 p. 2011.

IMAM, T.; CAPAREDA, S. Ultrasonic and high-temperature pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of lignocellulosic sweet sorghum to bio-ethanol. **International Journal of Ambient Energy**, v. 33, n. 3, 2012.

JABASINGH, S. A. Response Surface Methodology for the Evaluation and Comparison of Cellulase Production by *Aspergillus nidulans* SU04 and *Aspergillus nidulans* MTCC344 Cultivated on Pretreated Sugarcane Bagasse. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 25, n. 4, p. 501-511, 2011.

JABASINGH, S. A.; NACHIYAR, C. V. Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1564-1571, 2011.

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.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2000.

JIN, M. et al. Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium* phytofermentans on AFEX-treated corn stover for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1290-1297, 2011.

JIN, N. et al. Thermophilic xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2387-2394, 2012.

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.

KALOGERIS, E. et al. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003.

KAMAL-ELDIN, A. et al. Physical, microscopic and chemical characterisation of industrial rye and wheat brans from the Nordic countries. **Food & Nutrition Research**, v. 53, p. 1-11, 2009.

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

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 173-177, 1999.

KAR, S. et al. Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2013.

KAVYA, V.; PADMAVATHI, T. Optimization of Growth Conditions for Xylanase Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 125-130, 2009.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1515-1523, 2009.

KLEMAN-LEYER, K. M. et al. The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 8, p. 2883–2887, 1996.

KLING, S. H. et al. Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse by steam explosion pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 8, p. 1035-1039, 1987.

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389-407, 2010.

KORMELINK, F. J. M. et al. Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. **Carbohydrate Research**, v. 249, n. 2, p. 355-367, 1993.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 61-70, 2012.

KRANTHI, V. S.; MURALIDHAR RAO, D.; JAGANMOHAN, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 1, p. 12-15, 2012.

KRIEGER, N.; NETO, D.; MITCHELL, D. Production of Microbial Biosurfactants by Solid-State Cultivation. In: SEN, R. (Ed.). *Biosurfactants: Springer New York, (Advances in Experimental Medicine and Biology)*, v. 672, cap. 15, p.203-210, 2010.

KRISHNAN, C. et al. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 441-450, 2010.

KUHLS, K. et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 15, p. 7755-7760, Jul 23 1996.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, P. P.; BROEKHUIZEN, K.; ABBATT, J. Organic acids as cloud condensation nuclei: Laboratory studies of highly soluble and insoluble species. **Atmospheric Chemistry Physics**, v. 3, n. 3, p. 509-520, 2003.

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

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203-4213, 2009a.

_____. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology progress**, v. 25, n. 2, p. 302-314, 2009b.

KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1289-1298, 2011.

LABAT, G. A. A.; GONÇALVES, A. R. Oxidation in acid medium of lignins from agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n.1-3, p. 151-161, 2008.

LARA-MÁRQUEZ, A. et al. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 5, p. 859-868, 2011.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3634-3637, 2007.

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.

LEE, C. K.; DARAH, I.; IBRAHIM, C. O. Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. **Biotechnology Research International**, 2011.

LEE, D. et al. **Composition of herbaceous biomass feedstocks**. South Dakota State University Publication, 2007.

LEE, R. C. et al. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with alpha-L-arabinofuranosidase and beta-D-xylosidase activity - Characterization, primary structures, and COOH-terminal processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 5377-5387, 2003.

LEHTIO, J. et al. The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 484-489, 2003.

LEMOS, J. L. S.; FONTES, M. C. D.; PEREIRA, N. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-3, p. 681-689, 2001.

LEVASSEUR, A. et al. Production of a chimeric enzyme tool associating the *Trichoderma reesei* swollenin with the *Aspergillus niger* feruloyl esterase A for release of ferulic acid. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 872-880, 2006.

LI, Y.; GONZÁLEZ, G. Soil Fungi and Macrofauna in the Neotropics. In: **Post-Agricultural Succession in the Neotropics**: Springer New York, p.93-114, 2008.

LIN, C.-W. et al. Response surface optimization for ethanol production from *Pennisetum Alopecoider* by *Klebsiella oxytoca* THLC0409. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1922-1929, 2010.

LINDER, M.; TEERI, T. T. The roles and function of cellulose-binding domains. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 15-28, 1997.

LIO, J.; WANG, T. Solid-State Fermentation of Soybean and Corn Processing Coproducts for Potential Feed Improvement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7702-7709, 2012.

LIU, D. Y. et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717-725, 2011.

LONSANE, B. K. et al. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 259-273, 1992.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-77, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

LYND, L. R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577, 2005.

MACFADYEN, A. The contribution of the micro fauna to total soil metabolism. In: **Soil Organisms**, Amsterdam: J. North Holland, p. 3-15, 1963.

MACIEL, G. M. et al. Study of Some Parameters which Affect Xylanase Production: Strain Selection, Enzyme Extraction Optimization, and Influence of Drying Conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 748-755, 2009.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 22, 2012.

MAEDA, R. N. et al. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013.

MAEHARA, T. et al. Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. **Fungal Biology**, v. 117, n. 3, p. 220-226, 2013.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAI, V.; WIEGEL, J.; LORENZ, W. W. Cloning, sequencing, and characterization of the bifunctional xylosidase–arabinosidase from the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Gene**, v. 247, n. 1–2, p. 137-143, 2000.

MALATHI, S.; CHAKRABORTI, R. Productions of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 712-716, 1991.

MALILAS, W. et al. Lipase from *Penicillium camembertii* KCCM 11268: Optimization of solid state fermentation and application to biodiesel production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 405-412, 2013.

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.

MANZANARES, P. Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. In: **Bioalcohol production - biochemical conversion of lignocellulosic biomass**. Woodhead publishing, Cambridge, UK, n. 8, p. 205-226, 2010.

MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W. J. Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 23, p. 257-263, 1999.

MARGEOT, A. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MARKOV, A. V. et al. New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry-Moscow**, v. 70, n. 6, p. 657-663, 2005.

MARTÍN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 274-282, 2002.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 426-432, 2007.

MASANGKAY, R. F. et al. Solid substrate production of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae* conidia. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 385-397, 2000.

MATEO ANSON, N. et al. Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6148-6155, 2009.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 565-570, 2005.

MAURYA, D. P. et al. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, n. 1, p. 5-8, 2012.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6718-6727, 2010.

MEDEIROS, A. B. et al. Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 47-51, 2006.

MEDEIROS, A. P. et al. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 767-771, 2001.

MEKALA, N. et al. Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2-3, p. 122-131, 2008.

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, 2012.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for Biomass utilization. **Biofuels**, v. 108, p. 95-120, 2007.

MITCHELL, D.; VON MEIEN, O. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 2, p. 127-135, 2000.

MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, 2000.

_____. General principles of reactor design and operation for SSC. In: **Solid Substrate Cultivation**: Elsevier Applied Science, p.115-139, 1992.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 137-147, 2003.

MONRO, J. A.; BAILEY, R. W.; PENNY, D. Polysaccharide composition in relation to extensibility and possible peptide linked arabino-galactan of lupin hypocotyl cell walls. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1597-1602, 1972.

MONTENECOURT, B. S.; EVELEIGH, D. E. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 777-782, 1977.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 1119-1127, 2011.

MUZARD, M. et al. Evaluation of the transglycosylation activities of a GH 39 β -d-xylosidase for the synthesis of xylose-based glycosides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1-4, p. 1-5, 2009.

NAGEL, F. J. J. et al. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 219-230, 2001.

NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

NAIR, P. K. R. The Nature and Properties of Soils, 13th Edition. By N. C. Brady and R. R. Weil. **Agroforestry Systems**, v. 54, n. 3, p. 249-249, 2002.

NARRA, M. et al. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 355-361, 2012.

NCUBE, T. et al. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 118-123, 2012.

NEAGU, D et al. *Trichoderma Reesei* Cellulase Produced by Submerged Versus Solid State Fermentations. **Bulletin UASVM Agriculture**, v. 69, n. 2, p. 320-326, 2012.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 257-261, 2006.

NIEVES, I. et al. Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5145-5152, 2011.

NUMAN, M.; BHOSLE, N. α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.

OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2001.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLEMPSKA-BEER, Z. S. et al. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 144-158, 2006.

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

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

OOIJKAAS, L. P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R. M. Biomass Estimation of *Coniothyrium Minitans* in Solid-State Fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 480-486, 1998.

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

OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. OTA. **Technologies to maintain biological diversity**. Congress of U.S. Washington, DC: Government Printing Office, 1987.

OU, S. et al. Production of Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation on Different Carbon Sources. **Enzyme Research**, 2011.

OUYANG, J. et al. A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 11, p. 1266-1274, 2006.

PAES, L. A. D.; OLIVEIRA, M. A. Potential trash biomass of the sugar cane plant. In: HASSUANI, S. J.; LEAL, M. L. R. V., *et al* (Ed.). Biomass Power Generation. Sugarcane Bagasse and Trash. 1st. Piracicaba, Brazil: PNUD and CTC, p.19, 2005..

PAI, C.-K. *et al*. Molecular cloning and characterization of a bifunctional xylanolytic enzyme from *Neocallimastix patriciarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1451-1462, 2010.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7563-7569, 2010.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, p. 169, 2003.

PALMAROLA-ADRADOS, B. *et al*. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 843-850, 2005.

PAN, X.; GILKES, N.; SADDLER, J. N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Holzforschung**, v. 60, n. 4, p. 398-401, 2006.

PANAGIOTOU, G.; GRANOUILLET, P.; OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1117-1124, 2006.

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

_____. 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.; SOCCOL, C. R. Bioconversion of biomass: A case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, n. 4, p. 379-389, 1998.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

_____. Solid-state fermentation in biotechnology. New Delhi: Asiatech Publishers Inc 2001.
PANDYA, J. J.; GUPTA, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 5, p. 769-779, 2012.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S. E.; FILER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3-4, p. 397-402, 1999.

PARK, Y. S. et al. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 761-766, 2002.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. Soil microbiology and biochemistry. San Diego, Ca, USA: **Academic Press**: 2nd edition. p. 563-566, 1996.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 559-568, 2008.

PAYNE, C. M. et al. Decrystallization of Oligosaccharides from the Cellulose I beta Surface with Molecular Simulation. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 2, n. 13, p. 1546-1550, 2011.

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

PHRUEKSAWAN, P. et al. Direct fermentation of l(+)-lactic acid from cassava pulp by solid state culture of *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1429-1436, 2012.

PIKE, P.; SENGUPTA, D.; HERTWIG, T. Integrating biomass feedstocks into chemical production complexes using new and existing processes. **Minerals Processing Research Institute**, Louisiana State University, Baton Rouge, LA. v. 3, 2008.

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, p. 465-471, 2013.

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

POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 176-191, 2010.

PRIOR, B. A.; DAY, D. F. Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, β -glucosidase, and hemicellulase preparations. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**: Springer, p.271-284, 2008.

PRÉVOT, V. et al. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, n. 0, p. 690-693, 2013.

QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 251-256, 2012.

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

RAGAUSKAS, A. J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 127-135, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Electron J Biotechnol**, v. 1, p. 21-32, 1998.

RAIMBAULT, M.; GERMON, J. Procédés d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides. patent n° 76.06.677, 1976.

RAZA, F. et al. Solid state fermentation for the production of β -glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 75-83, 2011.

RAJESH, M. J.; RAJESH, L.; ABACHIRE, L. W. Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma Reesei* European Journal of Applied Engineering and Scientific Research, v. 1, n. 4, p. 196-200, 2012.

REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 4, p. 485-497, 1950.

RÉMOND, C. et al. Action of a GH 51 α -l-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 424-430, 2008.

RIGDEN, D. Iterative database searches demonstrate that glycoside hydrolase families 27, 31, 36 and 66 share a common evolutionary origin with family 13. **FEBS Letters**, v. 523, n. 1-3, p. 17-22, 2002.

RIVELA, I.; COUTO, S. R.; SANROMAN, A. Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 18, p. 1443-1447, 2000.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 284-289, 2001.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food and Bioprocess Processing**, v. 88, n. 1, p. 61-66, 2010.

RODRIGUES, R. C. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.

RODRÍGUEZ COUTO, S. et al. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, D. E. et al. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10657-10662, 2011.

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

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.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Editora Manole, p. 1-126, 1991.

ROSGAARD, L. et al. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1270-1276, 2007.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 143, n. 3, p. 284-296, 2007.

ROSSI, S. et al. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 484-486, 2009.

ROUSSOS, S. et al. Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. **Micología Neotropical Aplicada**, v. 4, p. 83-98, 1991.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature** v. 454, p. 841-845, 2008.

RUDOLF, A. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnol Bioeng**, v. 99, n. 4, p. 783-90, 2008.

RUÍZ-LEZA, H. A. et al. Diseño de biorreactores para fermentación em medio sólido; Bio-reactors design for solid state fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2007.

RYABOVA, O. et al. A novel family of hemicellulolytic alpha-glucuronidase. **Febs Letters**, v. 583, n. 9, p. 1457-1462, 2009.

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

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol. **New Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 10-16, 2010.

SAKAMOTO, T. et al. Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 203-210, 2012.

SAMSON, R. **Taxonomy—Current Concepts of *Aspergillus* Systematics**. SMITH, J. E. In: *Aspergillus*: Springer US, (Biotechnology Handbooks). v.7, p.1-22, 1994.

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

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

SANTOS, T. C. D. et al. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2210-2216, 2011.

SAQIB, A. A. N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SARGANTANIS, J. et al. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 2, p. 149-158, 1993.

SARHY-BAGNON, V. et al. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 103-109, 2000.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SEIDL, V. et al. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. **Bmc Genomics**, v. 9, 2008.

SELIG, M. et al. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 711-722, 2009.

SELIG, M. J. et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 11, p. 4997-5005, 2008.

SELVENDRAN, R. R.; DAVIES, A. M. C.; TIDDER, E. Cell wall glycoproteins and polysaccharides of mature runner beans. **Phytochemistry**, v. 14, n. 10, p. 2169-2174, 1975.

SERMANNI, G.; TISO, N. **Aspects of Design of Bioreactors in SSF**. PANDEY, A.; SOCCOL, C In: Current Developments in Solid-state Fermentation: Springer, New York, p.117-144, 2008.

SHAH, A.; MADAMWAR, D. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 233-243, 2005.

SHAHI, S. S. et al. Xylanase production under solid state fermentation by *Aspergillus niger* IJE Transactions B: **Applications**, v. 24, n. 3, p. 197-208, 2011.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-28, 2003.

SHAMALA, T. R.; SREEKANTIAH, K. R. Production of cellulases and d-xylanase by some selected fungal isolates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 3, p. 178-182, 1986.

SHEWRY, P. R. et al. Storage product synthesis and accumulation in developing grains of wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 106-112, 2009.

SHI, Y.; XU, X.; ZHU, Y. Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 921-927, 2009.

SHIVAKUMAR, S. Production and characterization of an acid Protease from a local *Aspergillus* sp. by solid substrate fermentation. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 1, p. 188-199, 2012.

SHOEMAKER, S. et al. Molecular-cloning of cellulase from *Trichoderma reesei* L27. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 186, p. 100, 1983.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 809-817, 2011.

SIMMONS, E. Classification of some cellulase-producing *Trichoderma* species International Mycological Congress. BIGELOW, H. e SIMMONS, E. University of South Florida, Tampa, p.618, 1977.

SIMS, I. M.; CRAIK, D. J.; BACIC, A. Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydrate research**, v. 303, n. 1, p. 79-92, 1997.

SINGH, J. et al. Solid Substrate Fermentation of Mycoherbicidal Agent *Alternaria alternata* FGCC#25. 2010.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; APPU RAO, A. Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 411-417, 1999.

SINGHANIA, R. R. et al. Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1521-1524, 2011.

SMAALI, I. et al. Biocatalytic conversion of wheat bran hydrolysate using an immobilized GH43 β -xylosidase. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 338-344, 2009.

SMAALI, I.; RÉMOND, C.; O'DONOHUE, M. Expression in *Escherichia coli* and characterization of β -xylosidases GH39 and GH-43 from *Bacillus halodurans* C-125. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 582-590, 2006.

SMITS, J. P. et al. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 5-6, p. 489-496, 1996.

SOCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.

SOHAIL, M. et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 437-441, 2009.

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

SOUZA, A. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, p. 1-16, 2012.

SOUZA, H. Q. D.; OLIVEIRA, L. A. D.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Food Science and Technology** (Campinas), v. 28, p. 116-124, 2008.

STEVENS, C.; VERHÉ, R. **Renewable bioresources: scope and modification for non-food application**. England: John Wiley and Sons Ltd., p.328, 2004.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

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

SURGET, A.; BARRON, C. Histologie du grain de blé. Paris, FRANCE: Association pour le progrès des industries céréalières, 2005.

Biocon India Limited. SURYANARAYAN, S.; MAZUMDAR, K. **Solid state fermentation**. US n PI 6197573 B1, 17 nov. 1998, 6 mar. 2001.

SZENDEFY, J.; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1354-1360, 2006.

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

SØRENSEN, H. R. et al. Enzymatic Hydrolysis of Wheat Arabinoxylan by a Recombinant “Minimal” Enzyme Cocktail Containing β -Xylosidase and Novel endo-1,4- β -Xylanase and α -l-Arabinofuranosidase Activities. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 1, p. 100-107, 2007.

_____. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5–6, p. 773-784, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007a.

_____. ENZYMATIC-BASED HYDROLYSIS PROCESSES FOR ETHANOL. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007b.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.

TARAGANO, V. M.; PILOSOF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3–5, p. 411-419, 1999.

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

TOPAKAS, E. et al. Production and partial characterisation of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1539-1543, 2003.

TRIANA, O. et al. **Atlas of Sugarcane Bagasse**. México: Geplacea and ICIDCA, 1990.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. Characterization of the Chitinolytic Machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and High-Resolution Structure of Its Oxidative CBM33. **Enzyme. Journal of Molecular Biology**, v. 416, n. 2, p. 239-254, 2012.

_____. Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. **J Biol Chem**, v. 280, p. 11313-11319, 2005.

VAISHNAVI, R. et al. Screening the Effect of Bagasse—An Agro Waste for the Production of Citric Acid Using *Aspergillus niger* through Solid State Fermentation. **Bioscience Methods**, v. 3, n. 8, p. 48-54, 2012.

VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. **Chemical Engineering Journal**, v. 84, n. 2, p. 115-123, 2001.

VAN DEN BROEK, P.; PITTET, A.; HAJJAJ, H. Aflatoxin genes and the aflatoxigenic potential of Koji moulds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 192-199, 2001.

VAN ZYL, W. H. et al. Fungal beta-mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1203-1213, 2010.

VARDAKOU, M. et al. A Family 10 *Thermoascus aurantiacus* Xylanase Utilizes Arabinose Decorations of Xylan as Significant Substrate Specificity Determinants. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, n. 5, p. 1060-1067, 2005.

_____. Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 1-3, p. 129-134, 2003.

VASTRAD, B.; NEELAGUND, S. Optimization and Production of Neomycin from Different Agro Industrial Wastes in Solid State Fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 3, n. 2, p. 104-111, 2011.

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.

VIMALA RODHE, A. et al. Enzymatic hydrolysis of sorghum straw using native cellulase produced by *T. reesei* NCIM 992 under solid state fermentation using rice straw. **3 Biotech**, v. 1, n. 4, p. 207-215, 2011.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 157-167, 2003.

VINTILA, T. et al. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 2, p. 4275-4281, 2009.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129-138, 2010.

WIĄCEK-ŻYCHLIŃSKA, A.; CZAKAJ, J.; SAWICKA-ŻUKOWSKA, R. Xylanase production by fungal strains in solid-state fermentations. **Bioresource Technology**, v. 49, n. 1, p. 13-16, 1994.

WICKLOW, D. T. Adaptation in wild and domesticated yellow-green aspergilli. In: KURATA, H. e UERO, Y. (Ed.). *Toxigenic Fungi—Their Toxins and Health Hazard*. Amsterdam: Elsevier, p.78-86, 1984.

_____. Conidium fermentation rate in wild and domesticated yellow-green Aspergilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 299-300, 1984.

WOOD, B. E.; INGRAM, L. O. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2103–2110, 1992.

WOOD, T.; MCCRAE, S. I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Adv Chem Ser**, v. 181, p. 181-209, 1979.

WYMELENBERG, A. V. et al. Comparative Transcriptome and Secretome Analysis of Wood Decay Fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 11, p. 3599-3610, 2010. XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 9, p. 909-912, 1999.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 9, p. 909-912, 1999.

XIANG, Q.; LEE, Y. Y.; TORGET, R. W. Kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 115, n. 1-3, p. 1127-1138, 2004.

XIAO, Z.; BERGERON, H.; LAU, P. C. K. *Alternaria alternata* as a new fungal enzyme system for the release of phenolic acids from wheat and triticale brans. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 837-844, 2012.

XIN, F.; GENG, A. Horticultural Waste as the Substrate for Cellulase and Hemicellulase Production by *Trichoderma reesei* Under Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 295-306, 2010.

YAMANE, Y. et al. Production of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 9-14, 2002.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.

YANG, J. S. et al. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. **Plant Cell Rep**, v. 15, p. 549-564, 1996.

YANG, S.; LIO, J.; WANG, T. Evaluation of Enzyme Activity and Fiber Content of Soybean Cotyledon Fiber and Distiller's Dried Grains with Solubles by Solid State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 1, p. 109-121, 2012.

YOSHIDA, S.; MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Biochemical and Domain Analyses of FSUAxe6B, a Modular Acetyl Xylan Esterase, Identify a Unique Carbohydrate Binding

Module in *Fibrobacter succinogenes* S85. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 483-493, 2010.

ZANELATO, A. I. et al. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. i-1d3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1536-1544, 2012.

ZHANG, H.; SANG, Q.; ZHANG, W. H. Statistical optimization of cellulases production by *Aspergillus niger* HQ-1 in solid-state fermentation and partial enzymatic characterization of cellulases on hydrolyzing chitosan. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 629-645, 2012.

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

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

ZHANG, Z. 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.; ZHANG, L.; LIU, D. 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.

ZHAO, X. et al. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 1, p. 17-23, 2009.

ZHOU, C.; WU, Q. Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies. 2012.

ZOIA, L.; ORLANDI, M.; ARGYROPOULOS, D. S. Microwave-Assisted Lignin Isolation Using the Enzymatic Mild Acidolysis (EMAL) Protocol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10115-10122, 2008.

Capítulo 3 – Produção de enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal por fungos isolados do solo e de madeira em decomposição da Região Amazônica

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirola; Mariana Tonelotto; Priscila da Silva Delabona; Cristiane Sanshez Farinas

Manuscrito submetido

Resumo

A conversão da biomassa vegetal proveniente de resíduos agroindustriais e florestais em biocombustíveis e bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinaria, é de grande interesse, principalmente para o Brasil, onde a agroenergia possui um enorme potencial de desenvolvimento. Entretanto, para garantir a viabilidade do processo de conversão é fundamental reduzir o custo de produção das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise. Para isso, deve-se dispor da peça chave deste processo, que é o micro-organismo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar fungos isolados da Região Amazônica em relação ao potencial de produção das enzimas celulasas e xilanasas. De um total de 40 isolados cultivados por fermentação em estado sólido (FES) durante 10 dias, os fungos que se destacaram quanto a produção de endoglucanase (351,8 UI/g em 120h) e β -glicosidase (62,3 UI/g em 72h) foram *A. niger* P47C3, na produção de xilanase (1076,9 UI/g em 72h), FPase (2,5 UI/g em 120h) e exo-poligalacturonase (21,0 UI/g em 24h) foram *A. oryzae* P6B2, P40B3 e P77C5, respectivamente. Os resultados obtidos demonstram o nível elevado de produção de enzimas pelos fungos isolados da Amazônia, contribuindo, assim, para gerar os avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável.

3.1. Introdução

Em um país como o Brasil, onde a agricultura é a principal atividade econômica, os resíduos e subprodutos agrícolas, agroindustriais e florestais são abundantes. Esses materiais são geralmente subaproveitados, sendo que uma parte é usada para geração de energia elétrica, enquanto outra grande parte é queimada ou simplesmente fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um passivo ambiental. A conversão dessa biomassa vegetal em produtos de valor comercial poderá, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais, trazer grandes dividendos à economia. Dessa forma, uma das possibilidades promissoras de utilização desses materiais lignocelulósicos é a sua conversão em biocombustíveis e outros bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinaria (KAMM; KAMM, 2004). No entanto, para garantir a viabilidade econômica do processo de conversão é fundamental reduzir o custo das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise da biomassa. Para

isso, deve-se dispor da peça chave deste processo, que é o micro-organismo produtor de enzimas.

A seleção de micro-organismos produtores de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal, como as celulases, xilanases e pectinases, é uma das possíveis estratégias para contribuir com a viabilização da produção do etanol celulósico. Neste sentido, o Brasil se destaca em biodiversidade tendo um vasto campo a ser explorado na busca de micro-organismos que apresentem as características desejadas para tal aplicação. Dentre os diferentes biomas do país, o bioma Amazônico representa uma fonte em potencial de micro-organismos devido as suas condições edafoclimáticas peculiares que propiciam a constante degradação da biomassa rasteira da floresta (DELABONA et al., 2012). Apesar desse enorme potencial, a literatura relacionada a esse tema ainda é bastante escassa. Garcia Medeiros, Hanada e Filho (2003) isolaram 10 espécies de fungos de madeira em decomposição da Floresta Amazônica e avaliaram sua capacidade de produzir as enzimas xilanases durante o crescimento em meio líquido. Souza et al. (2008) estudaram a produção de enzimas por linhagens de Basidiomicetos, oriundas de áreas de floresta da Amazônia, sendo possível detectar a produção de celulases e proteases por todos os isolados, amilases por 40% dos isolados, fenoloxidasas por 50% e pectinases por 10% dos isolados. Duran et al. (1995) utilizaram a técnica de triagem em placas para avaliar a produção de xilanase por 18 espécies de *Penicillium* e 10 espécies de *Aspergillus* isoladas da Região Amazônica. No entanto, o número de isolados avaliados nesses trabalhos foi pequeno quando comparado ao enorme potencial que o bioma Amazônico oferece.

As tecnologias existentes para a produção de enzimas por micro-organismos que utilizam processos fermentativos podem ser conduzidas tanto em meio líquido, chamado de fermentação submersa (FSm), como em meio sólido (FES). A FES se destaca frente à tecnologia submersa convencional por oferecer uma série de vantagens que a tornam uma tecnologia promissora para a produção de enzimas, sobretudo por possibilitar a utilização de substratos mais baratos, como resíduos agroindustriais, o que favorece a economia do processo de produção. Além disso, o uso da FES tem se mostrado particularmente vantajosa para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada à FSm (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004). No entanto, não há ainda relatos de estudos que tenham buscado aliar as vantagens dos cultivos em estado sólido para a caracterização abrangente de fungos isolados do bioma Amazônico

em relação ao potencial de produção das enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal.

A parede celular vegetal é constituída majoritariamente de celulose (20-50% em base seca), hemicelulose (15-35%) e lignina (10-30%) (CHUNDAWAT et al., 2011). Embora a biomassa vegetal seja muitas vezes considerada como tendo uma composição uniforme, pode haver uma substancial diversidade na sua composição. Compatível com a diversidade na composição da biomassa vegetal, os micro-organismos desenvolveram inúmeras estratégias para atacar os componentes da parede celular, apresentando assim um arsenal enzimático capaz de realizar a degradação da biomassa vegetal. Esse complexo de enzimas é necessário devido à elevada recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, sendo que esses coquetéis enzimáticos possuem celulasas, hemicelulasas, pectinases e outras enzimas acessórias atuando de forma sincronizada e sinérgica no processo de degradação (LYND et al., 2002). As celulasas são um complexo de enzimas que atuam na conversão do polímero insolúvel de celulose em açúcares fermentescíveis (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose mais aceito atualmente descreve a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glicosidases ou celobiasas (ZHANG; LYND, 2004). A endoglucanase tem ação randômica, causando mudança rápida no grau de polimerização através da hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose. A exoglucanase é ativa sobre celulose cristalina, liberando celobiose a partir dos terminais da cadeia. Já a β -glicosidase hidrolisa ligações glicosídicas β -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). As xilanases (endo-1,4- β -xilanase) são as enzimas responsáveis pela degradação da xilana, que é o tipo mais abundante de hemiceluloses (DODD; CANN, 2009). As poligalacturonases (PG) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4-glicosídicas em ácido pectínico. As endo-poligalacturonases hidrolisam as ligações glicosídicas α (1,4) internas, causando a despolimerização da molécula e liberando oligossacarídeos de ácido poligalacturônico, enquanto que as exo-poligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1,4) a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Além disso, essas enzimas possuem uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas nas indústrias de alimentos, ração animal, têxteis, papel e celulose e outros setores (BHAT, 2000).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal por 40 isolados de fungos do solo e madeira em decomposição da Floresta Amazônica. Para isso, os 40 isolados foram cultivados por fermentação em estado sólido (FES), durante 10 dias, e os extratos enzimáticos produzidos durante esse período foram quantificados em termos das atividades de FPase, endoglucanase, β -glucosidase, xilanase e poligalacturonase e comparados em termos de parâmetros de produção e produtividade enzimática.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Micro-organismos

Um total de 40 isolados fúngicos foram avaliados quanto à produção (UI/g de substrato) e produtividade enzimática (UI/g.h⁻¹) em FES (Quadro 1). Os fungos avaliados foram isolados do solo e de madeira em decomposição da região Amazônica, conforme descrito em Delabona et al. (2012). Os isolados são mantidos em placas em meio BDA (batata, dextrose e ágar) a 20°C e em temperatura ambiente, sob fina camada de óleo mineral.

Quadro 1 – Fungos isolados do solo e de madeira em decomposição da Floresta Amazônica.

P1M1	P18Q2	P29M4	P45C3	P83B3
P2C2	P19Q3	P30B2	P47C3	P84C3
P4Q4	P21C3	P34P9	P49P11	P86M1
P6B2	P23P6	P38P11	P50B2	P88B3
P6P2	P24C1	P40B3	P66E2	P93C3
P7B3	P27C3A	P40M2	P74M2	P94E2
P12P3	P28P11	P41C1	P75P1	P97P19
P18E2	P29C4	P43B3	P77C5	P108E2

3.2.2. Obtenção das enzimas por fermentação em estado sólido

3.2.2.1. Substrato

O substrato utilizado foi o farelo de trigo lavado. O material foi seco a 50°C até massa constante e posteriormente esterilizado em autoclave a 120°C, por 20 minutos.

3.2.2.2. Inóculo e condições de cultivo

A FES foi conduzida a 35°C, por 10 dias, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g de farelo de trigo, sendo que a 1ª e a última amostra foram retiradas em 24h e

todas as outras a cada 48 horas. O material foi inoculado com 10^7 esporos/g de substrato. Após a inoculação dos esporos foi adicionada aos frascos solução nutriente modificada de Mandels e Sternberg, (1976), composta de (g/L): 1,4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 KH_2PO_4 , 0,3 CaCl_2 , 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 peptona, 2 extrato de levedura, 0,3 uréia; mL/L: 1 tween-80, 1 solução de sais composta por mg/L: 5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 CoCl_2 , até a obtenção de uma umidade de 60% (massa/volume). Essa umidade foi obtida a partir da análise do peso seco do farelo de trigo.

3.2.2.3. Extração da solução enzimática

As enzimas foram extraídas adicionando-se ao material fermentado 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, sendo este homogeneizado em shaker e posteriormente agitado por 30 minutos, a 100 rpm. O material foi então filtrado (gaze) e centrifugado a 10000 rpm durante 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

3.2.3. Determinação das atividades enzimáticas

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de celulases, xilanase e exo-poligacturanase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com o procedimento padrão recomendada pela IUPAC (WOOD; BHAT, 1988), com algumas modificações.

3.2.3.1. Atividade de endoglucanase e xilanase

A atividade de endoglucanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de 4% de carboximetilcelulose (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8. Esta mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos. Uma unidade de atividade endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose.

A atividade da xilanase foi determinada de maneira similar a endoglucanase, exceto que 1% de uma solução de xilana (xilana *Birchwood*, Sigma) foi utilizada como substrato em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. E uma unidade de atividade de xilanase corresponde a um μmol de xilose liberada por minuto.

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

3.2.3.2. Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi realizada usando solução de celobiose 0,5% (Sigma) como substrato e a glicose liberada foi quantificada a partir do Kit de glicose (Laborlab, São Paulo, Brasil).

3.2.3.3. Atividade de papel de filtro (FPase – Filter Paper Activity)

A atividade de FPase foi medida segundo a metodologia de Ghose (1987). Uma unidade de atividade FPase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de substância redutora por minuto, nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

3.2.3.4. Atividade de poligalacturonase

A atividade de poligalacturonase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 4 mL de uma solução de pectina de citros a 0,5% (contendo 79% de ácido galacturônico e 8% de metoxilação) em tampão acetato de sódio 0,2 mol/L e pH 5,0. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos. E uma unidade de atividade de poligalacturonase corresponde a um μmol de ácido *D*-galacturônico (poligalacturonase) liberada por minuto. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

3.3. Resultados e Discussão

Um total de 40 isolados fúngicos de solo e de madeira em decomposição da Região Amazônica foram avaliados quanto à produção (U/g de substrato) e produtividade enzimática (U/g.h⁻¹) em termos de atividades de endoglucanase, β -glicosidase, FPase, xilanase e exo-poligalacturonase, conforme apresentado nas Figuras 25, 26, 27, 28 e 29, respectivamente. A seleção dos parâmetros de produção e produtividade para comparação dos resultados se deve ao interesse de aplicação industrial dessas enzimas. Nesse sentido, o

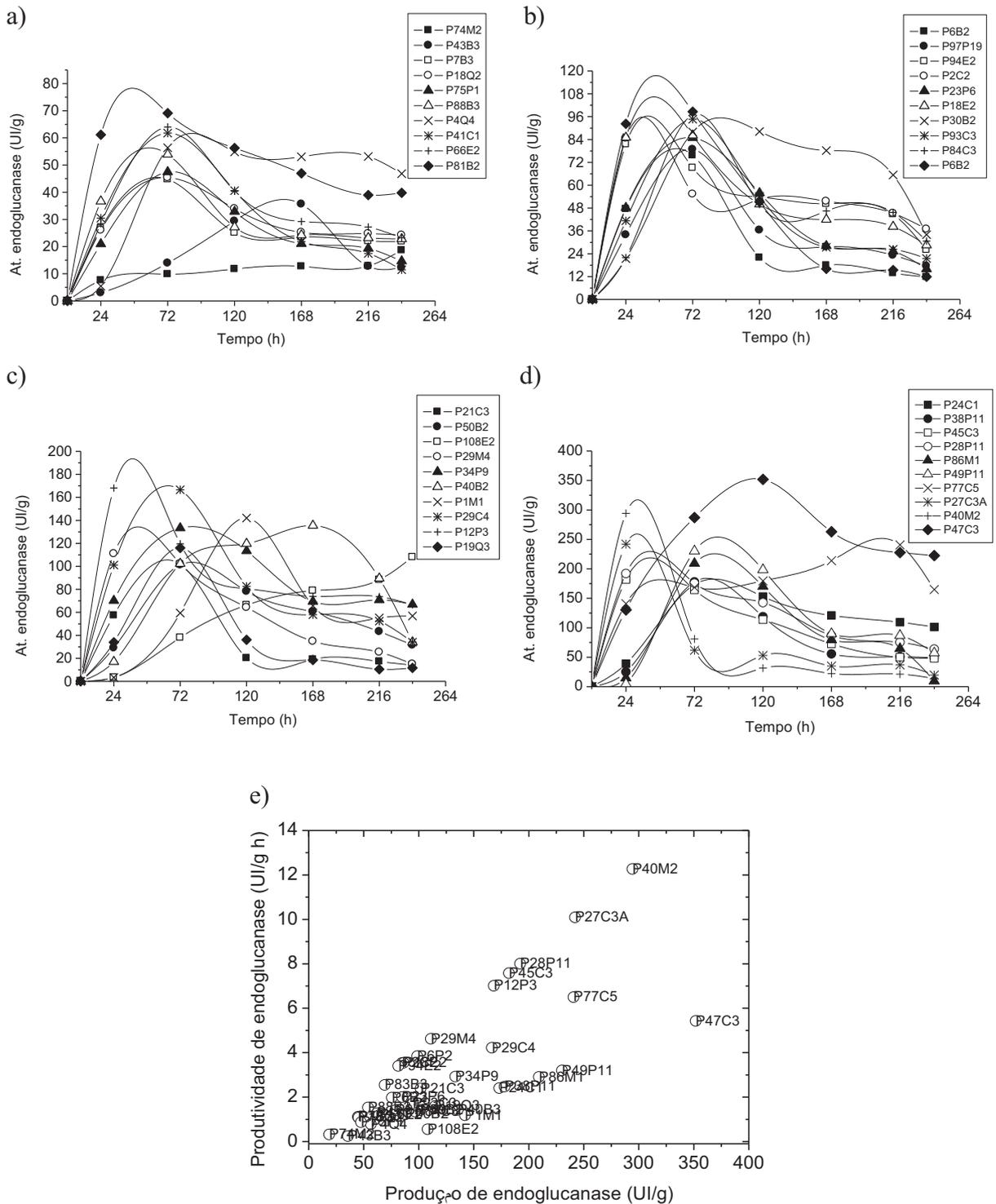
parâmetro produtividade se destaca por levar em consideração o tempo de cultivo necessário para obtenção de determinada atividade enzimática.

3.3.1. Perfis de produção e produtividade de endoglucanase

Com relação ao perfil de atividade de endoglucanase (Fig. 25), pode-se observar que duas linhagens se destacaram em termos tanto de produção, como de produtividade: a linhagem P40M2 (294,3 UI/g em 24h e 12,5 UI/g.h⁻¹ em 288h, respectivamente) e a linhagem P27C3A (242,1 UI/g em 24h e 10,2 UI/g.h⁻¹ em 240h, respectivamente) (Fig. 25d e 25e). Essas duas linhagens foram identificadas em trabalhos anteriores (DELABONA et al., 2012), sendo a linhagem P40M2 pertencente à espécie *Aspergillus fumigatus* e a linhagem de P27C3A pertencente à espécie *Aspergillus oryzae*. A linhagem P47C3, identificada como *Aspergillus niger*, também se destacou em termos de produção de endoglucanase (351,8 UI/g) (Fig. 25d). No entanto, esse valor foi obtido somente em 120 h de cultivo, comprometendo a eficiência em termos do parâmetro de produtividade (5,8 UI/g.h⁻¹ em 360h de cultivo).

Delabona et al. (2012) analisaram o complexo enzimático de *A. fumigatus* P40M2 cultivado em diversos resíduos agrindustriais (farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja e casca de laranja) como substratos para FES. A produção máxima de endoglucanase obtida foi de 160,1 IU/g em 72h de cultivo, utilizando farelo de soja como substrato. Soni, Nazir e Chadha (2010) obtiveram uma produção máxima de endoglucanase pelo fungo *A. fumigatus* de 98,5 UI/g em um estudo de seleção de substratos. Após a otimização das condições de cultivo, a atividade de endoglucanase aumentou para 240,2 UI/g em 120 horas de cultivo. Grigorevski-Lima et al. (2009) obtiveram atividade de endoglucanase por *A. fumigatus* de 21,1 UI/g, em 96 horas, por FES, utilizando uma combinação de bagaço de cana e água de maceração de milho como substrato. Brijwani et al. (2010) estudaram a produção de celulases em cultivo misto e simples por *T. reesei* e *A. oryzae* em FES utilizando farelo de soja e trigo (9:1) como substratos. A produção de endoglucanase por *A. oryzae* foi de 68,4 UI/g. Dhillon et al. (2011) obtiveram uma atividade máxima de endoglucanase de 48,2 UI/g em 120 horas por FES em farelo de trigo utilizando o fungo *A. niger*. Como pode-se observar, os valores reportados neste trabalho para as atividades de endoglucanase foram significativamente superiores aos relatados na literatura mencionada acima.

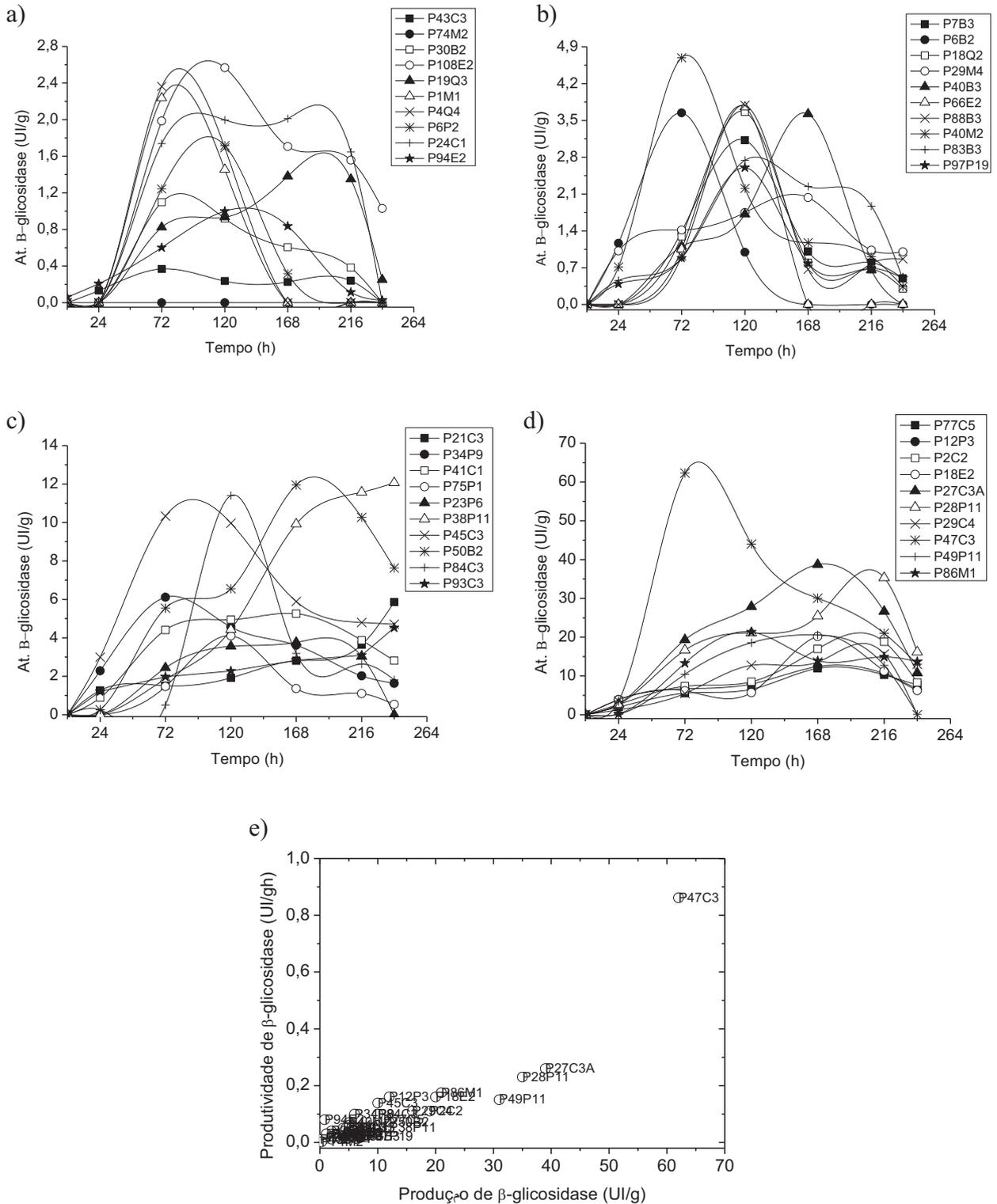
Figura 25 – Produção de endoglucanase pelos 40 fungos isolados da Região Amazônica (a, b, c e d). Valores máximos de produtividade versus produção de endoglucanase dos 40 fungos isolados da Região Amazônica e cultivados por FES por 240h (e).



3.3.2. Perfis de produção e produtividade de β -glicosidase

Em termos da atividade de β -glicosidase (Fig. 26), a linhagem *A. niger* P47C3 destacou-se consideravelmente com relação tanto à produção quanto à produtividade, com valores de β -glicosidase de 62,3 UI/g (em 72 h de cultivo) e 0,9 UI/g.h⁻¹, respectivamente (Fig. 26d e 26e). Todas as outras linhagens avaliadas apresentaram valores de produção inferiores a 40,0 UI/g. Da mesma forma que para a atividade de endoglucanase, os resultados obtidos para a atividade de β -glicosidase foram superiores ou da mesma ordem de grandeza aos relatados na literatura mencionados neste trabalho. Brijwani et al. (2010) estudaram a produção de β -glicosidase por *T. reesei* e *A. oryzae* em cultivo simples e misto usando farelo de soja e trigo como substrato para FES e obtiveram valores inferiores aos encontrados neste trabalho. Os valores foram de 6,3UI/g para *T. reesei* e 9,5U/g para *A. oryzae* e 10,78 UI/g em cultivo misto (BRIJWANI et al., 2010). Gupte e Madamwar (1997) avaliaram o cultivo isolado de fungos *A. ellipticus* e *A. fumigatus* e obtiveram valores máximos de atividade de β -glicosidase de 11,8 e 7,7 UI/g, respectivamente, em 8 dias de cultivo por FES. Dhillon et al. (2011) obtiveram uma atividade máxima de β -glicosidase de 21,8 UI/g em 96 horas de FES em farelo de trigo utilizando o fungo *A. niger*. Gao et al. (2008) reportaram valores de β -glicosidase 128 UI/g em 96 horas de cultivo do fungo *A. terreus* M11 em FES. Apesar de o fungo *Trichoderma reesei* ser um dos micro-organismos mais estudados em relação à produção de celulasas, uma vez que produzem altas concentrações do complexo enzimático hidrolítico, a quantidade de β -glicosidase contida no complexo foi relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação (KIM; KANG; LEE, 1997). Nesse sentido, a utilização do fungo *Aspergillus niger* tem sido apontada como alternativa para superar esta desvantagem, podendo ser avaliada em cocultivos ou cultivos simples. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho destacam a linhagem *A. niger* P47C3 como potencial para a produção de β -glicosidase.

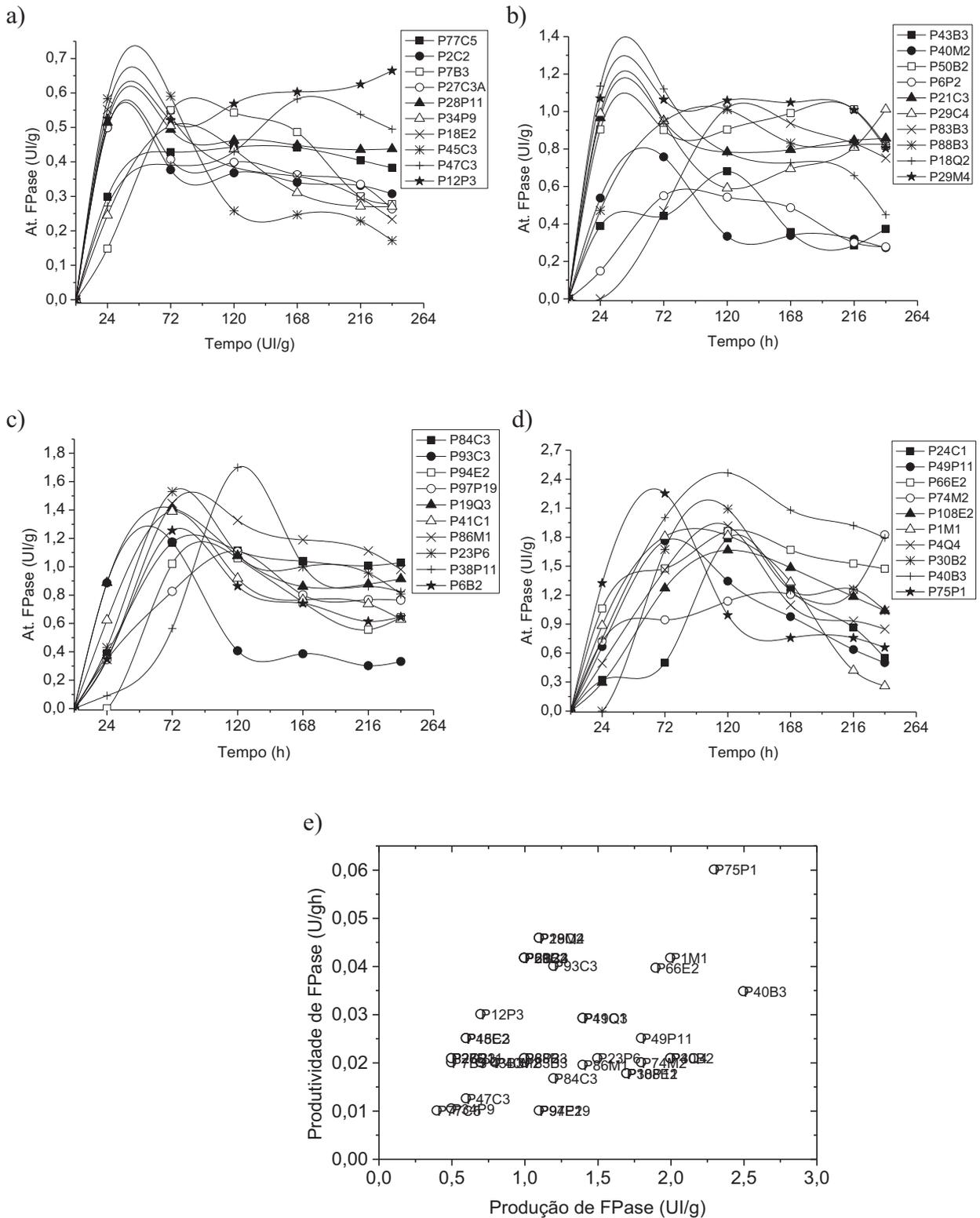
Figura 26 – Produção de β -glicosidase pelos 40 fungos isolados da Região Amazônica (a, b, c e d). Valores máximos de produtividade versus produção de β -glicosidase dos 40 fungos isolados da Região Amazônica e cultivados em FES por 240h (e).



3.3.3. Perfis de produção e produtividade de FPase

Quanto a atividade de FPase (Fig. 27), a linhagem P75P1 se destacou em relação as demais linhagens em termos de produção (2,3 UI/g em 120h de cultivo) (Fig. 27d) e produtividade ($0,1 \text{ UI/g.h}^{-1}$) (Fig. 27e). Rodríguez-Zuñiga et al. (2011) avaliaram a produção de celulasas por *A. niger*, por FES, em diferentes substratos e obtiveram uma atividade de FPase de 0,4 UI/g em 72h de cultivo, utilizando farelo de trigo como substrato. Hui et al. (2010) investigaram o efeito de diferentes substratos adicionados a palha de trigo para produção de lipídios e celulasas pelo fungo celulolítico *A. oryzae*, em FES. A produção de celulasas por *A. oryzae* em uma mistura de palha e farelo de trigo (1:9) foi de 1,8 FPU/g depois de 6 dias de cultivo. Soni, Nazir e Chadha (2010) reportaram uma produção de FPase por *A. fumigatus* de 3,4 UI/g em 120 horas de cultivo por FES em um estudo de seleção de substratos. Gupte e Madamwar (1997) avaliaram o cultivo isolado de fungos *A. ellipticus* e *A. fumigatus* e obtiveram valores máximos de atividade de FPase de 2,1 e 3,8 UI/g, respectivamente, em 8 dias de cultivo por FES. Os valores reportados neste trabalho em termos de atividade de FPase usando fungos isolados da região Amazônica são, portanto, menores ou da mesma ordem de grandeza destes valores reportados na literatura.

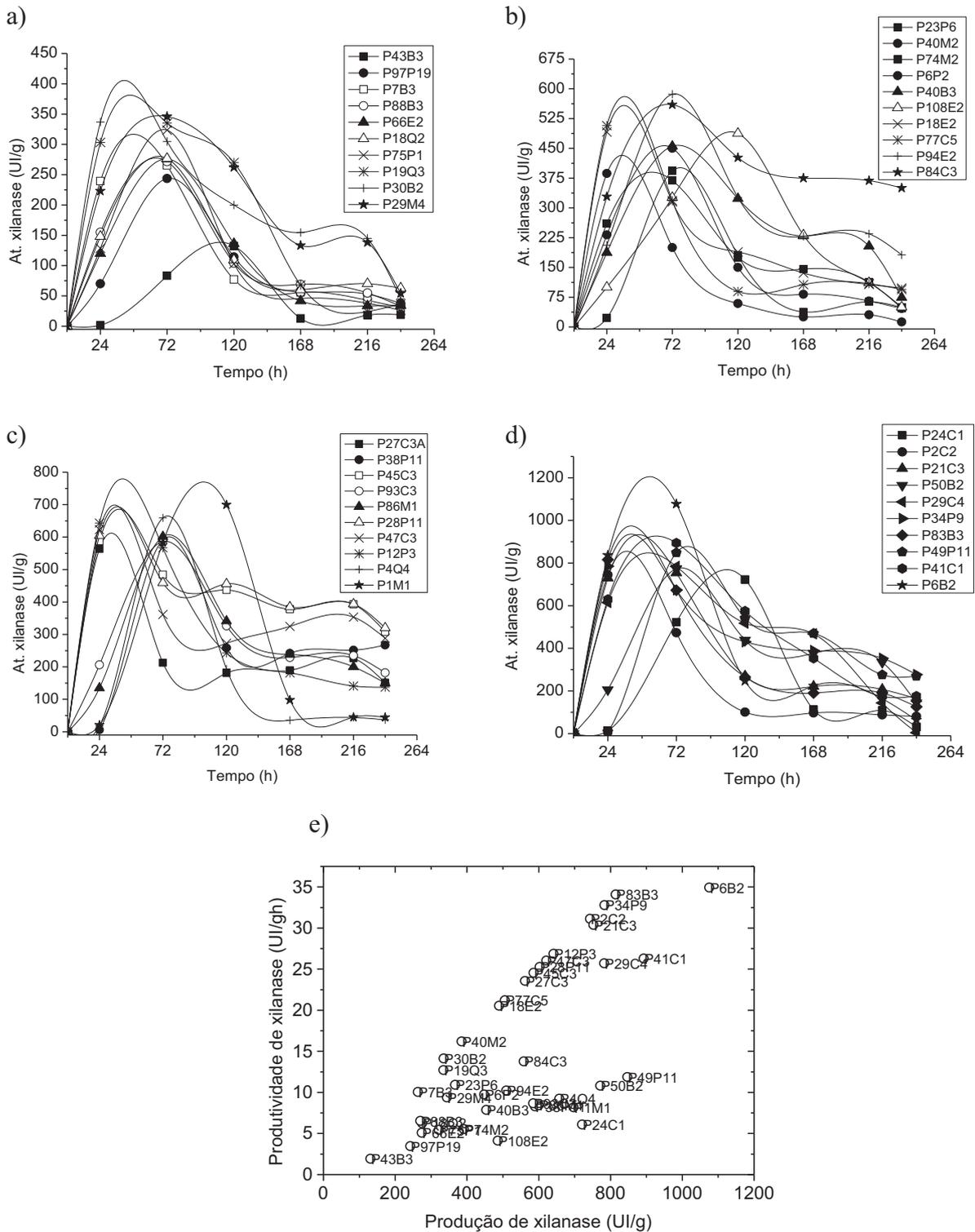
Figura 27 – Produção de FPase pelos 40 fungos isolados da região Amazônica (a, b, c e d). Valores máximos de produtividade versus produção de FPase dos 40 fungos isolados da Região Amazônica e cultivados em FES por 240h (e).



3.3.4. Perfis de produção e produtividade de xilanase

Na Figura 28, dos 40 isolados avaliados, o *Aspergillus oryzae* P6B2 foi o que apresentou a maior produção (1077,0 UI/g em 72h de cultivo) (Fig. 28d) e produtividade (34,9 UI/g.h⁻¹) (Fig. 28e) em termos da enzima xilanase. Muitas espécies de *Aspergillus* são reportadas na literatura como boas produtoras de xilanase. Dhillon et al. (2011) reportaram uma produção máxima de xilanase por *A. niger* de 2604,1 UI/g em 96 horas de cultivo, por FES. Das et al. (2012) empregaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção de celulases e xilanases por *A. fumigatus*, por FES, utilizando palha e farelo de trigo (1:1) como fontes de carbono. Em condições otimizadas, a produção de xilanase por *A. fumigatus* foi de 1130,0 UI/g. Brijwani, Oberoi e Vadlani (2010) estudaram a produção de celulases e xilanases por *T. reesei* e *A. oryzae* em cultivo simples e misto, usando farelo de soja e trigo como substratos para FES e obtiveram valores inferiores aos encontrados neste trabalho. Os valores de xilanase obtidos tanto para cultivo simples quanto misto foram em torno de 504-515 UI/g. Couri et al. (2000) obtiveram 76,6 UI/g de xilanase em 42 horas de cultivo, por FES de uma linhagem mutante do fungo *A. niger* (3T5B8), utilizando farelo de trigo como substrato. Mamma, Kourtoglou e Christakopoulos (2008), utilizando o fungo *A. niger* em cultivo por FES com casca de laranja como substrato, obtiveram uma atividade máxima de xilanase de 77,0 UI/g, em 10 dias de cultivo. Os valores reportados neste trabalho em termos de atividade de xilanase são, portanto, na sua maioria superiores aos valores reportados na literatura citada. Vale destacar que em alguns desses trabalhos, as condições de cultivo foram otimizadas, o que não é o caso deste trabalho no qual foi feita uma avaliação da produção enzimática em uma mesma condição de cultivo. No entanto, os isolados selecionados aqui possuem um grande potencial para utilização em trabalhos futuros de otimização.

Figura 28 – Produção de xilanase pelos 40 fungos isolados da região Amazônica (a, b, c e d). Valores máximos de produtividade versus produção de xilanase dos 40 fungos isolados da Região Amazônica e cultivados em FES por 240h (e).

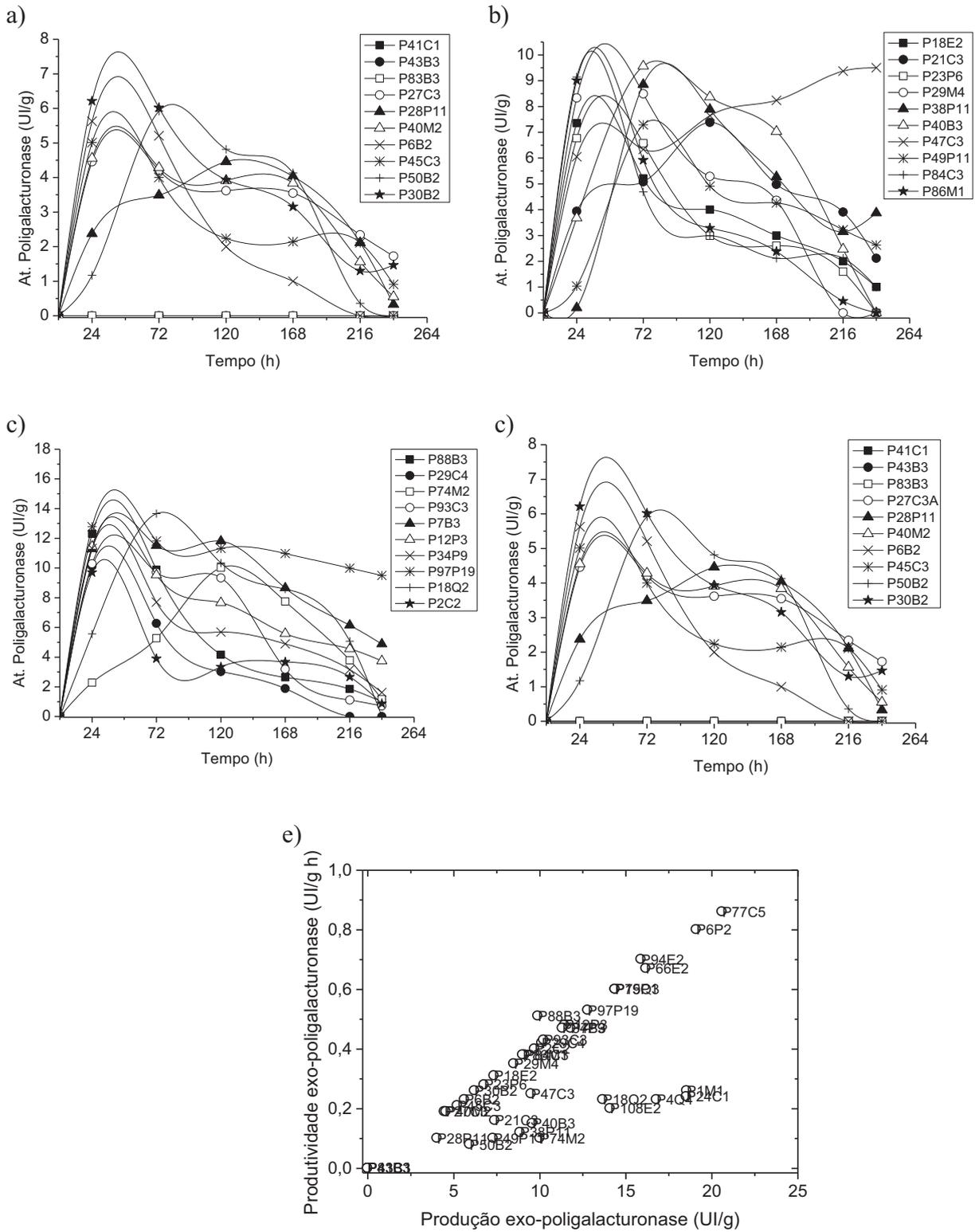


3.3.5. Perfis de produção e produtividade de poligalacturonase

Com relação a produção e produtividade de poligalacturonase a linhagem que se destacou foi a P77C5 (21 UI/g e 0,86 UI/g.h⁻¹ em 24h de cultivo, respectivamente) (Fig. 29d e 29e). Silva et al. (2002) estudaram a produção de pectinase por *Penicilium viridicatum*, por FES, usando resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato. A atividade máxima de poligalacturonase (30 UI/g) foi obtida usando farelo de trigo como substrato. Martin et al. (2004), usando uma mistura de bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos para FES, obtiveram uma produção máxima de poligalacturonase por *Moniliella* SB9 e *Penicilium* sp de 26,0 e 12,0 UI/g, respectivamente. Debing et al. (2006), em condições otimizadas, obtiveram uma produção de pectinase por *A. niger* de 36,0 UI/g usando farelo de trigo como substrato para FES. Neagu et al. (2012) avaliaram o efeito de várias fontes de carbono sobre a produção de pectinase por *Penicillium oxalicum*. A máxima atividade de pectinase foi de 7,2 UI/g, em 144h de cultivo, utilizando farelo de trigo como substrato.

Os valores reportados neste trabalho para alguns fungos isolados da Região Amazônica foram da mesma ordem de grandeza dos encontrados na literatura e citados acima. Contudo, o farelo de trigo utilizado para FES pode subestimar a produção real de pectinases, visto que resíduos agrícolas com quantidades maiores de pectina do que o farelo de trigo podem levar os fungos a expressarem maiores quantidades de enzimas pectinolíticas. Giese, Dekker e Barbosa (2008) estudaram a produção de pectinase e lacase pelo *Botryosphaeria rhodina* por FSm e FES usando bagaço de laranja. A atividade máxima de pectinase por FES usando bagaço de laranja foi de 240,0 UI/g, em 72h de cultivo. Patil e Chaudhari (2010) reportaram que a produção de poligalacturonase de 64,5 UI/g foi mais elevada quando o bagaço de laranja foi utilizado como substrato para FES.

Figura 29 – Produção de poligalacturonase pelos 40 fungos isolados da região Amazônica (a, b, c e d). Valores máximos de produtividade versus produção de poligalacturonase dos 40 fungos isolados da Região Amazônica e cultivados em FES por 240h (e).



3.6. Conclusões

Os fungos isolados da Região Amazônica que se destacaram quanto à produção de endoglucanase foram *A. niger* P47C3, *A. fumigatus* P40M2 e *A. oryzae* P27C3A. Entretanto, os dois últimos se destacaram em relação à produtividade de endoglucanase. Em termos de produção e produtividade de β -glicosidase o P47C3 se destacou em relação aos demais. A maior produção de xilanase, FPase e poligalacturonase foi obtida por P6B2 (*A. oryzae*), P40B3 e P77C5, respectivamente. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram o elevado potencial de produção de enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal pelos fungos isolados da Região Amazônica, contribuindo, assim, para gerar os avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável.

3.7. Referências

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.; VADLANI, P. 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.

CHUNDAWAT, 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.

COURI, S. et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

DAS, A. et al. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. **Bioresour Technol**, v. 128C, p. 290-296, 2012.

DEBING, J. et al. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 2, p. 244-250, 2006.

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

DHILLON, G. S. et al. Improved xylanase production using apple pomace waste by *Aspergillus niger* in koji fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 2, p. 198-208, 2012.

_____. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2-17, 2009.

DURAN, N. et al. Amazonian lignocellulosic materials - screening of xylanolytic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 155-162, 1995.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GARCIA MEDEIROS, R. G.; HANADA, R.; FILHO, E. X. F. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 2, p. 97-100, 2003.

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

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F.; BARBOSA, A. M. Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in submerged and solid state fermentation. **Bioresources**, v. 3, n. 2, p. 335-345, 2008.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L. et al. *Aspergillus fumigatus* Thermophilic and Acidophilic Endoglucanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, n. 1-3, p. 321-329, 2009.

GUPTE, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 2, p. 166-169, 1997.

HOLKER, U.; HOFER, 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.

HUI, L. et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556-7562, 2010.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

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

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 506-77, 2002.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2373-2383, 2008.

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

MARTIN, N. et al. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 813-819, 2004.

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

NEAGU, D. et al. *Trichoderma Reesei* Cellulase Produced by Submerged Versus Solid State Fermentations. **Bulletin UASVM Agriculture**, v. 69, n. 2, p. 320-326, 2012.

PATIL, N. P.; CHAUDHARI, B. L. Production and Purification of Pectinase by Soil Isolate *Penicillium* sp and Search for Better Agro-Residue for its SSF. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, n. 7, 2010.

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

SILVA, D. et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, n. 4, 2002.

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

SOUZA, H. Q. D.; OLIVEIRA, L. A. D.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, p. 116-124, 2008.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

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

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

Capítulo 4 - Avaliação de uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P27C3A isolado do solo da Floresta Amazônica para produção de celulasas e xilanases utilizando fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirota; Mariana Tonelotto; Priscila da Silva Delabona; Rafael Frederico Fonseca; Cristiane Sanchez Farinas

Manuscrito submetido

Resumo

O desenvolvimento de bioprocessos para a produção de celulasas e xilanases é muito importante, devido ao impacto significativo dessas enzimas sobre a economia da bioconversão da biomassa em combustíveis e produtos químicos. Este trabalho avaliou os efeitos das condições operacionais na produção de celulasas e xilanases por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* isolado do solo da Floresta Amazônica. O fungo foi cultivado em estado sólido, utilizando um biorreator de escala de laboratório equipado com um sistema de monitoramento e controle. Os efeitos do teor de umidade inicial do substrato e da temperatura na produção de celulasas (em termos de FPase, de endoglucanase e β -glicosidase) e xilanases foram avaliados e comparados com as condições estáticas. Foi notável o efeito positivo sobre a produção de celulasas e xilanases nos cultivos em estado sólido sob condições controladas. As melhores produções de FPase (0,4 UI/g), endoglucanase (123,6 UI/g), β -glicosidase (18,3 UI/g) e xilanase (169,2 UI/g) foram obtidas utilizando um teor de umidade inicial do substrato de 70%, a 28°C utilizando uma umidade do ar de entrada de 80% e taxa de fluxo de ar de 20 mL/min. Esta condição selecionada foi utilizada para posterior avaliação, em termos de perfil de cinética e estudos de análise respirométrica.

4.1. Introdução

As celulasas e hemicelulasas são complexos de enzimas que apresentam ação sinérgica durante a degradação das cadeias poliméricas de celulose e hemiceluloses, respectivamente. Estudos relacionados à produção de celulasas e hemicelulasas, em especial as xilanases (principal responsável pela degradação da xilana, componente majoritário das hemiceluloses) são de fundamental importância devido ao impacto significativo dessas enzimas sobre a economia de bioconversão de biomassa em combustíveis e produtos químicos. A ação das xilanases, bem como de outras enzimas auxiliares, melhora a conversão da celulose, removendo a hemicelulose e, conseqüentemente, aumentando a acessibilidade à celulose pelas celulasas (GAO et al., 2011).

Muitas celulasas e xilanases comerciais são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000; PARK et al., 2002). Entre

as espécies do gênero *Aspergillus*, *A. niger* e *A. oryzae* são os dois fungos mais importantes mundialmente para aplicações biotecnológicas (HU et al., 2011). Além disso, descobertas recentes sobre a genômica de *A. oryzae* revelaram que ele é enriquecido com genes envolvidos na degradação da biomassa (KOBAYASHI et al., 2007). Além das aplicações já estabelecidas de *A. oryzae* nas indústrias de alimentos, há um grande potencial deste fungo para a produção de enzimas industriais.

A utilização da fermentação em estado sólido (FES) é particularmente vantajosa para a produção de enzimas por fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos (HOLKER; LENZ, 2005). No entanto, algumas limitações operacionais da FES, tais como dificuldade em controlar o nível de umidade do substrato e evitar o acúmulo de calor, têm impedido que a FES fosse usada a nível industrial. Na verdade, a caracterização de cada micro-organismo em particular, em termos da influência da temperatura e do teor de umidade do substrato sobre a cinética de crescimento e formação de produto, é essencial para o processo de FES em grande escala. Estudos anteriores demonstraram a importância de avaliar a influência dos parâmetros de processo operacionais em produção de celulasas por *Aspergillus niger* cultivado por FES usando condições controladas de aeração forçada e umidade relativa do ar de admissão (FARINAS et al., 2011).

Estudos relacionados com a produção de enzimas industriais por *A. oryzae*, cultivado por FES, têm sido amplamente descritos na literatura. As enzimas consideradas incluem α -amilase (BOGAR et al., 2002; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007; XU et al., 2008; KAREEM; ASPAN; ODUTAN, 2009; FARID; SHATA, 2011; PENGTHAMKEERATI et al., 2012.), protease (CHUTMANOP et al., 2008), xilanase (SZENDEFY; SZAKAS; CHRISTOPHER, 2006), entre outras. No entanto, não há estudos sobre a produção de celulasas por *A. oryzae* cultivado por FES do ponto de vista do desenvolvimento de bioprocessos, ou seja, em termos de melhor umidade e temperatura para produção de celulasas por *A. oryzae* em biorreator de coluna instrumentado. Dado o potencial de *A. oryzae* e a sua reconhecida aplicação para a produção de enzimas industriais, existe um grande interesse na caracterização do fungo em termos de produção de enzimas que degradam biomassa utilizando FES sob condições operacionais controlada.

O presente trabalho investigou os efeitos das condições operacionais para a produção de celulasas (em termos de FPase, endoglucanase, e β -glucosidase) e xilanase por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* isolada do solo da Floresta Amazônica, cultivada por FES utilizando um biorreator de coluna instrumentado em escala laboratorial. A

influência do teor de umidade inicial do substrato e da temperatura na eficiência das produções de celulases e xilanases foram avaliadas e comparadas com as condições de aeração estática. Além disso, as condições selecionadas foram utilizadas para caracterização adicional em termos de perfil de produção enzimática e estudos de análise respirométricas.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Biorreator de coluna instrumentado

O biorreator utilizado foi um sistema de escala laboratorial adaptado de Raimbault e Germon, (1976) que consiste de 16 colunas de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento imersas em banho de água, para controle de temperatura (Fig. 30). O biorreator foi equipado com um sistema para monitorar e controlar a vazão de ar e umidade relativa do ar de admissão, tal como anteriormente descrito por Farinas et al. (2011). A vazão de ar e a umidade relativa do ar de admissão foram mantidas constante durante todos os cultivos, a 20 mL/min e 80%, respectivamente.

Figura 30 – Biorreator de coluna instrumentado.



Foto: Rosangela D. P. Buzon Pirota

4.2.2. Seleção do micro-organismo

Inicialmente, foi realizada a seleção de 40 linhagens de fungos isoladas do solo e de madeira em decomposição da Floresta Amazônica (DELABONA et al., 2012) produtoras de endoglucanase por FES. Neste primeiro passo, um conjunto de cultivos por FES foi

realizado, a 35°C, por 10 dias, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g de farelo de trigo lavado. O material foi inoculado com 10^7 esporos/g de substrato. Após a inoculação dos esporos foi adicionado aos frascos a solução nutriente modificada de Mandels e Sternberg, (1976), até a obtenção de uma umidade de 60% (massa/volume). As enzimas foram extraídas em intervalos de 24 e 48 horas e analisadas como descrito nas secções 4.2.5 e 4.2.7, respectivamente. A seleção baseou-se no critério de produtividade (IU/g.h^{-1}) das diferentes linhagens. A produtividade foi calculada em termos de unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g) dividido pelo tempo (em horas). Dessa forma, o micro-organismo selecionado e abordado neste estudo foi uma linhagem de *Aspergillus oryzae* P27C3A. Este micro-organismo encontra-se depositado no Banco da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil).

4.2.3. Seleção das condições operacionais para o cultivo por FES

Os cultivos no biorreator foram realizados por 72 horas usando farelo de trigo lavado como substrato sólido. O meio sólido foi esterilizado em autoclave, a 121°C, por 20 minutos e as colunas foram esterilizadas por 2 horas a 121°C em estufa antes da inoculação. Cada coluna foi preenchida com 5g de farelo de trigo lavado que foi esterilizado separadamente em béquer de 250 mL. Um volume de suspensão de esporos correspondente a 10^7 esporos/g foi inoculado no próprio béquer contendo o substrato sólido e o teor de umidade foi ajustado com uma solução nutriente (MANDELS; STERNBERG, 1976). O substrato sólido úmido foi homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro e as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. A estratégia adotada para a seleção das condições operacionais de FES foi avaliar a variável individualmente e, em seguida, selecionar o melhor valor obtido a partir de cada variável e incorporar na etapa de seleção da próxima variável. Inicialmente, os cultivos foram realizados a 35°C com um teor de umidade inicial do substrato variando de 50, 60, 70 e 80%. Após a seleção do teor de umidade mais favorável, diferentes temperaturas (28, 30, 32, 35 e 37°C) foram avaliadas usando um teor de umidade inicial de 70%. Todos os cultivos foram também realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sobre condições idênticas (gramas de substrato sólido, umidade e temperatura), a fim de comparar os resultados obtidos sob o sistema de aeração forçada (biorreator) com o de aeração estático. Em 72 horas, as enzimas foram extraídas e analisadas como descritas nas secções 4.2.5 e 4.2.7, respectivamente. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas.

4.2.4. Perfis de produção de celulases e xilanases

Após a definição da melhor condição operacional para o cultivo de *A. oryzae* P27C3A por FES, os perfis de produção de celulases e xilanase foram avaliados durante um período de cultivo de 120 horas. Foram utilizadas as condições operacionais selecionadas: velocidade de fluxo de ar de 20 mL/min, umidade relativa do ar de 80%, teor de umidade inicial de substrato de 70% e temperatura de 28°C. Os cultivos foram também realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sobre condições idênticas, a fim de comparar o sistema de aeração forçada (biorreator) com o de aeração estático. As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas, e as enzimas foram extraídas e analisadas como descritas nas seções 4.2.5 e 4.2.7, respectivamente.

4.2.5. Extração das enzimas

Após o período de cultivo, o meio sólido foi transferido para frascos Erlenmeyer (no caso dos cultivos em coluna) e as enzimas foram extraídas por adição de 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, para obter uma proporção sólido/líquido de 1:10. A suspensão foi homogeneizada e posteriormente agitada, a 120 rpm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. 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.

4.2.6. Análises respirométricas

A análise respirométrica foi realizada medindo-se o CO₂ na saída de ar de cada coluna do sistema de biorreator, utilizando-se um instrumento GMM 220 (Vaisala, Finlândia). A quantidade cumulativa de CO₂ produzido foi calculada a partir da área sob a % de CO₂ versus a curva do tempo de cultivo. Os dados do CO₂ produzido até o final da fase exponencial (aproximadamente 15 h após o final da fase de latência) foram ajustados a partir de equações diferentes de comparação de comportamento de crescimento celular, a equação logística, a equação de desaceleração e o ajuste foram realizados por meio de uma regressão não linear usando o software numérico (Origin, versão 8.0). A equação logística (1) Mitchell, Berovič e Krieger, (2006) foi escolhida para o cálculo da velocidade de crescimento específico, μ , para cada condição experimental, variando-se a umidade inicial do substrato e a temperatura, bem como o cultivo realizado por estimativa do perfil cinético sob a condição operacional selecionada.

$$C = \frac{C_m}{1 + \left(\frac{C_m}{C_0} - 1 \right) e^{-\mu t}} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, C é o teor de biomassa (em termos de CO₂ mmol), C_m é o teor de biomassa máxima (em termos de CO₂ mmol), C₀ é o teor inicial de biomassa (em termos de CO₂ mmol), μ é a taxa de crescimento específico (1/h) e t é o tempo. Na Equação 1, o CO₂ produzido foi usado para descrever o crescimento celular. Esta suposição é razoável, uma vez que, no período exponencial o CO₂ gerado para manutenção é mais baixo do que o CO₂ produzido para o crescimento, o que faz com que seja possível ajustar a produção de CO₂ durante este período com uma curva logística, como para o perfil de biomassa. A quantidade inicial de CO₂ (C₀) a partir de cada experimento foi assumido ser a mesma (1,99 E-04 mmoles de CO₂), uma vez que a concentração de inóculo foi fixada para estes estudos. O CO₂ máximo (C_m) foi calculado como a quantidade total de CO₂ produzido até ao final da fase exponencial (que correspondeu a aproximadamente 15 h depois do final da fase de latência).

4.2.7. Ensaios de atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de celulases e xilanase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com o procedimento padrão recomendado pela IUPAC (WOOD; BHAT, 1988), com algumas modificações. A atividade de FPase foi realizada segundo a metodologia de Ghose (1987). A atividade de endoglucanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL de extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 4% (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8. Esta mistura foi incubada a 50°C, por 10 minutos. A atividade de xilanase foi determinada de maneira similar, exceto que uma solução de xilana a 1% (xilana *Birchwood*, Sigma) foi utilizada como substrato em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. Finalmente, a atividade de β-glicosidase foi realizada usando-se uma solução de celobiose a 0,5% (Sigma) como substrato e a glicose liberada foi quantificada a partir do Kit de glicose (Laborlab, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade de FPase e endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de xilanase corresponde a um μmol de xilose liberada por minuto, sob as

condições de ensaio. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g).

4.2.8. Análise estatística

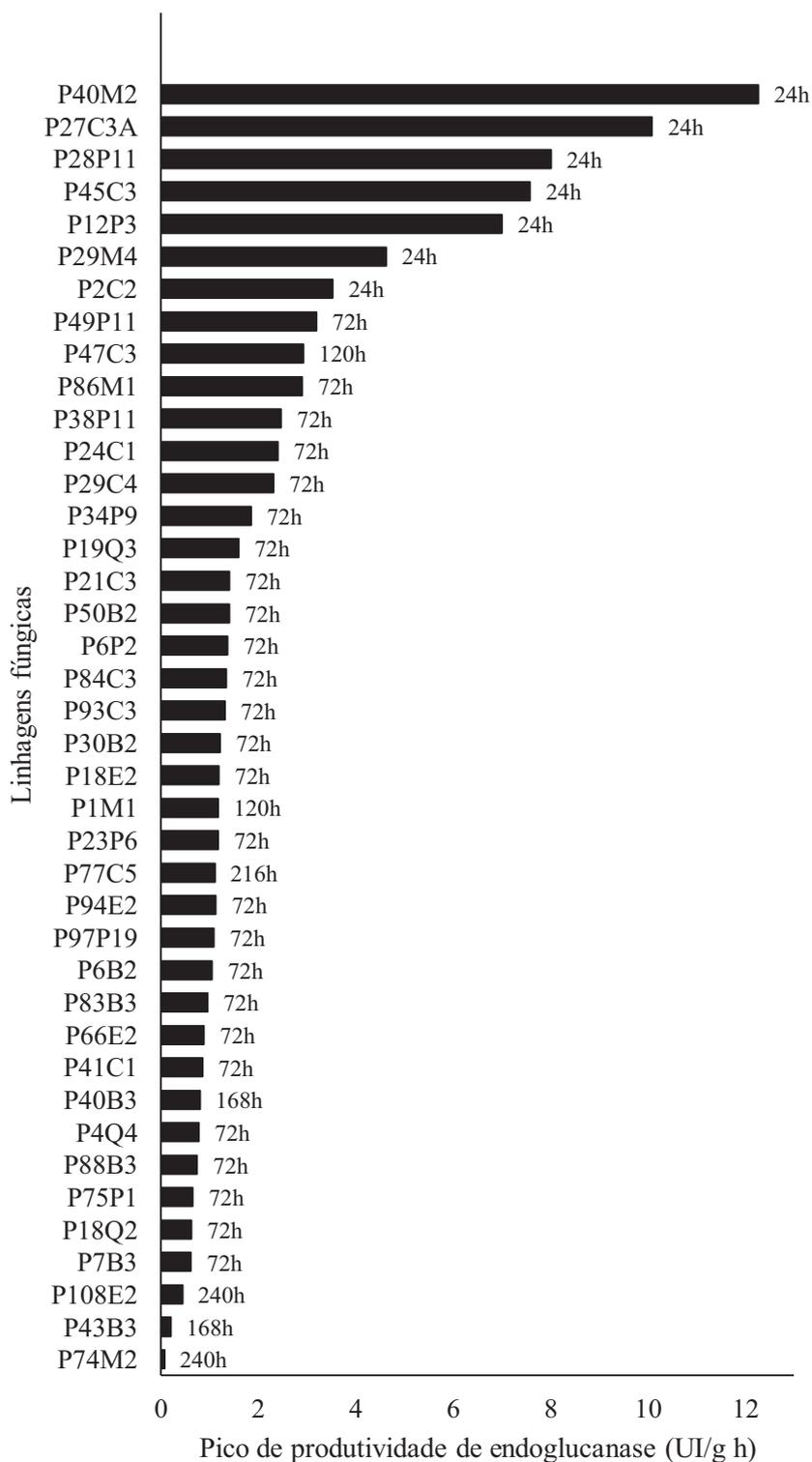
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O teste Tukey foi aplicado com a finalidade de verificar se os diferentes valores de umidade (50, 60, 70 e 80%) e temperatura (28, 30, 32, 35 e 37°C) utilizados no processo de FES afetam a produção de enzimas pelo fungo e se a produção de enzimas sob condições de aeração forçada é melhor do que em condições estáticas. O nível de significância para o teste de Tukey foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Origin 8.0.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Seleção das linhagens fúngicas produtoras de celulasas

A eficiência da produção de celulasas em termos de produtividade de endoglucanase pelas 40 linhagens fúngicas isoladas da Floresta Amazônica e cultivadas em farelo de trigo por FES é apresentado na Figura 31. Os valores de produtividade de endoglucanase variaram de $0,08 \text{ UI/g.h}^{-1}$ (P74M2) a $12,3 \text{ UI/g.h}^{-1}$ (P40M2).

Figura 31 – Produtividade de endoglucanase pelas 40 linhagens fúngicas isoladas do solo e de madeira em decomposição da Região Amazônica e cultivadas em farelo de trigo por FES.



As duas linhagens que apresentaram maiores valores de produtividade de endoglucanase foram a linhagem P40M2 (12,26 UI/g h) e P27C3A (10,09 UI/g h). Estas duas linhagens foram identificadas como *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus oryzae*,

respectivamente. Considerando que algumas linhagens de *A. fumigatus* podem exibir algum grau de patogenia (MEYER et al., 2011) e adicionando o fato de que o genoma de *A. oryzae* é enriquecido com genes envolvidos na degradação da biomassa (KOBAYASHI et al., 2007), *A. oryzae* P27C3A foi a linhagem selecionada para os estudos de avaliação adicionais em termos de produção de celulases e xilanases.

Além disso, *A. oryzae* é considerado um fungo não-toxigênico com grande potencial para produção de enzimas industriais e com uma longa história de uso extensivo na indústria de alimentos, o que prova a sua segurança (ABE et al., 2006).

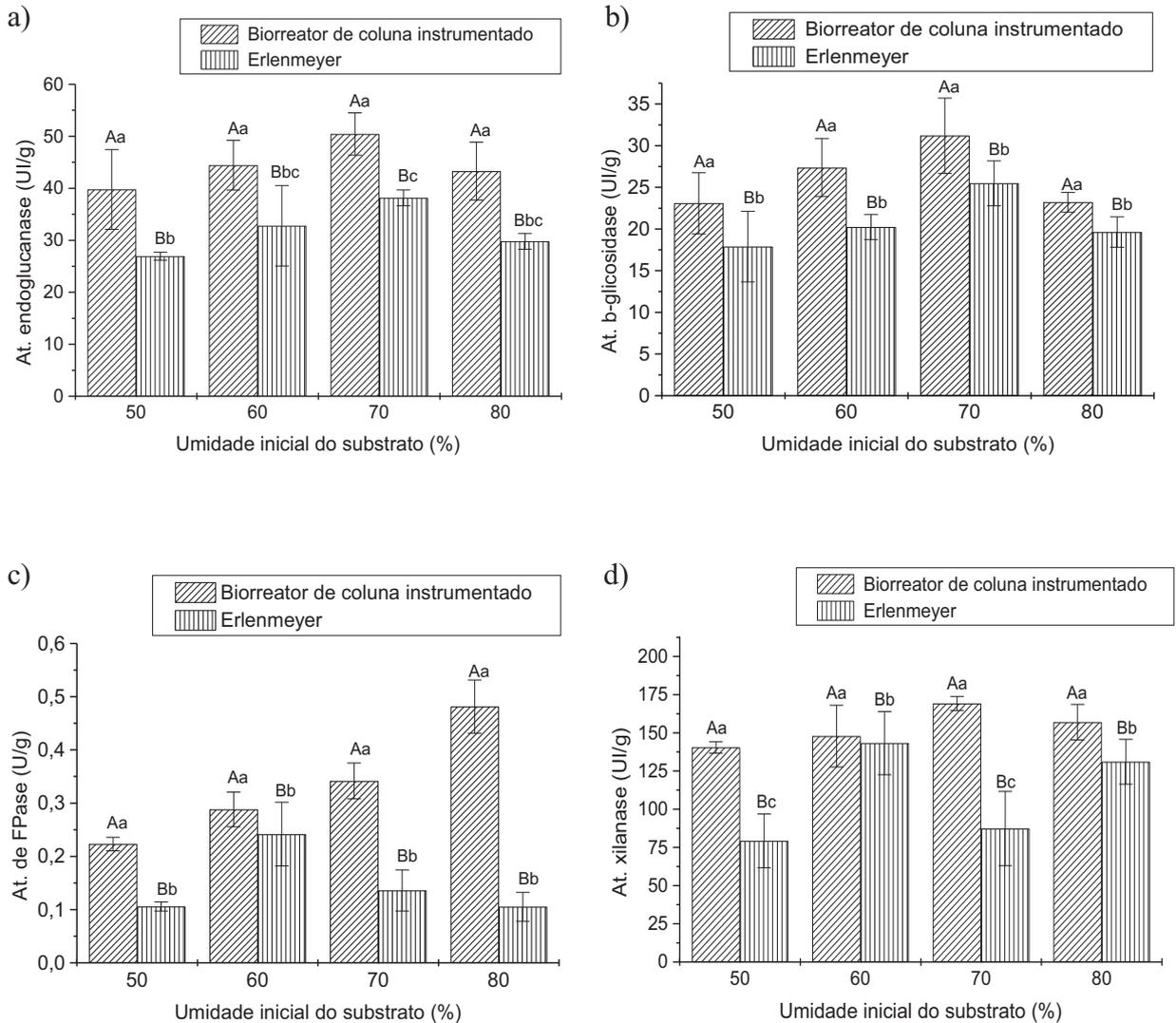
4.3.2. Efeito do teor de umidade inicial na produção de celulases e xilanases por *A. oryzae*

Estudos de caracterização da produção de celulases e xilanases por *A. oryzae* cultivados sob condições operacionais controladas de FES foram realizados em biorreator instrumentado de escala laboratorial. A fim de comparar a eficácia do sistema de biorreator utilizado, um conjunto idêntico de cultivos foi conduzido sobre condições de aeração estática.

Inicialmente, o efeito do teor de umidade inicial nas produções de celulases e xilanases foram investigados através do cultivo dos fungos por 72h, a 35°C. Uma comparação do efeito do teor de água em termos de produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases sob aeração forçada e estática é apresentada nas Figuras 32a-d, respectivamente.

É visível o efeito positivo dos cultivos em condições controladas de aeração forçada, uma vez que as produções de celulases e xilanases foram significativamente mais elevadas em relação aos cultivos realizados sob condições estáticas (Fig. 32a-d). Para esta série de experimentos, as atividades de endoglucanase, β -glicosidase, FPase e xilanase foram de até 48, 29, 336 e 40% mais elevadas, respectivamente, quando se utilizou aeração forçada, em vez da estática. Uma menor produção de enzimas em condições estáticas provavelmente está relacionada à limitação de oxigênio durante o crescimento de fungos, já que nesse tipo de cultivo o O_2 é transferido apenas por difusão. Além da transferência de oxigênio, a transferência de calor e dissipação de CO_2 são também favorecidas sob condições de aeração forçada.

Figura 32 – Efeito do teor de umidade inicial sob (a) produção de endoglucanase, (b) β -glucosidase, (c) FPase e d) xilanase por *A. oryzae* cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática em 72h de processo.



Letras minúsculas (a, b e c) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes umidades utilizadas para fermentação em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos em biorreator e Erlenmeyer, respectivamente. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a,b,c ou A,B) diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em termos do efeito do teor de umidade na produção de endoglucanase, a condição mais favorável foi alcançada utilizando o teor de umidade inicial de 70% (Fig. 32a). No entanto, a produção de endoglucanase não foi significativamente afetada pelo teor de umidade inicial em ambos os sistemas de aeração utilizados. Os valores de atividade de endoglucanase variaram de 39,8 a 50,4 UI/g quando se utilizou aeração forçada e 26,9 a 38,2 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, um efeito mais pronunciado foi observado para aeração estática, uma vez que o aumento de 42% em endoglucanase foi obtido através da modulação do teor de umidade inicial (de 50 a 70%), em comparação com um aumento de 27% quando se utilizou aeração forçada. Este resultado pode ser explicado pela capacidade do sistema de aeração forçada manter a umidade do meio, através da umidificação do ar que passa por cada coluna. Este é um resultado muito positivo em termos de desenvolvimento de bioprocessos, uma vez que os resultados deram a entender que a biossíntese de endoglucanase por *A. oryzae* não foi sensível a variações no teor de umidade inicial de substrato em ambos os cultivos sob aeração forçada e estática.

Uma tendência semelhante foi observada para β -glicosidase, uma vez que o teor de umidade inicial do substrato de 70% também favoreceu a atividade desta enzima (Fig. 32b). Os valores de atividade de β -glicosidase variaram entre 23,1 e 31,2 UI/g quando se utilizou aeração forçada e 17,9 e 25,4 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, também para β -glucosidase um efeito mais pronunciado foi observado para a aeração estática, com um aumento de 42% em atividade de β -glicosidase obtido por meio da modulação do teor de umidade inicial (de 50 a 70%), em comparação com um aumento de 35% quando se utilizou aeração forçada.

Em termos de atividade de FPase, valores maiores foram obtidos em biorreator utilizando teor de umidade inicial do substrato de 80%, enquanto que em Erlenmeyer foi de 60%, no entanto a atividade de FPase não foi afetada pela umidade inicial do substrato (Fig. 32c). Os valores de atividade FPase variaram de 0,22 a 0,48 UI/g quando se utilizou aeração forçada e 0,11 a 0,14 UI/g quando se utilizou aeração estática. No que se refere à atividade de FPase um efeito mais pronunciado foi observado para aeração forçada, com um aumento de 118% na atividade conseguida através da modulação do teor de umidade inicial (de 50 a 80%), em comparação com um aumento de 27% quando se utilizou aeração estática. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a produção de enzimas celulases que é quantificada pela atividade de FPase foi limitada devido à limitação de oxigênio durante o crescimento de fungos ou de transferência de calor quando se utilizou o sistema de aeração

estático. Além disso, uma vez que os ensaios de atividade total de celulase são medidos utilizando substrato insolúvel, a heterogeneidade de celulose insolúvel pode resultar em problemas, especialmente em relação à reprodutibilidade, quando os valores são da magnitude encontrada aqui.

Com relação à produção de xilanase por *A. oryzae* em biorreator a condição mais favorável foi obtida utilizando um teor de umidade inicial de 70% (169,21 UI/g) (Fig. 32d). No entanto, no sistema de aeração forçada à produção de xilanase não foi significativamente afetada pelo teor de umidade. Já no sistema estático a produção de xilanase nas umidades de 60 e 80% (143,28 e 131,07 UI/g, respectivamente) foi significativamente maior do que as obtidas nas umidades de 50 e 70% (79,28 e 87,33 UI/g, respectivamente). Isso pode ser devido ao sistema de aeração estático não apresentar controles de umidade e temperatura, o que pode afetar no crescimento e produção de enzimas pelos micro-organismos. Os valores de atividade de xilanase variaram de 140,5 a 169,2 UI/g quando se utilizou aeração forçada e 79,28 a 173,28 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, um efeito mais pronunciado foi observado para aeração estática, uma vez que o aumento de 119% na atividade de xilanase foi obtido através da modulação do teor de umidade inicial (de 50 a 60%), em comparação com um aumento de 20% quando se utilizou aeração forçada. Assim, no sistema de aeração estática a umidade afetou significativamente a produção de xilanase.

Entre os vários parâmetros operacionais que afetam a eficiência do processo de FES, o teor de umidade é um dos mais importantes. Se o teor de umidade é muito alto, os espaços vazios entre as partículas de sólidos são cheios com água, resultando na limitação da transferência de oxigênio. No outro extremo, se o teor de umidade for muito baixo, o crescimento do micro-organismo é prejudicado (RAGHAVARAO; RAUGANATHAN; KARANTH, 2003). Conseqüentemente, a identificação do conteúdo de umidade ótima para cada substrato sólido é crucial para a promoção de condições favoráveis de crescimento, e, conseqüentemente, para a produção satisfatória de metabólitos. No entanto, o valor do teor de umidade ótima depende tanto do substrato sólido quanto do micro-organismo utilizado (RAIMBAULT, 1998).

O efeito do teor de umidade inicial do substrato para a produção de celulases por outras linhagens de *Aspergillus* cultivados por FES foi descrito anteriormente. Mamma, Kourtoglou e Christakopoulos (2008) avaliaram a produção de enzimas por FES, utilizando o fungo *A. niger* e casca de laranja como substrato, e foram capazes de aumentar significativamente a atividade das enzimas após a otimização do teor de umidade inicial do

meio sólido. Gao et al. (2008) encontraram que o aumento no teor de umidade inicial aumentou a produção de enzima pelo fungo termofílico *Aspergillus terreus* M11, cultivado por FES utilizando palha de milho como substrato. Kavya e Padmavathi (2009) investigaram as condições ótimas de crescimento para produção de xilanases pelo *A. niger* em FES usando farelo de trigo e observaram que a umidade inicial teve efeito significativo. Park et al. (2002) estudaram a produção de xilanase por *A. niger* em FES usando planejamento experimental. O efeito da umidade foi avaliado entre os intervalos de 50 a 80% e a atividade máxima de xilanase (5071 UI/g) foi obtida a 65%.

Nossos resultados demonstraram que o teor de umidade inicial desempenhou um papel importante na produção de xilanases por *A. oryzae* em cultivos realizados sob sistema de aeração estática. No entanto, o *A. oryzae* não foi muito sensível a variações no teor de umidade do substrato quando se utilizou um sistema de biorreator com condições controladas de aeração forçada para produção de celulasas e xilanases. Com base nestes resultados, um teor de umidade inicial intermediário (70%) foi selecionado para mais estudos sobre a avaliação do efeito da temperatura sobre a produção de celulasas e xilanases.

4.3.3. Efeito da temperatura sob a produção de celulasas e xilanase por *A. oryzae*

Os cultivos foram realizados nas temperaturas de 28, 30, 32, 35, e 37°C por 72h usando os sistemas de aeração forçada e estática e o teor de umidade inicial de substrato foi fixado em 70%. Uma comparação do efeito da temperatura em termos de atividade de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanase sob os sistemas de aeração forçada e estática são apresentadas nas Figuras 33a-d, respectivamente.

Para este conjunto de cultivos foi notável o efeito positivo sob condições controladas de aeração forçada, tal como a produção de celulasas e xilanases que foram significativamente maiores nos cultivos com aeração forçada, em comparação com os realizados sob condições estáticas. Em termos da influência da temperatura nos cultivos, as atividades de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases foram de até 87, 281, 210 e 39% superiores, respectivamente. Estes resultados foram obtidos quando se utilizou aeração forçada. Isto pode ser explicado a partir das condições ambientais mais favoráveis obtidos no sistema de biorreator, como uma dissipação de calor eficiente, evitando-se gradientes de temperatura devido ao calor gerado como resultado da atividade microbiana.

A temperatura mais favorável para a produção de endoglucanase por *A. oryzae* foi de 28°C (Fig. 33a). A produção de endoglucanase foi significativamente afetada pela

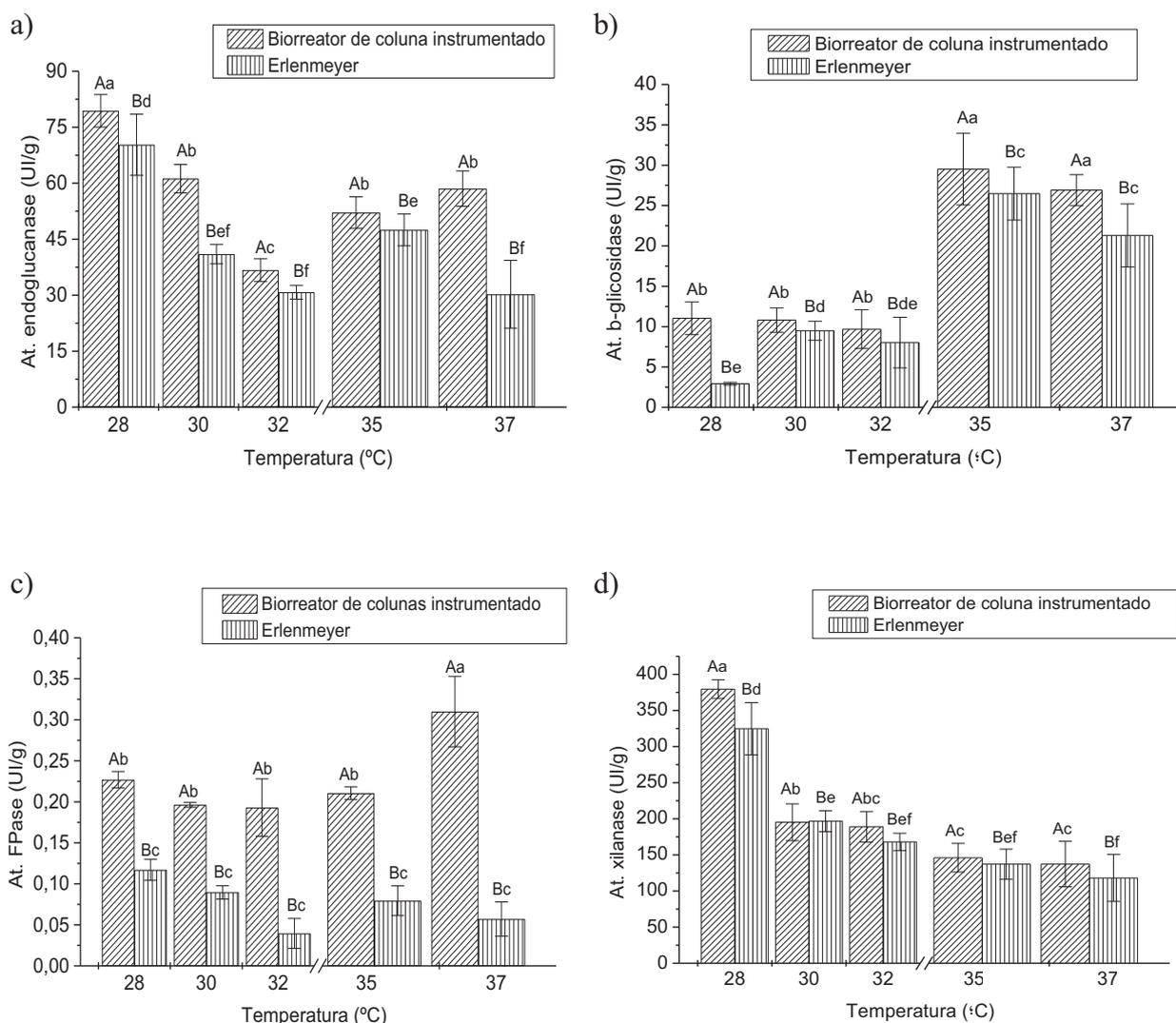
temperatura, em ambos os sistemas de cultivos utilizados. Os valores de atividade de endoglucanase variaram na faixa de 36,7-79,4 UI/g quando se utilizou aeração forçada e na faixa de 30,2-70,3 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, um efeito mais pronunciado de temperatura foi observado para aeração estática, uma vez que um aumento de 133% em atividade de endoglucanase foi conseguido pela modulação da temperatura, em comparação com um aumento de 116% quando se utilizou aeração forçada. Em termos de desenvolvimento de bioprocessos, é importante salientar que a biossíntese de endoglucanase por *A. oryzae* foi significativamente sensível a variações de temperatura.

Uma tendência diferente foi observada para β -glicosidase, uma vez que temperaturas mais elevadas de, 35 e 37°C, favoreceram significativamente a produção de β -glicosidase (Fig. 33b). Os valores de atividade de β -glicosidase variaram na faixa de 9,7 e 29,5 UI/g quando se utilizou aeração forçada e na faixa de 2,9 e 26,5 UI/g quando se usou aeração estática. Assim, para β -glicosidase um efeito mais pronunciado da temperatura também foi observado pela aeração estática, com um aumento de 813% em atividade de β -glicosidase obtido por modulação da temperatura, em comparação com um aumento de 204% quando se utilizou aeração forçada.

Com relação à atividade de FPase, a temperatura de 37°C foi significativamente favorável a produção de celulase em termos de FPase (Fig. 33c). Os valores de atividade de FPase variaram de 0,19 a 0,31 UI/g quando se utilizou aeração forçada e de 0,10 a 0,12 UI/g quando se utilizou aeração estática. No que se refere à atividade de FPase, um efeito mais pronunciado foi observado pela aeração forçada, com um aumento de 63% na atividade de FPase alcançada pela modulação da temperatura, quando comparado com um aumento de 20% quando se utilizou aeração estática.

A temperatura favorável para a produção de xilanase foi de 28°C (Fig. 33d). A produção de xilanase foi significativamente afetada pela temperatura, em ambos os sistemas de cultivos utilizados. A atividade de xilanase variou de 137,2 a 379,7 UI/g quando se utilizou aeração forçada e de 118,2 a 324,7 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, as condições de aeração forçada e estática aumentaram a produção de xilanase em 177 e 175%, respectivamente, ou seja, para produção de xilanase não houve diferença entre a modulação de temperatura dos sistemas.

Figura 33 – Efeito da temperatura sob (a) a produção de endoglucanase, (b) β -glucosidase (c) FPase e d) xilanase por *A. oryzae* cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática, em 72h de processo.



Letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas para a fermentação em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos no biorreator e no erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a,b,c,d,e,f ou A,B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

É importante salientar que a temperatura é uma variável importante na FES e que afeta o crescimento microbiano e, por conseguinte, interfere na formação do produto. No

entanto, o momento em que a atividade da enzima atinge seu nível máximo pode variar de acordo com a temperatura de cultivo. Aqui, consideramos o valor de atividade de um determinado período de cultivo (72h), a fim de simplificar a análise nesta etapa. No entanto, uma análise mais completa da influência da temperatura sobre o crescimento microbiano é discutida nas secções seguintes.

A influência da temperatura na produção de celulasas e xilanase por outras linhagens de *Aspergillus* cultivadas sob FES foi relatada. Jecu (2000) estudou o efeito da temperatura sobre a produção de endoglucanase por *A. niger* entre as temperaturas de 25 e 37°C e descobriu que a melhor produção de endoglucanase foi na faixa de 28-34°C. Jabasingh e Nachiyar (2011) estudaram a influência de diferentes variáveis sobre a produção de celulasas por *A. nidulans* MTCC344 utilizando a metodologia de superfície de resposta. O efeito da temperatura foi avaliado entre o intervalo de 20 a 60°C, e o valor ótimo para a produção de celulase foi encontrado ser a 37,5°C. Kheng e Omar (2005) também estudaram a influência de diferentes variáveis sobre a produção de xilanase por *A. niger* em FES usando torta de palmiste (subproduto do óleo de palma) como substrato. O efeito da temperatura foi avaliado entre os intervalos de 25 a 37°C, e o valor máximo de xilanase (14,4 UI/g) foi obtido a 28±3°C. Pal e Khanum (2010) estudaram vários parâmetros de produção de xilanase por *A. niger* em FES. Entre os parâmetros, o efeito de temperatura foi avaliado em um intervalo de 30 a 43°C. A produção mais elevada de xilanase (2596 UI/g) foi obtida a 40°C depois de 6 dias de cultivo, em temperaturas mais altas que 40°C a produção caiu nitidamente. De forma semelhante ao efeito do teor de umidade, a caracterização particular de cada micro-organismo, em termos de influência da temperatura na cinética de crescimento e formação de produto é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos para a FES. Com base nos resultados anteriores, o teor de umidade inicial de 70% e a temperatura de 28°C foram seleccionadas para a avaliação dos perfis de produção de celulasas e xilanases durante um período de 120 h de cultivo.

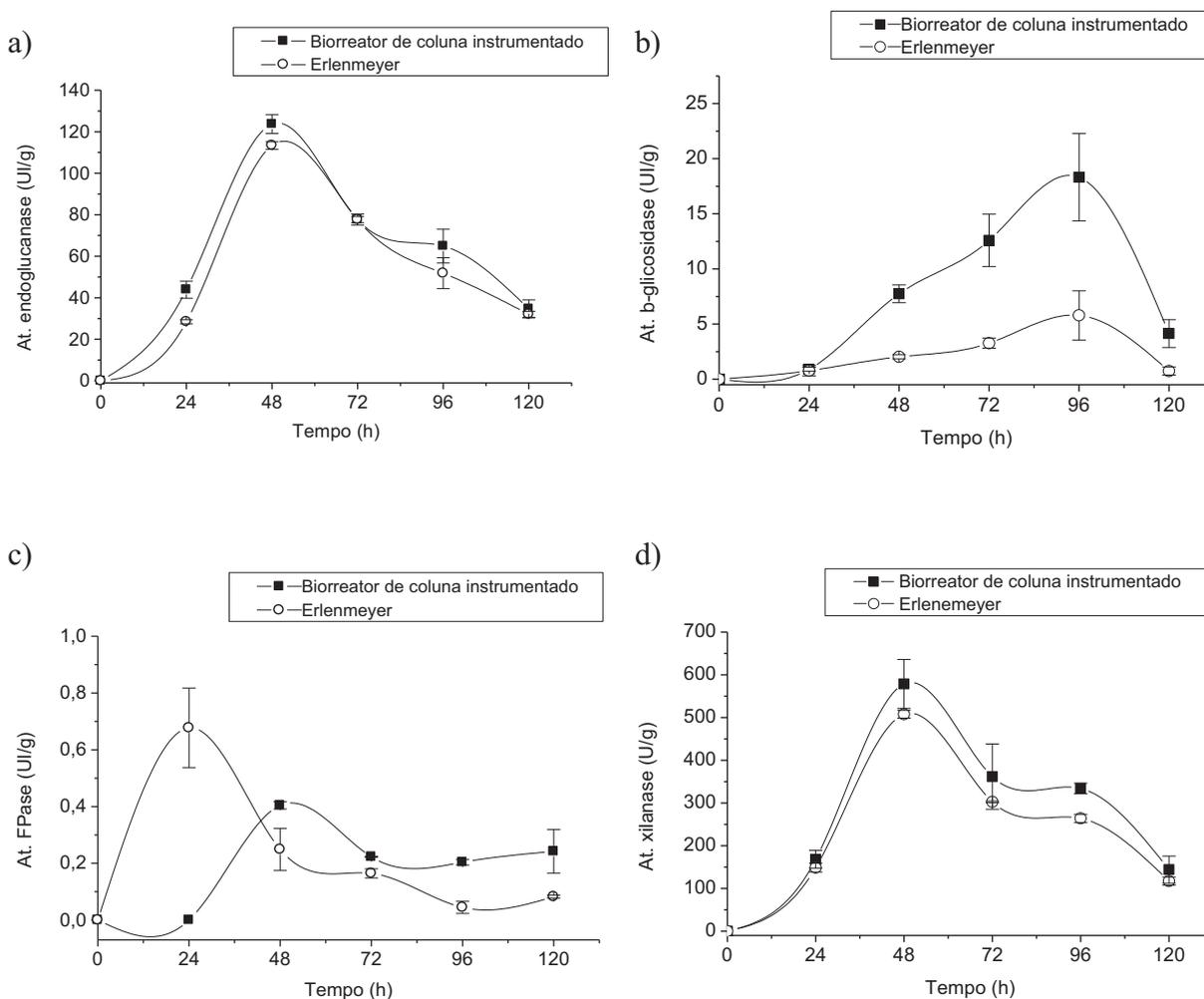
4.3.4. Perfil de produção de celulasas e xilanase por *A. oryzae* sob as condições seleccionadas

Os perfis de produção de celulasas e xilanases foram avaliados durante um período de 120 horas, utilizando as condições operacionais seleccionadas (temperatura de 28°C e teor de umidade inicial do substrato de 70%, mantendo a umidade de entrada do ar a 80% e uma vazão de 20 mL/min). os perfis de produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e

xilanase estão ilustrados nas Figuras 34a-d, respectivamente. A fim de comparar a eficácia do sistema utilizado, um conjunto idêntico de cultivos foram conduzidos sob condição de aeração estática.

As atividades de endoglucanase, FPase e xilanase no biorreator atingiram o seu valor máximo (123,6, 0,40 e 578,7UI/g, respectivamente), em 48 horas de cultivo, enquanto que os maiores valores de β -glucosidase (18,3 UI/g) foram alcançados em 96 horas de cultivo, para ambos os sistemas de cultivo utilizados. No entanto, as vantagens da FES operada sob condições de aeração forçada podem ser verificadas através da comparação dos resultados obtidos em condições estáticas (Fig. 34a-d). Assim, o sistema dinâmico utilizado aqui foi muito útil no controle das condições operacionais de FES para uma maior eficiência de produção de enzimas.

Figura 34 – Perfis de produção de celulases e xilanase por *A. oryzae* cultivado sob FES, por 120 horas, a 28°C, teor de umidade inicial de substrato de 70%, umidade do ar de entrada de 80%, e uma vazão de 20 mL/min.



Mo, Zhang e Li (2004) desenvolveram um sistema de controle de gás para melhorar a produção de celulases por *Penicillium decumbens* por FES e descobriram que a aeração forçada teve um efeito positivo sobre a produção de celulases por *P. decumbens* sob FES. Ridder, Nokes e Knutson (1999) também observaram que a aeração forçada influenciou na produção de xilanases por *Trichoderma Longibrachiatum* sob FES. Deshpande et al. (2008) compararam a produção de celulases e xilanases por *T. reesei* em frascos Erlenmeyer (aeração estática) e fermentador *cabinet* de estado sólido (semelhante ao biorreator de bandeja) e observaram que a produção de FPase foi melhor sob condições de aeração forçada (fermentador). Milagres et al. (2004) obtiveram níveis elevados de xilanase (1597 UI/g)

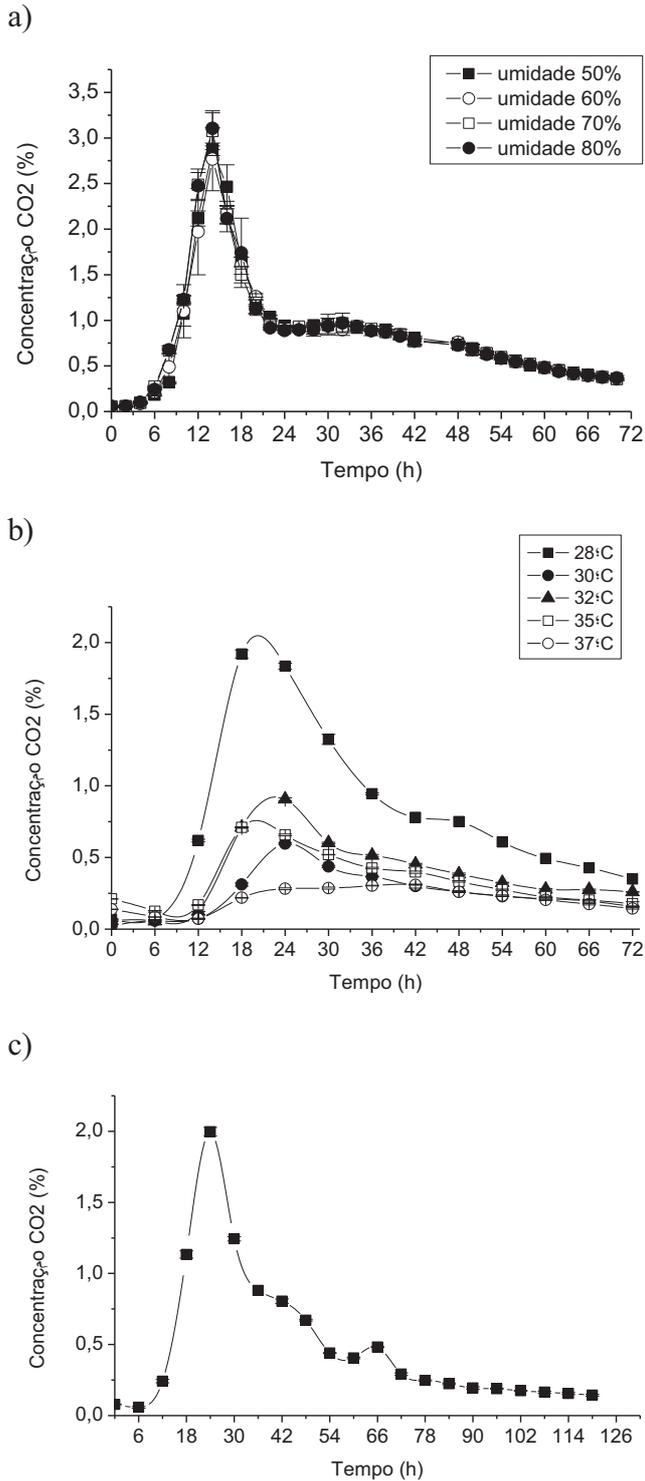
depois de 10 dias de FES em biorreator de coluna com aeração forçada usando *Thermoascus aurantiacus* em bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Em trabalhos anteriores, a produção de endoglucanase de até 56,1 UI/g foi obtida utilizando-se farelo de trigo como substrato sólido e uma linhagem de *Aspergillus niger* (FARINAS et al., 2011). Os valores obtidos aqui para a produção de endoglucanase foram 2,2 vezes maiores, demonstrando a importância da caracterização de novas linhagens de fungos em termos de produção das enzimas que degradam biomassa.

4.3.5. Análise respirométrica

A evolução do CO₂ durante o processo de fermentação foi monitorada através de um sensor ligado à corrente de gás que sai das colunas do sistema de biorreator. Dados de CO₂ podem fornecer elementos importantes para a compreensão das relações entre o crescimento dos fungos e a produção de enzimas, uma vez que é difícil medir a biomassa em FES, devido à dificuldade de separar a biomassa do substrato utilizado para a fermentação (RAIMBAULT, 1998). As Figuras 35a-c apresentam a evolução do CO₂ sob as fermentações realizadas para avaliar os efeitos do teor de umidade inicial, temperatura e perfil de produção enzimática sob a condição operacional selecionada, respectivamente.

Pode-se observar que as curvas de evolução do CO₂ representadas na Figura 35a são muito semelhantes. Isso pode implicar que o crescimento do fungo não foi afetado pelos diferentes teores de umidade utilizados, o que está de acordo com a observação anterior de que a produção de celulasas e xilanasas não foram significativamente afetadas pela umidade inicial ao utilizar um sistema de biorreator com aeração controlada e condições de umidade relativa do ar (Figura 35a).

Figura 35 – Evolução de CO₂ durante a produção de celulases e xilanases por *A.oryzae* cultivado sob (a) diferentes teores de umidade inicial, (b) diferentes temperaturas e (c) condição operacional selecionada (temperatura de 28°C, o teor de umidade inicial de substrato de 70%, uma umidade do ar de entrada de 80%, e uma vazão de 20 mL/min).



A fim de melhor avaliar a significância das curvas de evolução de CO₂ obtidos com diferentes teores de umidade inicial, a velocidade específica de crescimento (μ) foi obtida através da análise de regressão da equação 1. O perfil de crescimento foi ajustado muito bem pela equação logística, como podem ser observados pelos altos coeficientes de correlação alcançados (todos acima de 0,99) (Tabela 9). A equação de deceleração também foi avaliada e resultou em uma correlação semelhante (dados não mostrados). No entanto, a equação logística devido ao significado físico conhecido de seus parâmetros bem como ao vasto uso na literatura relacionada à FES. A velocidade de crescimento específico calculada foi semelhante para todas as condições de teor de água inicial investigadas (Tabela 9). No entanto, pode-se observar que o maior o valor de μ (0,532 1/h) foi conseguido ao usar um teor de umidade inicial de 70%. Isto está de acordo com a condição de umidade selecionada com base na produção de celulasas e xilanases. Pode-se observar que os cultivos em diferentes umidades iniciais do substrato não mostraram efeito significativo no tempo de fase lag.

Tabela 9 – Efeito do teor de umidade inicial dos parâmetros de fermentação obtidas utilizando a equação logística.

Teor de umidade inicial (%)	CO ₂ produzido na fase exponencial (mmol)	$C_m/C_0 - 1$	Fase lag (h)	μ (1/h)	R^2
50	1,14E-02	56,6	7,2	0,518	0,994
60	1,09E-02	53,7	7,0	0,511	0,995
70	1,18E-02	58,3	6,7	0,532	0,994
80	1,15E-02	57,0	6,7	0,523	0,995

Em termos do efeito da temperatura sobre o crescimento dos fungos, pode-se observar que as curvas de evolução de CO₂ representadas na Figura 35b são muito distintas, apresentando um crescimento notável quando o cultivo foi realizado a 28°C. Este crescimento significativamente favorável a 28°C está de acordo com a condição de maior produção de endoglucanase e xilanase (Figura 33a e 33d). Da mesma forma, o CO₂ total acumulado, assim, como as velocidades específicas de crescimento calculadas foram distintas para todas as condições de temperatura utilizadas (Tabela 10). Pode-se observar que o maior valor de μ (0,430 1/h), foi obtido quando se utilizou uma temperatura de 28°C. Isto está de acordo com a temperatura selecionada com base na produção de celulasas e xilanases.

Tabela 10 – Efeito da temperatura sob os parâmetros de fermentação obtidos utilizando a equação logística.

Temperatura (°C)	CO ₂ Produzido na				
	fase exponencial (mmol)	C _m /C ₀₋₁	Fase lag (h)	μ (1/h)	R ²
28	1,05E-02	51,76	9,9	0,430	0,993
30	3,30E-03	15,6	16,7	0,375	0,995
32	5,13E-03	24,82	14,8	0,410	0,995
35	3,82E-03	18,26	12,4	0,353	0,995

A análise da evolução de CO₂ no cultivo realizado para obter os perfis de produção de celulasas e xilanasas para as condições operacionais selecionadas (temperatura de 28°C, o teor de umidade inicial do substrato de 70%, umidade do ar de entrada de 80%, e uma vazão de 20 mL/min) ao longo de um período de 120 horas são ilustradas na Figura 34. O CO₂ total produzido durante a fase exponencial de (9,09 mmol), bem como o valor de μ (0,40 1/h) estão em concordância com os resultados descritos anteriormente (Tabela 10).

4.4. Conclusões

A avaliação de uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* isolada do solo da Floresta Amazônica para produção de celulasas e xilanasas utilizando FES sob condições operacionais controladas foi estudada usando um biorreator de coluna instrumentado. Os resultados obtidos permitiram a seleção de variáveis que puderam ser ajustadas de modo a melhorar a produção de celulasas e xilanasas. As produções mais elevadas de FPase, endoglucanase, β-glucosidase e xilanase foram obtidas utilizando um teor de umidade inicial de substrato de 70% e temperatura de 28°C utilizando uma umidade relativa do ar de 80% e vazão de ar de 20 mL/min. Dessa forma, conclui-se que umidades mais elevadas e temperaturas mais baixas são melhores para produção de celulasas e xilanasas por *A. oryzae* P27C3A, e que a otimização dessas variáveis operacionais levaram a uma maior produção de enzimas por este fungo.

4.5. Referências

ABE, K.; GOMI, K.; HASEGAWA, F.; MACHIDA, M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. **Mycopathologia**, v.162, p.143-153, 2006.

BOGAR, B., G; SZAKACS, R.; TENGERDY, J. L.; PANDEY, A. Production of alpha-amylase with *Aspergillus oryzae* on spent brewing grain by solid substrate fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102, p. 453-461, 2002.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SIRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012-1018, 2008.

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

DESHPANDE, S. et al. Production of cellulases and xylanases by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eihornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, p. 449-456, 2008.

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.

FARID M.; SHATA, H. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 267-274, 2011.

GAO, D. et al. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, n. 5, 2011.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

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

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

HU, H.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, H.; WOSTEN, J. G.; DE VRIES, R. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 248-252, 2011.

JABASINGH, S. A. Response Surface Methodology for the Evaluation and Comparison of Cellulase Production by *Aspergillus nidulans* SU04 and *Aspergillus nidulans* MTCC344 Cultivated on Pretreated Sugarcane Bagasse. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 25, n. 4, p. 501-511, 2011.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2000.

KAREEM, S.; AKPAN, I.; ODUNTAN, S. Cowpea waste: A novel substrate for solid state production of amylase by *Aspergillus oryzae*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 974-977, 2009.

KAVYA, V.; PADMAVATHI, T. Optimization of Growth Conditions for Xylanase Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 125-130, 2009.

KHENG, P.P.; OMAR, I.C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 27, p. 325-336, 2005.

KOBAYASHI, T. et al. Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2007.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2373-2383, 2008.

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

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. J. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters**. v. 33, p. 469-476, 2011.

MILAGRES, A. et al. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1387-1391, 2004.

MILLER, G. USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGAR. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. **Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and overview**. Springer, 2006.

MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1293-1297, 2004.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7563-7569, 2010.

PARK, Y. S. et al. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 761-766, 2002.

PENGTHAMKEERATI, P.; NUMSOMBOON, S.; SATAPANAJARU, T.; CHAIRATTANAMANOKORN, P. Production of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae* from cassava bagasse and wastewater sludge under solid-state fermentation. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 31, 122-129, 2012.

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 127-135, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Electron J Biotechnol**, v. 1, p. 21-32, 1998.

RAIMBAULT, M.; GERMON, J. **Procédés d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides**. 76.06.677, 1976.

RIDDER, E.; NOKES, S.; KNUTSON, B. Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **Transactions of the ASAE**, v. 42, n. 6, p. 1785-1790, 1999.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NARNPOOTHIRI, K.; C. SOCCOL, C.; PANDEY, A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66, 621-626, 2007.

SZENDEFY, J.; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1354-1360, 2006.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

XU, H.; SUN, L. ZHAO, D.; ZHANG, B.; SHI, Y.; WU, Y. Production of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 529-535, 2008.

Capítulo 5 - Aumento da produção de xilanases por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2 isolada do solo da Floresta Amazônica utilizando fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas

Rosangela Donizete Perpetua Buzon Pirolta; Mariana Tonelotto; Priscila Delabona; Rafael Frederico Fonseca; Douglas Antonio Alvaredo Paixão; Flávio César Freire Baleeiro; Victor Bertucci Neto; Cristiane Sanchez Farinas

*Manuscrito modificado e publicado na Revista Internacional **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, 2013*

Resumo

Estudos de bioprocessos no sentido de melhorar a produção de xilanases são de grande valor, devido à importância destas enzimas em várias aplicações industriais. Este trabalho avaliou o efeito das condições operacionais sobre a produção de xilanases por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2 isolada da Floresta Amazônica. O fungo foi cultivado em estado sólido utilizando um biorreator de coluna instrumentado de escala de laboratório, equipado com um sistema de controle e monitoramento. Os efeitos do teor de umidade inicial do substrato e da temperatura na produção de xilanases foram avaliados e comparados com as condições estáticas. Foi notável o efeito positivo sobre a produção de xilanases por FES sob as condições controladas de aeração forçada comparada com as condições estáticas. As condições selecionadas para a caracterização resultaram em maior produção de xilanases (2830,7 UI/g), que foi alcançada utilizando um teor de umidade inicial do substrato de 80%, a 28°C, com uma vazão de ar de 20 mL/min e uma umidade de entrada de ar de 80%. Os resultados da análise respirométrica mostraram boa correlação com a produção de enzimas, sugerindo que estes dados podem ser muito úteis para a otimização e estudos de bioprocessos em grande escala.

5.1. Introdução

As enzimas endo- β -1,4-xilanases (xilanases) clivam as ligações glicosídicas β -1,4 entre os resíduos de xilose da cadeia principal de xilana e são uma das mais importantes atividades enzimáticas necessárias para a despolimerização do componente hemicelulósico das paredes celulares das plantas (DODD; CANN, 2009), uma vez que a xilana representa o componente mais abundante das hemiceluloses (SAHA, 2003). A estrutura da parede celular das plantas consiste principalmente de celulose (20-50% em base de peso seco), hemiceluloses (15-35%) e lignina (10-30%) (CHUNDAWAT et al., 2011). Portanto, a desconstrução das hemiceluloses a açúcares constituintes é importante para o uso eficiente da

biomassa da planta na produção de combustível e outros produtos químicos (DODD; CANN 2009). A aplicação das xilanases em conjunto com as enzimas celulolíticas é considerada fundamental para a bioconversão de materiais lignocelulósicos (PARK et al., 2002). A ação das xilanases, bem como de outras enzimas auxiliares, é relatado melhorar a conversão de celulose, removendo a hemiceluloses e conseqüentemente aumentando a acessibilidade das celulasas à celulose (GAO et al., 2011). Além disso, as xilanases apresentam várias aplicações industriais importantes do setor de alimentos (frutas e vegetais, processamento de cerveja, produção de vinho) e no setor técnico (papel e celulose, têxtil, biorremediação/bioconversão) (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Em escala industrial, as xilanases são produzidas principalmente por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (PARK et al., 2002).

As xilanases podem ser produzidas industrialmente em cultivo submerso ou sobre um substrato sólido, sendo que cerca de 80-90% de todas as xilanases são produzidas em cultivo submerso (POLIZELI et al., 2005). No entanto, a utilização da fermentação em estado sólido (FES) é particularmente vantajosa para a produção de enzimas de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos (HOLKER; LENZ, 2005). No entanto, algumas limitações operacionais da FES, como dificuldade em controlar o nível de umidade do substrato e o acúmulo de calor, têm limitado a sua aplicação industrial. Na verdade, a caracterização de cada micro-organismo em termos de influência da temperatura e do teor de umidade do substrato sobre a cinética de crescimento e formação de produto é essencial para o processo de FES em grande escala. Estudos anteriores demonstraram a importância de avaliar a influência dos parâmetros operacionais de processo na produção de celulasas por *Aspergillus niger* cultivado por FES usando condições controladas de aeração forçada e umidade relativa do ar de admissão (FARINAS et al., 2011).

Estudos relacionados com a produção de xilanases por diferentes linhagens de *Aspergillus* cultivadas por FES são descritas na literatura. As linhagens consideradas incluem *A. tubingensis* (PANDYA; GUPTA 2012), *A. niger* (MACIEL et al., 2009;. PAL; KHANUM 2010; RODRIGUEZ-FERNANDEZ et al., 2011;. DHILLON et al., 2012;. JIN et al., 2012;. NCUBE et al., 2012), *A. Awamori* (UMSZA-GUEZ et al., 2011), *A. flavus* (PAL; KHANUM, 2011), *A. foetidus* (CHAPLA et al., 2010; VALTE et al., 2010), *A. carneous* (FANG; LIAO; LEE, 2010), *A. terreous* (LAKSHMI et al., 2009), *A. fumigatus* (SOUZA et al., 2012), *A. sulphureus*, entre outros. Szendefy et al. (2006) e Yamane et al. (2002) avaliaram a produção de xilanase por *A. oryzae* por FES. No entanto, para o melhor de nosso conhecimento, não há

estudos sobre a caracterização de linhagens de *Aspergillus oryzae* para a produção de xilanase usando FES sob condições operacionais controladas. Dado o potencial das linhagens de *Aspergillus oryzae* e sua aplicação na produção de enzimas de reconhecimento industrial, existe um grande interesse na caracterização do fungo em termos de produção de xilanase usando FES.

O presente trabalho investigou os efeitos das condições operacionais na produção de xilanase por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2 isolada da Floresta Amazônica, cultivada por FES utilizando biorreator de coluna instrumentado de escala laboratorial. A influência da temperatura e do teor de umidade inicial do substrato sobre a eficiência da produção de xilanase foi avaliada, e foram feitas comparações com as condições de aeração estática. As condições selecionadas foram utilizadas para a caracterização dos perfis de produção enzimática e estudos da análise respirométrica.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Biorreator de coluna instrumentado

O biorreator utilizado foi um sistema de escala laboratorial adaptado de Raimbault e Germon, (1976) que consiste de 16 colunas de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento imersas em banho de água, para controle de temperatura (Fig. 36). O biorreator foi equipado com um sistema para monitorar e controlar a vazão de ar e umidade relativa do ar de admissão, tal como anteriormente descrito por Farinas et al., (2011). A vazão de ar e a umidade relativa do ar de admissão foram mantidas constante durante todos os cultivos, a 20 mL/min e 80%, respectivamente.

Figura 36 – Biorreator de coluna instrumentado.



Foto: Rosangela D. P. Buzon Pirota

5.2.2. Seleção do micro-organismo

Inicialmente, foi realizada a seleção de 40 linhagens de fungos isoladas do solo e de madeira em decomposição da Floresta Amazônica (DELABONA et al., 2012) produtoras de endoglucanase por FES. Neste primeiro passo, um conjunto de cultivos por FES foi realizado, a 35°C, por 10 dias, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g de farelo de trigo lavado. O material foi inoculado com 10^7 esporos/g de substrato. Após a inoculação dos esporos foi adicionado aos frascos a solução nutriente modificada de Mandels e Sternberg, (1976), até a obtenção de uma umidade de 60% (massa/volume). As enzimas foram extraídas em intervalos de 24 e 48 horas e analisadas como descrito nas seções 5.2.5 e 5.2.7, respectivamente. A seleção baseou-se no critério de produtividade ($IU/g \cdot h^{-1}$) das diferentes linhagens. A produtividade foi calculada em termos de unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g) dividido pelo tempo (em horas). Dessa forma, o micro-organismo selecionado e abordado neste estudo foi uma linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2. Este micro-organismo encontra-se depositado no Banco da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil).

5.2.3. Seleção das condições operacionais para o cultivo por FES

Os cultivos no biorreator foram realizados por 72 horas usando farelo de trigo lavado como substrato sólido. O meio sólido foi esterilizado em autoclave, a 121°C, por 20 minutos e as colunas foram esterilizadas, por 2 horas, a 121°C em estufa antes da inoculação. Cada coluna foi preenchida com 5g de farelo de trigo lavado que foi esterilizado separadamente em béquer de 250 mL. Um volume de suspensão de esporos correspondente a 10^7 esporos/g foi inoculado no próprio béquer contendo o substrato sólido e o teor de umidade foi ajustado com uma solução nutriente (MANDELS; STERNBERG, 1976). O substrato sólido úmido foi homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro e as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. A estratégia adotada para a seleção das condições operacionais de FES foi avaliar a variável individualmente e, em seguida, selecionar o melhor valor obtido a partir de cada variável e incorporar na etapa de seleção da próxima variável. Inicialmente, os cultivos foram realizados a 35°C com um teor de umidade inicial do substrato variando de 50, 60, 70 e 80%. Após a seleção do teor de umidade mais favorável, diferentes temperaturas (28, 30, 32, 35 e 37°C) foram avaliadas usando um teor de umidade inicial de 70%. Todos os cultivos foram também realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sobre condições idênticas (gramas de substrato sólido, umidade e temperatura), a fim de comparar os resultados obtidos sob o sistema de aeração forçada (biorreator) com o de aeração estático. Em 72 horas, as enzimas foram extraídas e analisadas como descritas nas seções 5.2.5 e 5.2.7, respectivamente. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas.

5.2.4. Perfil de produção de celulasas e xilanasas

Após a definição da melhor condição operacional para o cultivo de *A. oryzae* P6B2 por FES, os perfis de produção de celulasas e xilanasas foram avaliados durante um período de cultivo de 120 horas. Foram utilizadas as condições operacionais selecionadas: velocidade de fluxo de ar de 20 mL/min, umidade relativa do ar de 80%, teor de umidade inicial de substrato de 80% e temperatura de 28°C. Os cultivos foram também realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sobre condições idênticas, a fim de comparar o sistema de aeração forçada (biorreator) com o de aeração estático. As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas, e as enzimas foram extraídas e analisadas como descritas nas seções 5.2.5 e 5.2.7, respectivamente.

5.2.5. Extração das enzimas

Após o período de cultivo, o meio sólido foi transferido para frascos Erlenmeyer (no caso dos cultivos em coluna) e as enzimas foram extraídas por adição de 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, para obter uma proporção sólido/líquido de 1:10. A suspensão foi homogeneizada e posteriormente agitada, a 120 rpm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. 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.

5.2.6. Análises respirométricas

A análise respirométrica foi realizada medindo-se o CO₂ na saída de ar de cada coluna do sistema de biorreator, utilizando-se um instrumento GMM 220 (Vaisala, Finlândia). A quantidade cumulativa de CO₂ produzido foi calculada a partir da área sob a % de CO₂ versus a curva do tempo de cultivo. Os dados do CO₂ produzido até o final da fase exponencial (aproximadamente 15 h após o final da fase de latência) foram ajustados a partir de equações diferentes de comparação de comportamento de crescimento celular, a equação logística, a equação de desaceleração e o ajuste foram realizados por meio de uma regressão não linear usando o software numérico (Origin, versão 8.0). A equação logística (1) Mitchell, Berovič e Krieger, (2006) foi escolhida para o cálculo da velocidade de crescimento específico, μ , para cada condição experimental, variando-se a umidade inicial do substrato e a temperatura, bem como o cultivo realizado por estimativa do perfil cinético sob a condição operacional selecionada.

$$C = \frac{C_m}{1 + \left(\frac{C_m}{C_0} - 1 \right) e^{-\mu t}} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, C é o teor de biomassa (em termos de CO₂ mmol), C_m é o teor de biomassa máxima (em termos de CO₂ mmol), C₀ é o teor inicial de biomassa (em termos de CO₂ mmol), μ é a taxa de crescimento específico (1/h) e t é o tempo. Na Equação 1, o CO₂ produzido foi usado para descrever o crescimento celular. Esta suposição é razoável, uma vez que, no período exponencial o CO₂ gerado para manutenção é mais baixo do que o CO₂ produzido para o crescimento, o que faz com que seja possível ajustar a produção de CO₂ durante este período com uma curva logística, como para o perfil de biomassa. A quantidade inicial de CO₂ (C₀) a partir de cada experimento foi assumido ser a mesma (1,99 E-04 mmoles

de CO₂), uma vez que a concentração de inóculo foi fixada para estes estudos. O CO₂ máximo (C_m) foi calculado como a quantidade total de CO₂ produzido até ao final da fase exponencial (que correspondeu a aproximadamente 15 h depois do final da fase de latência).

5.2.7. Ensaio de atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de celulases e xilanase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com o procedimento padrão recomendado pela IUPAC (WOOD; BHAT, 1988), com algumas modificações. A atividade de FPase foi realizada segundo a metodologia de Ghose (1987). A atividade de endoglucanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL de extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 4% (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8. Esta mistura foi incubada a 50°C, por 10 minutos. A atividade de xilanase foi determinada de maneira similar, exceto que uma solução de xilana a 1% (xilana *Birchwood*, Sigma) foi utilizada como substrato em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. Finalmente, a atividade de β -glicosidase foi realizada usando-se uma solução de celobiose a 0,5% (Sigma) como substrato e a glicose liberada foi quantificada a partir do Kit de glicose (Laborlab, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade de FPase e endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de xilanase corresponde a um μ mol de xilose liberada por minuto, sob as condições de ensaio. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g).

5.2.8. Análise estatística

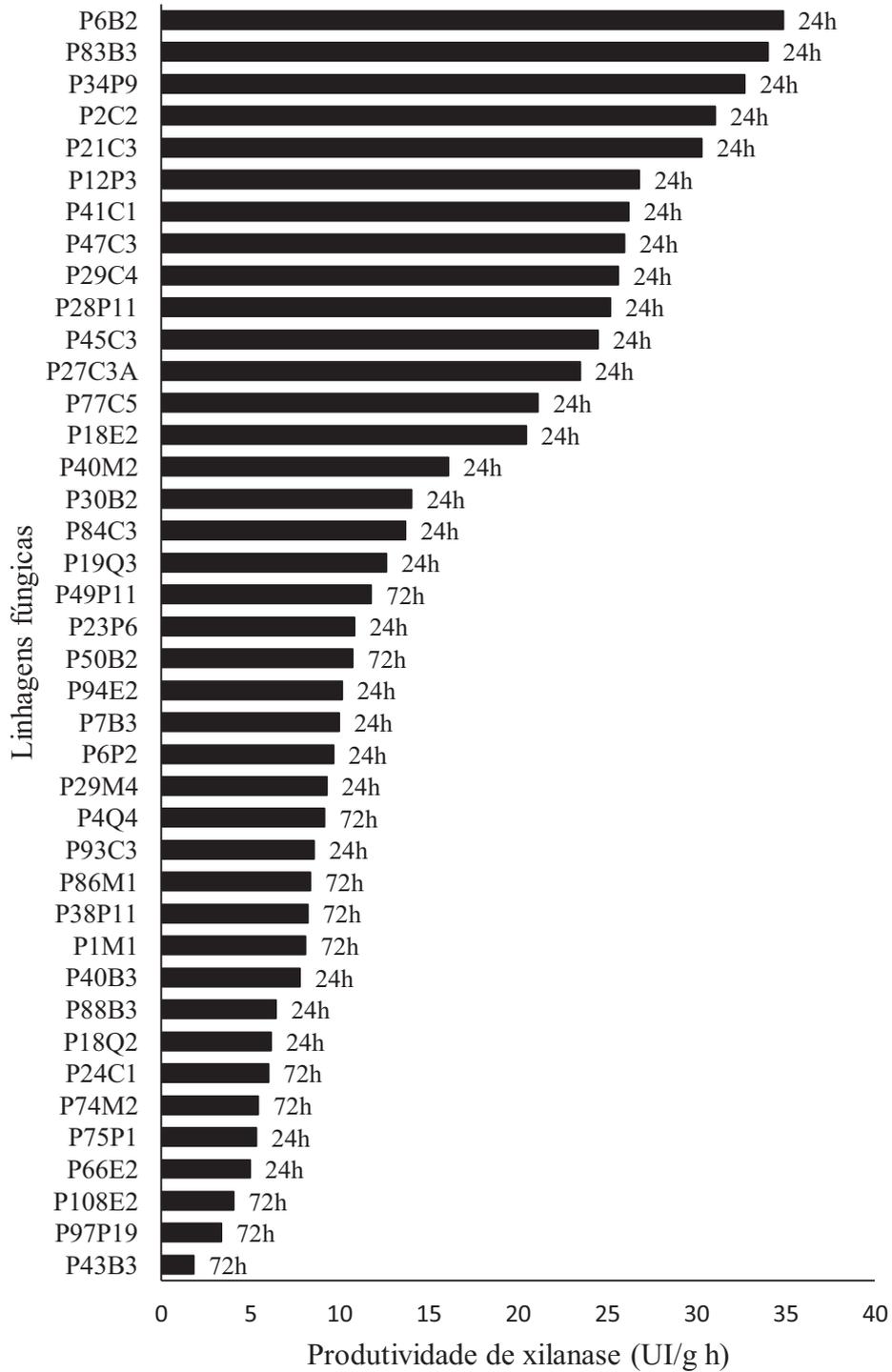
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O teste Tukey foi aplicado com a finalidade de verificar se os diferentes valores de umidade (50, 60, 70 e 80%) e temperatura (28, 30, 32, 35 e 37°C) utilizados no processo de FES afetam a produção de enzimas pelo fungo e se a produção de enzimas sob condições de aeração forçada é melhor do que em condições estáticas. O nível de significância para o teste de Tukey foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Origin 8.0.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Seleção de linhagens fúngicas produtoras de xilanases

A eficiência da produção de xilanase em termos de produtividade pelas 40 linhagens fúngicas isoladas do solo e da madeira em decomposição da Floresta Amazônica e cultivadas em farelo de trigo por FES é apresentada na Figura 37. A linhagem que apresentou o valor mais elevado de produção e produtividade de xilanases (1076,9UI/g e 34,9 UI/g.h⁻¹, repectivamente) foi a P6B2, que foi identificada molecularmente como *Aspergillus oryzae*. O *A. oryzae* é considerado um fungo não-toxigênico com grande potencial de produção de enzimas industriais e um longo histórico de uso extensivo na indústria de alimentos, o que prova a sua segurança (ABE et al., 2006). Trabalhos recentes sobre o genoma de *A. oryzae* revelaram que ele é altamente enriquecido com genes envolvidos na degradação de biomassa (KOBAYASHI et al., 2007), enfatizando a importância dos estudos de seu potencial para a produção de xilanases.

Figura 37 – Produtividade de xilanase pelas 40 linhagens fúngicas isoladas do solo e da madeira em decomposição da Floresta Amazônica e cultivadas em farelo de trigo por FES.



5.3.2. Efeito do teor de umidade inicial sob a produção de celulases e xilanases

Estudos de produção de celulases e xilanase por *Aspergillus oryzae* P6B2 cultivado sob condições controladas de FES foram realizadas em biorreator de coluna instrumentado. A fim de comparar a eficácia do sistema de biorreator utilizado, um conjunto idêntico de cultivos foram conduzidos sob condições de aeração estática. Primeiramente, o efeito do teor de umidade inicial para a produção de celulases e xilanases foi investigado cultivando *A. oryzae* P6B2 por 72 horas, a 35°C, e utilizando diferentes teores de umidade inicial do substrato (50, 60, 70, e 80%) para fermentação. O efeito do teor de umidade, em termos de produção de celulases e xilanase por *A. oryzae* P6B2 cultivado sob aeração forçada e estática são representados nas Figuras 38a-d.

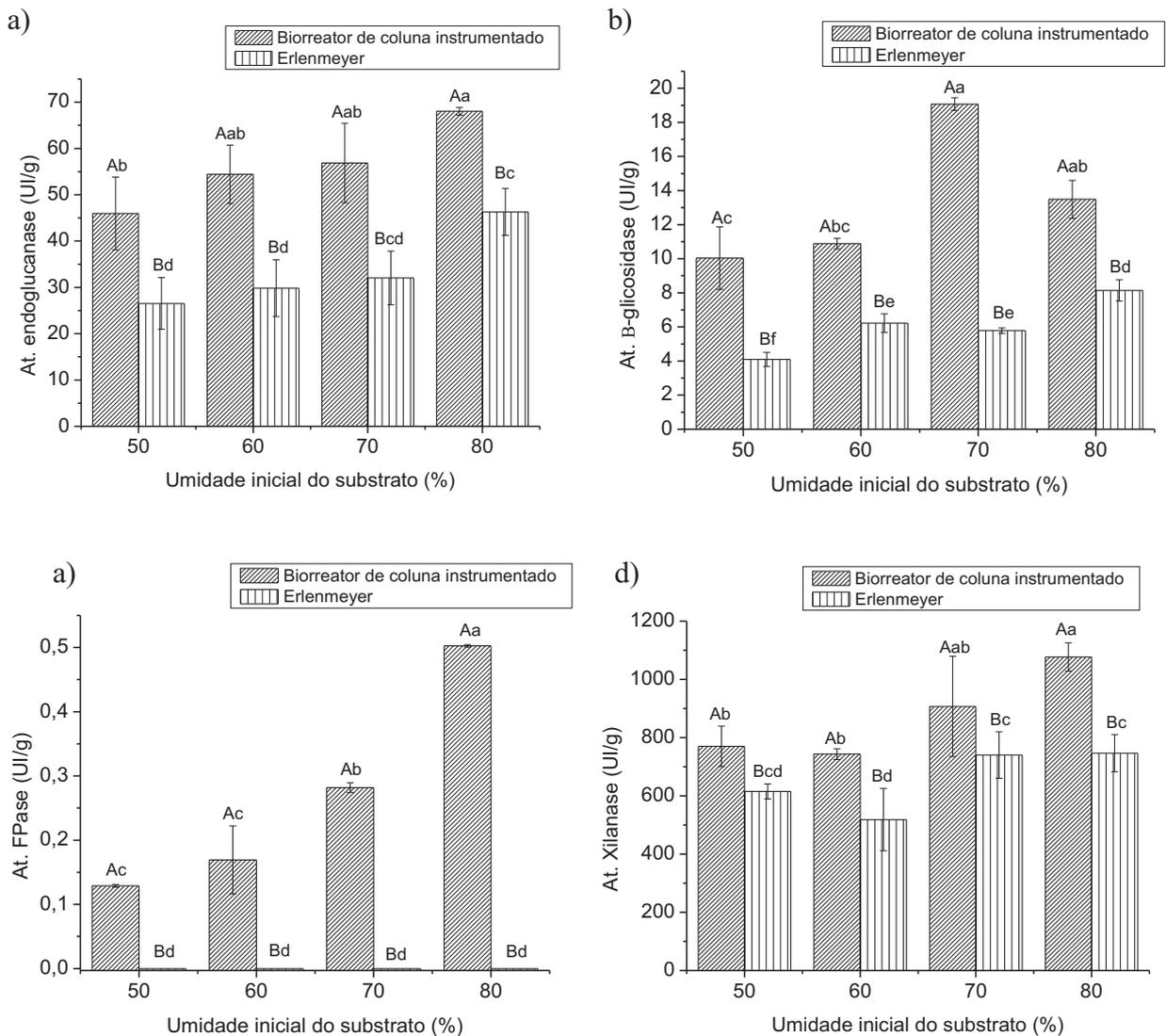
Como pode ser observado, a atividade de celulases e xilanases foram significativamente maiores nos cultivos com aeração forçada do que sob condições de aeração estática (Fig. 38). Para esta série de experimentos, a atividade de endoglucanase, β -glicosidase, FPase e xilanase foram de até 47, 127, 500 e 44% mais elevadas, respectivamente, quando se utilizou aeração forçada, em vez da estática. A menor produção de enzimas em condições estáticas provavelmente está relacionada à limitação de oxigênio durante o crescimento dos fungos, já que o O₂ é transferido por difusão. Além disso, a transferência de oxigênio, a transferência de calor e dissipação de CO₂ são também favorecidas sob condições de aeração forçada.

Em termos do efeito do teor de umidade na produção de endoglucanase, as condições mais favoráveis foram alcançadas utilizando teores de umidade inicial do substrato em torno de 60-80% (Figura 38a). Neste caso, a produção de endoglucanase não foi significativamente afetada pelo teor de umidade inicial em ambos os sistemas de aeração utilizados. Os valores de atividade de endoglucanase variaram de 45,9 a 68 UI/g quando se utilizou aeração forçada e de 26,5 a 46,3 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, um efeito mais pronunciado foi observado para aeração estática, uma vez que o aumento de 74% em endoglucanase foi obtido através da modulação do teor de umidade inicial (50 a 80%), em comparação com um aumento de 48% quando se utilizou aeração forçada. Este resultado pode ser explicado pela capacidade do sistema de aeração forçada manter a umidade do meio de cultivo por umidificação do ar que passa por cada coluna.

Para β -glicosidase, teores de umidade iniciais do substrato mais elevados (70 – 80%) favoreceram significativamente a atividade de β -glicosidase (Figura 38b). Os valores de atividade de β -glicosidase variaram entre 10 – 19 UI/g quando se utilizou aeração forçada e

4,1 – 8,1 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, para β -glucosidase um efeito mais pronunciado foi observado para a aeração estática, com um aumento de 98% em atividade de β -glucosidase obtido por meio da modulação do teor de umidade inicial (50 a 80%), em comparação com um aumento de 90% quando comparado com a aeração forçada.

Figura 38 – Efeito do teor de umidade inicial na produção de celulases e xilanases por *A. oryzae* cultivado em FES com aeração forçada e estática.



Letras minúsculas (a, b, c, d, e) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes umidades tanto em biorreator e quanto em Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre os cultivos em biorreator e Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas

pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a,b,c e d ou A,B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em termos de atividade de FPase, valores maiores foram obtidos utilizando teor de umidade inicial do substrato de 80%, neste caso a atividade de FPase foi significativamente afetada pela umidade inicial do substrato (Fig. 38c). Os valores de atividade de FPase variaram de 0,13 a 0,5 UI/g quando se utilizou aeração forçada, em aeração estática a atividade foi nula. No sistema de aeração forçada a atividade de FPase teve um aumento de 285% através da modulação do teor de umidade inicial de 50 a 80%. A atividade de FPase nula em sistema de aeração estática pode ser devido a má transferência de calor ou limitação de oxigênio durante o crescimento de fungos.

Uma tendência similar da atividade de β -glicosidase foi observada para xilanase, uma vez que a umidade inicial do substrato mais elevada (70 – 80%) proporcionou atividade de xilanase mais elevada em ambos os sistemas de cultivos, estático (740 – 746 UI/g, respectivamente) e forçado (907 – 1077 UI/g, respectivamente). Entretanto, no sistema de aeração forçada a produção de xilanase foi significativamente maior do que em cultivos realizados em condições estáticas (Fig. 38b). Por outro lado, embora os valores de atividade de xilanase variaram de 743 a 1077 UI/g quando se utilizou aeração forçada e de 518 a 746 UI/g quando se utilizou aeração estática, um aumento semelhante de 45 e 44%, respectivamente na atividade de xilanase foi obtida por meio da modulação do teor de umidade inicial.

Entre os vários parâmetros operacionais que afetam a eficiência do processo de FES, o teor de umidade é um dos mais importantes. Se o teor de umidade é muito elevado, os espaços vazios entre as partículas sólidas são cheias com água, resultando na limitação da transferência de oxigênio. No outro extremo, se o teor de umidade for muito baixo, o crescimento do micro-organismo será prejudicado (RAGHAVARAO; RAUGANATHAN; KARANTH, 2003). Conseqüentemente, a identificação do conteúdo de umidade ótima para cada substrato sólido é crucial para a promoção de condições favoráveis de crescimento, e, conseqüentemente, para a produção de metabólitos satisfatória. No entanto, o valor do conteúdo de umidade ótima depende tanto do substrato sólido como do micro-organismo utilizado (RAIMBAULT, 1998).

O efeito do teor de umidade inicial do substrato para a produção de celulases e xilanase de outras linhagens de *Aspergillus* cultivado sob FES foi descrito anteriormente. Liang et al. (2012) avaliaram o efeito de sete níveis de umidade entre 55 e 85% para produção de celulases por *Aspergillus* sp em FES e observaram que a maior produção de FPase (0,75 FPU/g) foi obtida quando o nível de umidade inicial foi de 70%. Prasertsan et al. (1997) otimizaram a produção de celulases e xilanases por *A. niger* por FES usando resíduos de palmiste. O teor de umidade inicial ótimo para atividade de endoglucanase (23,8 UI/g) e xilanase (282,9 UI/g) foi de 50% e 60%, respectivamente. Shenef, El-Tanash e Atia (2010) estudaram a produção de celulases e xilanases por *A. fumigatus* cultivado em substrato misto de palha de arroz e farelo de trigo sob diferentes umidades iniciais do substrato. O fungo expressou maior produção de endoglucanase (14,71 UI/g), exoglucanase (0,93 UI/g), β -glicosidase (8,51 UI/g) e xilanase (42,7 UI/g) depois de quatro dias de cultivo a uma umidade de 75%. Souza et al. (2012) avaliaram a produção de endoxilanase por *A. fumigatus* FBSPE-05 cultivado em três diferentes substratos sólidos sob diferentes níveis de umidade inicial e descobriram que a maior produção ocorreu após 8 dias de incubação utilizando a razão bagaço de cana/meio líquido de 1:2, atingindo 219,5 UI/g. Os autores também verificaram que a proporção de sólido para líquido mais favorável variou para os diferentes substratos sólidos utilizados. Lu, Li e Wu (2003) estudaram a influência do teor de umidade inicial na produção de xilanase por *A. sulfuros* em um sistema de FES em escala piloto e a produção foi extremamente afetada pela umidade. Pal e Khanum (2010) compararam a produção de xilanase por *A. niger* cultivado por FES em seis níveis de umidade entre 55% a 80%. A maior produção de xilanase foi obtida quando a umidade foi de 70%. E umidade muito alta ou muito baixa diminuiu a produção da enzima de forma significativa ($p < 0,05$).

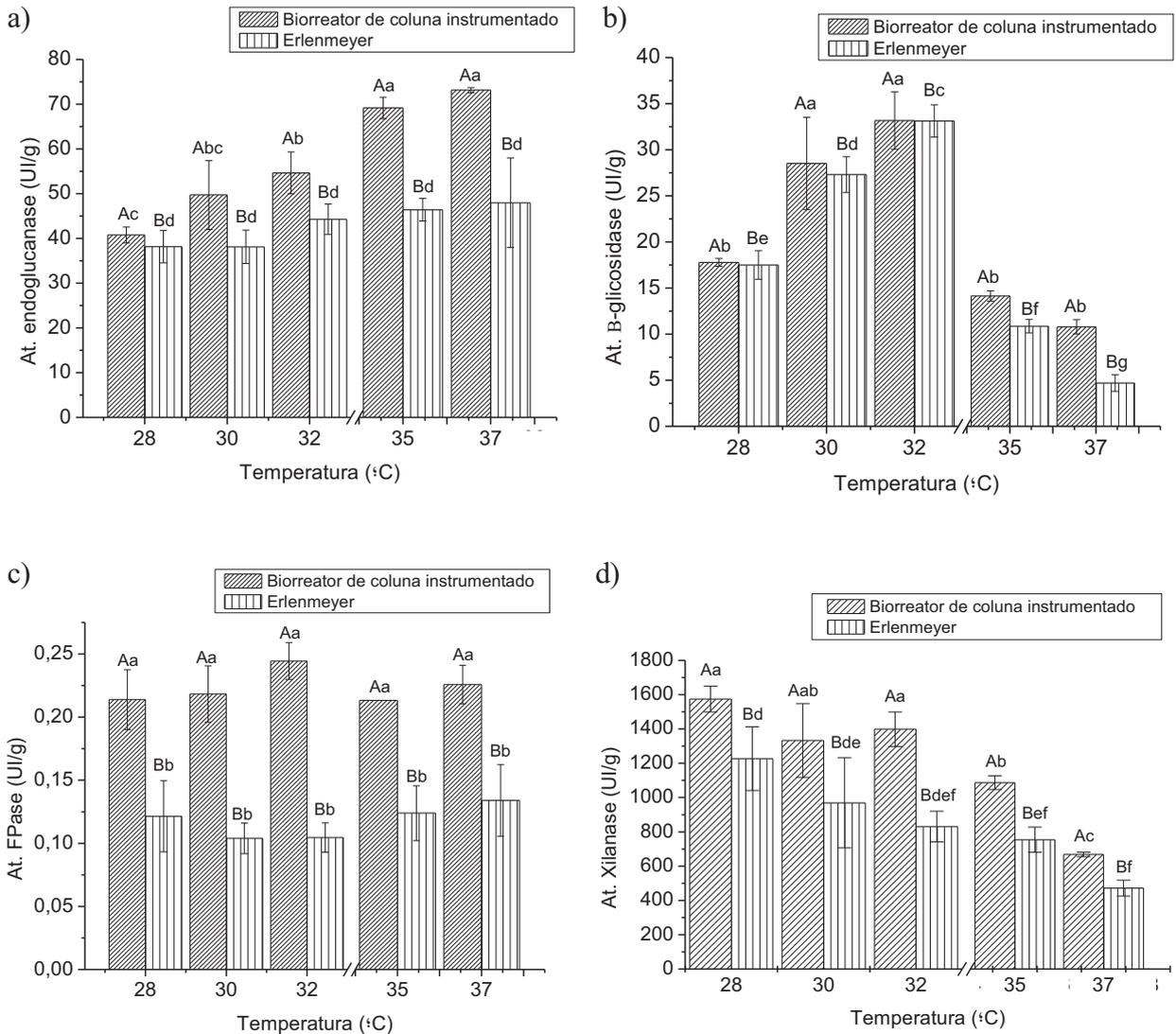
Nossos resultados demonstraram que o teor de umidade inicial também desempenhou um papel importante na produção de celulases e xilanase por *A. oryzae* P6B2. Com base nos resultados de produção de xilanase, o teor de umidade inicial de 80% foi selecionado para mais estudos sobre a avaliação do efeito da temperatura sobre a produção de celulases e xilanase.

5.3.3. Efeito da temperatura na produção de celulases e xilanase

Os cultivos foram realizados usando temperaturas de 28, 30, 32, 35, e 37°C e sistemas de aeração forçada e estática, com um teor de umidade inicial do substrato de 80%. A comparação do efeito da temperatura em termos de produção de celulases e xilanases,

utilizando aeração forçada e estática é apresentada nas Figuras 39a-d. Nesse conjunto de cultivos, à produção de celulasas e xilanase sob condições de aeração forçada foi significativamente maior do que em condições de aeração estática (Figura 39a). Em termos de influência da temperatura sobre o cultivo com *A. oryzae* P6B2, a atividade de endoglucanase, FPase e xilanase foram até 52, 85, 28% mais elevadas quando se utilizou aeração forçada, em vez da estática. Isto pode ser explicado por condições ambientais mais favoráveis no sistema de biorreator, com uma melhor dissipação de calor, evitando-se gradientes de temperatura devido ao calor gerado como resultado da atividade microbiana.

Figura 39 – Efeito da temperatura na produção de xilanase por *A. oryzae* P6B2 cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática.



Letras minúsculas (a, b, c, e, f) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas para a fermentação em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos em biorreator e Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a,b,c,d,e,f ou A,B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As temperaturas mais favoráveis para a produção de endoglucanase por *A. oryzae* P6B2 no sistema de aeração forçada foram entre 35 e 37°C (Fig. 39a). Dessa forma, a produção de endoglucanase no sistema de aeração forçada foi significativamente melhor em temperaturas mais altas. Já no sistema de aeração estática a produção de endoglucanase não foi significativamente afetada pela temperatura, mantendo-se praticamente constante em todas as temperaturas de cultivo. Os valores de atividade de endoglucanase variaram entre 40,8 e 73,1 UI/g quando se utilizou aeração forçada e entre 38,1 e 48 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, um efeito mais pronunciado de temperatura foi observado para aeração forçada, uma vez que um aumento de 79% em atividade de endoglucanase foi obtido pela modulação da temperatura, em comparação com um aumento de 25% quando se utilizou aeração estática. Estes resultados demonstram a importância do controle da temperatura no meio fermentativo, pois a transferência de calor ineficiente em frascos Erlenmeyer pode limitar a produção de enzimas diminuindo sua eficiência em temperaturas mais elevadas.

Uma tendência diferente foi observada para β -glicosidase, uma vez que temperaturas intermediárias em torno de 30 a 32°C em condições de aeração forçada e 32°C em condições de aeração estática favoreceram significativamente a produção de β -glicosidase (Fig. 39b). Os valores de atividade de β -glicosidase variaram entre 10,8 e 33,2 UI/g quando utilizou aeração forçada e 4,7-33,1 UI/g quando usou-se aeração estática. Assim, para β -glicosidase um efeito mais pronunciado de temperatura foi observado sob condições de aeração estática, com um aumento de 604% em comparação com um aumento de 207% quando se utilizou aeração forçada. Este aumento foi obtido por modulação da temperatura.

Com relação à atividade de FPase, esta foi significativamente maior quando *A. oryzae* P6B2 foi cultivado em biorreator do que em Erlenmeyer. No entanto em ambos os sistemas de cultivos as temperaturas entre 28 e 37°C não influenciaram na produção de celulases em termos de FPase (Fig. 39c). Os valores de atividade de FPase variaram de 0,21 a 0,24 UI/g quando se utilizou aeração forçada e de 0,10 a 0,13 UI/g quando se utilizou aeração estática. No que se refere à atividade de FPase um efeito mais pronunciado foi observado sob condições de aeração estática, com um aumento de 30% na atividade de FPase quando comparado com um aumento de 14% quando se utilizou aeração forçada. Os resultados de atividade de FPase foram baixos, o que pode resultar em problemas, especialmente em relação à reprodutibilidade, e consequentemente explicar a atividade constante nos diferentes níveis de temperatura de cultivo.

Para xilanase, temperaturas mais baixas em torno de 28 a 32°C (Fig. 39a) foram mais favoráveis. Dessa forma, a produção de xilanase foi significativamente afetada por temperaturas elevadas (35 a 37°C), em ambos os sistemas de cultivos utilizados. Os valores de atividade de xilanase variaram de 668,4 a 1574,5 UI/g quando se utilizou aeração forçada e de 471,6 a 1227,0 UI/g quando se utilizou aeração estática. Assim, um efeito mais pronunciado de temperatura foi observado para aeração estática, uma vez que um aumento de 160% na atividade de xilanase foi obtido pela modulação da temperatura, em comparação com um aumento de 136% quando se utilizou aeração forçada. Em termos de desenvolvimento de bioprocessos, é importante salientar que a biossíntese de xilanase de *A. oryzae* foi significativamente sensível a variações de temperatura.

A temperatura é uma variável importante que afeta o crescimento microbiano na FES, influenciando assim a formação de produto, enquanto que o tempo em que um nível máximo de atividade de enzima é atingido também irá variar de acordo com a temperatura do cultivo. Aqui, o valor de atividade após um determinado período de cultivo (72 horas), foi considerado, a fim de simplificar a análise. No entanto, uma análise mais completa da influência da temperatura sobre o crescimento é discutido nas seções seguintes (5.3.4 e 5.3.5).

A influência da temperatura na produção de celulasas e xilanase por outras linhagens de *Aspergillus* cultivadas por FES foi relatada. Liang et al. (2012) avaliaram o efeito da temperatura (24-36°C) na produção de celulasas por *Aspergillus* sp em FES e observaram que a maior produção de FPase (~0,6 FPUI/g) foi obtida a temperatura de 32°C. Prasertsan et al. (1997) investigaram a produção de celulasas e xilanases por *A. niger* sob diferentes temperaturas de fermentação. Segundo os autores, a produção de xilanase diminuiu à medida que a temperatura aumentou, o valor mais elevado de xilanase (262,2 UI/g) foi obtido a 30±2°C. Entretanto, a temperatura ótima para produção de endoglucanase foi de 35°C, com uma atividade de enzima de 21,6 UI/g. Estes resultados corroboram com os obtidos neste trabalho. Shenef, El-Tanash e Atia, (2010) estudaram a produção de celulasas e xilanases por *A. fumigatus* cultivado em substrato misto de palha de arroz e farelo de trigo sob diferentes níveis de temperatura de fermentação (25-50°C). O fungo expressou maior produção de endoglucanase (10,8 e 14,3 UI/g), exoglucanase (0,53 e 0,56 UI/g), β-glicosidase (7,6 e 8,2 UI/g) e xilanase (24,4 e 29,4 UI/g) a uma temperatura entre 35 e 45%, entretanto, 40°C aparentou ser a temperatura ótima de produção de enzimas por *A. fumigatus*. Pal e Khanum (2010) relataram que a maior produção de xilanase por *A. niger* foi obtida a 40°C, após seis dias, temperaturas acima de 40°C diminuiu acentuadamente a produção de xilanase

pelo fungo. Gawande e Kamat (1999) estudaram a produção de xilanase por linhagens de *Aspergillus* cultivadas em frascos a diferentes temperaturas e descobriram que a produção máxima de ambas as linhagens (*A. niger* e *A. terreus*) ocorreu a 35°C. Lu, Li e Wu (2003) estudaram a influência da temperatura na produção de xilanase de *A. sulfuros* e descobriram que a condição ideal se manteve entre o intervalo de temperatura de 30 a 35°C.

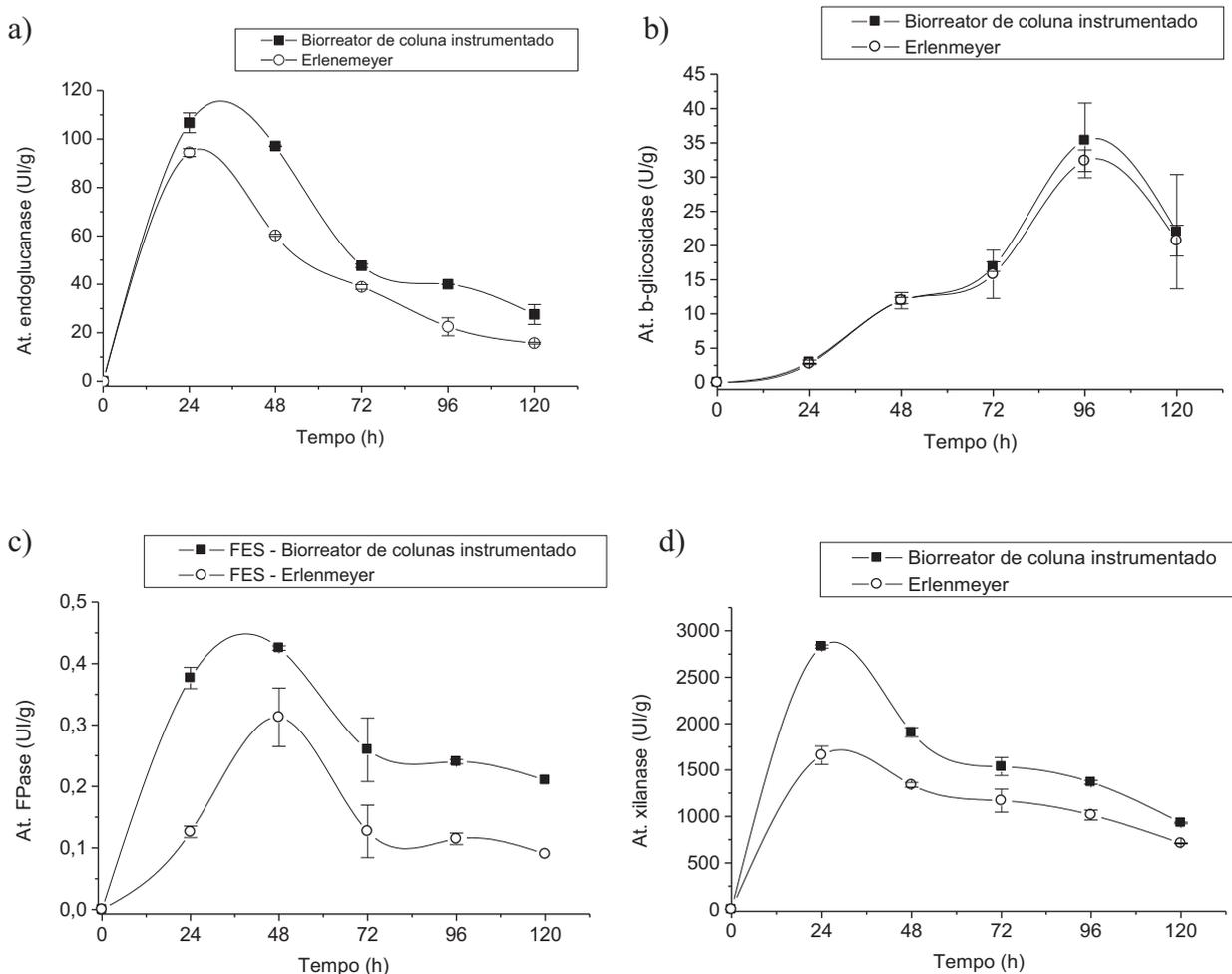
Tal como acontece com o efeito do teor de umidade, a avaliação de cada micro-organismo em termos da influência da temperatura na cinética de crescimento e formação de produto é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos em FES. Com base nos resultados de produção de xilanase, um teor de umidade inicial de 80% e uma temperatura de 28°C foram selecionados para avaliação dos perfis de produção de celulasas e xilanase ao longo de um período de cultivo de 120 horas.

5.3.4. Perfis de produção de celulasas e xilanase por *A. oryzae* P6B2 sob condições de aeração forçada e estática

Os perfis de produção de celulasas e xilanasas por um período de 120 horas, utilizando as condições operacionais selecionadas (teor de umidade inicial do substrato de 80%, temperatura de 28°C, umidade do ar de admissão de 80% e vazão de 20 mL/min) são ilustrados nas Figuras 40a-d. A fim de comparar a eficácia do sistema utilizado, um conjunto idêntico de cultivos foram conduzidos sob condições de aeração estática.

A atividade de endoglucanase e xilanase atingiram o seu valor máximo no sistema de aeração forçada (106,7 e 2830,7 UI/g, respectivamente) e estática (94,5 e 1658 UI/g), após 24 horas de cultivo, enquanto que os maiores valores de FPase (0,43 e 0,31 UI/g, respectivamente) e β -glucosidase (35,3 e 32,4 UI/g, respectivamente) foram alcançados após 48h e 96h, respectivamente (Fig. 40). A produção de celulasas e xilanasas por *A. oryzae* P6B2 foram melhores no sistema de aeração forçada. Assim, o sistema dinâmico utilizado aqui foi encontrado ser muito útil no controle das condições operacionais de FES para uma maior eficiência da produção de enzima, principalmente para xilanasas.

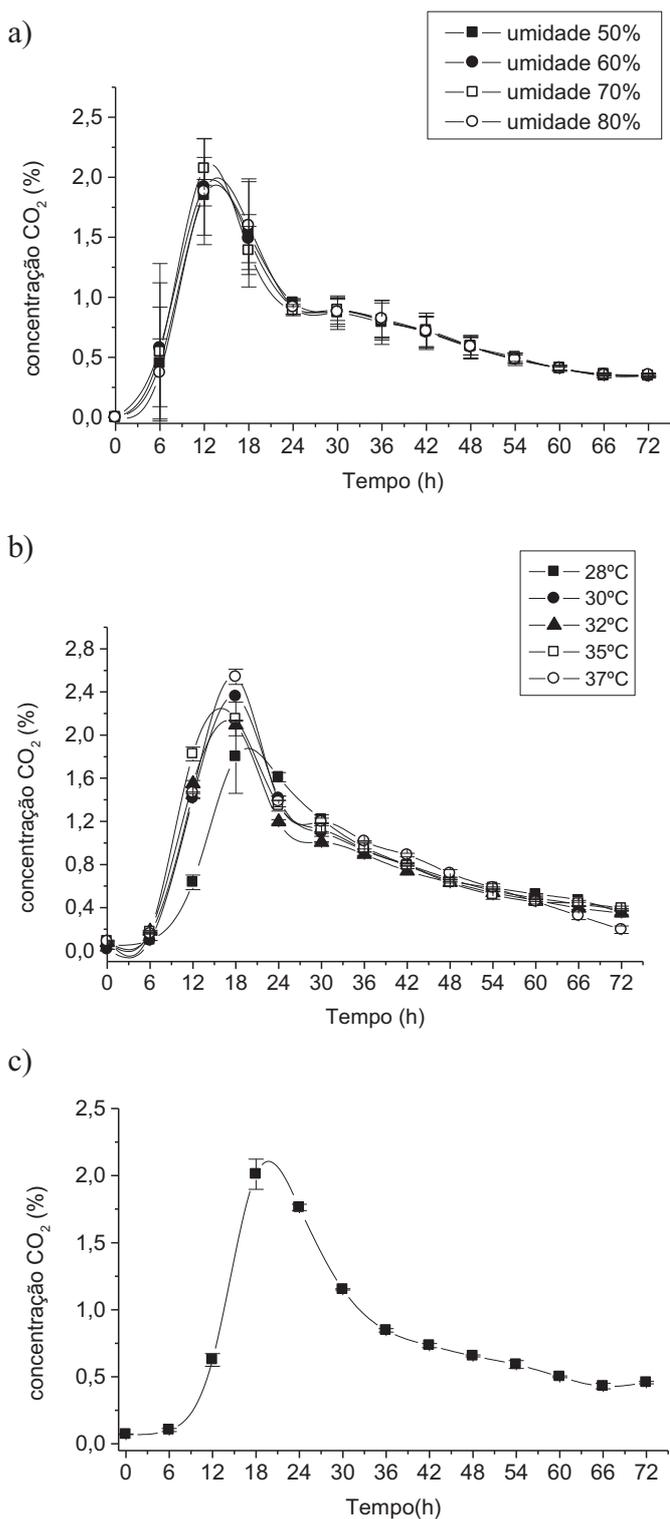
Figura 40 – Perfil de produção de celulases e xilanases por *A. oryzae* cultivado sob FES por 120 horas, a 28°C, teor de umidade inicial de substrato de 80%, umidade do ar de admissão de 80%, e uma vazão de 20 mL/min.



5.3.5. Análise respirométrica

A evolução do CO_2 durante o processo de FES é apresentada nas Figuras 41a-c. Pode-se observar que a curva de evolução do CO_2 representada na Figura 39a é muito semelhante em termos de efeito do teor de umidade inicial do substrato. Isso pode implicar que o crescimento de *A. oryzae* P6B2 não foi muito afetado pelos diferentes teores de umidade utilizados.

Figura 41 – Evolução do CO₂ durante a produção de celulases e xilanase por *A.oryzae* P6B2 cultivado sob (a) diferentes teores de umidade iniciais, (b) diferentes temperaturas e (c) condições operacionais selecionadas (temperatura de 28°C, teor de umidade inicial do substrato de 80%, uma umidade do ar de admissão de 80%, e vazão de 20 mL/min).



Com o intuito de melhor avaliar a significância das curvas de evolução de CO₂ obtidas utilizando diferentes teores de umidades iniciais (Fig. 41a), a taxa de crescimento específico (μ) foi obtida por análise de regressão da Equação 1. O perfil de crescimento foi ajustado muito bem pela equação logística, conforme mostrado pelos coeficientes de correlação que foram todos acima 0,99 (Tabela 11). A equação de desaceleração também foi avaliada e resultou em uma correlação semelhante (dados não mostrados). No entanto, a equação logística foi escolhida devido à familiaridade de seus parâmetros e seu uso mais amplo na literatura sobre a FES. A velocidade específica de crescimento celular foi semelhante para todas as condições de umidades iniciais investigadas (Tabela 11). Contudo, o maior valor de μ (0,48 1/h) foi obtido em ambos os teores de umidades iniciais de 70% e 80%. Isto está de acordo com a condição de umidade selecionada, com base na produção de xilanases. Não houve efeito significativo do teor de umidade inicial do substrato sobre a duração da fase de latência.

Tabela 11 – Efeito do teor de umidade inicial dos parâmetros de fermentação obtidas utilizando a equação logística.

Teor de umidade inicial (%)	CO ₂ produzido na fase exponencial (mmol)	C _m /C ₀ - 1	Fase Lag (h)	μ (1/h)	R ²
50	7,31E-03	35,8	7	0,429	0,995
60	1,00E-02	49,6	6,8	0,467	0,993
70	1,10E-02	54,4	6,3	0,482	0,993
80	1,10E-02	54,4	6,2	0,48	0,995

Em termos de efeito da temperatura sobre o crescimento de P6B2, pode-se observar que as curvas de evolução do CO₂ representadas na Figura 41b não são muito distintas. No entanto, houve temperaturas distintas relacionadas com diferenças na evolução do CO₂ total acumulado, bem como velocidade específica de crescimento celular (Tabela 12). O valor mais alto de μ (0,474 1/h) foi alcançado utilizando uma temperatura de 35°C, que não está de acordo com a temperatura selecionada com base na produção de xilanase (28°C), mas de acordo com a temperatura ótima de endoglucanase (35-37°C).

Tabela 12 – Efeito da temperatura sob os parâmetros de FES obtidos utilizando a equação logística.

Temperatura (°C)	CO ₂ produzido na fase exponencial (mmol)	C _m /X ₀ - 1	Fase Lag (h)	μ (1/h)	R ²
28	9,29E-03	45,8	9.3	0,417	0.994
30 ^a	--	--	--	--	--
32	1,13E-02	55,74	6.8	0,46	0.996
35	1,24E-02	61,6	7.8	0,474	0.997
37	1,24E-02	61,3	7.3	0,465	0,997

^a os dados de CO₂ para esta condição não resultou em uma boa correlação.

A Figura 41c ilustra a evolução do CO₂ por um período de 120 horas, durante o cultivo realizado para se obter os perfis de produção de celulasas e xilanase sob as condições operacionais selecionadas. O CO₂ total produzido durante a fase exponencial (9,29 E-03 mmol), bem como o valor de μ (0,42 1/h), estão de acordo com os resultados descritos anteriormente para xilanase (Tabela 12). A boa correlação com a produção de xilanase foi mostrada pela quantidade de CO₂ total produzido e a velocidade específica de crescimento celular, indicando o benefício destes parâmetros para utilização na otimização de estudos em grande escala.

5.4. Conclusões

A caracterização de uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* P6B2 isolada do solo da Floresta Amazônica para produção de xilanase utilizando fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas foi estudada usando um biorreator instrumentado de escala laboratorial. Os resultados obtidos permitiram a seleção das variáveis que puderam ser ajustadas a fim de melhorar a produção de xilanase. A atividade de xilanase mais elevada foi obtida utilizando um teor de umidade inicial de substrato de 80%, temperatura de 28°C, umidade do ar de admissão de 80%, e vazão de ar de 20 mL/min.

A umidade inicial do substrato de 80% também favoreceu a produção de celulasas. Entretanto, valores maiores de celulasas poderiam ter sido obtidos se tivesse sido utilizadas para o perfil de produção endoglucanase e β-glicosidase temperaturas de 37 e 32°C, respectivamente.

5.5. Referências

ABE, K., GOMI, K., HASEGAWA, F., MACHIDA, M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. **Mycopathologia**, v. 162, p. 143–153, 2006.

CHAPLA, D., DIVECHA, J., MADAMWAR, D., SHAH, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 361–369, 2010.

CHUNDAWAT, S., BECKHAM, G., HIMMEL, M., DALE, B., PRAUSNITZ, J. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121–145, 2011.

COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 3–23, 2005.

DELABONA, P., PIROTA, R., CODIMA, C., TREMACOLDI, C., RODRIGUES, A., FARINAS, C. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 2012.

DHILLON, G.S., KAUR, S., BRAR, S.K., GASSARA, F., VERMA, M. Improved xylanase production using apple pomace waste by *Aspergillus niger* in koji fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 198–208, 2012.

DODD, D., CANN, I. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob. Change Biology Bioenergy**, v. 1, p. 2–17, 2009.

FANG, T.J., LIAO, B.C., LEE, S.C. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. **New Biotechnology**, v. 27, p. 25–32, 2010.

FARINAS, C., VITCOSQUE, G., FONSECA, R., NETO, V., COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1186–1192, 2011.

GAO, D.H., UPPUGUNDLA N., CHUNDAWAT, S.P.S., YU, X.R., HERMANSON, S., GOWDA, K., BRUMM, P., MEAD, D., BALAN, V., DALE, B.E. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnology Biofuels**, v. 4, p. 11, 2011.

GAWANDE, P.V., KAMAT, M.Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal Applied Microbiology**, v. 87, p. 511–519, 1999.

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

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

JIN, N., MA, S.H., LIU, Y., YI, X.L., HE, R., XU, H., QIAO, D.R., CAO, Y. Thermophilic xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 2387–2394, 2012.

KOBAYASHI, T., ABE, K., ASAI, K., GOMI, K., JUVVADI, P., KATO, M., KITAMOTO, K., TAKEUCHI, M., MACHIDA, M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology Biochemical**, v. 71, p. 646–670, 2007.

LAKSHMI, G.S., RAO, C.S., RAO, R.S., HOBBS, P.J., PRAKASHAM, R.S. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: a statistical optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 51–57, 2009.

LIANG X., HUANG Y., HUA D., ZHANG J., XU H., LI Y., ZHANG X. Cellulase production by *Aspergillus* sp. on rice grass (*Spartina* spp.) under solid-state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 6785–6792, 2012.

LU, W.Q., LI, D.F., WU, Y.B. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.32, p. 305–311, 2003.

MACIEL, G.M., VANDENBERGHE, L.P.D., FENDRICH, R.C., DELLA BIANCA, B.E., HAMINIUK, C.W.I., SOCCOL, C.R. Study of some parameters which affect xylanase production: strain selection, enzyme extraction optimization, and influence of drying conditions. **Biotechnology Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 748–755, 2009.

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

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

MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. **Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and overview**. Springer, 2006.

NCUBE, T., HOWARD, R.L., ABOTSI, E.K., VAN RENSBURG, E.L.J., NCUBE, I. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118–123, 2012.

PAL, A., KHANUM, F. Identification and optimization of critical medium components using statistical experimental designs for enhanced production of xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 228–236, 2011.

PAL, A., KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7563–7569, 2010.

PANDYA, J.J., GUPTE, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 769–779, 2012.

PARK, Y.S., KANG, S.W., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 761–766, 2002.

POLIZELI, M., RIZZATTI, A.C.S., MONTI, R., TERENCEZI, H.F., JORGE, J.A., AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577–591, 2005.

PRASERTSAN, P. et al. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 555-559, 1997.

RAGHAVARAO, K., RANGANATHAN, T., KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127–135, 2003.

RAIMBAULT, R. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1 (3), 174–188, 1998.

RAIMBAULT, M.; GERMON, J. **Procédés d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides**. patent n°76.06.677, 1976.

RODRIGUEZ-FERNANDEZ, D.E., RODRIGUEZ-LEON, J.A., DE CARVALHO, J.C., STURM, W., SOCCOL, C.R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10657–10662, 2011.

SAHA, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p. 279–291.

SHENEF, A.; EL-TANASH, A.; ATIA, N. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 199-211, 2010.

SOUZA, D.T., BISPO, A.S.R., BON, E.P.S., COELHO, R.R.R., NASCIMENTO, R.P. Production of thermophilic endo-beta-1,4-xylanases by *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05 using agro-industrial by-products. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 166, p. 1575–1585, 2012.

SZENDEFY, J.; SZAKACS, G.; CHRISTOPHER, L. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1354-1360, 2006.

UMSZA-GUEZ, M.A., DIAZ, A.B., DE ORY, I., BLANDINO, A., GOMES, E., CARO, I. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1585–1597, 2011.

VALTE, R.D., BORUDE, P.C., HULE, A.K., JUVEKAR, A.R. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 by solid state fermentation using statistical methods. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 56, p. 75–80, 2010.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

YAMANE, Y.I., FUJITA, J., SHIMIZU, R.I., HIYOSHI, A., FUKUDA, H., KIZAKI, Y., WAKABAYASHI, S. Production of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 93, 9–14, 2002.

Capítulo 6 – Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar usando extrato enzimático e meio fermentado integral obtido por fermentação em estado sólido e produzido por duas novas linhagens de *Aspergillus oryzae* isoladas do solo da Floresta Amazônica

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirola; Priscila da Silva Delabona; Cristiane Sanchez Farinas

Manuscrito submetido

Resumo

A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) foi investigada usando meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) produzido *in house* pelas linhagens de *A. oryzae* P6B2 e P27C3A cultivadas sob fermentação em estado sólido (FES) sob condições selecionadas de aeração forçada e estática. A conversão de biomassa utilizando MFI de *A. oryzae* P6B2, obtido em ambos os sistemas de cultivos (aeração estática - 14% do valor teórico; aeração forçada - 15,4% do valor teórico) foi melhor, quando comparado com o EE (aeração forçada e estática - 6,5% do valor teórico). A utilização do MFI de P27C3A obtido em sistema de aeração forçada (21,7% do valor teórico) também promoveu uma melhor conversão de biomassa do que o EE (11,8% do valor teórico). No entanto, a utilização do MFI das linhagens de *A. oryzae* P6B2 ou P27C3A suplementado com enzima comercial foi a combinação que mais favoreceu a hidrólise do BEX. O MFI do P27C3A suplementado com enzima comercial apresentou uma conversão final de 44,8% do valor teórico comparado a combinação de *A. oryzae* P6B2 e enzima comercial, que apresentou uma conversão de 26,2% do valor teórico. Assim, a combinação utilizando o MFI de *A. oryzae* P27C3A e enzima comercial se destacou em relação a combinação de MFI de *A. oryzae* P6B2 e enzima comercial. Além disso, usando a combinação de MFI de P27C3A suplementado com enzima comercial, a dosagem de enzima comercial foi reduzida pela metade, e a hidrólise ainda foi 40% mais eficiente comparada a hidrólise do BEX utilizando apenas enzima comercial. Neste contexto, a produção de enzimas *in house* e a utilização de MFI pode ser muito vantajosa na hidrólise enzimática para produção de etanol celulósico, visto que a produção de enzimas *in house* pode reduzir a quantidade de enzima comercial utilizada na etapa de hidrólise enzimática e a utilização do MFI pode levar à eliminação da etapa de extração/filtração das enzimas reduzindo a geração de efluentes e, consequentemente, o custo de processo tornando-o economicamente viável. Por conseguinte, a produção de enzimas *in house* e a utilização de MFI na hidrólise do BEX podem ser consideradas como um processo biotecnológico em potencial para produção de etanol de segunda geração.

6.1. Introdução

A biomassa lignocelulósica é o material renovável mais abundante no mundo e uma fonte promissora para a produção de combustível etanol sustentável (LYND et al., 1991; Saha, 2004). A conversão de biomassa lignocelulósica a etanol envolve pelo menos quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise (sacarificação), fermentação e recuperação do etanol (SHAIBANI et al., 2012). Dentre essas etapas, a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica é considerada uma das tecnologias chave na produção de bioetanol. A hidrólise enzimática converte os carboidratos da biomassa lignocelulósica (celulose e hemiceluloses) em açúcares fermentescíveis pela ação de um conjunto de enzimas incluindo celulasas, hemicelulasas e enzimas acessórias (SELIG et al., 2008; KESHWANI; CHENG, 2009; SOUZA et al., 2012). As celulasas degradam a celulose a partir da ação cooperativa das endoglucanases, que hidrolisam o polímero de celulose internamente, expondo as extremidades redutoras e não redutoras a ação das exoglucanases ou celobiohidrolases que liberam celbiose e celo-oligossacarídeos. O processo de hidrólise da celulose é finalizado através da ação das β -glicosidases, que clivam a celbiose liberando duas moléculas de glicose – produto final (LYND et al., 2002; ZHANG; LYND, 2004). A ação das celulasas pode ainda ser facilitada pelas enzimas recentemente descobertas, CBM33 e GH61 que clivam as cadeias de celulose cristalina usando um mecanismo oxidativo, que depende da presença de íons metálicos divalentes e um doador de elétrons (HORN et al., 2012). As hemicelulasas também atuam de maneira sinérgica na degradação da hemicelulose e envolvem a ação de várias enzimas incluindo as endoxilanasas, β -xilosidase, α -glucuronidase, α -arabinofuranosidase, arabinase, acetil xilana esterase e feruloil esterases. Entre essas, a endoxilanasase e β -xilosidase (coletivamente chamadas de xilanasas) são as mais estudadas, provavelmente, por à xilana ser o principal componente da hemicelulose da biomassa de gimnospermas e angiospermas (JUTURU; WU, 2013). A endoxilanasase hidrolisa as ligações β -1,4 da cadeia de heteroxilana liberando xilo-oligossacarídeos curtos, que por sua vez, são convertidos em xilose, pela β -xilosidase (SHALLOM; SHOHAM, 2003; JUTURU; WU, 2013). A presença de xilanasas nos coquetéis enzimáticos celulolíticos podem facilitar a hidrólise, através do aumento da acessibilidade das celulasas às microfibrilas de celulose (KUMAR; RAJEEV; WYMAN, 2009).

A comercialização do etanol a partir de biomassa lignocelulósica é dificultada principalmente pelos custos das preparações de enzimas celulasas disponível atualmente (SUKUMARAN et al., 2009). Algumas estratégias que podem ser adotadas para a redução do

custo das celulases e hemicelulases compreendem (1) a seleção de micro-organismos altamente produtores de celulases e hemicelulases eficazes na hidrólise da biomassa lignocelulósica, (2) a utilização de matéria-prima mais barata e estratégias de fermentação a um custo efetivo - como a fermentação em estado sólido (FES) e (3) o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes na etapa de sacarificação, como por exemplo, a melhor utilização dos complexos enzimáticos.

As enzimas são produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, contudo, os fungos filamentosos são os mais usados na produção de enzimas industriais e exibem características modelo para tal aplicação (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). Dentre algumas dessas características destacam-se a facilidade de cultivo, a produção de quantidades elevadas de enzimas extracelulares e o baixo custo de produção em biorreatores de grande escala. Os fungos filamentosos frequentemente usados na produção de enzimas industriais são os gêneros de *Trichoderma* e *Aspergillus* (DE VRIES; VISSER, 2001; ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005). Espécies do gênero *Aspergillus*, *A. niger* e *A. oryzae* são os dois fungos mais importantes a nível mundial para aplicações biotecnológicas (GUOWEIA et al., 2011). *A. oryzae* é usado há milênios como fonte de bolor *Koji*, utilizado na produção de alimentos fermentados, incluindo o molho de soja, pasta de soja, missô, saquê de vinho e arroz (OLEMPSKA-BEER et al., 2006). Além disso, descobertas recentes sobre a genômica de *A. oryzae* revelaram que ele é extremamente rico em genes envolvidos na degradação da biomassa lignocelulósica (KOBAYASHI et al., 2007).

Nos últimos vinte anos, a FES ganhou atenção e credibilidade dos pesquisadores em muitas corporações industriais, devido às suas inúmeras vantagens (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Uma das vantagens desse sistema de cultivo são os rendimentos elevados de metabólitos secundários ou enzimas pelos fungos filamentosos, visto que a FES simula o habitat natural desses micro-organismos (HOLKER; LENZ, 2005; SINGHANIA et al., 2009; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Do ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada com a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato sólido, atuando, como fonte de carbono (RAIMBAULT, 1998). Tradicionalmente, em processos de FES, após o período de cultivo, as enzimas sintetizadas pelos micro-organismos são extraídas do substrato sólido através de uma operação convencional de extração do sólido-líquido. Essa etapa resulta em produtos finais, após o passo de filtração, o sobrenadante líquido contendo as enzimas de interesse que pode ser eventualmente concentrado e um resíduo sólido. Uma alternativa potencial para evitar a

produção deste resíduo sólido seria a utilização do meio fermentado integral (MFI) contendo as enzimas, o micélio e o substrato sólido residual diretamente na etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar. Um processo similar já foi avaliado usando o caldo da fermentação submersa (FSm) integral de *T. reesei*, para melhorar o desempenho da sacarificação simultânea e do processo de fermentação alcoólica (SCHELL et al., 1990). O caldo da FSm integral de *T. reesei* e *T. atrovide* também foi utilizado para a hidrólise de abeto vermelho (KOVACS; SZAKACS; ZACCHI, 2009) e o caldo da FSm integral de *T. reesei* ZU-02 para a hidrólise de sabugo de milho (LIMING; XUELIANG, 2004). Além disso, Sørensen et al. (2011), demonstraram a utilização do meio fermentado integral, obtido por FES para a hidrólise da palha de trigo.

No Brasil, a produção de bioetanol de primeira geração é desenvolvida utilizando-se a cana-de-açúcar como matéria-prima (AMORIM et al., 2011), sendo o país o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. Na safra de 2011/12, o Brasil produziu 560,36 milhões de toneladas de cana, gerando 36 milhões de toneladas de açúcar e 22 bilhões de litros de etanol (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012, p.8). Cada tonelada de cana processada pelas usinas gera aproximadamente 270-280 Kg de bagaço (RODRIGUES et al., 2003) e 140 kg de palha (LABAT; GONÇALVES, 2008). Assim, as usinas brasileiras produziram na safra de 2011/2012 aproximadamente 151 a 157 milhões de toneladas de bagaço de cana. Neste contexto, pesquisas vêm sendo realizadas para que o bagaço da cana-de-açúcar possa ser usado para produção de etanol de 2ª geração (SUKUMARAN et al., 2009; SILVA et al., 2011; CHANDEL et al., 2013), visto que o aproveitamento do bagaço para produção de etanol de 2ª geração no Brasil pode ser favorecido devido ao processo de produção poder ser anexado as unidades de açúcar/etanol já em vigor, o que exige investimentos menores em infraestrutura, logística e fornecimento de energia (SOCCOL et al., 2010). Nesse cenário, mais etanol poderia ser produzido sem aumentar a área plantada (CERQUEIRA LEITE, 2009). Além disso, o rendimento de etanol por hectare de cana plantada passaria de 6.000 litros para 10.000 litros se apenas metade do bagaço de cana fosse aproveitado para produção de biocombustíveis (SOCCOL et al., 2010). No entanto, ainda não há conhecimento de nenhum estudo sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar usando o meio fermentado integral obtido por FES para avaliar a contribuição das enzimas ligadas ao micélio para esse processo. Além disso, a eliminação do passo de extração/filtração da FES durante a produção das enzimas seria muito vantajosa para

a redução dos custos de processo e também para evitar a produção de efluentes, se adequando dentro do conceito de biorrefinaria.

O presente trabalho investigou a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) usando o meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) das duas linhagens de *A. oryzae* P6B2 e P27C3A cultivado por fermentação em estado sólido (FES), sob condições selecionadas de aeração estática e forçada. Além disso, os rendimentos de hidrólise foram comparados com os obtidos por uma preparação de celulase comercial e também por combinações dessas diferentes fontes de enzimas.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram duas linhagens de *Aspergillus oryzae* P6B2 e P27C3A isoladas do solo da floresta Amazônica por Delabona et al. (2012a) e depositadas na coleção da Embrapa Tecnologia de Alimentos – Rio de Janeiro. Essas linhagens foram caracterizadas pelo sequenciamento do gene RNAr 18S e a sequência foi registrada no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (número de acesso JX429926 e JX163919, respectivamente). Os micro-organismos isolados são mantidos na geladeira em placas com meio PDA, a temperatura ambiente em tubos sob fina camada de óleo mineral e no ultrafreezer por meio de esporos congelados. As culturas foram revitalizadas e mantidas em Erlenmeyer de 125 mL com PDA inclinado a 32°C, por 5 dias, antes da inoculação.

6.2.2. Materiais lignocelulósicos

A FES foi realizada utilizando-se farelo de trigo (FT) (Agricopecuária Claro, São Carlos, Brasil) como substrato sólido. O farelo de trigo foi lavado até que a água saísse limpa e incolor, depois foi seco a 50°C e armazenado no ultrafreezer. Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) cedido gentilmente pelo CTBE (Campinas, Brasil). O BEX foi triturado no moinho de facas e passado em uma peneira de 2,5 mm. A composição do BEX utilizado em todos os experimentos de hidrólise, em termos de celulose, hemicelulose e lignina foram 51,7 ± 0,6, 8,9 ± 0,1 e 34,3 ± 0,3%, respectivamente (DELABONA et al., 2012b).

6.2.3. Condições de cultivo da fermentação em estado sólido

O FT lavado foi o substrato sólido utilizado para a FES para produção de celulases e xilanases. Cinco gramas de FT lavado foram adicionado aos frascos Erlenmeyer de 250 mL e umedecidos com meio de Mandels modificado (MANDELS; STERNBURG, 1976) até atingir uma umidade de 70% para o P27C3A e 80% para o P6B2 condições previamente determinadas por Pirota et al. (2013). O meio de Mandels modificado continha (g/L): 1,4 (NH₄)₂SO₄; 2,0 KH₂PO₄; 0,3 ureia; 0,3 CaCl₂; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 2,0 extrato de levedura e 5,0 peptona (mg/ L): 5,0 FeSO₄.7H₂O; 1,6 MnSO₄. H₂O; 1,4ZnSO₄.7H₂O; 2,0 CoCl₂ e 0,1% (v/v) de Tween 80 a pH 5,0. Os frascos Erlenmeyer foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos à 1 atm. O substrato foi inoculado com uma suspensão de esporos de *A. oryzae* P27C3A ou de *A. oryzae* P6B2 de 10⁷ esporos/g. Os frascos foram incubados a 28°C, por 24h (P6B2) e 48h (P27C3A). Os cultivos foram também realizados em biorreator de coluna instrumentado, sobre condições idênticas as dos frascos (gramas de substrato sólido, umidade e temperatura), a fim de comparar a eficiência do meio fermentado integral (MFI) e do extrato enzimático (EE) produzido sob os sistemas de aeração forçada (biorreator) e estática (Erlenmeyer) na hidrólise enzimática.

O biorreator de coluna instrumentado utilizado foi um sistema de escala laboratorial adaptado de Raimbault e Germon, (1976) que consiste em 16 colunas de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento colocadas em um banho de água. O biorreator foi equipado com um sistema de controle e monitoramento da vazão e da umidade relativa do ar de admissão, tal como anteriormente descrito por Farinas et al. (2011). A vazão e a umidade relativa do ar de admissão foram mantidas constante durante todos os cultivos a 20 mL/min e 80%, respectivamente.

Após o período de cultivo, o meio sólido foi transferido para frascos Erlenmeyer (no caso dos cultivos em coluna), e as enzimas foram extraídas por adição de 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, para obter uma proporção sólido/líquido de 1:10. A suspensão foi homogeneizada e posteriormente agitada a 120 rpm, por 30 minutos, à temperatura ambiente. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 rpm, por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta para estudos de hidrólise, como descrito na secção seguinte. Alternativamente, MFI foi utilizado para os experimentos de hidrólise (secção 6.2.4). Todos os experimentos de cultivo foram realizados em triplicatas, e os dados foram calculados como médias ± desvio padrão.

6.2.4. Hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 5g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e 100 mL de tampão de citrato de sódio, pH 4,8. Esta suspensão foi inicialmente climatizada a 50°C, por 4h, a 200 rpm de agitação. Após este passo, 5g de material fermentado integral (como descrito na seção 6.2.3) foram adicionados ao BEX e toda esta mistura foi então incubada a 50°C, por 72h, a 200 rpm. As amostras foram tomadas no tempo zero e depois em 6, 12, 24, 36, 48 e 72h para a quantificação da glicose e de açúcares redutores totais liberados. Quando a hidrólise foi realizada com extrato enzimático bruto (EE), em vez do meio fermentado integral (MFI), apenas 50 mL de tampão de citrato de sódio, pH 4,8 foram adicionados ao BEX para aclimatização e, em seguida, o volume final de 100 mL foi completado por adição de 50 mL de extrato enzimático bruto (EE) de *A. oryzae* P27C3A ou P6B2 cultivados por FES. Além disso, a fim de comparar os resultados e avaliar o sinergismo das enzimas do meio fermentado integral e do extrato enzimático sobre a hidrólise enzimática do BEX, uma preparação de enzimas comerciais (Cellic Cetec2®, gentilmente doada pela Novozymes A/S, Dinamarca), foi usada sozinha e em diferentes combinações com outras fontes de enzimas. A preparação de celulase comercial foi suficientemente diluída de modo a atingir uma atividade enzimática próxima (em termos de FPU/mL) a do extrato enzimático bruto dos fungos. Em todos os experimentos de hidrólise, 0,1% m/v de azida de sódio foi adicionada com o intuito de parar o desenvolvimento de fungos durante a fase de hidrólise. Todos os experimentos de hidrólise foram efetuados em triplicatas, e os dados foram calculados como médias \pm desvio padrão. As médias de cada condição foram submetidas a uma análise estatística, utilizando o software Origin (versão 8.0).

6.2.5. Ensaio de atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de FPase, endoglucanase, xilanase e β -glicosidase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com o procedimento padrão recomendado pela IUPAC (WOOD; BHAT, 1988), com algumas modificações. A atividade de FPase foi realizada segundo a metodologia de Ghose, (1987). A atividade de endoglucanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL de extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de carboximetilcelulose à 4% (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 0,05mol/L e pH 4,8. Esta mistura foi incubada a 50°C, por 10 minutos. A atividade de xilanase foi determinada de maneira similar, exceto que uma solução

de xilana à 1% (xilana *Birchwood*, Sigma) foi utilizada como substrato em tampão acetato de sódio 0,1mol/L e pH 5,0. Finalmente, a atividade de β -glicosidase foi realizada usando uma solução de celobiose à 0,5% (Sigma) como substrato e os açúcares liberados foram quantificados a partir do Kit de glicose (Laborlab, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade de FPase e endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de xilanase corresponde a um μ mol de xilose liberada por minuto sob as condições de ensaio. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g). A glicose e açúcares redutores totais dos experimentos de hidrólise foram medidos utilizando o kit enzimático para medição de glicose (Doles, Goiânia, Brasil) e o método de DNS (MILLER, 1959), respectivamente.

6.2.6. Análise Estatística

Os resultados de hidrólise obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O teste de Tukey foi aplicado com a finalidade de verificar se a adição do meio sólido fermentado e/ou do extrato enzimático bruto e/ou da enzima comercial na hidrólise enzimática teria um efeito positivo sobre o teor de açúcares redutores totais. O nível de significância para o teste de Tukey foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Origin 8.0.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Produção de celulasas e xilanases

A FES foi realizada por um período de 120h em sistemas de aeração estático (frascos Erlenmeyer) e forçado (biorreator de colunas instrumentado) utilizando duas linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e farelo de trigo como substrato. A Tabela 13 ilustra os picos de atividade enzimática dos fungos P6B2 e do P27C3A em ambos os sistemas de aeração em 24h e 48h de cultivo, respectivamente.

A produção de endoglucanase pelas linhagens de *A. oryzae* em Erlenmeyer foram semelhantes. Já a produção de endoglucanase pelo *A. oryzae* P6B2 em biorreator foi 18% mais elevada do que a obtida pelo *A. oryzae* P27C3A. No entanto, em geral a produção

de endoglucanase por ambas as linhagens em biorreator foi de até 1,7 vezes mais elevada do que a obtida em Erlenmeyer. A produção de β -glicosidase por ambas as linhagens de *A. oryzae* sob os dois sistemas de cultivo foram semelhantes, exceto a produção de β -glicosidase pelo *A. oryzae* P27C3A em biorreator que foi de 3,8 vezes mais elevada do que a obtida em Erlenmeyer. A produção de FPase pelas duas linhagens de *A. oryzae* em ambos os sistemas de cultivo não ultrapassou 0,4 UI/g. Por outro lado, a produção de xilanase foi elevada por ambas as linhagens em ambos os sistemas de cultivo. Entretanto a produção de xilanase pela linhagem de *A. oryzae* P6B2 em Erlenmeyer e biorreator foi 3,3 e 4,9 vezes mais elevada do que a obtida pela linhagem de *A. oryzae* P27C3A, respectivamente.

Tabela 13 – Produção de celulasas e xilanases pelas linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) usando Erlenmeyer e biorreator de coluna instrumentado para FES.

Enzimas (UI/g)	<i>Aspergillus oryzae</i>			
	P6B2 (24h)		P27C3A (48h)	
	Erlenmeyer	Reator	Erlenmeyer	Reator
Endoglucanase	115,78 \pm 5,28	194,49 \pm 4,70	113,35 \pm 0,68	164,5 \pm 7,04
β -glicosidase	2,74 \pm 0,10	2,99 \pm 0,30	2,04 \pm 0,18	7,74 \pm 1,01
FPase	0,13 \pm 0,01	0,38 \pm 0,02	0,25 \pm 0,07	0,4 \pm 0,01
Xilanase	1658, 1 \pm 98,74	2830,7 \pm 16,57	507,93 \pm 14,01	578,7 \pm 5,73

Brijwani, Oberoi e Vadlani (2010), utilizando uma linhagem de *A. oryzae* e farelo de trigo e soja (4:1) como substratos, em FES, obtiveram uma produção de endoglucanase, FPase, β -glicosidase e xilanase de 68,4, 6,7, 9,5 e 512,16 UI/g, respectivamente. Hui et al. (2010) obtiveram uma produção menor de FPase (2,31 UI/g) por *A. oryzae* utilizando palha e farelo de trigo (9:1). Yamane et al. (2002) observaram uma produção de xilanase pelo *A. oryzae* em farelo de trigo de apenas 60 UI/g. Neste contexto, o resultado obtido neste trabalho em relação à produção de endoglucanases, β -glicosidases e xilanases pelo *A. oryzae* foram maiores do que os encontrados na literatura, o que mostra a eficiência das linhagens isoladas na Floresta Amazônica para produção de enzimas hemi(celulolíticas).

6.3.2. Perfil temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana explodido

A atuação das enzimas produzidas pelos isolados de *A. oryzae* cultivados sob FES em Erlenmeyer e biorreator foram avaliadas durante a hidrólise de bagaço de cana pré-

tratado por explosão a vapor (BEX). Para isso, foram realizados dois experimentos diferentes. No primeiro experimento o meio fermentado integral (MFI) em Erlenmeyer ou biorreator sob condições previamente selecionadas foi misturado ao BEX, sem separar as enzimas do micélio fúngico. Enquanto que no segundo experimento o extrato enzimático (EE), obtido a partir da extração/filtração das enzimas depois da FES em Erlenmeyer ou biorreator foi misturada ao BEX. Além disso, a fim de avaliar o efeito sinérgico das diferentes combinações de fontes de enzimas na hidrólise do BEX e o potencial de utilização das enzimas produzidas sob FES para a suplementação de coquetéis de enzimas comerciais, um conjunto de ensaios foram realizados utilizando as enzimas presentes no MFI e EE das linhagens de *A. oryzae* em diferentes combinações com uma baixa dosagem de preparação de enzima comercial. Os objetivos destes experimentos foram: (1) verificar se as enzimas produzidas pelas linhagens de *A. oryzae* em biorreator eram mais eficientes na hidrólise do que as produzidas em Erlenmeyer, visto que a produção de enzimas pelos fungos foi mais elevada no biorreator; (2) avaliar se era possível reduzir a quantidade de enzimas comerciais usando enzimas produzidas *in house*; (3) e por fim, se era mais vantajoso em termos de eficiência de hidrólise usar o MFI ou o EE em combinação com a preparação de enzima comercial.

A Figura 42 apresenta os perfis temporais de açúcares redutores totais (ART) liberados durante a hidrólise do BEX usando as enzimas do meio fermentado integral (MFI) (Fig. 42a) ou do extrato enzimático (EE) (Fig. 42b) de *A. oryzae* P6B2 ou de *A. oryzae* P27C3A obtidas por FES, em Erlenmeyer ou biorreator. As atividades enzimáticas totais do EE de ambos os fungos no estado de cultivo selecionado (seção 6.3.1), bem como a atividade enzimática total da preparação comercial utilizada são listadas na Tabela 14. A enzima comercial foi diluída de modo que a atividade enzimática de FPase se aproximasse da obtida pelas linhagens de *A. oryzae*.

Na Figura 42, pode ser visto que a quantidade de ART aumenta com o tempo e este efeito é mais pronunciado quando se utiliza o meio fermentado integral (MFI) produzido em biorreator por *A. oryzae* P27C3A. A quantidade de ART liberado utilizando o MFI produzido em biorreator pelo P27C3A em 72h de hidrólise do BEX foi de 7,3 g/L, enquanto que o ART liberado utilizando o MFI produzido no Erlenmeyer foi de 2,5 g/L, o que significa que o MFI produzido no biorreator pelo P27C3A liberou aproximadamente 3 vezes mais ART do que o produzido em Erlenmeyer. A mesma tendência é observada quando se utiliza o extrato enzimático (EE) produzido pelo P27C3A em biorreator, no entanto a quantidade de

ART liberado em 72h de hidrólise é de apenas 1,3 vezes mais elevada (4g/L) do que o obtido em Erlenmeyer (3,1 g/L). É interessante notar que a quantidade de ART liberado utilizando MFI ou EE produzido pelo P27C3A em biorreator foi mais elevada (Fig. 42a e 42b). Uma comparação preliminar entre a quantidade de ART liberado utilizando o MFI de P6B2 produzido em Erlenmeyer e biorreator mostrou que os resultados foram semelhantes entre si. O mesmo ocorreu utilizando o EE de P6B2 produzido em ambos os sistemas de cultivo, no entanto não podemos deixar de mencionar que a concentração de ART liberado utilizando o MFI de P6B2 foi maior do que o obtido utilizando o EE do mesmo, tanto em Erlenmeyer quanto em biorreator. As enzimas do MFI de *A. oryzae* P6B2 obtidas em Erlenmeyer e biorreator, resultaram em uma concentração de ART liberado em 72 horas de 4,7 e 5,2 g/L, respectivamente. Por outro lado, a concentração de ART utilizando as enzimas do EE do P6B2 em ambos os sistemas de cultivo não ultrapassou 2,2 g/L em 72h de hidrólise do BEX (Fig. 42a e 42b). Assim, o MFI do P6B2 produzido em ambos os sistemas de cultivos promoveu uma concentração de ART de até 2,4 vezes mais elevada do que a obtida utilizando o EE. Embora o MFI produzido principalmente no biorreator por ambos os fungos tenha sido melhor para a hidrólise do BEX, os valores foram inferiores a concentração de ART obtida utilizando a enzima comercial (10,9 g/L em 72h de hidrólise). Isso se deve provavelmente a menor atividade de β -glicosidase e FPase produzida pelas linhagens de *A. oryzae* em ambos os sistemas de cultivo, quando comparada com a atividade em UI da enzima comercial (Tabela 13). A atividade significativamente menor de β -glicosidase nos coquetéis de *A. oryzae*, pode ter levado ao acúmulo de celobiose e à inibição enzimática, o que pode explicar o baixo desempenho das enzimas desses micro-organismos durante a hidrólise. A celobiose é o principal produto final do processo de hidrólise da celulose, tanto por celobiohidrolases quanto por endoglucanase (VAN TILBEURGH et al., 1989; BÉGUIN; AUBERT, 1994). No sentido fisiológico, a celobiose é um forte inibidor para exoglucanase e seu potencial de inibição é maior do que o da glicose (LEE; FAN, 1983; TOMME, WARREN; GILKES, 1995). Deste modo, a eliminação da inibição da celobiose por β -glicosidase é necessária para obter uma completa hidrólise dos materiais celulolíticos (ZHAO et al., 2004). Outra possível explicação para o melhor desempenho da preparação comercial é a presença de enzimas acessórias na preparação comercial, que não foram quantificadas aqui, e que podem também ter tido um papel importante durante a hidrólise do BEX.

Figura 42 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX), usando (a) meio fermentado integral (MFI), (b) extrato enzimático (EE) dos isolados de *A. oryzae* produzidas no Erlenmeyer ou biorreator.

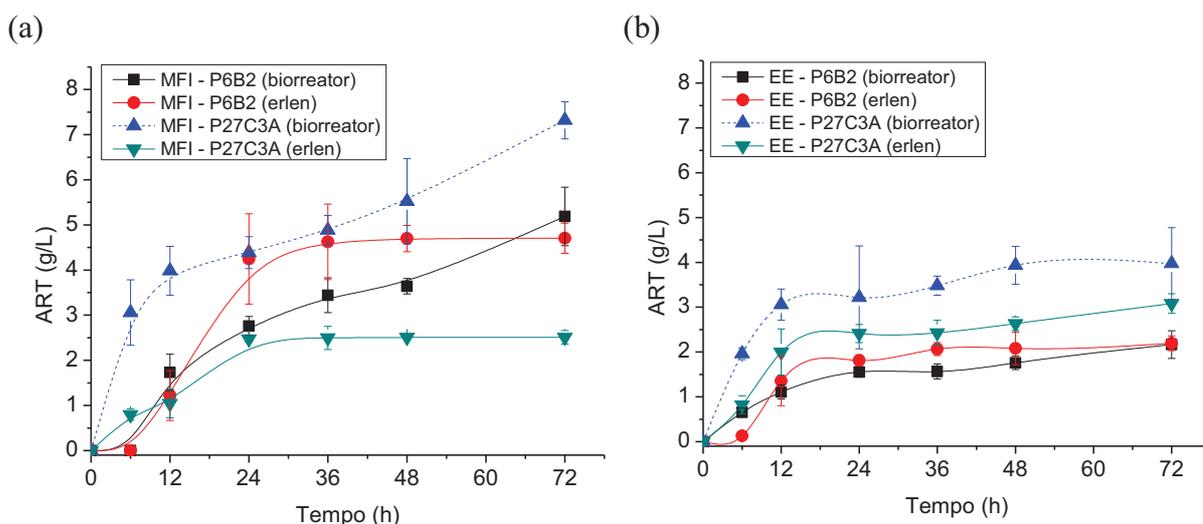


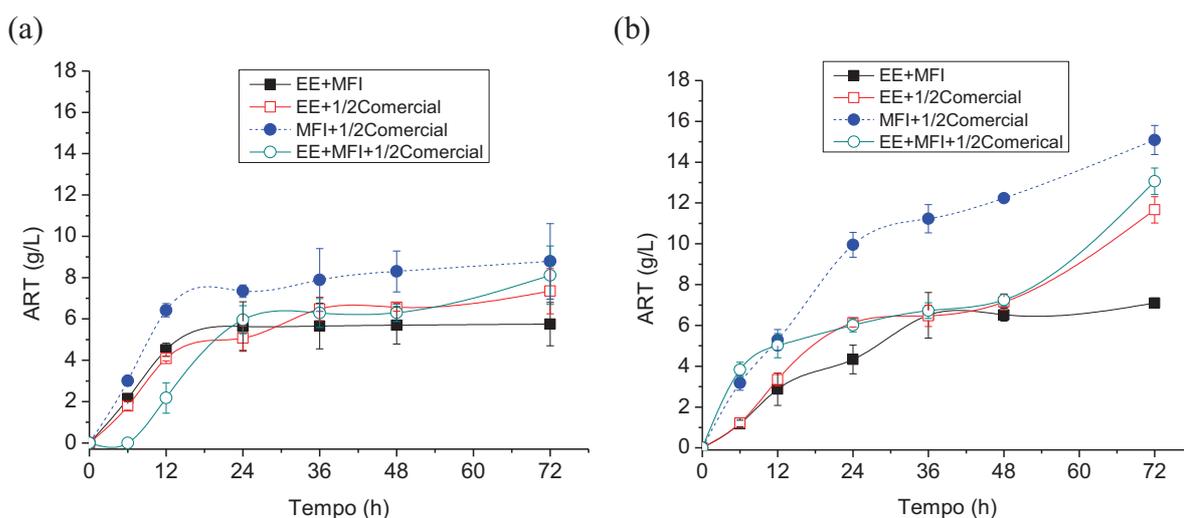
Tabela 14 – Atividade enzimática total dos extratos de *A. oryzae* P6B2 e P27C3A produzidos por FES em Erlenmeyer e biorreator e da preparação comercial usada para hidrólise do BEX.

Atividade enzimática (UI)	<i>A. oryzae</i> P6B2		<i>A. oryzae</i> P27C3A		Enzima comercial
	Erlen	Reator	Erlen	Reator	
Endoglucanase	578,9	972,5	566,8	822,5	1730
β -glicosidase	13,7	15	10,2	38,7	468
FPase	0,65	2	1,3	2	5
Xilanase	8290,5	14153,5	2539,7	2893,5	1820

Ao analisar os resultados da hidrólise do BEX obtidos em Erlenmeyer utilizando o MFI e/ou o EE das linhagens de *A. oryzae* em diferentes combinações com as enzimas comerciais (Fig. 43a-b), é interessante notar que o MFI de *A. oryzae* P6B2 ou P27C3A suplementado com enzima comercial resultou em uma concentração de ART de 8,8 e 15,1 g/L, respectivamente, salientando que a dosagem de enzima comercial utilizada nesses experimentos foi a metade da utilizada para dosar a atividade enzimática (Tabela 14). No entanto, todas as combinações promoveram um aumento na concentração de ART, porém não tão efetiva quanto à combinação mencionada acima. A combinação de enzima comercial e EE de P6B2 ou de P27C3A resultou em uma concentração de ART de 7,4 e 11,7 g/L, já a

combinação de enzima comercial, EE e MFI de P6B2 ou de P27C3A promoveu uma concentração de ART de 8,1 e 13,1 g/L, respectivamente (Fig.43). Por outro lado, a combinação de EE e MFI do P6B2 ou do P27C3A sem a suplementação com enzima comercial foi a que resultou em uma menor hidrólise do BEX (5,6 e 7,1 g/L, respectivamente) (Fig.43).

Figura 43 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão vapor (BEX), utilizando o meio fermentado integral – MFI e extratos enzimáticos – EE de (a) *A. oryzae* P6B2 ou de (b) *A. oryzae* P27C3A obtidas em Erlenmeyer ou estas combinações com uma preparação de enzima comercial.



As combinações de MFI e/ou EE de *A. oryzae* P27C3A com enzima comercial foi as que mais contribuíram para a hidrólise do BEX quando comparada as combinações utilizando MFI e/ou EE de *A. oryzae* P6B2 com enzima comercial (Fig. 43). Uma possível explicação para as combinações de EE e/ou MFI de P6B2 e enzima comercial terem hidrolisado até 42% menos o BEX, pode ser devido à atividade de xilanase de *A. oryzae* P6B2 ter sido muito elevada em comparação com a atividade de xilanase de *A. oryzae* P27C3A e da preparação comercial (Tabela 14). Segundo Qing, Yang e Wyman (2010) a xilana, xilose e xilo-oligômeros em grandes quantidades inibem a ação das celulasas na hidrólise enzimática da biomassa. Dekker (1986) reportou uma diminuição de 13% na atividade de β -glicosidase quando foi detectada uma suplementação de 5% m/v de *D*-xilose. Xiao et al. (2004)

estudaram o efeito inibitório dos açúcares derivados da hemicelulose na hidrólise enzimática de coníferas e observaram que a hidrólise diminuiu 32, 38, e 45% após a suplementação com galactose, xilose e manose, respectivamente. Assim, os açúcares derivados da hemicelulose parecem ter um efeito inibitório direto sobre as enzimas celulases.

6.3.3. Hidrólise do BEX em termos de conversão total

Neste tópico, uma análise em termos de conversão final de glicose e açúcares redutores totais na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) foi conduzida. A Figura 44 resume a porcentagem de conversão obtida em 72 horas de hidrólise do BEX usando meio fermentado integral (MFI) e/ou extrato enzimático (EE) das linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) produzidas no Erlenmeyer ou no biorreator. O MFI e o EE de ambos os fungos foram comparados com o coquetel comercial, bem como combinações destas diferentes fontes de enzimas foram realizadas.

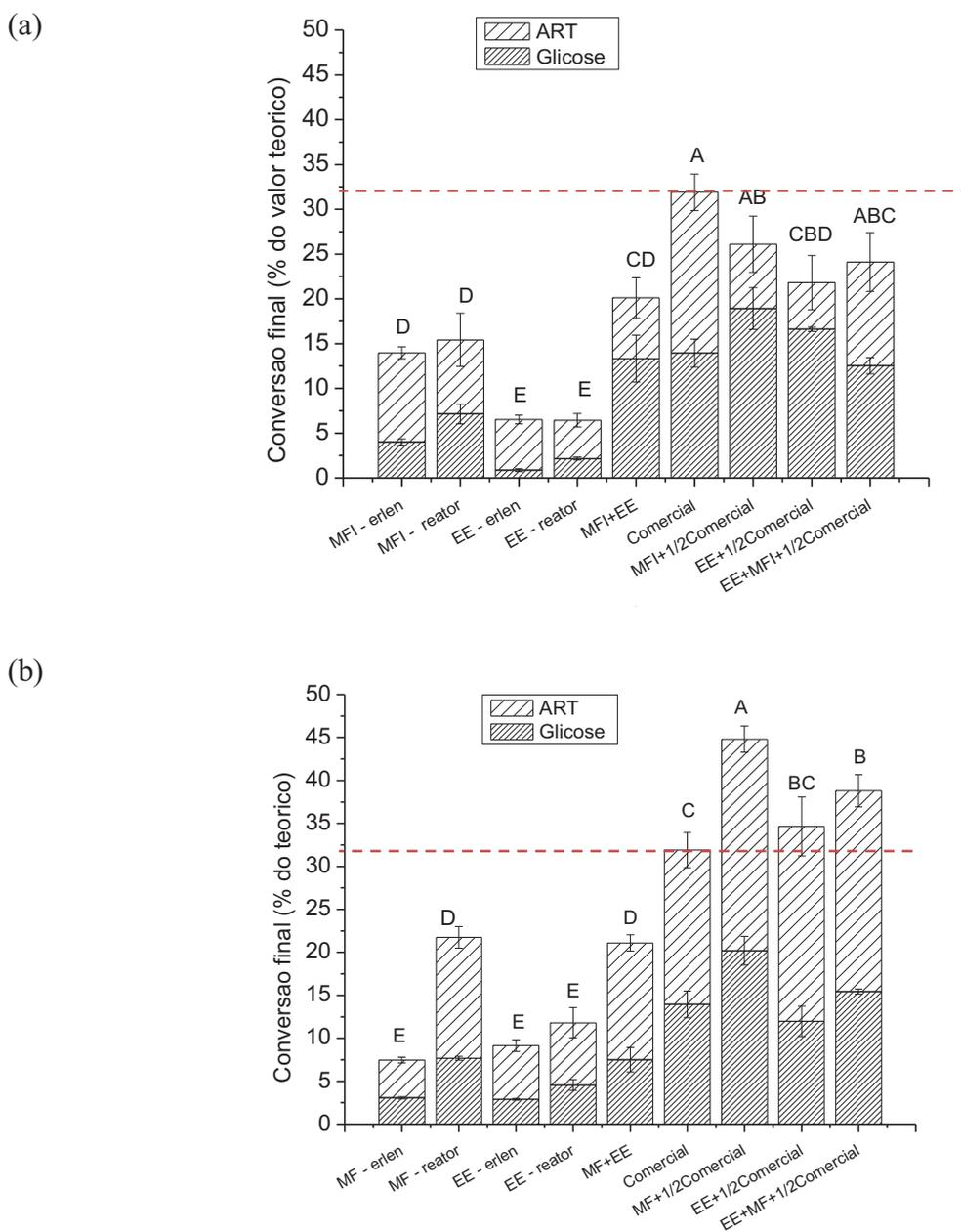
Como mostra a Figura 44a, a conversão final do BEX utilizando o MFI de *A. oryzae* P6B2 obtido em Erlenmeyer e biorreator foram significativamente similares (14 e 15,4% do valor teórico, respectivamente). A mesma tendência ocorreu com o EE de P6B2 produzido em ambos os sistemas de cultivos (6,6 e 6,5%, respectivamente). No entanto, o MFI de *A. oryzae* P6B2 obtido em ambos os sistemas de cultivos, biorreator e Erlenmeyer, foi melhor na conversão do BEX do que o EE, tanto em termos de ART (MFI - 10 e 8,3% do valor teórico, respectivamente; EE - 5,7 e 4,3% do valor teórico, respectivamente) quanto em termos de glicose (MFI - 4, e 7,4% respectivamente; EE - 0,9 e 2,2% do valor teórico, respectivamente) (Fig. 44a). Isso se deve provavelmente a algumas enzimas que permaneceram adsorvidas ao MFI (enzimas ligadas micélio) e que estiveram ativas durante a etapa de sacarificação. No entanto, a conversão de biomassa usando o coquetel comercial foi significativamente melhor (32% do valor teórico) do que o MFI ou EE de *A. oryzae* P6B2 obtido em ambos os sistemas de cultivos, devido provavelmente a maior quantidade de celulases (endoglucanase, β -glicosidase e FPase) presente no coquetel comercial (Tabela 14). Com relação às combinações, o EE e MFI de P6B2 e o MFI, EE e $\frac{1}{2}$ de enzima comercial proporcionaram conversões semelhantes em termos de glicose (13,3 e 13% do valor teórico, respectivamente) e distintas em termos de ART (6,8 e 11,6% do valor teórico, respectivamente). Em termos de glicose, essas conversões de biomassa foram semelhantes à obtida pela enzima comercial (14% do valor teórico) (Fig. 44a). Por outro lado, as combinações de MFI de P6B2 e $\frac{1}{2}$ de enzima comercial e EE de P6B2 e $\frac{1}{2}$ de enzima

comercial resultaram em uma conversão de glicose mais elevada do que a obtida pela enzima comercial, 19 e 17% do valor teórico, respectivamente, porém em termos de ART as conversões dessas combinações foram menores (7,1 e 5,2% do valor teórico, respectivamente) comparadas a da enzima comercial (18% do valor teórico) (Fig. 44a). Essas semelhanças e diferenças nos valores de conversão de biomassa foram consideradas com base no teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$). É importante salientar que a suplementação de enzima comercial ao MFI ou EE do P6B2 aumentou a conversão de glicose em cerca de 5 e 18,4 vezes, respectivamente, em comparação ao MFI ou EE do P6B2 utilizado sozinho na hidrólise do BEX. Isso provavelmente ocorreu devido à preparação comercial apresentar uma maior quantidade de celulasas quando comparada ao complexo enzimático do *A. oryzae* P6B2, que se mostrou deficiente na formação de açúcares monoméricos, uma vez que a atividade de β -glicosidase foi baixa comparado com a enzima comercial (Tabela 14). Neste sentido, a maior concentração de celulasas na preparação comercial, provavelmente anulou o efeito inibitório provocado pelo acúmulo de celobiose decorrente da baixa atividade de β -glicosidase nos coquetéis de *A. oryzae* P6B2, e aumentou a hidrólise do BEX. Outro fato que é importante ressaltar é que a quantidade de enzima comercial utilizada nas combinações foi metade da utilizada na hidrólise do BEX sozinha e os resultados obtidos utilizando a combinação de MFI do P6B2 e enzima comercial foram, pelo teste de Tukey, estatisticamente semelhantes. Isso mostra que utilizando MFI a quantidade de enzima comercial pode ser reduzida pela metade.

No estudo da hidrólise do BEX utilizando o complexo enzimático de *A. oryzae* P27C3A (Figura 44b), a tendência foi semelhante à obtida pelo *A. oryzae* P6B2. No entanto, os valores de conversão foram em geral melhores do que os obtidos pelas enzimas do P6B2. A conversão de biomassa utilizando MFI de P27C3A obtida em biorreator foi semelhante ao alcançado usando a combinação de MFI e EE obtido em Erlenmeyer tanto em termos de ART (14 e 13,6% do valor teórico, respectivamente) quanto em termos de glicose (7,7 e 7,5% do valor teórico, respectivamente). A conversão de biomassa utilizando MFI ou EE de P27C3A obtido em Erlenmeyer foi significativamente menor do que os alcançados usando MFI de P27C3A em biorreator, tanto em termos de ART (4,4 e 6,2% do teórico, respectivamente) como de glicose (3,1 e 3% do valor teórico, respectivamente). Neste contexto, estes resultados vêm corroborar com as atividades enzimáticas (principalmente, de β -glicosidase) mais elevadas obtidas durante a fermentação em biorreator. Por outro lado, embora a atividade de β -glicosidase tenha sido maior nos complexos enzimático do biorreator, o EE desse sistema de cultivo não foi tão eficiente na hidrólise do BEX como o MFI, com uma conversão de

ART e de glicose de apenas 7,3 e 4,6% do valor teórico, respectivamente. Chandra, Viswanath e Reddy (2010) e Pirota et al. (2013) analisaram extrações consecutivas de enzimas obtidas por FES, aproximadamente 20% das enzimas ativas foram perdidas durante a etapa de extração do meio de cultivo. Assim, como já mencionado anteriormente, as enzimas que permanecem ligadas ao micélio fúngico e ao material sólido podem ocasionar uma maior conversão de ART e de glicose durante a hidrólise da biomassa. Com relação às combinações, a que mais favoreceu a hidrólise do BEX foi à combinação de MFI de P27C3A e ½ de enzima comercial, com uma conversão de ART e de glicose de 24,6 e 20,2% do valor teórico, respectivamente (conversão final – 44,8%). As combinações de EE do P27C3A e ½ de enzima comercial e EE, MFI e ½ de enzima comercial foram semelhantes entre si com uma conversão final de 34,7 (ART - 22,7%; glicose – 12%) e 38,8% do valor teórico (ART - 23,4%; glicose – 15,4%), respectivamente. Assim, a adição de uma baixa dosagem de enzima comercial aumentou a hidrólise do BEX em 6, 3,8 e 1,8 vezes quando comparado com a hidrólise utilizando apenas MFI, EE e a combinação de MFI e EE de P27C3A, respectivamente.

Figura 44 – Conversão do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) em 72h de hidrólise enzimática, utilizando MFI e/ou EE de *A. oryzae* (a) P6B2 e de (b) P27C3A e diferentes combinações com enzima comercial. Meios com letras diferentes são significativamente diferentes após comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Os nossos resultados demonstraram que a utilização do MFI desde a produção das enzimas *in house* por FES em combinação com uma baixa dosagem de celulases comerciais aumentou a hidrólise do BEX. Neste contexto, a produção de enzimas *in house* pode reduzir a quantidade de enzima comercial utilizada na hidrólise enzimática e

consequentemente reduzir o custo do processo tornando-o economicamente viável. Outro fator que também pode contribuir para a redução do custo do processo é a utilização direta de MFI na hidrólise enzimática, a eliminação da etapa de extração/filtração das enzimas pode reduzir a geração de efluentes tornando-se muito vantajosa nos processos biotecnológicos relacionado com a conversão do bagaço de cana-de-açúcar em combustíveis e produtos químicos.

6.4. Conclusão

Pode-se concluir que o MFI das linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) obtidas em ambos os sistemas de cultivo foi melhor na hidrólise do BEX do que o EE, exceto o MFI e o EE do *A. oryzae* P27C3A obtido em Erlenmeyer que apresentaram conversões semelhantes entre si. A suplementação dos complexos enzimáticos (MFI e EE) de ambos os fungos com enzima comercial foi necessário para uma melhor hidrólise do BEX. O MFI das linhagens de *A. oryzae* P6B2 e P27C3A suplementado com enzima comercial foram às combinações mais eficientes na hidrólise do BEX, porém a combinação de *A. oryzae* P27C3A se destacou com uma conversão final de 44,8% do valor teórico comparado à combinação do *A. oryzae* P6B2 que apresentou uma conversão de 26,2% do valor teórico. Esta combinação deixa claro que o MFI de ambos os fungos suplementados com enzima comercial pode levar a uma maior hidrólise do BEX e que o passo de extração/filtração das enzimas pode ser eliminado. A produção de enzimas *in house* e a eliminação da etapa de extração das enzimas podem ser muito vantajosas na hidrólise enzimática. A produção de enzimas *in house* pode reduzir a quantidade de enzima comercial utilizada na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica e a eliminação da etapa de extração/filtração das enzimas pode reduzir a geração de efluentes e consequentemente reduzir o custo do processo tornando-o economicamente viável. Neste contexto, a produção de enzimas *in house* e a utilização de MFI na hidrólise do BEX podem ser consideradas como um processo biotecnológico em potencial para produção de etanol de segunda geração.

6.5. Referências

AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

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.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.; VADLANI, P. 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.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J.-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

CENTRO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM BIOMASSA. Brasil, 2003.

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, 2009.

CHANDEL, A. K. et al. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Optimization of extraction of β -endoglucanase from the fermented bran of *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 122-126, 2010.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Brasília: EQUIPE DA BIBLIOTECA DA CONAB. p. 4-18, 2012.

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.

DEKKER, R. F. H. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 9, p. 1438-1442, 1986.

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

DELABONA, P. 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, 2012b.

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.

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

GUOWEIA, S. et al. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, n. 0, p. 357-361, 2011.

HOLKER, 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. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.

HUI, L. et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556-7562, 2010.

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.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1515-1523, 2009.

KOBAYASHI, T. et al. Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2007.

KOVACS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1350-1357, 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203-4213, 2009.

LABAT, G. A. A.; GONÇALVES, A. R. Oxidation in acid medium of lignins from agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n.1-3, p. 151-161, 2008.

LARA-MÁRQUEZ, A. et al. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 5, p. 859-868, 2011.

LEE, Y. H.; FAN, L. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose:(II). Analysis of extended hydrolysis times. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 4, p. 939-966, 1983.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 259-262, 2004.

LYND, L. R. et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science(Washington)**, v. 251, n. 4999, p. 1318-1323, 1991.

_____. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 506-77, 2002.

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

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

OLEMPСКА-BEER, Z. S. et al. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 144-158, 2006.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 117-123, 2013.

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

RAIMBAULT, M.; GERMON, J. **Procédés d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides**. patent n°76.06.677, 1976.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Electron J Biotechnol**, v. 1, p. 21-32, 1998.

RODRIGUES, R. C. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.

SAHA, B. C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. ACS symposium series, ACS Publications. p.2-35, 2004.

SCHELL, D. J. et al. Whole broth cellulase production for use in simultaneous saccharification and fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 287-297, 1990.

SELIG, M. J. et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 11, p. 4997-5005, 2008.

SHAIBANI, N. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse by means of on-site produced and commercial enzymes; a comparative study. **Chemical Engineering**, v. 56, n. 2, p. 91-96, 2012.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 219-28, 2003.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 809-817, 2011.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

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

SOUZA, A. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **BioEnergy Research**, p. 1-16, 2012.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SØRENSEN, 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.

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. In: POOLE, R. K. (Ed.). **Advances in Microbial Physiology: Academic Press**, v.37, p.1-81, 1995.

VAN TILBEURGH, H. et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. **European Journal of Biochemistry**, v. 184, n. 3, p. 553-559, 1989.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

XIAO, Z. et al. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. In: FINKELSTEIN, M.;MCMILLAN, J., et al (Ed.). **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO**: Humana Press, cap. 90, p.1115-1126, 2004.

YAMANE, Y. et al. Production of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 9-14, 2002.

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

ZHAO, Y. et al. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2004.

Capítulo 7 – Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor usando extrato enzimático e meio fermentado integral das linhagens de *Aspergillus niger* 3T5B8 e *Trichoderma reesei* RUT-C30 cultivadas por fermentação em estado sólido

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirola; Flávio César Freire Baleeiro; Cristiane Sanchez Farinas

*Manuscrito modificado e publicado na revista **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013*

Resumo

A hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) foi investigada usando meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) produzido *in-house* por *Aspergillus niger* 3T5B8 e *Trichoderma reesei* RUT-C30, cultivado sob fermentação em estado sólido (FES) em condições de aeração forçada (biorreator) e estática (Erlenmeyer). Os rendimentos de hidrólise foram comparados com os obtidos por uma preparação comercial. A conversão total de BEX em 72h usando o MFI de *A. niger* obtido em biorreator atingiu um valor superior (41,3% do valor teórico) ao apresentado pelo MFI de *T. reesei* no mesmo sistema de cultivo (24,8% do valor teórico) e também pela enzima comercial (32% do teórico). A suplementação de enzima comercial ao MFI ou à combinação de MFI e EE de *A. niger* resultou em conversões semelhantes a conseguida usando apenas MFI obtida em biorreator. Por outro lado, a suplementação de enzima comercial ao MFI ou a combinação de MFI e EE de *T. reesei* promoveu uma conversão de biomassa mais elevada (42% do valor teórico) do que a obtida utilizando apenas enzima comercial e da mesma ordem de grandeza da apresentada pelas enzimas do MFI de *A. niger* obtida em biorreator. De modo geral, esses resultados demonstram que o MFI de *A. niger* e *T. reesei* obtido em biorreatores de estado sólido podem proporcionar um aumento na hidrólise enzimática, devido às condições de monitoramento e controle da umidade e temperatura de fermentação desse sistema de cultivo. Além disso, a utilização do MFI na hidrólise enzimática pode ser muito vantajosa, pois pode reduzir os custos de processo, além de evitar a geração de efluentes, contribuindo assim significativamente para a redução do custo das enzimas. Por conseguinte, a hidrólise do BEX utilizando MFI a partir da FES pode ser considerada como um processo alternativo em potencial, adequando-se dentro do conceito de biorrefinaria.

7.1. Introdução

A conversão enzimática dos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica será uma tecnologia chave para as biorrefinarias no futuro (HORN et al., 2012). No entanto, para tornar o processo economicamente viável, estudos para melhorar o

passo de produção de enzimas são de grande importância, devido à influência destes coquetéis enzimáticos sobre a economia de todo o processo de bioconversão da biomassa em combustíveis e outros produtos químicos. Os esforços para a redução dos custos incluem, estudos recentes direcionados ao aumento da eficiência do passo de produção das enzimas por novas linhagens microbianas (AMORE et al., 2013; DELABONA et al., 2012b; KING et al., 2011) e técnicas de fermentação eficientes (CUNHA et al., 2012; LAN et al., 2013; PIROTA et al., 2013b), bem como estratégias de reciclar as enzimas (RODRIGUES et al., 2012; WAEONUKUL et al., 2013; WEISS et al., 2013). A produção de enzimas *on-site*, também é considerada uma estratégia potencial para reduzir os custos das enzimas, uma vez que há menos necessidade de estabilizar as preparações enzimáticas, evitando os custos associados com o transporte e armazenagem por longos períodos (DELABONA et al., 2012a; KOVACS et al., 2009a; SORENSEN et al., 2011).

A fim de hidrolisar os componentes da parede celular vegetal um coquetel enzimático contendo celulasas, hemicelulasas e outras enzimas acessórias é necessário para aumentar a eficiência da hidrólise. Este complexo enzimático é produzido por uma grande variedade de micro-organismos (bactérias e fungos), contudo, os fungos aeróbios são conhecidos pelo seu elevado crescimento e taxas de secreção de proteínas (LYND et al., 2002a). A maioria das preparações de celulasas comerciais é produzida por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (BHAT, 2000). O fungo *Trichoderma reesei* é conhecido por ser altamente celulolítico e ser uma grande fonte microbiana industrial de celulasas, xilanases e outras enzimas comerciais que degradam a parede celular. No entanto, pesquisas de prospecção de enzimas são uma oportunidade para encontrar micro-organismos altamente produtores de enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica e, desse modo, melhorar a atividade das enzimas de *T. reesei* nas preparações enzimáticas, completando-as com enzimas de outros micro-organismos (KING et al., 2011). O fungo *Aspergillus niger* tem mostrado um papel de destaque no campo da biotecnologia como um produtor de enzimas bem estudado, eficiente e amplamente utilizado na indústria (ANDERSEN et al., 2012). Além disso, uma comparação entre as sequências do genoma de *T. reesei* e *A. niger* mostrou que o *A. niger* é mais versátil na produção de celulasas, hemicelulasas e esterases codificados (SOUZA et al., 2011).

Nos últimos 20 anos, o uso da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de enzimas tem ganhado uma atenção considerável, e as vantagens deste sistema de cultivo estão atraindo o interesse do setor industrial (BARRIOS-GONZALEZ, 2012; CHEN;

HE, 2012; SINGHANIA et al. 2010). Na verdade, há um grande número de estudos relacionados com a produção de enzimas envolvidas na desconstrução da biomassa usando FES como descrito por Pandey et al. (1999) e Singhania et al. (2010). A FES é particularmente vantajosa para a produção de enzimas por fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos (HOLKER; LENZ, 2005; SINGHANIA et al., 2009). Do ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada com a utilização de resíduos agroindustriais como substratos sólidos, atuando, como fonte de carbono (RAIMBAULT, 1998). Tradicionalmente, em processos de FES, após o período de cultivo, as enzimas sintetizadas pelos micro-organismos são extraídas do substrato sólido através de uma operação convencional de extração do sólido-líquido. Essa etapa resulta em um sobrenadante líquido contendo as enzimas de interesse que pode ser eventualmente concentrado e um resíduo sólido. Uma alternativa para superar a produção deste resíduo sólido seria a utilização do meio fermentado integral (MFI) contendo as enzimas, o micélio e o substrato sólido residual na etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar. Um processo similar já foi avaliado usando o caldo integral da fermentação submersa (FSm) de *T. reesei*, para melhorar o desempenho da sacarificação simultânea e do processo de fermentação (SCHELL et al., 1990). O caldo integral da FSm de *T. reesei* e *T. atrovide* também foi relatado por Kovacs et al. 2009b para a hidrólise do abeto vermelho e o caldo integral da FSm de *T. reesei* ZU-02 para a hidrólise do sabugo de milho (XIA; SHEN, 2004). Além disso, Sorensen et al. (2011) demonstraram a utilização do meio fermentado integral obtido por FES para a hidrólise da palha de trigo.

No Brasil, a produção de bioetanol de primeira geração é desenvolvida utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima, sendo o país um dos produtores mais competitivos de bioetanol do mundo (AMORIM et al., 2011). A produção de bioetanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar é considerada uma importante alternativa sustentável para aumentar esta produção (LAGO et al., 2012; SOCCOL et al., 2010). No entanto, ainda não há conhecimento de nenhum estudo sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar usando o meio fermentado integral obtido por FES para avaliar a contribuição das enzimas ligadas ao micélio para esse processo. Além disso, a eliminação do passo de extração/filtração da FES durante a produção das enzimas seria muito vantajosa para a redução dos custos de processo e também para evitar a produção de efluentes, se adequando dentro do conceito de biorrefinaria.

7.2. Material e Métodos

7.2.1. Biorreator de coluna instrumentado

O biorreator utilizado foi um sistema de escala laboratorial adaptado de Raimbault e Germon, (1976) que consiste de 16 colunas de 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento imersas em banho de água, para controle de temperatura (Fig. 36). O biorreator foi equipado com um sistema para monitorar e controlar a vazão de ar e umidade relativa do ar de admissão, tal como anteriormente descrito por Farinas et al., (2011). A vazão de ar e a umidade relativa do ar de admissão foram mantidas constante durante todos os cultivos, a 20 mL/min e 80%, respectivamente.

7.2.2. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram uma linhagem mutante de *Aspergillus niger* (conhecida como *A. niger* 3T5B8) da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil) e uma linhagem de *Trichoderma reesei* RUT-C30 da *American Type Culture Collection*. As culturas foram armazenadas a 4°C em batata dextrose ágar (BDA) inclinado. As culturas foram revitalizadas e mantidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com BDA inclinado a 32°C, durante cinco dias, antes da inoculação.

7.2.3. Materiais lignocelulósicos

A FES foi realizada utilizando-se farelo de trigo (FT) (Agricopecuária Claro, São Carlos, Brasil) como substrato sólido. O farelo de trigo foi lavado até que a água saísse limpa e incolor, depois foi seco a 50°C e armazenado no ultrafreezer. Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) cedido gentilmente pelo CTBE (Campinas, Brasil). O BEX foi triturado no moinho de facas e passado em uma peneira de 2,5 mm. A composição do BEX utilizado em todos os experimentos de hidrólise, em termos de celulose, hemicelulose e lignina foram $51,7 \pm 0,6$, $8,9 \pm 0,1$ e $34,3 \pm 0,3\%$, respectivamente (DELABONA et al., 2012a).

7.2.4. Seleção das condições operacionais para o cultivo em FES

Os cultivos no biorreator foram realizados por 72 horas usando farelo de trigo lavado como substrato sólido. O meio sólido foi esterilizado em autoclave, a 121°C, por 20 minutos e as colunas foram esterilizadas por 2 horas a 121°C em estufa antes da inoculação. Cada coluna foi preenchida com 5g de farelo de trigo lavado que foi esterilizado separadamente em

béquer de 250 mL. Um volume de suspensão de esporos correspondente a 10^7 esporos/g foi inoculado no próprio béquer contendo o substrato sólido e o teor de umidade foi ajustado com uma solução nutriente (MANDELS; STERNBERG, 1976). O substrato sólido úmido foi homogeneizado com o auxílio de um bastão de vidro e as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. A estratégia adotada para a seleção das condições operacionais de FES foi avaliar a variável individualmente e, em seguida, selecionar o melhor valor obtido a partir de cada variável e incorporar na etapa de seleção da próxima variável. Inicialmente, os cultivos foram realizados a 35°C com um teor de umidade inicial do substrato variando de 50, 60, 70 e 80%. Após a seleção do teor de umidade mais favorável, diferentes temperaturas (28, 30, 32, 35 e 37°C) foram avaliadas usando um teor de umidade inicial de 80% para *A. niger* e 60% para *T. reesei*. Todos os cultivos foram também realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sobre condições idênticas (gramas de substrato sólido, umidade e temperatura), a fim de comparar os resultados obtidos sob aeração forçada com o sistema de aeração estático. Em 72 horas, as enzimas foram extraídas e analisadas como descritas nas seções 7.2.6 e 7.2.8, respectivamente. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas.

7.2.5. Perfis de produção de celulases e xilanases

Após a definição da melhor condição operacional para o cultivo de *A. niger* e *T. reesei* por FES, os perfis de produção de celulases e xilanase foram avaliados durante um período de cultivo de 120 horas e as amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas. As condições de FES selecionadas para *A. niger* foram um teor de umidade inicial do farelo de trigo de 80% e temperatura de fermentação de 28°C, enquanto que para *T. reesei* foram selecionadas um teor de umidade inicial do substrato de 60% e temperatura de 35°C. Os cultivos foram também realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, sobre condições idênticas, a fim de comparar o sistema de aeração forçada (biorreator) com o de aeração estático na produção de enzimas e na hidrólise enzimática. Alternativamente, os cultivos para a etapa de hidrólise foram realizados sob as mesmas condições selecionadas, no entanto por um período de fermentação de 48 horas. Após os períodos de cultivos, as enzimas foram extraídas e analisadas como descritas nas seções 7.2.6 e 7.2.8, respectivamente. Alternativamente, o meio fermentado integral (MFI) foi utilizado para os experimentos de hidrólise, tal como descrito na seção 7.2.7. Todos os experimentos de cultivo foram realizados em triplicatas, e os dados foram calculados como médias \pm desvio padrão.

7.2.6. Extração das enzimas

Após o período de cultivo, o meio sólido foi transferido para frascos Erlenmeyer (no caso dos cultivos em coluna) e as enzimas foram extraídas por adição de 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, para obter uma proporção sólido/líquido de 1:10. A suspensão foi homogeneizada e posteriormente agitada, a 120 rpm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. 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.

7.2.7. Hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 5g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e 100 mL de tampão de citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. Esta suspensão foi inicialmente climatizada a 50°C, por 4 h, a 200 rpm de agitação. Após este passo, 5g de material fermentado em Erlenmeyer (como descrito na secção 7.2.4) foram adicionados ao BEX e toda esta mistura foi então incubada a 50°C, por 72 h, a 200 rpm. As amostras foram tomadas no tempo zero e depois a cada 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h para a quantificação da glicose e dos açúcares redutores totais liberados. Quando a hidrólise foi realizada com extrato enzimático bruto (EE), em vez do meio fermentado integral (MFI), apenas 50 mL de tampão de citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 foram adicionados ao BEX para aclimatização e, em seguida, o volume final de 100 mL foi completado por adição de 50 mL de extrato enzimático bruto (EE) de *A. niger* ou de *T. reesei* cultivado por FES sob condições de aeração forçada ou estática. Além disso, a fim de comparar os resultados e avaliar o sinergismo do meio fermentado integral e do extrato enzimático sobre a hidrólise enzimática do BEX, uma preparação de enzima comercial (Cellic Cetec2[®], gentilmente doada pela Novozymes A/S, Dinamarca), foi usada sozinha e em diferentes combinações com outras fontes de enzimas. A preparação de celulase comercial foi suficientemente diluída de modo a atingir uma atividade enzimática próxima (em termos de FPU/mL) ao extrato enzimático bruto dos fungos. Em todos os experimentos de hidrólise 0,1% m/v de azida de sódio foi adicionada, com o intuito de parar o desenvolvimento dos fungos durante a fase de hidrólise. Todos os experimentos de hidrólise foram efetuados em triplicatas, e os dados foram calculados como médias \pm desvio padrão. As médias de cada condição foram submetidas a uma análise estatística, utilizando o software Origin (versão 8.0).

7.2.8. Ensaios de atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de celulases e xilanase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com o procedimento padrão recomendado pela IUPAC (WOOD; BHAT, 1988), com algumas modificações. A atividade de FPase foi realizada segundo a metodologia de Ghose (1987). A atividade de endoglucanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL de extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 4% (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8. Esta mistura foi incubada a 50°C, por 10 minutos. A atividade de xilanase foi determinada de maneira similar, exceto que uma solução de xilana a 1% (xilana *Birchwood*, Sigma) foi utilizada como substrato em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. Finalmente, a atividade de β -glicosidase foi realizada usando-se uma solução de celobiose a 0,5% (Sigma) como substrato e a glicose liberada foi quantificada a partir do Kit de glicose (Laborlab, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade de FPase e endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de xilanase corresponde a um μ mol de xilose liberada por minuto, sob as condições de ensaio. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g).

7.2.9. Análises respirométricas

A análise respirométrica foi realizada medindo o CO₂ na saída de ar de cada coluna do sistema de biorreator, utilizando um instrumento GMM 220 (Vaisala, Finlândia).

7.2.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O teste Tukey foi aplicado com a finalidade de verificar se os diferentes valores de umidade (50, 60, 70 e 80%) e temperatura (28, 30, 32, 35 e 37°C) utilizados no processo de FES afetam a produção de enzimas pelo fungo e se a produção de enzimas sob condições de aeração forçada é melhor do que em condições estáticas. O nível de significância para o teste de Tukey foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Origin 8.0.

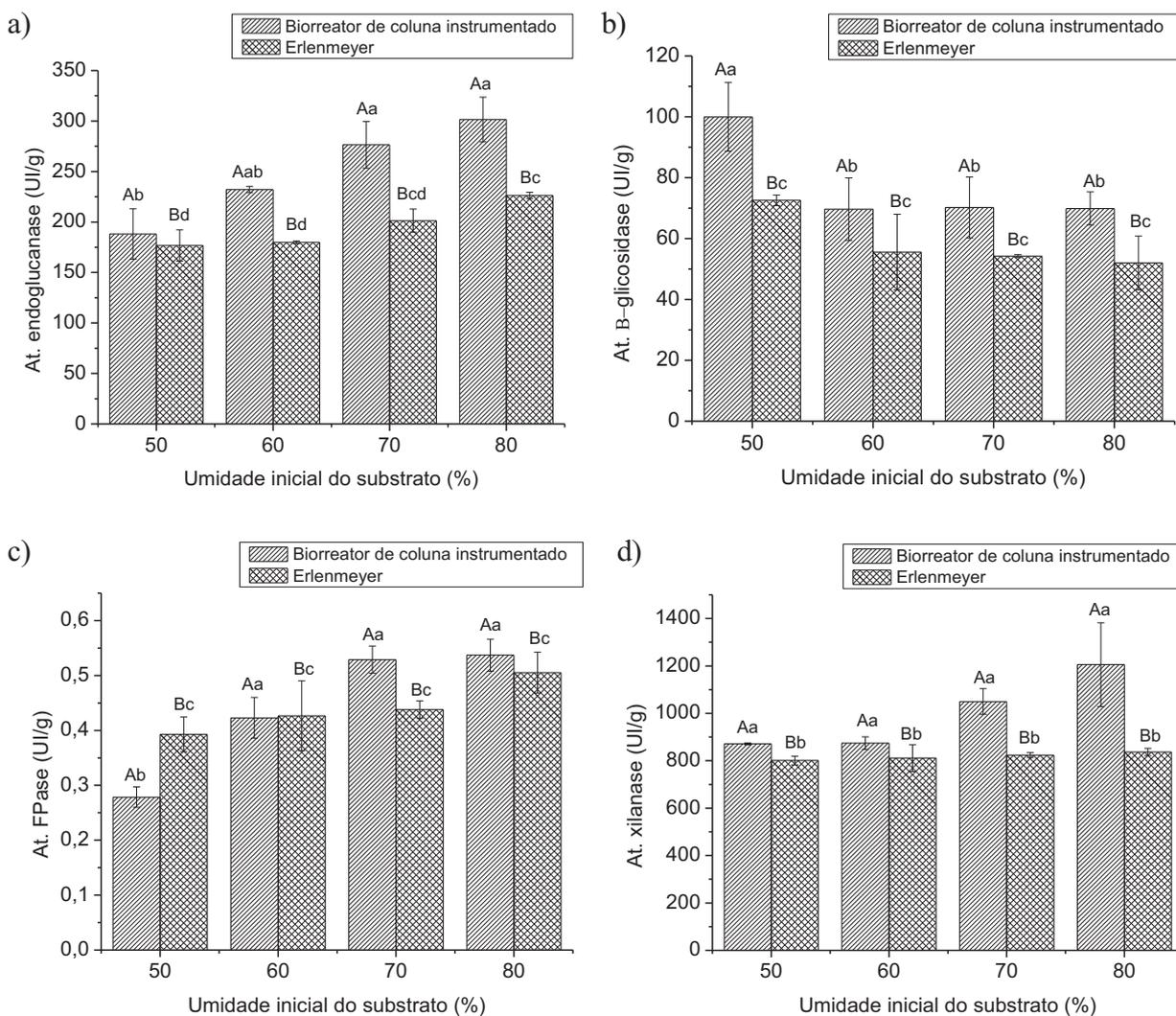
7.3. Resultados e discussão

7.3.1. Efeito do teor de umidade inicial na produção de celulases e xilanases por *A. niger* e *T. reesei*

Estudos de avaliação da produção de celulases e xilanases por *A. niger* e *T. reesei* cultivados sob condições operacionais controladas de FES foram realizadas em biorreator de coluna instrumentado. A fim de comparar a eficácia do sistema de biorreator utilizado, um conjunto idêntico de cultivos foi conduzido sobre condições de aeração estática. As melhores condições de FES pelos fungos foram selecionadas para serem aplicadas na etapa de hidrólise enzimática.

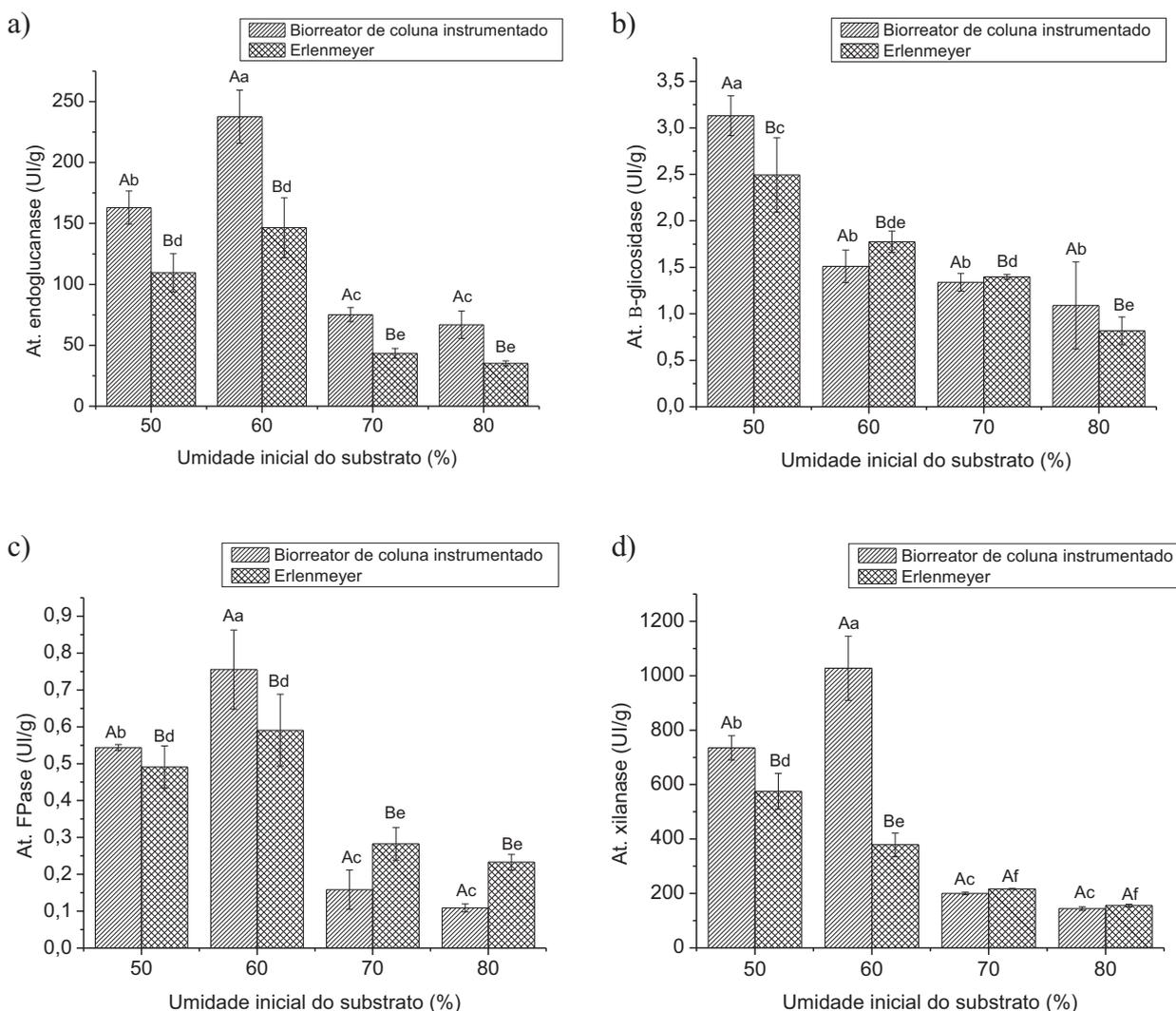
Primeiramente, o efeito do teor de umidade inicial do substrato sobre a produção enzimática foi investigada através do cultivo dos fungos durante 72 horas, a 35°C, utilizando-se diferentes teores de umidade inicial (50, 60, 70, e 80%). Uma comparação do efeito do teor de umidade inicial do substrato em termos de produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases por *A. niger* e *T. reesei* sob condições de aeração forçada e estática é apresentada nas Figuras 45 e 46, respectivamente.

Figura 45 – Efeito do teor de umidade inicial sob (a) produção de endoglucanase, (b) β -glucosidase, (c) FPase e d) xilanases por *A. niger* cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática.



Letras minúsculas (a, b, c, d) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes umidades em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos em biorreator e Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a, b, c, d ou A, B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 46 – Efeito do teor de umidade inicial sob (a) produção de endoglucanase, (b) β -glucosidase, (c) FPase e d) xilanases por *T. reesei* cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática.



Letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes umidades em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos em biorreator e Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a, b, c, d, e, f ou A,B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

É visível o efeito positivo dos cultivos em condições controladas de aeração forçada, de modo que, neste trabalho a produção de celulasas e xilanases foram

significativamente maiores do que em fermentações realizadas sob condições estáticas (Figs. 45 e 46). Para esta série de experimentos, a atividade de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase por *A. niger* e *T. reesei* foram de até 21 e 37%, 24 e 37% e 22 e 8% mais elevadas, respectivamente, quando se utilizou aeração forçada, em vez da estática. Por outro lado, a produção de FPase por *A. niger* e *T. reesei* em condições de aeração forçada e estática esteve praticamente na mesma ordem de grandeza, entretanto, a produção de FPase por *T. reesei* em biorreator foi 1% mais elevada em relação a produção de FPase em Erlenmeyer. Uma menor produção de enzimas em condições estáticas provavelmente está relacionada à limitação de oxigênio durante o crescimento dos fungos, já que o O_2 é transferido principalmente por difusão. Além disso, a transferência de oxigênio, a transferência de calor e a dissipação de CO_2 são também favorecidas sob condições de aeração forçada.

Em termos do efeito do teor de umidade inicial do substrato, a condição mais favorável para a produção de xilanase, endoglucanase e FPase por *A. niger* foi de 80% e para β -glicosidase de 50%, em ambos os sistemas de cultivos. No entanto, a análise estatística indicou que as médias das atividades obtidas usando teor de umidade inicial mais elevado (80%) não foram significativamente diferentes após uma comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Na verdade, este é um resultado muito positivo em termos de desenvolvimento de bioprocessos, pois implica que a biossíntese de celulasas e xilanase por *A. niger* 3T5B8 não foi muito sensível às variações de umidade inicial do substrato. Entre os vários parâmetros de funcionamento que afetam a eficiência do processo FES, o teor de umidade é um dos mais importantes. Se o teor de umidade é muito elevado, os espaços vazios entre os sólidos são cheios com água, resultando na limitação da transferência de oxigênio. Por outro lado, se o teor de umidade for muito baixo, o crescimento do micro-organismo pode ser prejudicado (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003). Consequentemente, a identificação do teor de umidade ótimo para cada substrato sólido é crucial para promover as condições favoráveis de crescimento do micro-organismo, e, consequentemente, uma produção de metabólito satisfatória. No entanto, o teor de umidade inicial ótimo depende tanto do substrato sólido quanto do micro-organismo utilizado (RAIMBAULT, 1998). Além disso, é importante notar que esta variável de processo pode variar ao longo do período de cultivo, uma vez que o crescimento e a respiração dos micro-organismos resultam na liberação de calor. Assim, encontrar uma linhagem que não é muito sensível às variações de teor de umidade inicial do substrato, como parece ser o caso do *A. niger* 3T5B8, é uma característica muito interessante para o desenvolvimento do processo. Por outro lado, a

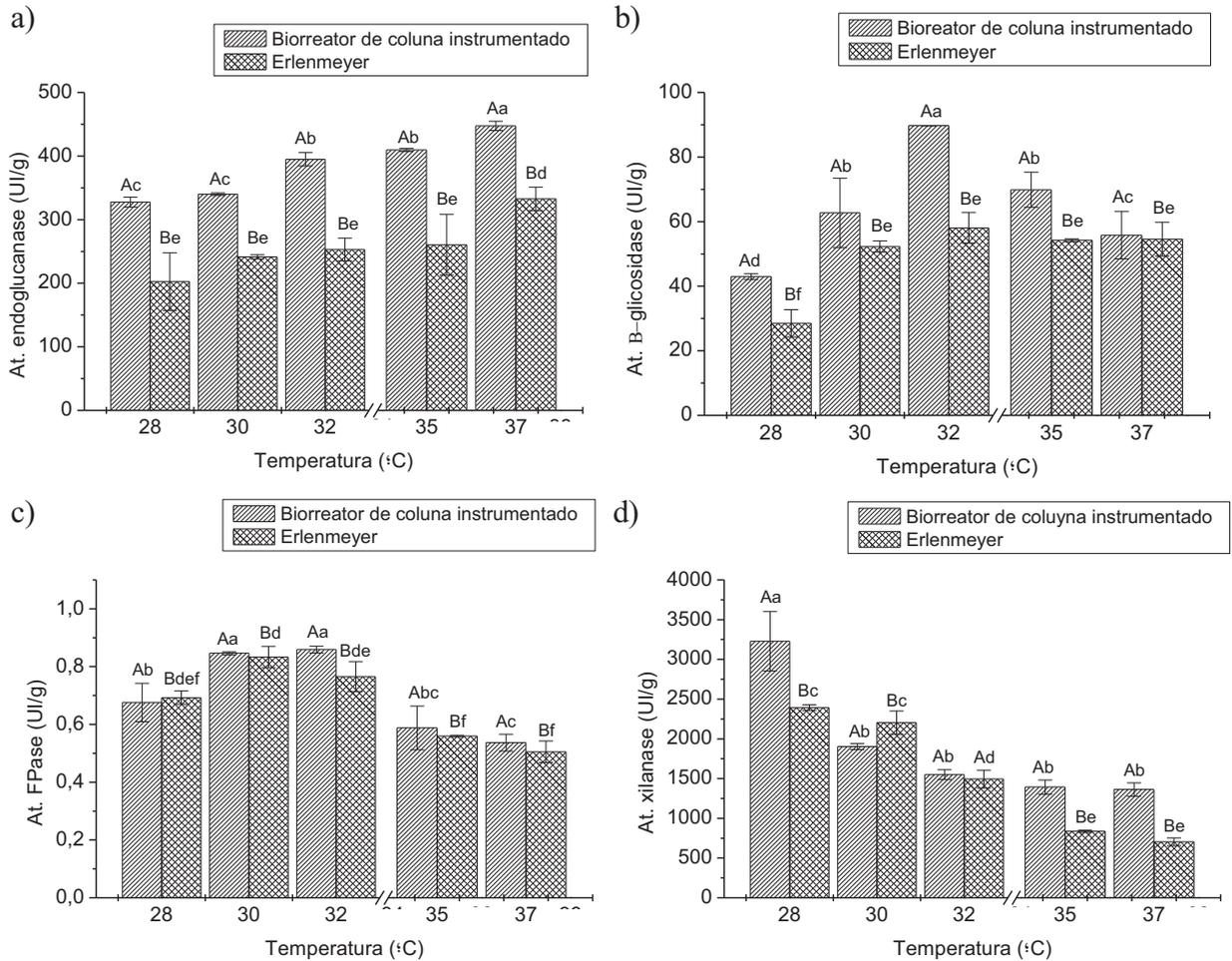
linhagem de *T. reesei* foi aparentemente mais sensível as variações de teor de umidade inicial do substrato (Fig. 46). A produção enzimática por *T. reesei* foi em geral mais elevada com teor de umidade de 50 ou 60%, com uma diminuição significativa da produção de enzimas mediante o aumento no teor de umidade (70 e 80%). Com base nestes resultados, o teor de umidade inicial do substrato de 80 e 60% foi selecionado para avaliar o efeito da temperatura sobre a produção enzimática por *A. niger* e *T. reesei*, respectivamente.

O efeito do teor de umidade inicial do substrato sobre a produção de enzimas celulases e xilanases pelas linhagens de *Aspergillus* e *Trichoderma* por FES foi descrito anteriormente. Mamma et al. (2008) avaliaram a produção de enzimas por FES, utilizando o fungo *A. niger* e casca de laranja como substrato, e foram capazes de aumentar significativamente a atividade das enzimas após a otimização do teor de umidade inicial do meio sólido. Delabona et al. (2013) usaram uma linhagem de *A. niger* P47C3 isolada da Floresta Amazônica para avaliar o efeito do teor de umidade na produção de endoglucanase e verificaram que a redução do teor de umidade do farelo de trigo de 70 para 50% m/m, resultou em um aumento de 2,5 vezes a produção de endoglucanase. Pal e Khanum (2010) avaliaram a produção de xilanase por *A. niger* cultivado em FES em seis níveis de umidade entre 55 a 80%. A maior produção de xilanase foi obtida quando a umidade inicial foi de 70%, sendo que a umidade inicial muito alta ou baixa diminuiu significativamente a produção de enzima. Singhanía, Sukumaran e Pandey (2007) investigaram a influência dos parâmetros de processo na produção de celulases por *T. reesei* RUT-C30 sob FES utilizando farelo de trigo como substrato e também verificaram que o teor de umidade inicial do meio teve um efeito negativo na produção das enzimas.

7.3.2. Efeito da temperatura sob a produção de celulases e xilanase por *A. niger* e *T. reesei*

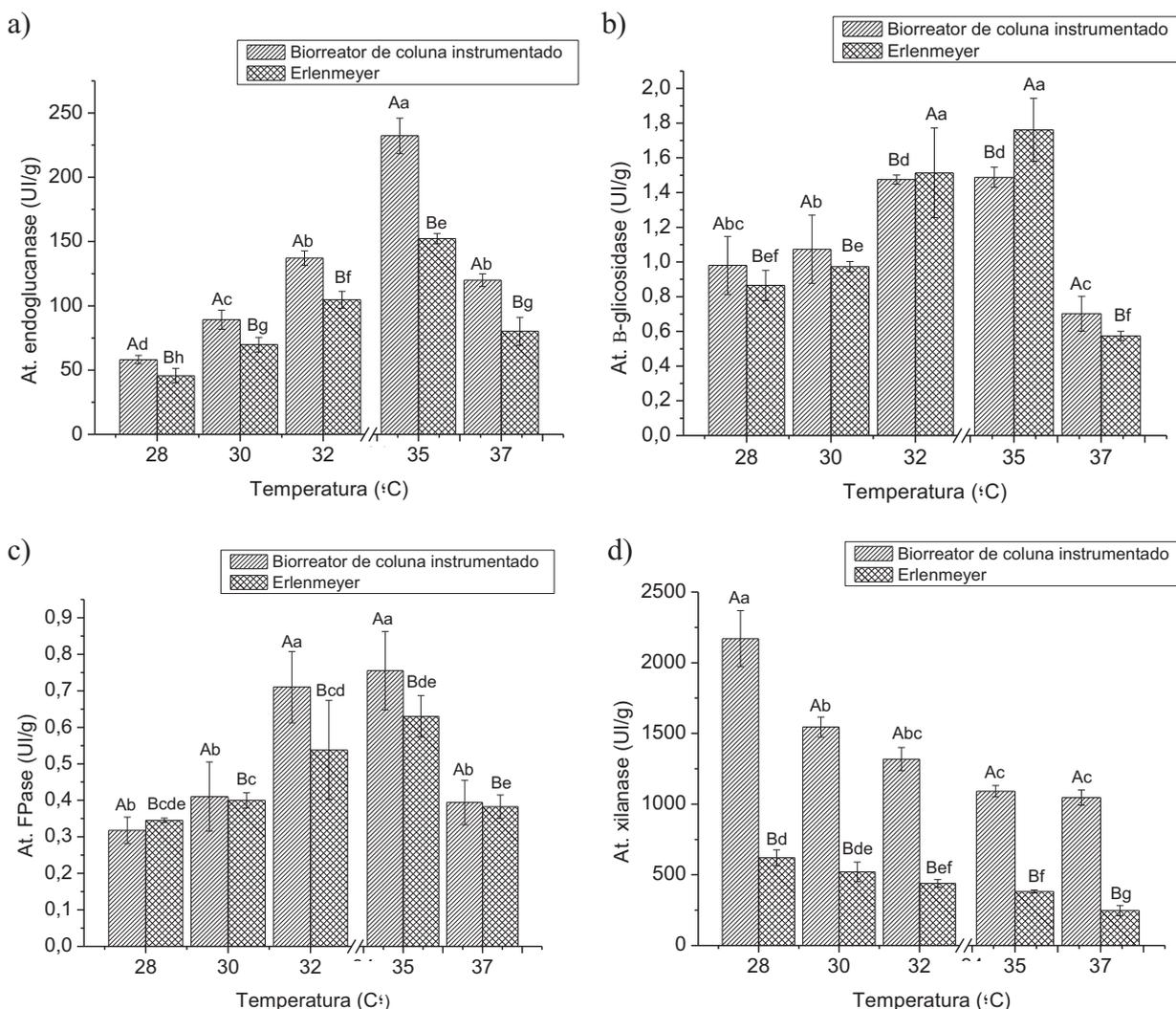
Os cultivos foram realizados nas temperaturas de 28, 30, 32, 35, e 37°C usando os sistemas de aeração forçada e estática e o teor de umidade inicial do substrato de 80% para *A. niger* e 60% para *T. reesei*. Uma comparação do efeito da temperatura em termos de atividade de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanase sob os sistemas de aeração forçada e estática são apresentadas nas Figuras 47 e 48, respectivamente.

Figura 47 – Efeito da temperatura sob (a) produção de endoglucanase, (b) β -glucosidase (c) FPase e d) xilanase por *A. niger* cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática.



Letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas para a fermentação em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos em biorreator e Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a, b, c, d, e, f ou A,B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 48 – Efeito da temperatura sob (a) produção de endoglucanase, (b) β -glucosidase (c) FPase e d) xilanase por *T.reesei* cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática.



Letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas para a fermentação em biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos em biorreator e Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g ou A,B) difere significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para o conjunto de cultivos realizados neste trabalho foi notável o efeito positivo sob condições controladas de aeração forçada, tal como a produção de celulasas e

xilanases por *A. niger* e *T. reesei* foram significativamente maiores nas fermentações com aeração forçada do que nas realizadas sob condições estáticas. Em termos de influência da temperatura nos cultivos sob aeração forçada, a atividade de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases por *A. niger* e *T. reesei* foram de até 49 e 43%, 24 e 234%, 29 e 1%, 5 e 13% maiores do que nos cultivos sob aeração estática, respectivamente. Isto pode ser explicado a partir das condições ambientais mais favoráveis obtidos no sistema de biorreator, como uma dissipação de calor eficiente, evitando-se gradientes de temperatura devido ao calor gerado como resultado da atividade microbiana.

O efeito da temperatura sobre a produção enzimática de *A. niger* variou para cada uma das enzimas analisadas (Fig. 47). Para xilanases, o aumento na temperatura teve um efeito negativo em ambos os sistemas de cultivos, uma vez que a produção de xilanase por *A. niger* no sistema de aeração forçada diminuiu de 3227,82 UI/g aos 28°C para 1362, 24 UI/g aos 37°C e na aeração estática diminuiu de 2396,3 UI/g aos 28°C para 704,4 UI/g aos 37°C, uma redução de 2,4 e 3,4 vezes, respectivamente. Por outro lado, a produção de endoglucanase foi favorecida pelo aumento da temperatura, com valores mais elevados (447,5 e 332,7 UI/g) a 37°C em ambos os sistemas de cultivos, forçado e estático, respectivamente. Quanto à β -glicosidase, a maior produção foi alcançada a 32°C com valores de 89,7 UI/g em sistema de cultivo de aeração forçada e 58,06 UI/g em sistema de cultivo de aeração estática. Por outro lado, a atividade de FPase foi maior na faixa de 30-32°C (0,9 UI/g) no sistema de cultivo sob condições de aeração forçada e 30°C (0,8 UI/g) no sistema de aeração estática. Os valores de FPase obtidos em ambos os sistemas foram muito semelhantes, embora no sistema de aeração forçada a atividade de FPase se manteve constante em duas faixas de temperatura, provavelmente devido a maior estabilidade obtida no sistema de biorreator. Para *T. reesei*, o efeito da temperatura foi mais homogêneo em ambos os sistemas de cultivos, com uma maior produção de celulases (em termos de endoglucanase, β -glicosidase e FPase) a 35°C, enquanto que a produção de xilanase foi melhor a 28°C (Fig. 48).

A temperatura é outra variável importante que afeta o crescimento microbiano na FES, influenciando assim a formação do produto. A influência da temperatura sobre a produção de celulases foi relatado para outras espécies de *Aspergillus* cultivadas por FES. Jecu (2000) estudou o efeito da temperatura na produção de endoglucanase por *A. niger* entre 25 e 37°C e descobriu que a melhor temperatura para a produção de endoglucanase foi na faixa de 28 a 34°C. Singhanian et al. (2007) investigaram o efeito da temperatura sobre a produção de celulase por *T. reesei* RUT C-30 cultivada em farelo de trigo por FES e também

descobriram que a temperatura de incubação influenciou positivamente na produção de celulases por esta linhagem.

Semelhante ao efeito do teor de umidade do substrato, a caracterização de cada micro-organismo em particular, em termos de influência da temperatura na cinética de crescimento e formação de produto é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos em FES. Com base nesses resultados, o teor de umidade inicial de 80% e temperatura de 28°C, foram selecionados para avaliação dos perfis cinéticos de produção enzimática ao longo de um período de cultivo de 120 horas por *A. niger*, enquanto que para *T. reesei* um teor de umidade inicial de 60% e uma temperatura de 35°C foram selecionados, baseado nas atividades de xilanase e celulases de ambos os fungos, respectivamente.

7.3.3. Perfis de produção enzimática por *A. niger* e *T. reesei* sob as condições selecionadas

Os perfis de produção de celulases e xilanases foram avaliados durante um período de 120 horas, utilizando as condições operacionais selecionadas (temperatura de 28°C e teor de umidade inicial do substrato de 80% para *A. niger*, e temperatura de 35°C e teor de umidade inicial de 60% para *T. reesei*, mantendo a umidade de entrada do ar a 80% e uma taxa de fluxo de 20 mL/min). A produção de endoglucanase, β -glucosidase, FPase e xilanases por *A. niger* e *T. reesei* em ambos os sistemas de cultivo estão ilustradas nas Figuras 49 e 50, respectivamente. A fim de comparar a eficácia do sistema utilizado, um conjunto idêntico de cultivos foram conduzidos sob condição de aeração estática.

Figura 49 – Perfis de produção de celulases e xilanases por *A.niger* cultivado sob FES por 120 horas, a 28°C, teor de umidade inicial de substrato e umidade do ar de entrada de 80%, e vazão de 20 mL/min.

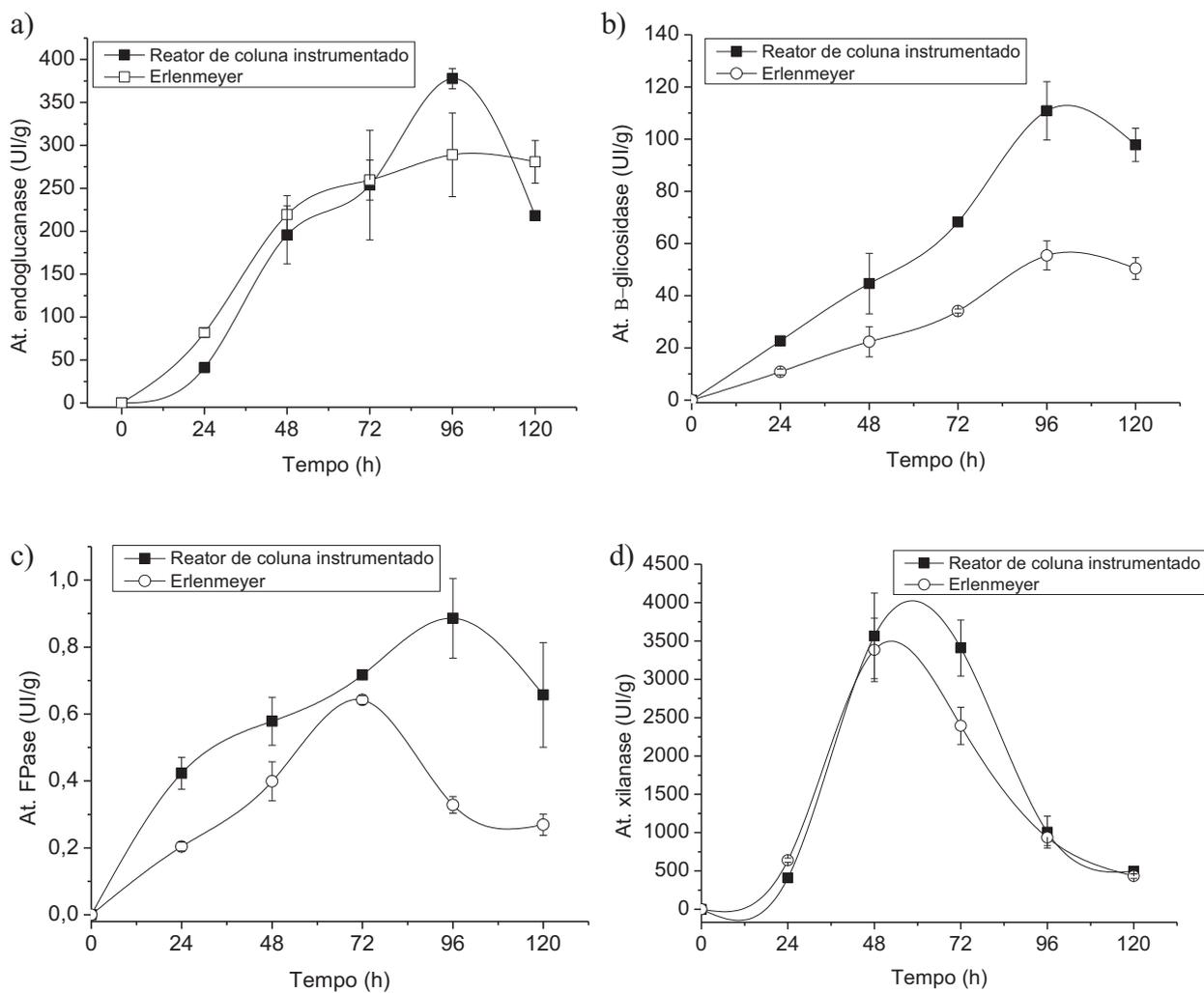
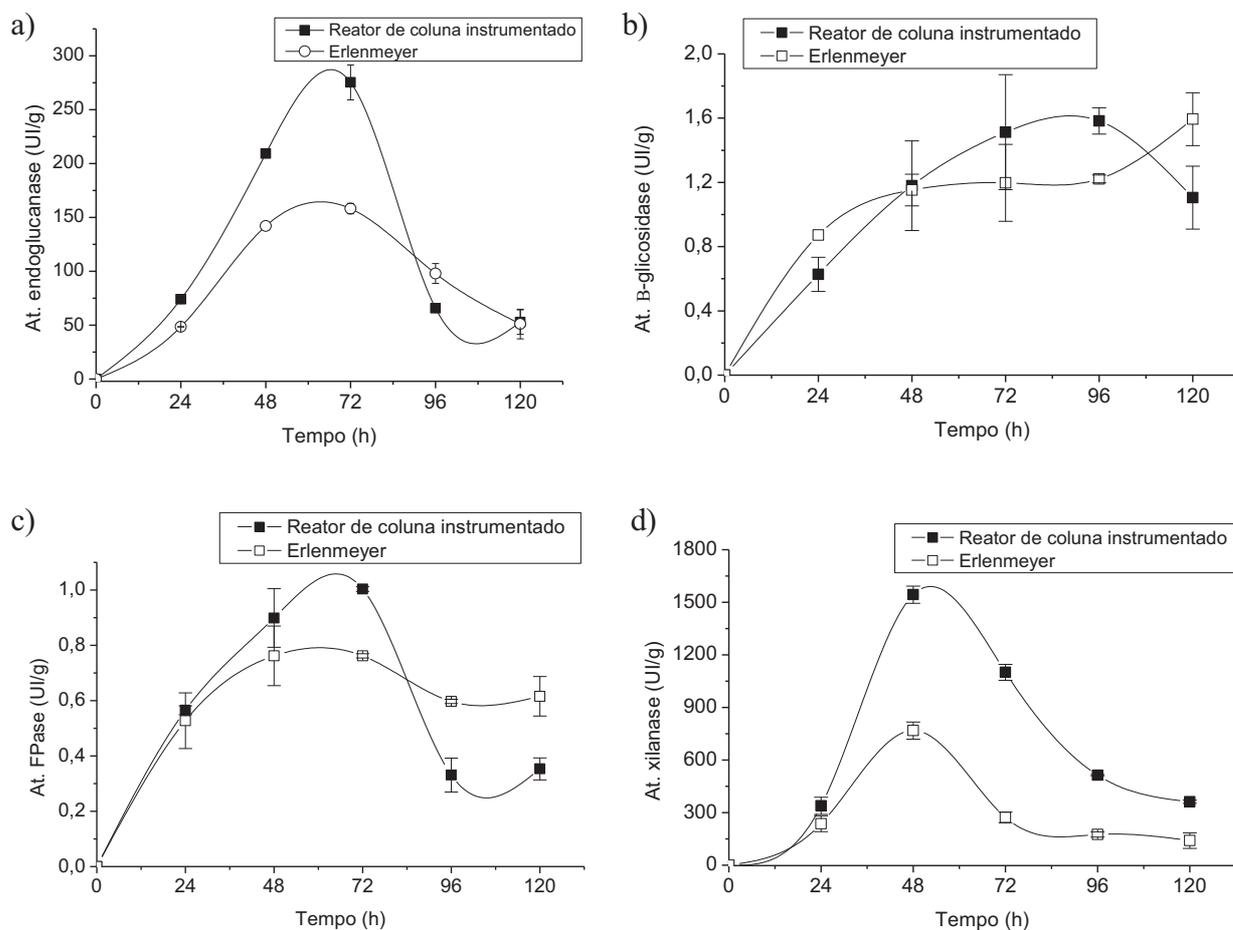


Figura 50 – Perfis de produção de celulases e xilanases por *T. reesei* cultivado sob FES por 120 horas, a 35°C, teor de umidade inicial de substrato de 60%, umidade do ar de entrada de 80%, e vazão de 20 mL/min.



O pico de produção da maioria das enzimas em ambos os sistemas de cultivos foi entre 48 e 96h tanto para *A. niger* quanto para *T. reesei*. O pico de produção de xilanase tanto para *A. niger* (3565,5 e 3382,5UI/g) quanto para *T. reesei* (1543,4 e 768,4 UI/g) foi em 48 h de cultivo, sob condições aeração forçada e estática, respectivamente. É interessante notar a grande diferença entre a quantidade de xilanases sintetizados por estes dois fungos tanto em sistemas de aeração forçada quanto estática. No sistema de aeração forçada e estática *A. niger* produziu 2,3 e 4,4 vezes mais xilanase do que *T. reesei*, respectivamente. O sistema de aeração forçada, como já mencionado anteriormente, torna as condições de fermentação mais favoráveis diminuindo a diferença entre a quantidade de enzimas produzidas entre os fungos.

Em termos de FPase, os valores de atividade foram semelhantes por ambos os fungos em ambos os sistemas de cultivos, no entanto, o valor máximo foi alcançado em 72h para *T. reesei* (1 UI/g) no sistema de aeração forçada e em 48h no sistema de aeração estática (0,8 UI/g) e para *A. niger* o valor máximo ocorreu em 96h (0,9 UI/g) e 72h (0,6 UI/g) no sistema de aeração forçada e estática, respectivamente. Os valores máximos de endoglucanase diferiram tanto em tempo quanto em ordem de grandeza. A produção de endoglucanase por *A. niger* foi de 377,6 e 289 UI/g em 96 horas cultivo no sistema de aeração forçada e estática, respectivamente. Esses valores foram 1,4 e 1,8 vezes mais elevados do que os obtidos por *T. reesei*, em 72 horas, no sistema de aeração forçada (275,4 UI/g) e estático (158,2 UI/g). A síntese de β -glicosidase seguiu a mesma tendência, diferindo principalmente na ordem de grandeza. Enquanto *T. reesei* produziu um valor máximo de β -glicosidase de 1,6 UI/g tanto no sistema de aeração estática (120h) quanto no sistema de aeração forçada (96h), a produção de β -glicosidase por *A. niger* foi de 110,9 UI/g (aeração forçada) e 55,4 UI/g (aeração estática) em 96 horas de cultivo. Nesse sentido, a produção de β -glicosidase por *A. niger* no sistema de aeração forçada e estática foi de 69 e 35 vezes mais elevada do que a produção de β -glicosidase por *T. reesei* em ambos os sistemas de cultivo, forçado e estático, respectivamente.

A maior produção de β -glicosidase pelas linhagens de *A. niger* em comparação com as linhagens de *T. reesei* já era esperada, devido às linhagens de *A. niger* serem amplamente citadas na literatura como boas produtoras de β -glicosidase, mas a grande diferença foi imprevista. Mesmo admitindo que *T. reesei* seja um dos fungos celulolíticos mais produtivos e a linhagem de *T. reesei* RUT-C30 uma das mais estudadas e melhor caracterizadas (AHAMED; VERMETTE, 2008; GUSAKOV, 2011), a quantidade de β -glicosidase produzida por *Trichoderma reesei* não é suficiente para uma conversão eficiente de biomassa (LYND et al., 2002b), uma vez que a conversão completa da celulose em glicose é dependente da quantidade de β -glicosidase ativa. Além disso, como a atividade β -glicosidase reduz os efeitos de inibição da celobiose, que é o produto final das atividades de exo e endoglucanase, a proporção adequada de cada uma destas enzimas é crucial para uma hidrólise eficiente (LYND et al., 2002b). Por outro lado, a produção β -glicosidase pela linhagem de *Aspergillus*, tais como *A. niger*, têm sido muitas vezes utilizadas para complementar os coquetéis enzimáticos comerciais (GUSAKOV, 2011; LYND et al., 2002b).

Em geral, estes resultados demonstraram o grande potencial da linhagem de *A. niger* 3T5B8 para a produção de glicosil hidrolases, uma vez que mostrou uma significativa

capacidade de biossíntese enzimática mais elevada em ambos os sistemas de cultivos, quando comparada com a linhagem celulolítica já bem consolidada *T. reesei* RUT-C30. Esta conclusão é consistente com estudos anteriores relatados por Couri et al. (2000), onde a mesma linhagem foi utilizada para produzir de forma eficiente as enzimas hidrolíticas de extração de óleo vegetal.

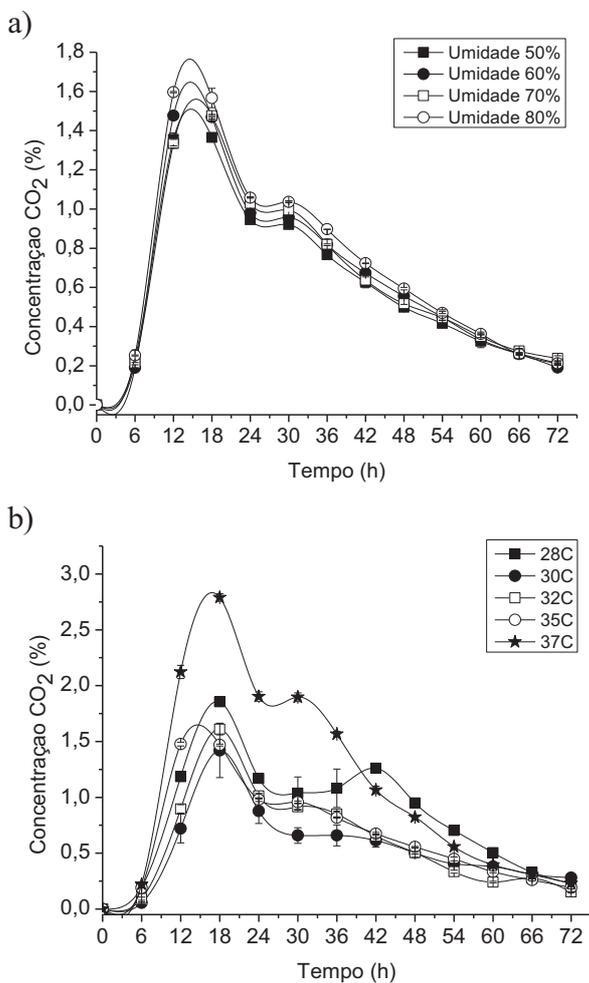
Com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, cultivos de 48 h para ambos os fungos sob condições selecionadas de FES (para *A. niger* um teor de umidade inicial de 80% e temperatura de 28°C e para *T. reesei* um teor de umidade inicial de 60% a temperatura de 35°C) foram realizados neste trabalho como parte do estudo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX).

7.3.4. Análises respirométricas

A evolução do CO₂ durante o processo de fermentação foi monitorado através de um sensor ligado à corrente de gás que sai das colunas do sistema de biorreator. Dados de CO₂ podem fornecer um meio importante para a compreensão das relações entre o crescimento dos fungos e a produção de enzimas, uma vez que é difícil medir a biomassa em FES, devido à dificuldade de separar a biomassa do substrato utilizado para a fermentação (RAIMBAULT, 1998). As Figuras 51 e 52 apresentam a evolução do CO₂ sobre as fermentações realizadas para avaliar os efeitos do teor de umidade inicial e temperatura sob a produção enzimática dos fungos *A. niger* e *T. reesei* sobre a condição operacional selecionada.

A Figura 51 mostra a evolução do CO₂ na fermentação em estado sólido utilizando *A. niger*. Pode-se observar que as curvas de evolução do CO₂ representadas na Figura 51a são muito semelhantes. Isso pode implicar que o crescimento do fungo não foi afetado pelos diferentes teores de umidade utilizados, o que está de acordo com a observação anterior de que a produção de celulasas e xilanases não foram significativamente afetadas pela umidade inicial ao utilizar um sistema de biorreator com aeração controlada e condições de umidade relativa do ar (Fig. 45). Com relação, ao efeito da temperatura sobre o crescimento dos fungos, pode-se observar que a curva de evolução do CO₂ a temperatura de 37°C se destacou em relação às demais (Fig. 51b). Este aumento favorável a 37°C está de acordo com a condição de maior produção de endoglucanase (Fig. 51b e 47a).

Figura 51 – Evolução do CO₂ durante a produção de celulases e xilanases por *A.niger* cultivado sob (a) diferentes teores de umidade iniciais e (b) diferentes temperaturas.

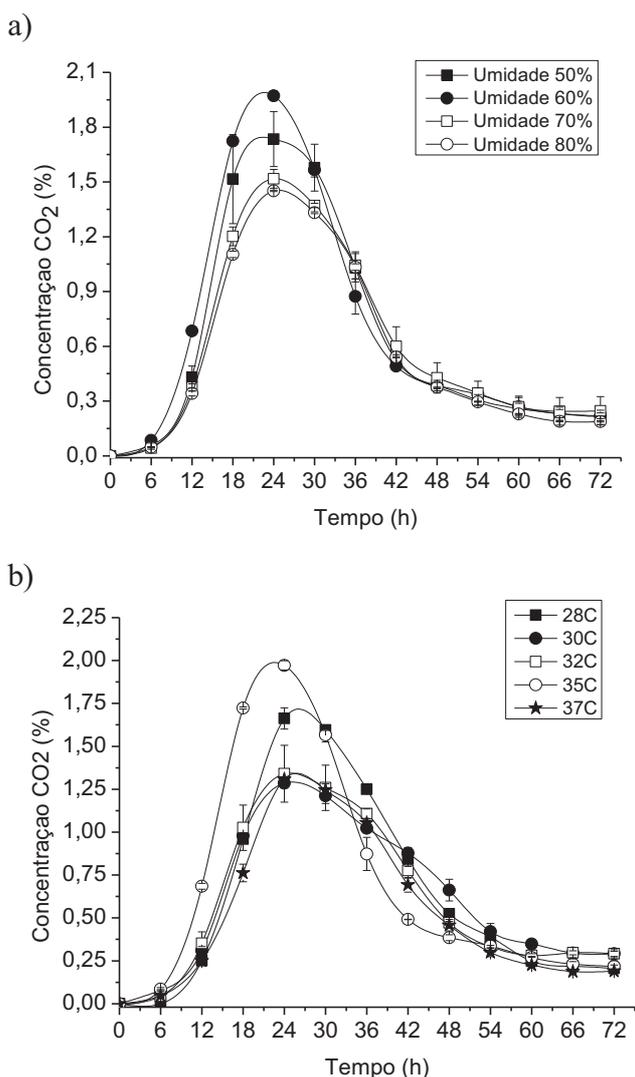


Condição operacional selecionada (umidade do ar de entrada de 80%, e vazão de 20 mL/min).

A Figura 52 mostra a evolução do CO₂ na fermentação em estado sólido utilizando *T. reesei*. Pode-se observar que as curvas de evolução do CO₂ representadas na Figura 52a são distintas entre si. Isso pode implicar que o crescimento do fungo foi afetado pelos diferentes teores de umidade utilizados, o que está de acordo com a observação anterior de que a produção de celulases e xilanases foram significativamente afetadas pela umidade inicial ao utilizar um sistema de biorreator com aeração controlada e condições de umidade relativa do ar (Fig. 46). Com relação, ao efeito da temperatura sobre o crescimento dos fungos, pode-se observar que a curva de evolução do CO₂ a temperatura de 28 e 35°C se destacaram em relação às demais (Fig. 52b). Este aumento favorável a 28 e 35°C está de

acordo com a condição de maior produção de xilanase e celulases, respectivamente (Fig. 48 e 52b).

Figura 52 – Evolução do CO₂ durante a produção de celulases e xilanases por *T. reesei* cultivado sob (a) diferentes teores de umidade iniciais e (b) diferentes temperaturas.



Condição operacional selecionada (umidade do ar de entrada de 80%, e uma taxa de fluxo de 20 mL/min).

7.3.5. Perfil temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor

A eficácia das enzimas produzidas por *A. niger* 3T5B8 e *T. reesei* RUT-C30 cultivados por FES em Erlenmeyer e biorreator foram avaliadas durante a hidrólise do bagaço

de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX). Para isso, foram realizados dois experimentos diferentes: (1) o meio fermentado integral (MFI) obtido em 48 h de cultivo em Erlenmeyer ou biorreator sob condições previamente selecionadas foi misturado com o BEX, sem separar as enzimas do micélio fúngico; (2) o extrato enzimático (EE), obtido a partir da extração/filtração das enzimas após procedimentos de FES em Erlenmeyer ou biorreator realizados sob as mesmas condições de cultivo foi misturado ao BEX. Além disso, a fim de avaliar o efeito sinérgico das diferentes combinações de fontes de enzimas na hidrólise do BEX e o potencial de utilização das enzimas produzidas por FES em Erlenmeyer e biorreator para a suplementação de coquetéis de enzimas comerciais, um conjunto de ensaios foi realizado utilizando as enzimas presentes no MFI e EE de *A. niger* ou de *T. reesei* em diferentes combinações com uma baixa dosagem de preparação comercial. Os objetivos destes experimentos foram: (1) verificar se as enzimas produzidas por *A. niger* e *T. reesei* no biorreator eram mais eficientes na hidrólise do que as produzidas em Erlenmeyer, visto que a produção de enzimas pelos fungos foi mais elevada no biorreator; (2) avaliar se era possível reduzir a quantidade de enzimas comerciais usando enzimas produzidas *in house*; (3) e se era mais vantajoso em termos de eficiência de hidrólise usar o MFI ou o EE em combinação com a preparação de enzima comercial.

A Figura 53 apresenta os perfis temporais de açúcares redutores totais (ART) liberados durante a hidrólise do BEX usando as enzimas presentes no meio fermentado integral (MFI) (Fig. 53a) e no extrato enzimático (EE) (Figura 53b) de *A. niger* 3T5B8 ou de *T. reesei* RUT-C30 produzidas em Erlenmeyer ou biorreator. Para efeitos de comparação, as duas figuras incluem os resultados da hidrólise do BEX obtidos utilizando uma preparação de enzima comercial. As atividades enzimáticas totais do EE de ambos os fungos no estado de cultivo selecionado, bem como a atividade enzimática total da preparação comercial utilizada são listadas na Tabela 15. A preparação enzimática comercial foi utilizada em uma dosagem semelhante em termos de atividade de FPase a que está sendo produzida pelo fungo *T. reesei* em biorreator.

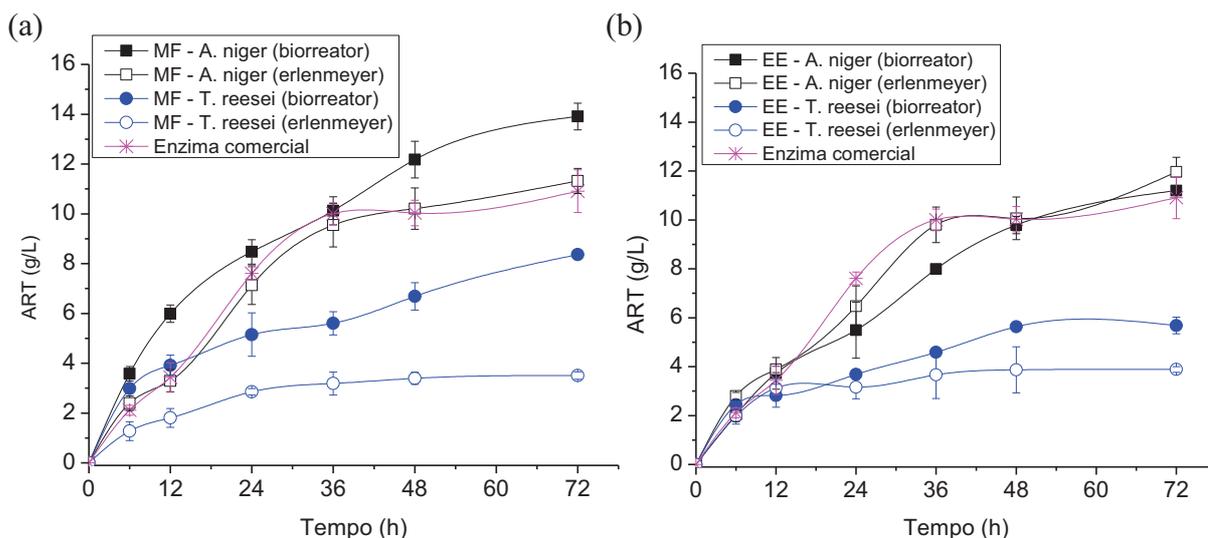
Tabela 15 – Atividade enzimática total dos extratos de *A. niger* e *T. reesei* produzidos por FES em Erlenmeyer e biorreator e da preparação comercial usada para hidrólise do BEX.

Atividade enzimática (UI)	<i>A. niger</i> 3T5B8		<i>T. reesei</i> RUT-C30		Enzima comercial
	Erlen	Reator	Erlen	Reator	
Xilanase	16913	17828	3842	7717	1820
Endoglucanase	1095	980	710	1045	1730
β -glicosidase	110	225	6	6	468
FPase	2	3	4	5	5

Na Figura 53, pode ser visto que a quantidade de ART aumenta com o tempo e este efeito é mais pronunciado quando se utiliza as enzimas de *A. niger* do que as enzimas de *T. reesei*, obtidas em ambos os sistemas de cultivos. O elevado desempenho das enzimas de *A. niger* é observado tanto quando se utiliza o meio fermentado integral (MFI) (Fig. 53a), como quando se utiliza o extrato enzimático (EE) destes cultivos (Fig. 53b). Também é interessante notar que o MFI de *A. niger* produzido em biorreator apresentou um desempenho mais elevado (14 g/L) do que o obtido pela enzima comercial (11 g/L), por outro lado, o EE de *A. niger* produzido tanto em Erlenmeyer quanto em biorreator e o MFI produzido em Erlenmeyer apresentaram desempenho semelhante (11,2, 12 e 11,3 g/L, respectivamente) à enzima comercial na hidrólise do BEX (Fig. 53).

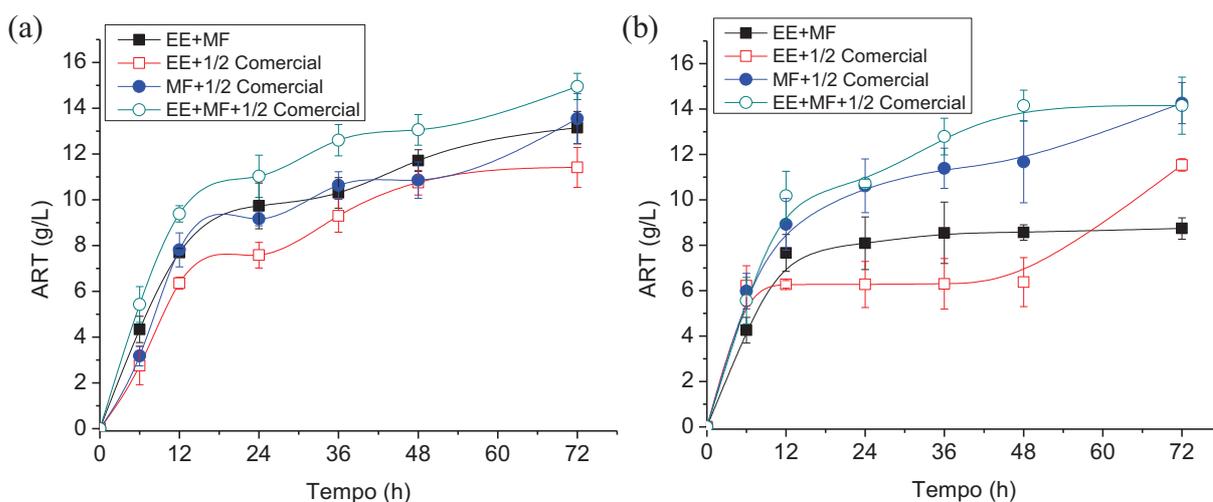
A concentração de ART obtida usando as enzimas do MFI ou do EE de *T. reesei* produzidas em biorreator foram de 8,4 e 5,7 g/L, respectivamente, no entanto quando se utilizou as enzimas do MFI ou EE de *T. reesei* obtidas em Erlenmeyer essa concentração foi de apenas 3,5 e 3,9 g/L, respectivamente, o que significa que as enzimas do MFI e EE de *T. reesei* obtidas em biorreator promoveram uma hidrólise do BEX de 2,4 e 1,5 vezes mais elevada do que as obtidas em Erlenmeyer, respectivamente. Neste contexto, o MFI de *T. reesei* obtido em biorreator teve um efeito positivo sobre a hidrólise do BEX quando comparado com as enzimas obtidas em Erlenmeyer, entretanto as enzimas de *A. niger* obtidas em ambos os sistemas de cultivo foram melhores na hidrólise do BEX do que as enzimas de *T. reesei*.

Figura 53 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizando o meio de fermentado integral- MFI, extratos enzimáticos - EE e combinações de (a) *A. niger* 3T5B8 e de (b) *T. reesei* RUT-C30 obtidas em Erlenmeyer. Ambas as figuras incluem também as combinações utilizando uma preparação de enzima comercial.



Ao analisar os resultados da hidrólise do BEX obtidos utilizando as enzimas de *A. niger* e *T. reesei* em diferentes combinações com a enzima comercial (Fig. 54), é interessante notar que, a dosagem de enzima comercial utilizada na combinação de MFI (a partir de *T. reesei* ou *A. niger*) e enzima comercial foi reduzida pela metade e a hidrólise do BEX ainda foi de até 40% mais eficiente em termos de açúcares redutores totais liberados do que usando apenas enzima comercial (10,7 g/L de ART liberados usando apenas a enzima comercial versus 15 g/L de ART liberados usando MFI de *A. niger* e metade da dosagem de enzima comercial ou 14,1 g/L de ART liberados usando MFI de *T. reesei* e metade da dosagem de enzima comercial).

Figura 54 – Perfis temporais de concentração de açúcares redutores totais liberados durante a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizando meio de fermentado integral- MFI, extratos enzimáticos - EE e combinações de (a) *A. niger* 3T5B8 e de (b) *T. reesei* RUT-C30 obtidas em Erlenmeyer. Ambas as figuras incluem também as combinações utilizando uma preparação de enzima comercial.



De modo geral, pode ser observado nas Figuras 53 e 54a, que as concentrações de ART obtidas a partir da hidrólise do BEX utilizando as enzimas de *T. reesei* produzidas em Erlenmeyer ou biorreator são baixas (3,5 - 3,9 g/L), exceto quando essas enzimas são usadas em combinação com a enzima comercial (14,1 g/L). Este resultado é surpreendente quando se leva em conta a atividade de FPase de *A. niger* (2 UI) que é de 2,5 vezes menor em comparação a de *T. reesei* (5 UI) e com a da enzima comercial (5 UI) (Tabela 15). Uma possível explicação para o desempenho superior do coquetel enzimático de *A. niger* pode ser relacionado com o valor mais elevado da atividade de xilanase (4,4 vezes superior ao coquetel enzimático do *T. reesei* e 9,3 vezes maior do que o da preparação comercial), bem como o valor mais elevado de β -glicosidase em relação ao coquetel de *T. reesei* (Tabela 15). Segundo Wyman e Kumar (2009), a presença de xilanase no coquetel enzimático pode facilitar a hidrólise, através do aumento da acessibilidade das celulasas as microfibrilas de celulose. Outra explicação possível para o melhor desempenho do coquetel enzimático de *A. niger* pode estar relacionado com a força de inibição ou de desativação das celulasas por compostos fenólicos. O tipo de enzima, de micro-organismo que a enzima foi produzida e o tipo de composto fenólico presente, por exemplo, no BEX pode influenciar a força de inibição e de desativação das celulasas. Ximenes et al. (2011) relataram que a β -glicosidase de *A. niger* foi

mais resistente à inibição e desativação por fenóis, requerendo concentrações de aproximadamente 5 e 10 vezes mais elevadas, respectivamente, para os mesmos níveis de inibição ou de desativação por fenóis, como observado para as enzimas de *T. reesei*. Assim, a atividade significativamente menor de β -glicosidase nos coquetéis de *T. reesei*, pode ser a causa do acúmulo de celobiose e inibição enzimática, o que pode explicar o seu desempenho inferior durante a hidrólise. Além do mais, pode-se supor que a presença de outras enzimas acessórias nos coquetéis de *A. niger* e na preparação comercial, que não foram quantificadas aqui, pode também ter tido um papel importante durante a hidrólise. A descoberta recente do importante papel das monooxigenases polissacarídeos líticas (MOPL) de aumentar a degradação da celulose, juntamente com outras enzimas acessórias tem levado à concepção de uma nova categoria de enzimas no banco de dados CAZY chamado "atividades auxiliares" (AA) que integram um grupo do módulo catalítico envolvido na degradação da parede celular vegetal (LEVASSEUR et al. 2013).

7.3.6. Hidrólise do BEX em termos de conversão total

Uma análise em termos de açúcares totais liberados (em termos de glicose e de açúcares redutores totais) no final da hidrólise do BEX foi conduzida. A Figura 55 resume a porcentagem de conversão obtida após 72 horas de hidrólise do BEX usando as enzimas de *A. niger* (Fig. 55a) e de *T. reesei* (Fig. 55b) obtidas em Erlenmeyer e biorreator a partir dos extratos enzimáticos (EE), ou meio fermentado integral (MFI), em comparação com o coquetel comercial, bem como combinações destas diferentes fontes de enzimas.

Para estudo da hidrólise do BEX utilizando os complexos enzimáticos de *A. niger* (Fig. 55a), a conversão de biomassa usando o MFI produzido no reator foi significativamente melhor do que o produzido em Erlenmeyer e semelhante à combinação de EE, MFI e $\frac{1}{2}$ de enzima comercial em termos de glicose (MFI – biorreator 27,5% do valor teórico; MFI - Erlenmeyer 16,7% do valor teórico; combinação: EE+MFI+ $\frac{1}{2}$ Comercial 25% do valor teórico), já em termos de açúcares redutores totais (ART) a combinação de EE, MFI e $\frac{1}{2}$ de enzima comercial apresentou uma conversão maior (19,5% do valor teórico) do que o obtido pelas enzimas do MFI de *A. niger* em biorreator e Erlenmeyer (14 e 15,1% do valor teórico, respectivamente). Por outro lado, em termos de conversão final de biomassa o MFI de *A. niger* produzido no biorreator (41,3% do valor teórico) resultou em uma conversão semelhante à obtida pelas seguintes combinações: (1) MFI e EE (39% do valor teórico); (2) MFI e $\frac{1}{2}$ de enzima comercial (40,2% do valor teórico); (3) EE, MFI e $\frac{1}{2}$ de enzima comercial

(44% do valor teórico). A conversão final de biomassa utilizando as enzimas do MFI de *A. niger* obtida em Erlenmeyer foi semelhante à conseguida pelas enzimas do EE de *A. niger* obtida em Erlenmeyer e biorreator (37,1 e 33,3% do valor teórico, respectivamente), da preparação comercial (31,4% do valor teórico) e da combinação de EE e ½ de preparação comercial (34% do valor teórico). Para essas condições de hidrólise, em termos de glicose essa semelhança permaneceu (EE – Erlenmeyer 18,5% do valor teórico; EE – biorreator 16,7% do valor teórico; EE e ½ comercial 19,6% do valor teórico), exceto para a preparação de enzima comercial que apresentou uma conversão de glicose de apenas 14%. Em termos de ART a conversão alcançada pelas enzimas do MFI de *A. niger* obtida em erlenmeyer (15,1% do valor teórico) foi semelhante à combinação de EE e ½ de enzima comercial (14,3) e menor do que a conseguida pela enzima comercial (17,9% do valor teórico) e EE de *A. niger* em Erlenmeyer (18,6% do valor teórico). Essas semelhanças e diferenças nos valores de conversão de biomassa foram consideradas com base no teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$). É importante notar aqui uma boa correlação entre a liberação de glicose e açúcares redutores totais. Isso pode ser uma indicação de que os níveis de atividade de β -glicosidase estão sendo suficientes para a formação de açúcares monoméricos. Além disso, os resultados de conversão enzimática utilizando o complexo enzimático de *A. niger*, resultaram em valores semelhantes ou até mesmo maiores do que os obtidos utilizando uma preparação de enzima comercial (14,0% do valor teórico em termos de glicose e 31,9%, em termos de ATR). Este resultado é bastante interessante, especialmente quando se considera que a dosagem de enzimas (em termos de atividade FPase) presente no coquetel comercial foi de até 2,5 vezes maior do que o do EE de *A. niger*.

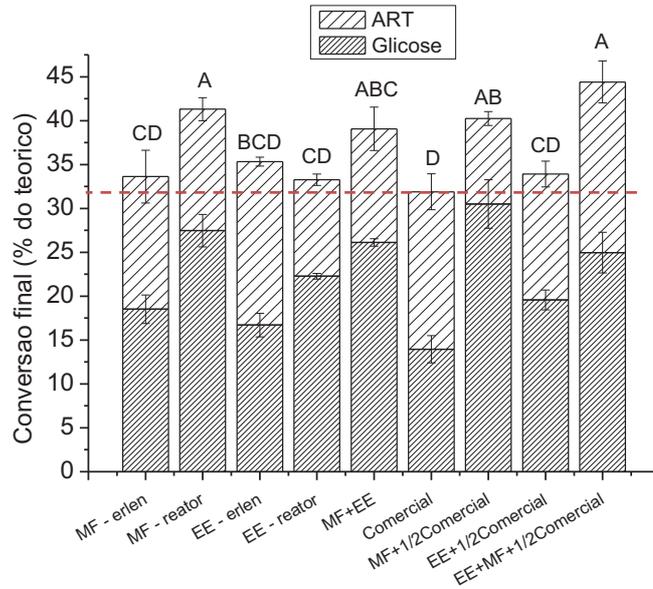
De modo geral, é interessante notar que os valores de conversão mais elevados foram obtidos, especialmente quando o MFI esteve presente. Considerando-se que os açúcares liberados a partir do farelo de trigo no MFI já foram subtraídos, uma vez que foi utilizado como um dos controles é sugerido que algumas enzimas que permaneceram adsorvidas ao meio fermentado integral (enzimas ligadas micélio) estão ativas durante a etapa de sacarificação, melhorando assim a conversão do BEX.

Para estudo da hidrólise do BEX utilizando o complexo enzimático de *T. reesei* (Fig. 55b), a tendência foi semelhante a obtida para *A. niger*. No entanto, os valores de conversão foram significativamente inferiores aos obtidos pelas enzimas de *A. niger* ou da preparação comercial. A conversão final de biomassa utilizando MFI ou EE de *T. reesei* produzido em biorreator foi significativamente maior (24,8 e 16,9% do valor teórico,

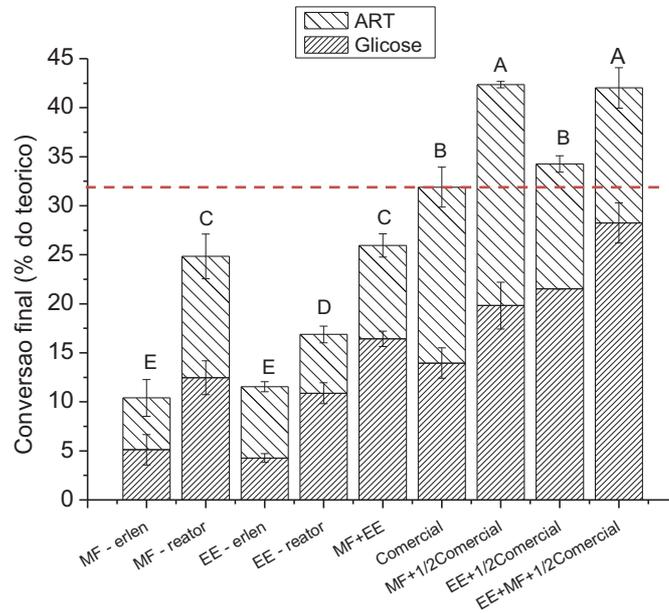
repectivamente) do que o produzido em Erlenmeyer (10,4 e 11,6% do valor teórico, repectivamente), entretanto a conversão final utilizando MFI de *T. reesei* produzido no biorreator foi semelhante à combinação de MFI e EE produzido em Erlenmeyer (26% do valor teórico). Em termos de conversão de glicose o MFI ou EE obtido em biorreator apresentaram valor teórico semelhante (12,5 e 11%, respectivamente). No entanto, um valor notavelmente elevado de conversão foi obtido através da combinação de MFI de *T. reesei* e enzima comercial (20% do valor teórico em termos de glicose e 42,5%, em termos de conversão total). A adição de EE de *T. reesei* a essa combinação resultou em rendimentos de conversão total semelhante (42%). Kovacs et al. (2009b) observaram também uma melhora na capacidade hidrolítica quando caldos fermentativos foram utilizados em vez dos sobrenadantes de *T. reesei* e *T. atrovide* cultivados em fermentação submersa. Estes autores atribuíram as enzimas ligadas ao micélio tal melhora na hidrólise do abeto vermelho. Este melhor desempenho usando o caldo fermentativo integral de *T. reesei* em vez do sobrenadante também já tinha sido relatado por Schell et al. (1990) para a sacarificação simultânea e processo de fermentação, que mostrou que, usando o caldo fermentativo integral foi possível produzir rendimentos mais elevados de etanol do que utilizando o caldo filtrado. Os nossos resultados demonstram que a utilização do MFI de *A. niger* obtido em biorreator e a combinação de MFI de *T. reesei* e celulasas comerciais pode ser de grande interesse para a execução de processos biotecnológicos relacionado com a conversão do bagaço de cana-de-açúcar em combustíveis e produtos químicos.

Figura 55 – Conversão depois de 72 horas de hidrólise do bagaço de cana explodido (BEX) utilizando enzimas do extrato enzimático (EE) e meio fermentado integral (MFI) de (a) *A. niger* 3T5B8 e de (b) *T. reesei* RUT-C30 e diferentes combinações com enzima comercial.

(a)



(b)



Meios com letras diferentes são significativamente diferentes após comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em geral, quando se analisou o desempenho isolado das enzimas de ambos os fungos, a hidrólise do BEX usando extrato enzimático (EE) ou meio fermentado integral (MFI) produzido em Erlenmeyer mostrou rendimentos semelhantes, tanto em termos de

glicose quanto em açúcar redutor total. Por outro lado, quando se analisou o desempenho do EE ou MFI produzido em biorreator, a hidrólise foi mais elevada utilizando o MFI o que dá a clara indicação de que o passo de extração da enzima produzida por FES pode ser eliminada. Desse modo, mostramos aqui que (1) a produção de EE e MFI em biorreatores de estado sólido pode ser uma ótima alternativa para aumentar a produção de enzimas e conseqüentemente a hidrólise enzimática e que (2) a utilização de resíduo lignocelulósico agrícola para a produção de enzimas por FES e sua reutilização durante o passo de sacarificação, pode eliminar os passos de extração/filtração das enzimas. Neste contexto, a produção de enzimas em biorreatores de estado sólido por micro-organismos e a posterior eliminação da etapa de extração das enzimas pode ser muito vantajosa na hidrólise enzimática, pois a produção de enzimas por micro-organismos em biorreatores de estado sólido pode proporcionar um aumento na produção de enzimas devido às condições mais favoráveis de fermentação e a eliminação da etapa de extração pode reduzir os custos de processo além de evitar a produção de efluentes, contribuindo assim significativamente para a redução do custo das enzimas. Além disso, a configuração do processo de produção de enzimas que foi proposta aqui – produção de enzimas *in house* usando FES e posterior aplicação do MFI na etapa de sacarificação de biomassa para gerar os açúcares necessários para a produção de biocombustíveis e outros produtos químicos – podem ser uma alternativa promissora para uma sustentável instalação industrial de conversão de biomassa dentro do conceito de biorrefinaria.

Ao comparar os resultados obtidos de conversão final de biomassa utilizando as enzimas de ambos os fungos, o complexo enzimático de *A. niger* produzido em biorreator de estado sólido e Erlenmeyer, resultou em valores de conversão de 2 e 3,2 vezes mais elevados, respectivamente, do que o complexo de *T. reesei*. No entanto, é importante notar que, completando as enzimas do MFI de *T. reesei* com enzimas comerciais foi possível atingir valores de conversão semelhantes aos obtidos usando as enzimas de *A. niger*. Embora os rendimentos de conversão relatados neste trabalho, sejam ainda de escala de laboratório, eles são muito promissores, visto a baixa dosagem de enzima comercial utilizada nos experimentos de hidrólise. Assim, nossas descobertas destacam o potencial de utilização dos biorreatores de FES para a produção de enzimas *in house*, seguido pela aplicação do MFI no passo de sacarificação como um processo de configuração que é útil de ser investigado.

7.4. Conclusão

Pode-se concluir que a linhagem de *A. niger* 3T5B8 cultivado sob FES em biorreator e Erlenmeyer foi capaz de produzir um complexo enzimático eficiente na hidrólise do BEX, quando comparado com as enzimas de *T. reesei* RUT C30 e também de uma preparação comercial sob uma dosagem inferior ou semelhante de atividade de FPase. Além disso, a hidrólise do BEX usando o MFI produzido por ambos os fungos no biorreator de estado sólido resultou em rendimentos mais elevados quando comparado com a hidrólise do BEX utilizando o sobrenadante (EE) ou o MFI produzido em Erlenmeyer, dando a clara indicação de que o MFI em biorreatores de estado sólido pode levar a uma maior hidrólise do BEX e que o passo de extração/filtração das enzimas pode ser eliminado. A produção de enzimas em biorreatores de estado sólido por micro-organismos e a posterior eliminação da etapa de extração das enzimas pode ser muito vantajosa na hidrólise enzimática, pois a produção de enzimas por micro-organismos em biorreatores de estado sólido pode proporcionar um aumento na produção de enzimas devido às condições mais favoráveis de fermentação e, a eliminação da etapa de extração pode reduzir os custos de processo além de evitar a produção de efluentes, contribuindo assim significativamente para a redução do custo das enzimas. Por conseguinte, a hidrólise do BEX utilizando meio fermentado integral a partir da FES pode ser considerada como um processo alternativo em potencial, adequando-se dentro do conceito de biorrefinaria.

7.5. Referências

AHAMED, A., VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40(3), p. 399-407, 2008.

AMORE, A., PEPE, O., VENTORINO, V., BIROLO, L., GIANGRANDE, C., FARACO, V. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. **Fems Microbiology Letters**, v. 339(2), p. 93-101, 2013.

AMORIM, H.V., LOPES, M.L., OLIVEIRA, J.V.D., BUCKERIDGE, M.S., GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91(5), p. 1267-1275, 20

ANDERSEN, M.R., GIESE, M., DE VRIES, R.P., NIELSEN, J. Mapping the polysaccharide degradation potential of *Aspergillus niger*. **Bmc Genomics**, v. 13, p. 17, 2012.

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

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18(5), p. 355-383, 2000.

CHEN, H.Z., HE, Q. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87(12), p. 1619-1625, 2012.

COURI, S., TERZI, S.D., PINTO, G.A.S., FREITAS, S.P., DA COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36(3), p. 255-261, 2000.

CUNHA, F.M., ESPERANCA, M.N., ZANGIROLAMI, T.C., BADINO, A.C., FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

DELABONA, P., FARINAS, C., DA SILVA, M., AZZONI, S., PRADELLA, J. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012a.

DELABONA, P., PIROTA, R., CODIMA, C., TREMACOLDI, C., RODRIGUES, A., FARINAS, C. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012b.

DELABONA, P.D., PIROTA, R., CODIMA, C.A., TREMACOLDI, C.R., RODRIGUES, A., FARINAS, C.S. 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, p. 236-242, 2013.

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.

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

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29(9), p. 419-425, 2011.

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

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

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11(1), p. 1-5, 2000.

KING, B.C., WAXMAN, K.D., NENNI, N.V., WALKER, L.P., BERGSTROM, G.C., GIBSON, D.M. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 14, 2011.

KOVACS, K., MACRELLI, S., SZAKACS, G., ZACCHI, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 11, 2009a.

KOVACS, K., SZAKACS, G., ZACCHI, G. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresource Technology**, v. 100(3), p. 1350-1357, 2009b.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203-4213, 2009.

LAGO, A.C., BONOMI, A., CAVALETT, O., DA CUNHA, M.P., LIMA, M.A.P. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. **Biomass & Bioenergy**, v. 46, p. 5-12, 2012.

LAN, T.Q., WEI, D., YANG, S.T., LIU, X.G. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 175-182, 2013.

LEVASSEUR, A., DRULA, E., LOMBARD, V., COUTINHO, P.M., HENRISSAT, B. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 14, 2013.

LYND, L., WEIMER, P., VAN ZYL, W., PRETORIUS, I. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66(3), p. 506-+, 2002a.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66(3), p. 506-+, 200b.

MAMMA, D., KOURTOGLOU, E., CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99(7), p. 2373-2383, 2008.

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

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

PAL, A., KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101(19), p. 7563-7569, 2010.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77(1), p. 149-162, 1999.

PIROTA, R., TONELOTTO, M., DELABONA, P.D., FONSECA, R.F., PAIXAO, D.A.A., BALEEIRO, F.C.F., NETO, V.B., FARINAS, C.S. 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, p. 465-471, 2013b.

RAGHAVARAO, K., RANGANATHAN, T., KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13(2-3), p. 127-135, 2003.

RAIMBAULT, M.; GERMON, J. Procédés d'enrichissement en protéines de produits comestibles solides. patent n° 76.06.677, 1976.

RAIMBAULT, R. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. in: **Electronic Journal of Biotechnology**, p. 3-45, 1998

RODRIGUES, A.C., LEITAO, A.F., MOREIRA, S., FELBY, C., GAMA, M. Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 526-533, 2012.

SCHELL, D.J., HINMAN, N.D., WYMAN, C.E., WERDENE, P.J. Whole broth cellulase production for use in simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-5, p. 287-297, 1990.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., PANDEY, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142(1), p. 60-70, 2007.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., PATEL, A.K., LARROCHE, C., PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46(7), p. 541-549, 2010.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.D., MEDEIROS, A.B.P., KARP, S.G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L.P., PITARELO, A.P., FERREIRA-LEITAO, V., GOTTSCHALK, L.M.F., FERRARA, M.A., BON, E.P.D., DE MORAES, L.M.P., ARAUJO, J.D., TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101(13), p. 4820-4825, 2010.

SORENSEN, A., TELLER, P.J., LUBECK, P.S., AHRING, B.K. Onsite Enzyme Production During Bioethanol Production from Biomass: Screening for Suitable Fungal Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164(7), p. 1058-1070, 2011.

SOUZA, W.R., DE GOUVEA, P.F., SAVOLDI, M., MALAVAZI, I., BERNARDES, L.A.D., GOLDMAN, M.H.S., DE VRIES, R.P., OLIVEIRA, J.V.D., GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 16, 2011.

WAEONUKUL, R., KOSUGI, A., PRAWITVVONG, P., DENG, L., TACHAAPAIKOON, C., PASON, P., RATANAKHANOKCHAI, K., SAITO, M., MORI, Y. Novel cellulase recycling method using a combination of *Clostridium thermocellum* cellulosomes and *Thermoanaerobacter brockii* beta-glucosidase. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 424-430, 2013.

WEISS, N., BORJESSON, J., PEDERSEN, L.S., MEYER, A.S. Enzymatic lignocellulose hydrolysis: Improved cellulase productivity by insoluble solids recycling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 14, 2013.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

XIA, L.M., SHEN, X.L. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, v. 91(3), p. 259-262, 2004.

XIMENES, E., KIM, Y., MOSIER, N., DIEN, B., LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48(1), p. 54-60, 2011.

Capítulo 8 – Produção de bioetanol a partir do bagaço de cana hidrolisado por meio fermentado integral e extrato enzimático dos fungos *Aspergillus niger* 3T5B8, *Aspergillus oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *Trichoderma reesei* RUT C30

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirola; Priscila da Silva Delabona; Cristiane Sanchez Farinas

Manuscrito modificado e publicado na revista internacional Bioenergy Research, in press, 2014

Resumo

As linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A), *A. niger* (3T5B8) e *T. reesei* (RUT C30) foram utilizadas para produção de enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas por fermentação em estado sólido (FES), utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono. O meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) produzido *in house* por essas linhagens foram utilizados na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX). As combinações que mais favoreceram a hidrólise do BEX foram (1) MFI de *A. niger* 3T5B8 e EE de *T. reesei* RUT C30, (2) MFI de *A. oryzae* P6B2 e EE de *A. niger* 3T5B8 e (3) MFI de *T. reesei* RUT C30 e EE de *A. niger* 3T5B8 com uma conversão de açúcares redutores totais de 66, 65 e 64%, respectivamente. O material hidrolisado dessas combinações (contendo resto de bagaço de cana não hidrolisado, farelo de trigo, micélio fúngico e açúcares) foi utilizado para produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1). O rendimento de etanol pela levedura *S. cerevisiae* (CAT-1) utilizando o material hidrolisado pelo MFI de *A. oryzae* P6B2 e EE de *A. niger* 3T5B8 foi de 84% do valor teórico, enquanto que os rendimentos em etanol utilizando as combinações de MFI de *A. niger* 3T5B8 e EE de *T. reesei* RUT C30 ou MFI de *T. reesei* RUT C30 e EE de *A. niger* 3T5B8 foram de 57,7 e 61,1%, respectivamente. Neste contexto, a produção de enzimas *in house* por microorganismos bons produtores de enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas pode ser muito vantajosa para reduzir os custos do processo de hidrólise enzimática, visto que hoje o preço das enzimas comerciais é um dos principais fatores limitantes para a produção de etanol celulósico. Outro fator que também pode contribuir para a redução do custo do processo de produção de etanol celulósico são técnicas mais eficientes de sacarificação e de fermentação alcoólica. Deste modo, a utilização do meio fermentado integral na etapa de sacarificação e a eliminação da etapa de filtração do hidrolisado para posterior utilização na fermentação alcoólica pode ser uma alternativa promissora para reduzir os custos energéticos e o tempo de processo, visto que a utilização do meio fermentado integral na hidrólise do BEX e a eliminação da etapa de filtração do hidrolisado não afetou a hidrólise e nem a produção de etanol pela levedura.

8.1. Introdução

Nas últimas décadas, o bioetanol tem assumido um papel muito importante entre as fontes de combustíveis renováveis e seu mercado está em contínua expansão. A poluição do ar, o aquecimento global e o futuro da produção de petróleo são as principais motivações que levaram o interesse público e privado ao desenvolvimento da produção de bioetanol como um aditivo ou uma alternativa para o petróleo (DEMIRBAS, 2008). Devido a estas vantagens aparentes, há um grande interesse em comercializar tecnologias para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (SHELL et al., 2004).

No Brasil, o bagaço de cana é um subproduto lignocelulósico abundante e uma alternativa atraente para a produção de bioetanol. No entanto, devido à sua recalcitrância, o uso bem sucedido desta matéria-prima exige um pré-tratamento adequado. O pré-tratamento da lignocelulose é um passo importante para uma utilização eficiente da biomassa para a produção de açúcares fermentescíveis. A remoção da lignina e hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose, e o aumento da porosidade no processo de pré-tratamento pode melhorar significativamente a hidrólise (MCMILLAN, 1994), e evitar a formação de inibidores. Vários métodos de pré-tratamento são utilizados para a hidrólise da lignocelulose. As vantagens do pré-tratamento por explosão a vapor incluem o baixo requerimento de energia comparado com o pré-tratamento mecânico e sem custos ambientais ou de reciclagens. Os métodos convencionais requerem 70% mais energia do que o processo de explosão a vapor para atingir a redução do tamanho da partícula (HOLTZAPPLE; HUMPHREY; TAYLOR, 1989). O processo de explosão a vapor é reconhecido como um dos processos de pré-tratamento mais rentável para os resíduos agrícolas e folhosos, mas é menos eficaz para coníferas (CLARK; MACKIE, 1987).

Após o pré-tratamento, os polímeros de carboidratos dos materiais lignocelulósicos são convertidos em monômeros de açúcares (glicose, xilose, arabinose, galactose, manose) por um processo chamado hidrólise (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b; BALAT; BALAT, 2009). A hidrólise enzimática converte os carboidratos da biomassa lignocelulósica (celulose e hemiceluloses) em açúcares fermentescíveis pela ação de um conjunto de enzimas incluindo celulasas, hemicelulasas e enzimas não hidrolíticas (SELIG et al., 2008; KESHWANI; CHENG, 2009; SOUZA et al., 2012).

As enzimas são produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, contudo, os fungos filamentosos são os mais usados na produção de enzimas industriais e exibem características modelo para tal aplicação (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011). Dentre

algumas dessas características destacam-se a facilidade de cultivo, a produção de quantidades elevadas de enzimas extracelulares e o baixo custo de produção em biorreatores de grande escala. Os fungos filamentosos frequentemente usados na produção de enzimas industriais são os gêneros de *Trichoderma* e *Aspergillus* (DE VRIES; VISSER, 2001; ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005). O fungo *Trichoderma reesei* RUT C30 é um dos micro-organismos melhor caracterizados, e tornou-se referência entre as linhagens de *T. reesei* produtoras de celulasas (LE CROM et al., 2009). Além disso, as celulasas de *T. reesei* são consideradas “padrão industrial” para hidrólise enzimática da lignocelulose (Merino e Cherry, 2007). No entanto, *T. reesei* apresenta deficiência na produção de algumas enzimas, como por exemplo, de β -glicosidase (ANDRIC et al., 2010). Assim, uma maneira de melhorar a atividade das enzimas de *T. reesei* nas preparações enzimáticas é completando-a com enzimas de outros micro-organismos (KING et al., 2011). Entre o gênero *Aspergillus*, *A. niger* e *A. oryzae* são os dois fungos mais importantes a nível mundial para aplicações biotecnológicas (GUOWEIA et al. 2011). Uma comparação entre as sequências do genoma de *T. reesei* e *A. niger* mostrou que *A. niger* é mais versátil na produção de celulasas, hemicelulasas e esterases codificados (SOUZA et al, 2011). Por outro lado, descobertas recentes sobre a genômica de *A. oryzae* revelaram que ele é enriquecido com genes envolvidos na degradação da biomassa (KOBAYASHI et al. 2007).

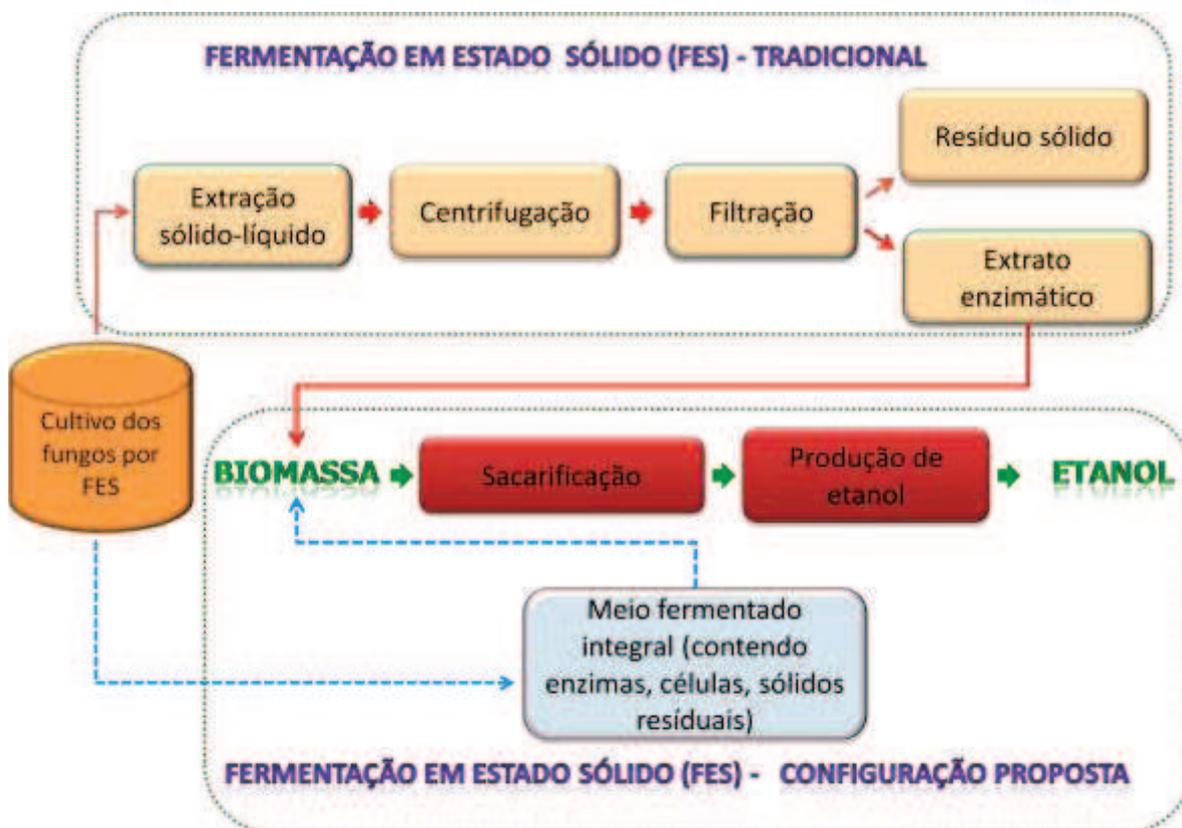
Os fungos filamentosos são considerados os micro-organismos melhor adaptados para a fermentação em estado sólido (FES), uma vez que os substratos sólidos se assemelham ao habitat natural onde esses fungos vivem (TENGERDY; SZAKACS, 2003). Além disso, a FES é um processo interessante para produção de enzimas hemicelulolíticas/celulolíticas a baixo custo, devido à possibilidade de usar resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato para o crescimento microbiano (CASTILHO et al., 2000). Tradicionalmente, em processos de FES, as enzimas sintetizadas pelos micro-organismos são extraídas do substrato sólido através de uma operação convencional de extração do sólido-líquido, resultando em um sobrenadante líquido contendo as enzimas de interesse e um resíduo sólido. Uma maneira de evitar a geração deste resíduo sólido seria a utilização do meio fermentado integral contendo as enzimas, o micélio e o substrato sólido residual diretamente na etapa de sacarificação da biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar.

Convencionalmente, na hidrólise e fermentação separada (HFS) o material hidrolisado é filtrado para posterior utilização na fermentação alcoólica. Uma maneira de se

reduzir os custos energéticos e tempo de processo seria adicionar diretamente a levedura a esse material hidrolisado, contendo restos de biomassa lignocelulósica, micélio fúngico e enzima. A adição do meio fermentado integral a biomassa lignocelulósica que vai ser hidrolisada e a eliminação da etapa de filtração do material hidrolisado podem ser muito vantajosas no conceito de biorrefinaria, uma vez que pode reduzir os custos e o tempo de processo de produção do etanol celulósico e evitar a geração de efluentes. No entanto, ainda não há conhecimento de nenhum estudo sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar usando meio fermentado integral por FES para avaliar a contribuição das enzimas ligadas ao micélio para esse processo e nem tão pouco a utilização do material hidrolisado, contendo restos de biomassa lignocelulósica, micélio fúngico e enzimas na fermentação alcoólica.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar o meio fermentado integral e extrato enzimático dos fungos *A. oryzae*, *A. niger* e *T. reesei* obtidos por fermentação em estado sólido em diferentes combinações na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e investigar a utilização do material hidrolisado contendo restos de bagaço de cana, farelo de trigo, micélio fúngico e enzimas na fermentação alcoólica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. Neste contexto, foi proposto um novo processo simplificado de conversão da biomassa a etanol. Esta configuração permitiu o uso de um único sistema de reator, evitando a adição de passos adicionais de separação (Fig. 56).

Figura 56 – Ilustração esquemática do processo simplificado de conversão da biomassa a etanol.



A produção da enzima *on site* é incluída no processo de sacarificação e fermentação alcoólica usando as enzimas do meio fermentado integral obtidas por fungos, por FES, na sacarificação. Este processo pode ser realizado em um único sistema de reator, evitando a necessidade de passos adicionais de separação.

8.2. Material e Métodos

8.2.1. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram uma linhagem mutante de *Aspergillus niger* (conhecido como *A. niger* 3T5B8) da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil), uma linhagem de *Trichoderma reesei* RUT-C30 da *American Type Culture Collection* e duas linhagens de *Aspergillus oryzae* (P6B2 e P27C3A) isoladas do solo da floresta Amazônica por Delabona et al. (2012a) e depositadas na coleção da Embrapa Tecnologia de Alimentos – Rio de Janeiro. A levedura comercial CAT-1 é uma

linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* desenvolvida especificamente para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar e foi cedida por Jalles Machado Mill (Góias, Brasil).

Os fungos são mantidos na geladeira em placas com meio BDA, a temperatura ambiente em tubos sob fina camada de óleo mineral e no ultrafreezer por meio de esporos congelados. As culturas fúngicas foram revitalizadas e mantidas em Erlenmeyer de 125 mL com BDA inclinado a 32°C, durante 5 dias, antes da inoculação. A levedura é mantida liofilizada.

8.2.2. Materiais lignocelulósicos

A FES foi realizada utilizando-se farelo de trigo (FT) (Agricopecuária Claro, São Carlos, Brasil) como substrato sólido. O farelo de trigo foi lavado até que a água saísse limpa e incolor, depois foi seco a 50°C e armazenado no ultrafreezer. Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) cedido gentilmente pelo CTBE (Campinas, Brasil). O BEX foi triturado no moinho de facas e passado em uma peneira de 2,5 mm. A composição do BEX utilizado em todos os experimentos de hidrólise, em termos de celulose, hemicelulose e lignina foram $51,7 \pm 0,6$, $8,9 \pm 0,1$ e $34,3 \pm 0,3\%$, respectivamente (DELABONA et al., 2012b).

8.2.3. Condições de cultivo da fermentação em estado sólido

O FT lavado foi o substrato sólido utilizado para a FES para produção de celulases e xilanases. Cinco gramas de FT lavado foram adicionado ao Erlenmeyer de 250 mL e umedecidos com meio de Mandels modificado (MANDELS; STENBERG, 1976) até atingir uma umidade inicial de 60% para *T. reesei*, 70% para *A. oryzae* P27C3A e 80% para *A. oryzae* P6B2 e *A. niger*. Os Erlenmeyer foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos, à 1 atm. O substrato foi inoculado com uma suspensão de esporos de *A. niger* (3T5B8), *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* (RUT C30) de 10^7 esporos/g. Os Erlenmeyer foram incubados a 28°C por 24h para *A. oryzae* P6B2 e 48h para *A. oryzae* P27C3A e *A. niger*, para *T. reesei* os Erlenmeyer foram incubados a 35°C por 48h. Após o período de cultivo, as enzimas foram extraídas por adição de 50 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, para obter uma proporção sólido/líquido de 1:10. A suspensão foi homogeneizada e posteriormente agitada a 120 rpm, por 30 minutos, à temperatura ambiente. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 rpm, por 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta para estudos de hidrólise, como descrito na secção

seguinte. Alternativamente, o meio fermentado integral foi utilizado para os experimentos de hidrólise (seção 8.2.4). Todos os experimentos de cultivo foram realizados em triplicatas, e os dados foram calculados como médias \pm desvio padrão.

8.2.4. Hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 5g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) e 50 mL de tampão de citrato de sódio, 50 mmol/L, pH 4,8. Esta suspensão foi inicialmente climatizada a 50 ° C por 4 h a 200 rpm de agitação. Após este passo, 5g de meio fermentado integral (MFI) em Erlenmeyer (como descrito na seção 8.2.3) e 50 mL de extrato enzimático bruto (EE) foram adicionados ao BEX e toda esta mistura foi então incubada a 50°C, por 72h, sob 200 rpm. As amostras foram tomadas no tempo zero e depois em 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h para a quantificação da glicose e de açúcares redutores totais liberados. Em todos os experimentos de hidrólise 0,1% m/v de azida de sódio foi adicionada, com o intuito de parar o desenvolvimento de fungos durante a fase de hidrólise. Todos os experimentos de hidrólise foram efetuados em triplicatas, e os dados foram calculados como médias \pm desvio padrão. As médias de cada condição foram submetidas a uma análise estatística, utilizando o software Origin (versão 8.0).

8.2.5. Produção de etanol

A produção de etanol foi realizada adicionando ao material hidrolisado 25g/L de levedura hidratada e glicose até a concentração de 10% m/v. Os Erlenmeyer de 500 mL contendo o BEX hidrolisado, meio fermentado integral, enzimas e levedura foram incubados a 31°C, por 8 horas, a 100 rpm. Amostras foram retiradas no tempo zero e depois a cada 1h para a quantificação da glicose (Kit Dolles, Goiânia, Brasil) e etanol. O cálculo de rendimento de etanol foi realizado assumindo que 100g/L de glicose, teoricamente, equivale a 51g/L de etanol.

8.2.6. Ensaios de atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram analisados para quantificação das atividades de celulasas e xilanase. Todas as enzimas foram analisadas de acordo com o procedimento padrão recomendado pela IUPAC (WOOD; BHAT, 1988), com algumas modificações. A atividade de FPase foi realizada segundo a metodologia de Ghose (1987). A atividade de

endoglucanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL de extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 4% (CMC, Sigma) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L e pH 4,8. Esta mistura foi incubada a 50°C, por 10 minutos. A atividade de xilanase foi determinada de maneira similar, exceto que uma solução de xilana a 1% (xilana *Birchwood*, Sigma) foi utilizada como substrato em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L e pH 5,0. Finalmente, a atividade de β -glicosidase foi realizada usando-se uma solução de celobiose a 0,5% (Sigma) como substrato e a glicose liberada foi quantificada a partir do Kit de glicose (Laborlab, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade de FPase e endoglucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de xilanase corresponde a um μ mol de xilose liberada por minuto, sob as condições de ensaio. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Os resultados foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato sólido seco inicial (UI/g).

8.2.7. Quantificação dos açúcares e etanol

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). A glicose foi quantificada a partir do Kit de glicose (Dolles, Goiânia, Brasil). A determinação de etanol após 8h de fermentação alcoólica foram feitas em HPLC (Varian 356-LC) utilizando uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-rad), detector de índice de refração (RID), forno a 50°C e vazão de 0,6 mL/min. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 0,05mol/L.

8.2.9. Análise Estatística

Os resultados de hidrólise obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O teste Tukey foi aplicado com a finalidade de verificar qual ou quais combinações teriam um efeito positivo na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX). O nível de significância para o teste de Tukey foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Origin 8.0.

8.3. Resultados e Discussão

8.3.1. Produção de celulases e xilanases

A FES foi realizada por um período total de 120h em frascos Erlenmeyer utilizando *A. niger* (3T5B8), *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A), *T. reesei* (RUT C30) e FT como substrato. A Tabela 16 ilustra os picos de atividade enzimática de P6B2 em 24h e de P27C3A, 3T5B8 e RUT C30 em 48h de cultivo, respectivamente.

A produção de endoglucanase pela linhagem de *T. reesei* foi de até 25% mais elevada do que a conseguida pelas linhagens de *A. oryzae*. No entanto, a produção de endoglucanase pelo *A. niger* foi de 93, 89 e 54% mais elevada do que as obtidas pelas linhagens de *A. oryzae* (P27C3A e P6B2) e *T. reesei*, respectivamente. A mesma tendência ocorreu para a produção de β -glicosidase e xilanase. A produção de β -glicosidase pela linhagem de *A. niger* foi de 726, 993 e 1758% mais elevada do que a obtida pelas linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei*, respectivamente. Já a produção de xilanase por *A. niger* foi de 104, 566 e 340% mais elevada quando comparada com a produção de xilanase pelas linhagens de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei*, respectivamente. Por outro lado, a produção de FPase por *A. niger* (0,4 UI/g) foi maior do que a obtida pelas linhagens de *A. oryzae* (P6B2 - 0,13 UI/g; P27C3A – 0,25 UI/g) e menor do que a alcançada por *T. reesei* (0,8 UI/g), ou seja, a produção de FPase por *T. reesei* foi 100% mais elevada do que a conseguida por *A. niger* (Tabela 16).

Tabela 16 – Produção máxima de celulases e xilanases por *A. niger* 3T5B8, *A. oryzae* P6B2 e *T. reesei* RUT C30 por FES.

Enzimas (UI/g)	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>T. reesei</i>
	3T5B8 (48h)	P6B2 (24h)	P27C3A (48h)	RUT C30 (48h)
Endoglucanase	219,2 ± 22,2	115,9 ± 5,3	113,35 ± 0,7	142,1 ± 0,0
β -glicosidase	22,3 ± 5,8	2,7 ± 0,10	2,04 ± 0,2	1,2 ± 0,1
FPase	0,4 ± 0,06	0,13 ± 0,01	0,25 ± 0,07	0,8 ± 0,1
Xilanase	3382,5 ± 414,3	1658, 1 ± 98,7	507,93 ± 14,0	768,4 ± 49,2

Dhillon et al. (2011) avaliaram o potencial dos resíduos agrícolas para produção de celulases e hemicelulases por *A. niger* e *T. reesei* RUT C30. As produções de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase por *A. niger* utilizando farelo de trigo como substrato para FES foram de 48,2, 21,7, e 2604 UI/g, respectivamente. Por outro lado, a produção de endoglucanase por *T. reesei* RUT C30 foi de 68,6 UI/g. O resultado de β -glicosidase equivale

ao obtido neste trabalho pela linhagem de *A. niger* (22,3 UI/g em 48h de cultivo). Couri et al. (2000) estudaram a produção de várias enzimas por *A. niger* 3T5B8 usando diferentes resíduos agroindustriais por FES e observaram uma atividade de xilanase utilizando farelo de trigo como substrato para a FES de 100 UI/g. Brijwani, Oberoi e Vadlani (2010), utilizando uma linhagem de *A. oryzae* e farelo de trigo e soja (4:1) como substrato, em FES, obtiveram produções de endoglucanase e xilanase de 68,4 e 512,16 UI/g, respectivamente. Yamane et al. (2002) observaram uma produção de xilanase por *A. oryzae* em farelo de trigo de apenas 60 UI/g. Florencio, Couri e Farinas (2012) avaliaram a produção de endoglucanase por várias linhagens de *T. reesei* utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) como substrato para a FES. A produção de endoglucanase pela linhagem de *T. reesei* RUT C30 foi de 70,2 UI/g em 240h de cultivo. Os resultados obtidos neste trabalho foram maiores do que os encontrados na literatura, o que mostra o grande potencial desses fungos para produção de enzimas hidrolíticas e a aplicação dessas enzimas na hidrólise enzimática para produção de etanol de segunda geração.

8.3.2. Perfil temporal da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor

A eficácia das enzimas produzidas por *A. niger*, *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* cultivados sob FES em Erlenmeyer foram avaliadas durante a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX). O meio fermentado integral (MFI) e o extrato enzimático (EE) dos fungos foram misturados ao BEX em diferentes combinações com o intuito de avaliar o efeito sinérgico dessas combinações na hidrólise do BEX.

A Figura 57 apresenta os perfis temporais de glicose e açúcares redutores totais (ART) liberados durante a hidrólise do BEX usando as enzimas do meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) dos fungos *A. niger*, *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* em diferentes combinações.

As atividades enzimáticas totais dos extratos enzimáticos dos fungos no estado de cultivo selecionado (seção 8.3.1) são listadas na Tabela 17.

Tabela 17 – Atividade enzimática total dos extratos de *A. niger*, *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* produzido por FES em Erlenmeyer e usado para hidrólise do BEX.

Atividade enzimática (UI)	<i>A. niger</i> (3T5B8)	<i>A. oryzae</i> (P6B2)	<i>A. oryzae</i> (P27C3A)	<i>T. reesei</i> (RUT C30)
Endoglucanase	1096	578,9	566,8	710,5
β -glicosidase	111,5	13,7	10,2	6
FPase	2	0,65	1,3	4
Xilanase	16912,5	8290,5	2539,7	3842

Na Figura 57a, pode ser visto que a quantidade de glicose aumenta com o tempo e este efeito é mais pronunciado quando se utiliza as combinações contendo MFI ou EE de *A. niger* (3T5B8). A quantidade de glicose liberada utilizando as combinações A e I em 72h de hidrólise do BEX foi praticamente à mesma (9,32 e 9,56 g/L, respectivamente). A quantidade de glicose liberada utilizando as combinações C e L em 72h de hidrólise do BEX também foi muito semelhante entre si (8,14 e 8,73 g/L, respectivamente). A mesma tendência foi observada para as outras combinações, exceto que a combinação E foi 1,8 vezes mais elevada (6,04 g/L) do que a combinação K. Por outro lado, a quantidade de glicose liberada utilizando a combinação D foi de apenas 4,72 g/L esse valor foi semelhante ao obtido utilizando a combinação G (3,83 g/L) e J (4,19 g/L).

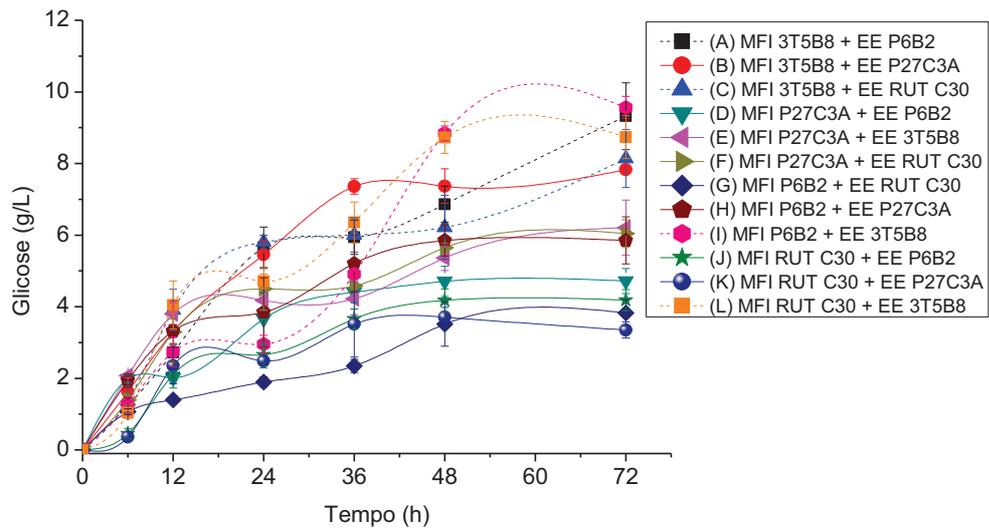
De modo geral, pode-se observar que as combinações utilizando MFI ou EE de *A. niger* 3T5B8 foram melhores na hidrólise do BEX do que as demais combinações. Isso pode ser provavelmente devido a maior quantidade de endoglucanase (1096 UI), β -glicosidase (111,5 UI) e xilanase (16912,5 UI) presente no coquetel enzimático de *A. niger* 3T5B8 quando comparado com o complexo enzimático das linhagens de *A. oryzae* e *T. reesei* (Tabela 2). Segundo Kumar e Wyman (2009) a presença de xilanase no coquetel enzimático aumenta à acessibilidade das celulasas as microfibrilas de celulose podendo facilitar à hidrólise. Outra explicação possível para o melhor desempenho do coquetel enzimático de *A. niger* pode estar relacionado com a força de inibição ou de desativação das celulasas por compostos fenólicos. O tipo de enzima, de micro-organismo que a enzima foi produzida e o tipo de composto fenólico presente, por exemplo, no BEX pode influenciar na força de inibição e de desativação das celulasas. Ximenes et al. (2011) relataram que a β -glicosidase de *A. niger* foi mais resistente à inibição e desativação por fenóis, requerendo concentrações de aproximadamente 5 e 10 vezes mais elevadas, respectivamente, para os mesmos níveis de inibição ou de desativação por fenóis, como observado para as enzimas de *T. reesei*. Assim, a

atividade significativamente maior de β -glicosidase nos coquetéis de *A. niger*, pode ter evitado o acúmulo de celobiose e favorecido a hidrólise enzimática do BEX, visto que a celobiose é o principal produto final do processo de hidrólise da celulose tanto por celobiohidrolases quanto por endoglucanase (VAN TILBEURGH et al., 1989; BÉGUIN; AUBERT, 1994). No sentido fisiológico, a celobiose é um forte inibidor para celulase e seu potencial de inibição é maior do que o da glicose (LEE; FAN, 1983; TOMME; WARREN; GILKES, 1995). Deste modo, a eliminação da inibição da β -glicosidase por celobiose é necessária para obter uma completa hidrólise dos materiais celulolíticos (ZHAO et al., 2004).

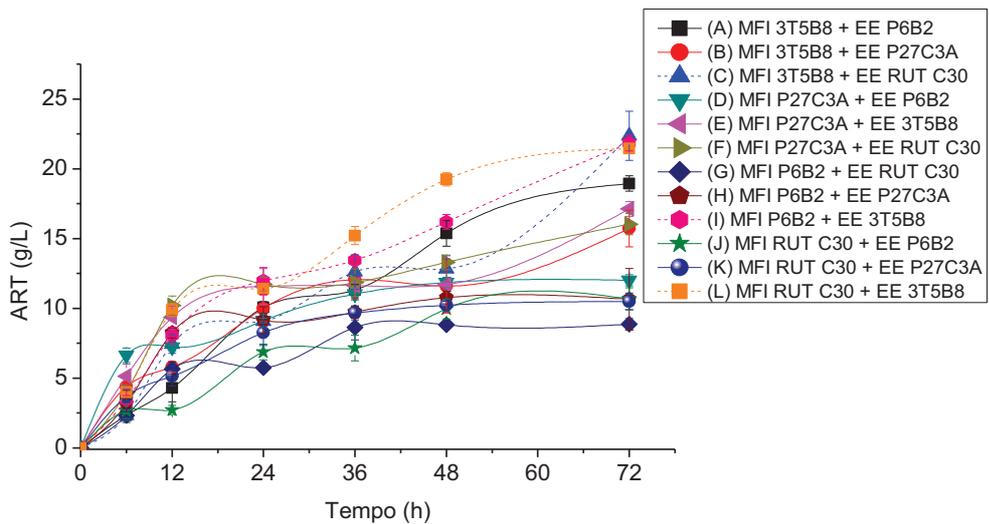
Na figura 57b, pode ser visto que a quantidade de açúcar redutor total (ART) também aumenta com o tempo e este efeito é mais pronunciado quando se utiliza as seguintes combinações: C, I e L. As quantidades de ART liberada por essas três combinações após 72h de hidrólise do BEX foram bastante semelhantes (23, 21,8 e 21,5 g/L, respectivamente). A mesma tendência ocorreu para outras combinações. A quantidade de ART liberado pela combinação B, E ou F foram de 15,7, 17 e 16 g/L, respectivamente. A quantidade de ART liberada pela combinação D, J, K e G também foram semelhantes entre si (12, 10,7, 10,5, 8,9 g/L, respectivamente), no entanto os valores de ART foram menores do que os obtidos pelas combinações anteriores.

Figura 57 – Perfis temporais de concentração da glicose (a) e dos açúcares redutores totais (b) liberados durante a hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX), utilizando o meio fermentado integral – MFI e extratos enzimáticos - EE dos fungos *A. niger*, *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* obtidas em Erlenmeyer por FES.

a)



b)

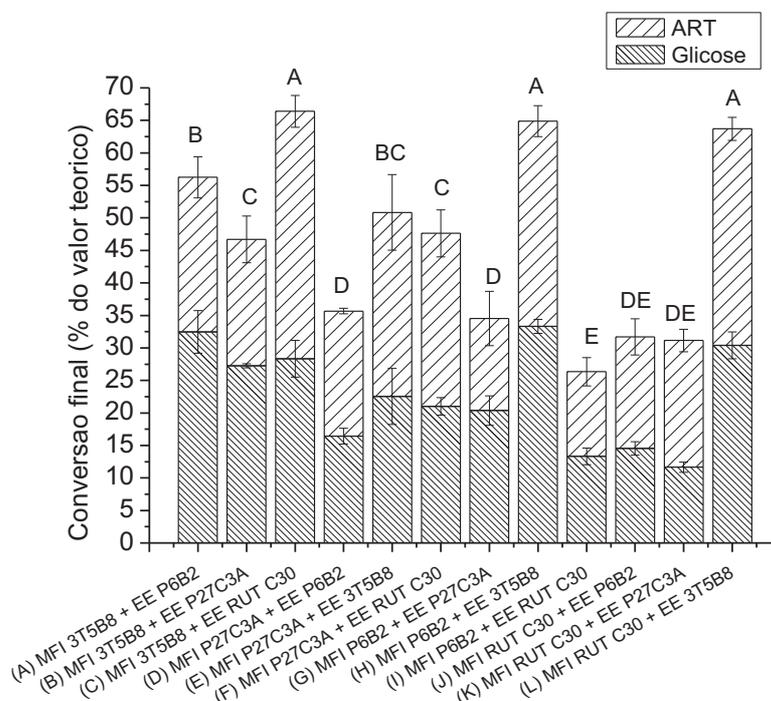


8.3.3. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) em termos de conversão total

Neste tópico, uma análise em termos de conversão final de glicose e açúcares redutores totais na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (BEX) foi conduzida. A Figura 58 resume a porcentagem de conversão obtida em 72 horas de hidrólise do BEX usando meio fermentado integral (MFI) e extrato enzimático (EE) das linhagens de *A. niger*, *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* por FES.

Como mostra a Figura 58, a conversão final do BEX utilizando as combinações C, H e L foram melhores na hidrólise do BEX do que as demais combinações. Além disso, essas combinações apresentaram valores significativamente similares tanto em termos de ART (66, 65 e 64% do valor teórico, respectivamente) quanto em termos de glicose (28, 33 e 30% do valor teórico, respectivamente). A combinação A também apresentou resultados similares às combinações mencionadas acima em termos de glicose (32% do valor teórico), no entanto em termos de ART a conversão foi um pouco menor, 56% do valor teórico. As combinações B, E e F apresentaram conversões significativamente semelhantes tanto em termos de ART (47, 51 e 48% do valor teórico, respectivamente) quanto em termos de glicose (27, 21 e 22% do valor teórico, respectivamente). A mesma tendência ocorreu para outras combinações. A combinação D, G, J e K também apresentaram valores de conversões significativamente semelhantes entre si, tanto em termos de ART (36, 35, 32 e 31% do valor teórico, respectivamente) quanto em termos de glicose (16, 20, 14 e 12% do valor teórico, respectivamente). Por outro lado, a combinação I apresentou uma conversão final de ART de apenas 26% do valor teórico. Essas semelhanças e diferenças nos valores de conversão de biomassa foram consideradas com base no teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 58 – Conversão final, em 72 horas de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (BEX) utilizando meio fermentado integral e extrato enzimático (EE) de *A. niger* 3T5B8, *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e de *T. reesei* Rut-C30.



Combinações com letras diferentes são significativamente diferentes após comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

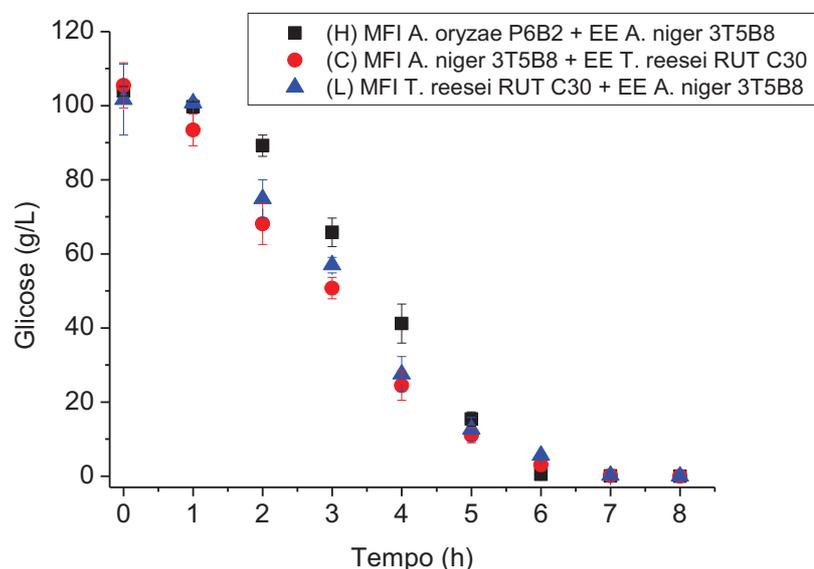
Em geral, as combinações contendo complexo enzimático de *A. niger* 3T5B8 apresentaram uma melhor conversão do BEX. Em especial, as combinações C, H e L destacaram-se em relação às demais combinações tanto em termos de ART quanto em termos de glicose. Essas combinações apresentaram uma conversão final de ART e glicose de até 2,5 e 2,8 vezes mais elevada, respectivamente, quando comparada com as outras combinações. Como já mencionado anteriormente (seção 8.3.2) a quantidade elevada de endoglucanase, β -glicosidase e xilanase presente nos complexos enzimáticos de *A. niger* 3T5B8 provavelmente favoreceram a hidrólise do BEX (Tabela 17). A atividade enzimática de xilanase e endoglucanase do complexo de *A. oryzae* P6B2 e de *T. reesei* RUT C30 e de FPase de *T. reesei* RUT C30 somados a atividade das enzimas do complexo enzimático de *A. niger* 3T5B8 também contribuíram para uma melhor hidrólise do BEX. Neste contexto, as combinações C, H e L foram selecionadas para o próximo experimento de fermentação alcoólica.

8.3.4. Fermentação alcoólica

O material hidrolisado (contendo bagaço de cana, farelo de trigo, micélio fúngico, enzimas e açúcares) foi fermentado a etanol pela levedura CAT-1 que é uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* desenvolvida especificamente para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. Além disso, o material hidrolisado foi suplementado com glicose até a concentração de 100 g/L. A estratégia adotada aqui foi baseada no fato de que a concentração de monossacarídeos de 100g/L resulta teoricamente em 50g/L de etanol, enquanto que a destilação torna-se ineficiente abaixo de 45g/L (XIMENES et al., 2010). Também tem sido sugerido que a produção de etanol de segunda geração pode ser agregada a produção de etanol de primeira geração, aumentando assim a produção de etanol sem aumentar a área de cana-de-açúcar plantada (SOCCOL et al., 2010).

A Figura 59 ilustra o consumo de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em 8h de fermentação alcoólica. A levedura CAT-1 consumiu as 100 g/L de glicose em 7h de fermentação alcoólica para as três condições de hidrolisados (C, H e L), o que mostra a rapidez com que essa levedura consome a glicose. Isso é muito importante em termos de processos industriais, visto que a redução no tempo de conversão de glicose a etanol pode ser muito significativo em termos de redução de custos energéticos e de produção de etanol em períodos mais curtos de tempo.

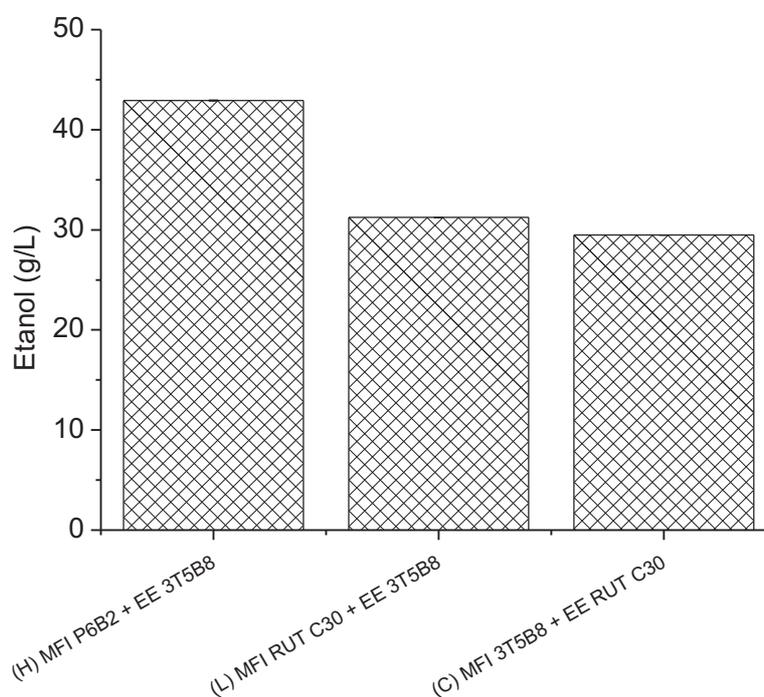
Figura 59 – Consumo da glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em 8h de fermentação alcoólica.



A Figura 60 apresenta a concentração de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) em 7h de fermentação alcoólica. A concentração de etanol pela levedura CAT-1 utilizando o material hidrolisado pela combinação H foi de 42,9 g/L, enquanto que o material hidrolisado pela combinação L ou C foram de 31,2 e 29,5 g/L, respectivamente. Martín et al. (2002) estudaram a produção de etanol a partir de hidrolisados enzimáticos do bagaço de cana usando duas linhagens de *S. cerevisiae* (TMB 3001 e ATCC 96581) para fermentação alcoólica. O bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado por explosão a vapor e hidrolisado com enzimas celulolíticas. A produção de etanol pela linhagem *S. cerevisiae* TMB 3001 recombinante foi de 11,9 g/L, enquanto que a produção de etanol pela linhagem de *S. cerevisiae* ATCC 96581 industrial foi de 7,4 g/L esses resultados foram inesperados, visto que esta última linhagem foi isolada a partir da fermentação do liquor de sulfito e portanto é mais resistente aos inibidores. Rudolf et al. (2008) avaliaram a produção de etanol a partir do bagaço de cana explodido usando duas linhagens de levedura, uma recombinante que utiliza xilose (*S. cerevisiae*) e outra não-recombinante (*Pichia stipitis*). A *S. cerevisiae* consumiu toda a glicose e grande parte da xilose na fermentação alcoólica. As concentrações finais de etanol por *S. cerevisiae* e *P. stipitis* foram de 26,7 e 19,5 g/L, respectivamente. Abo-State et al. (2013) avaliaram o efeito do pré-tratamento sobre a sacarificação do bagaço de cana e a habilidade das linhagens de *Trichoderma viride* F-94 e *Aspergillus terreus* F-98 de formar açúcares fermentescíveis por crescimento direto no bagaço de cana-de-açúcar como única

fonte de carbono e energia durante o processo de fermentação em estado sólido. Os hidrolisados mais promissores obtidos a partir da sacarificação fúngica foram fermentados a etanol pelas leveduras *Candida tropicalis* Y-26 e *S. cerevisiae* Y-39. A produção de etanol pela levedura Y-39 a partir do hidrolisado do F-94 e do F-98 foi de 17,1 e 18,5 g/L, respectivamente. Pereira et al. (2013) estudaram a produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1 a partir do hidrolisado de bagaço de cana explodido por enzimas comerciais e obtiveram um rendimento de etanol de 81% do valor teórico. Embora os tipos de pré-tratamentos, as linhagens de levedura e o método de sacarificação e fermentação alcoólica reportados nos trabalhos acima foram diferentes ao deste estudo, vale ressaltar que os resultados obtidos aqui foram maiores do que os reportados na literatura.

Figura 60 – Concentração de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) utilizando o material hidrolisado (contendo bagaço de cana, farelo de trigo, micélio fúngico e glicose) pelos complexos enzimáticos de *A. oryzae* P6B2, *A. niger* 3T5B8 e *T. reesei* RUT C30.



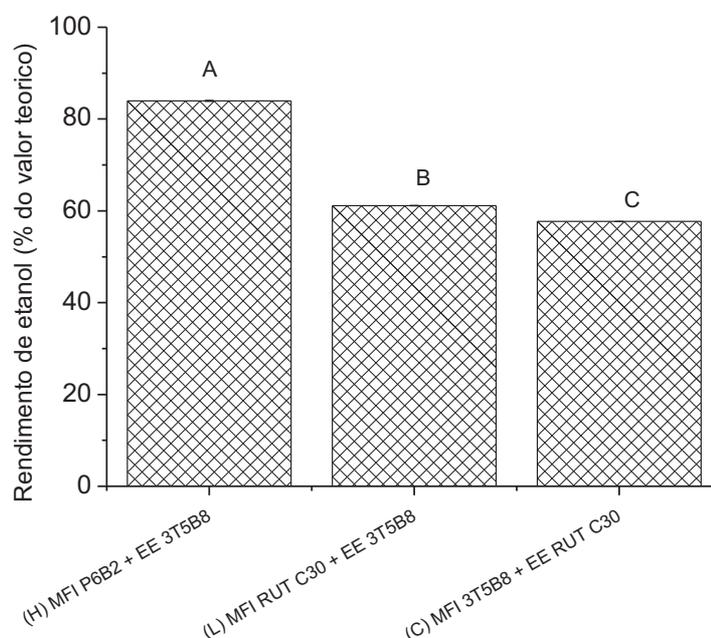
Há várias publicações sobre a produção de etanol por bactérias, leveduras e fungos. No entanto, a levedura mais comumente utilizada é a *S. cerevisiae* pela sua elevada produção etanol, sendo a preferida para a maioria dos processos de fermentação alcoólica. Esta levedura pode crescer tanto em açúcares simples, tais como glicose, como em dissacarídeo, sacarose. *Saccharomyces* também é geralmente reconhecida como um aditivo

alimentar seguro para o consumo humano e, portanto, ideal para a produção de bebidas alcoólicas e fermento para pão (Vijayalaxmi et al. 2013).

A Figura 61 mostra o rendimento de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) em 7h de fermentação alcoólica. O rendimento de etanol pela levedura *S. cerevisiae* (CAT-1) utilizando o material hidrolisado pela combinação H foi de 84% do valor teórico. Por outro lado, o rendimento de etanol pela levedura CAT-1 utilizando o material hidrolisado pelas combinações C ou L foram de 61,1 e 57,7% do valor teórico, respectivamente. Esses resultados foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey, o que nos leva a dizer que o material hidrolisado pela combinação H promoveu um maior rendimento de etanol pela levedura CAT-1 em relação aos outros hidrolisados. Assim, o rendimento de etanol utilizando o material hidrolisado pela combinação H foi de até 1,4 vezes mais elevada do que o rendimento de etanol utilizando os outros dois hidrolisados (combinações C ou L). Rao et al. (1985) estudaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana usando biomassa micelial do *Penicillium funiculosum* ou enzimas livres e a reutilização da biomassa micelial na hidrólise da lignocelulose. A utilização dos hidrolisados na produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* também foram avaliados. As conversões finais do bagaço de cana pela biomassa micelial de 2 dias e enzimas produzidas pelo *P. funiculosum* em 10 dias de fermentação submersa, foram de 50 e 48%, respectivamente. O rendimento de etanol utilizando o hidrolisado proveniente da biomassa micelial do *Penicillium funiculosum* e enzimas livres foram de 40 e 45%, respectivamente. Shaibani et al. (2011) compararam a sacarificação e fermentação simultânea do bagaço de cana utilizando enzimas produzidas pelos fungos *A. niger*, *T. longibrachiatum* e enzima comercial (Celluclast 1.5L). O rendimento de etanol pela levedura *S. cerevisiae* utilizando enzimas de *A. niger*, *T. longibrachiatum* e enzima comercial foi de 4, 50 e 81% do valor teórico, respectivamente. Abo-State et al. (2013) estudaram doze isolados microbianos, cinco bactérias, quatro leveduras e três fungos filamentosos isolados do bagaço de cana-de-açúcar. Os isolados de bactérias e leveduras foram selecionados pela sua capacidade de utilizar diferentes açúcares e celulose. O bagaço de cana pré-tratado foi inoculado com uma suspensão de esporos dos fungos *Trichoderma viride* (F-94) e *Aspergillus terreus* (F-98). Os frascos inoculados foram incubados por sete dias a 30°C. Após esse período de incubação o conteúdo dos frascos foi extraído e filtrado e os açúcares redutores totais (ART) determinados. A produção máxima de ART pelos fungos *T. viride* e *A. terreus* foi de 26,1 e 20,4 g/L, respectivamente. Esses filtrados foram utilizados para fermentação alcoólica pelas leveduras *Candida tropicalis* (Y-26) e *Saccharomyces cerevisiae* (Y-39). O rendimento de

etanol pela levedura *S. cerevisiae* a partir do hidrolisado do *T. viride* e *A. terreus* foi de 70,8 e 97,4% do valor teórico, respectivamente. Cao e Aita (2013) avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com amônia diluída e surfactantes a partir da combinação de duas enzimas comerciais, Spezyme CP e Novozyme 188. A produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* também foi avaliado. Os resultados indicaram que o pré-tratamento do bagaço de cana com os surfactantes PEG 4000 e Tween 80 melhoraram a digestibilidade da celulose pela combinação de enzimas comerciais (62 e 66%, respectivamente) apresentando um rendimento de etanol de 73 e 69%, respectivamente. Vijayalaxmi et al. (2013) avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor pelas enzimas lignocelulolíticas do fungo *Exiguobacterium* sp. VSG-1. O hidrolisado foi utilizado para a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O rendimento de etanol foi 78% do valor teórico.

Figura 61 – Rendimento de etanol (%) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) utilizando o material hidrolisado (contendo bagaço de cana, farelo de trigo, micélio fúngico e glicose) pelos complexos enzimáticos de *A. oryzae* P6B2, *A. niger* 3T5B8 e *T. reesei* RUT C30.



A produção de açúcares fermentescíveis a partir de resíduos agrícolas e agroindustriais é um passo crucial para o sucesso da indústria de álcool e de bebidas. No entanto, este processo é ainda limitado por causa dos elevados investimentos necessário, dos processos operacionais do tempo requerido (VIJAYALAXMI et al., 2013). De modo geral, o

rendimento de etanol obtido neste estudo foi semelhante ou superior aos reportados na literatura o que demonstra, neste caso, que não há necessidade de se filtrar o hidrolisado para posterior fermentação alcoólica. Neste contexto, a etapa de filtração do hidrolisado pode ser eliminada contribuindo para a redução de custos e tempo no processo de produção de etanol de segunda geração.

8.4. Conclusão

Os coquetéis enzimáticos obtidos a partir de MFI e EE de fungos filamentosos cultivados por FES foram utilizados na hidrólise do BEX. A produção de etanol equivalente a 84% do rendimento teórico foi obtido após a hidrólise usando a combinação de MFI de *A. oryzae* P6B2 e EE de *A. niger*. Conceitualmente, a etapa de produção de enzimas por FES, sacarificação e fermentação alcoólica pode ser realizada em um único reator, evitando a necessidade de etapas de filtração. A descoberta destaca o potencial de produção das enzimas *in house* por FES, seguido pela aplicação do MFI na etapa de sacarificação como uma alternativa a configuração do processo tradicional, no entanto, estudos mais aprofundados da configuração proposta ainda precisam ser realizados.

8.5. Referências

ABO-STATE, M. A. et al. Effect of different pretreatments on egyptian sugar-cane bagasse saccharification and bioethanol production. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 22, n. 1, p. 161-167, 2013.

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

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

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.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H.; VADLANI, P. 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.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J.-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

CAO, S.; AITA, G. M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 131, n. 0, p. 357-364, 2013.

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.

CLARK, T. A.; MACKIE, K. L. Steam explosion of the softwood *Pinus Radiata* with sulphur dioxide addition. 1. Process optimisation. **J Wood Chem Technol**, 7:373-403, 1987.

COURI, S. et al. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000.

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., PIROTA, R., CODIMA, C., TREMACOLDI, C., RODRIGUES, A., FARINAS, C. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012a.

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, 2012b.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 8, p. 2106-2116, 2008.

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. **Enzyme Research**, p. 7, 2012.

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

GUOWEIA, S. et al. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, n. 0, p. 357-361, 2011.

HOLTZAPPLE, M. T.; HUMPHREY, A. E.; TAYLOR, J. D. Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 2, p. 207-210, 1989.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1515-1523, 2009.

KING, B.C., WAXMAN, K.D., NENNI, N.V., WALKER, L.P., BERGSTROM, G.C., GIBSON, D.M. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 14, 2011.

KOBAYASHI, T. et al. Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2007.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203-4213, 2009.

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.

LEE, Y. H.; FAN, L. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose:(II). Analysis of extended hydrolysis times. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 4, p. 939-966, 1983.

MANDELS, M.; STERNBURG, D. RECENT ADVANCES IN CELLULASE TECHNOLOGY. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, n. 4, p. 267-286, 1976.

MARTÍN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 274-282, 2002.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for Biomass utilization. **Biofuels**, v. 108, p. 95-120, 2007.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. ACS symposium series, ACS Publications. p.292-324, 1994.

MILLER, G. USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGAR. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959

PEREIRA et al. Bioethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion: chemical and morphological insights. **XIX Sinaferm e X Sheb**, p. 217, 2013.

RAO, M. et al. Hydrolysis of sugarcane bagasse by mycelial biomass of *Penicillium funiculosum*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 27, n. 7, p. 1070-1072, 1985.

RUDOLF, A. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnol Bioeng**, v. 99, n. 4, p. 783-90, 2008.

SCHELL, D.J.; RILEY, C.J.; DOWE, N.; FARMER, J.; IBSEN, K.N.; RUTH, M.F.; TOON S.T.; LUMPKIN, R.E. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 179-188, 2004.

SELIG, M. J. et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresour Technol**, v. 99, n. 11, p. 4997-5005, 2008.

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

SOUZA, W.R., DE GOUVEA, P.F., SAVOLDI, M., MALAVAZI, I., BERNARDES, L.A.D., GOLDMAN, M.H.S., DE VRIES, R.P., OLIVEIRA, J.V.D., GOLDMAN, G.H. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 16, 2011.

SOUZA, A. et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **BioEnergy Research**, p. 1-16, 2012.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.

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

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. In: POOLE, R. K. (Ed.). **Advances in Microbial Physiology**: Academic Press, v.37 p.1-81, 1995.

VAN TILBEURGH, H. et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. **European Journal of Biochemistry**, v. 184, n. 3, p. 553-559, 1989.

VIJAYALAXMI, S. et al. Production of Bioethanol from Fermented Sugars of Sugarcane Bagasse Produced by Lignocellulolytic Enzymes of *Exiguobacterium* sp. VSG-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-15, 2013.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

YAMANE, Y. et al. Production of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 9-14, 2002.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170-176, 2010.

XIMENES, E., KIM, Y., MOSIER, N., DIEN, B., LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48(1), p. 54-60, 2011.

ZHAO, Y. et al. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2004.

Capítulo 9 – Conclusões e Perspectivas

9.1. Conclusões principais

Esta tese representa um sumário do projeto de pesquisa “Simplificação do processo de conversão de biomassa a etanol usando enzimas do meio fermentado integral de fungos filamentosos cultivados por fermentação em estado sólido”. A conversão de biomassa lignocelulósica a etanol envolve pelo menos quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise (sacarificação), fermentação e recuperação do etanol. Dentre essas etapas, a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica é a tecnologia chave na produção de etanol celulósico. Em particular, este trabalho focou nas etapas de produção de enzimas e sua aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando meio fermentado integral (contendo o meio fermentado de farelo de trigo, micélio fúngico e enzimas) e/ou extrato enzimático obtido por fermentação em estado sólido por fungos filamentosos para produção de etanol celulósico.

A maioria das linhagens fúngicas mostraram potencial de produção de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas. No entanto algumas linhagens se destacaram em relação às demais, como a linhagem de *A. fumigatus* P40M2, *A. niger* P47C3 e *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A), mostrando que a seleção de micro-organismos em locais ainda pouco explorados pode contribuir nos avanços tecnológicos necessários para o aumento da eficiência do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável.

A umidade inicial do substrato não influenciou na produção de celulasas e xilanases pela linhagem de *A. oryzae* P27C3A. Em geral, umidades mais elevadas (70-80%) foram melhores para a produção de enzimas pelas linhagens de *A. oryzae* P6B2 e *A. niger*. Para a linhagem de *T. reesei*, umidades mais baixas (50-60%) foram melhores para a produção de endoglucanase, em ambos os sistemas de cultivo. Com relação à temperatura de fermentação, 28°C foi melhor para a produção de xilanase por todas as linhagens fúngicas avaliadas e para a produção de endoglucanase pela linhagem de *A. oryzae* P27C3A. A temperatura de 35°C foi melhor para a produção de celulasas pelo *T. reesei* em ambos os sistemas de cultivo.

O sistema de aeração forçada foi melhor para produção de enzimas estudadas neste trabalho.

A linhagem de *A. niger* 3T5B8 cultivado por FES sob condições de aeração forçada e estática foi capaz de produzir um complexo enzimático mais eficiente na hidrólise do BEX do que os complexos enzimáticos de *A. oryzae* (P6B2 e P27C3A) e *T. reesei* RUT C30. Os complexos enzimáticos produzidos *in house* pelos fungos *A. oryzae*, *A. niger* e *T. reesei* reduziu pela metade a quantidade de enzima necessária para a hidrólise do BEX. Os rendimentos de hidrólise do BEX utilizando MFI foram semelhantes ou mais elevados do que os obtidos utilizando apenas EE dos fungos estudados neste trabalho, mostrando que o passo de extração/filtração das enzimas pode ser eliminado.

Conceitualmente, a etapa de produção de enzimas por FES, sacarificação e fermentação alcoólica pode ser realizada em um único reator, evitando a necessidade de etapas de filtração. A descoberta destaca o potencial de produção das enzimas *in house* por FES, seguido pela aplicação do MFI na etapa de sacarificação como uma alternativa a configuração do processo tradicional, no entanto, estudos mais aprofundados da configuração proposta, ainda precisam ser realizados.

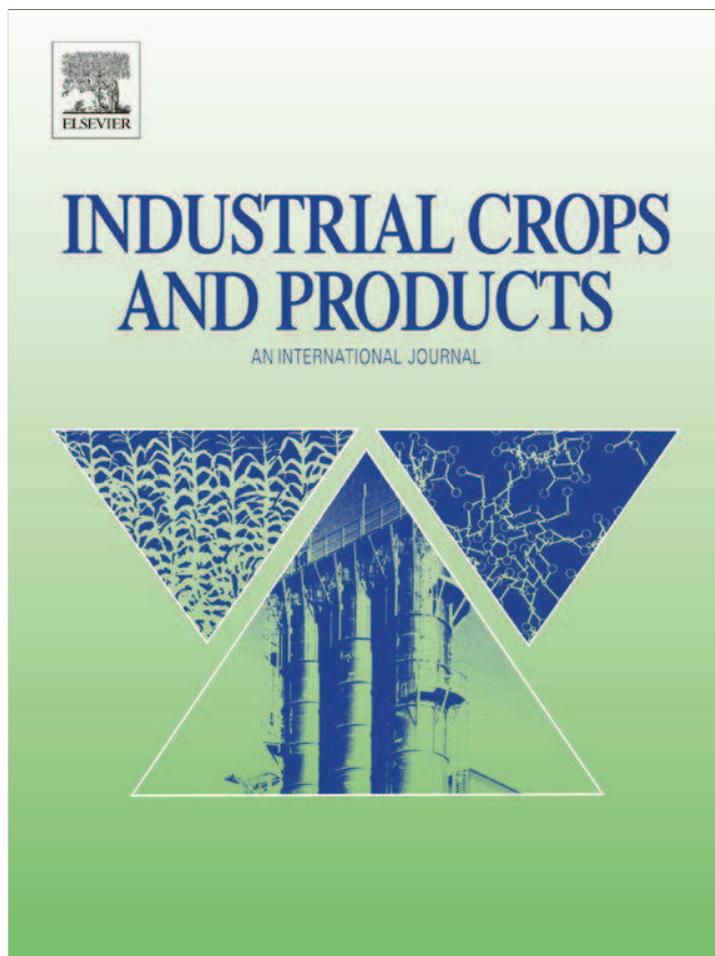
9.2. Perspectivas

Um dos maiores obstáculos da sacarificação enzimática para produção de etanol celulósico é o custo das enzimas utilizadas na degradação da lignocelulose. A seleção de micro-organismos altamente produtores de celulasas e hemicelulasas e a produção dessas enzimas *in house*, podem contribuir para a redução do custo das enzimas. Outro fator que também pode contribuir para a redução do custo das enzimas é a técnica de fermentação em estado sólido. A FES é particularmente vantajosa para a produção de enzimas por fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes micro-organismos resultando em uma melhor adaptação ao meio e elevadas produções enzimáticas. Do ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada com a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato sólido, atuando, como fonte de carbono e energia renovável. No entanto, apesar das vantagens da FES, existem desafios tecnológicos a serem confrontados, pois há poucos designs viáveis na literatura de biorreatores operando em condições de estado sólido. Assim, o desenvolvimento de um biorreator de estado sólido para produção de enzimas em escala industrial seria um grande avanço no campo biotecnológico, o que provavelmente garantiria a redução do custo das enzimas e, conseqüentemente, a viabilidade econômica da hidrólise enzimática para produção de etanol celulósico.

Técnicas mais eficientes de hidrólise enzimática incorporada à produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES) também pode ser uma alternativa de reduzir não só o custo das enzimas, mas também o custo e tempo do processo de produção de etanol celulósico. A utilização de um único reator para a realização das etapas de produção de enzimas por FES, sacarificação e fermentação alcoólica pode ser realizada, evitando-se a necessidade de etapas de filtração. Essa nova descoberta pode ser uma alternativa promissora para redução do custo das enzimas e de etapas do processo, como mostrado neste trabalho. No entanto, os resultados obtidos aqui são de escala de laboratório, e assim, maiores estudos como a simulação desse método de hidrólise em biorreatores maiores e com agitação são necessários para validar se essa técnica é realmente eficaz em escala industrial.

Anexos

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

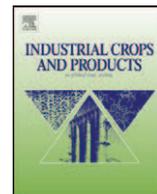
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions

Rosangela Donizete Perpetua Buzon Pirota^{a,b}, Mariana Tonelotto^{a,b}, Priscila da Silva Delabona^{a,c}, Rafael Frederico Fonseca^{a,b}, Douglas Antonio Alvaredo Paixão^c, Flávio César Freire Baleeiro^a, Victor Bertucci Neto^b, Cristiane Sanchez Farinas^{a,b,*}

^a Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, São Paulo, Brazil

^b Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970 São Carlos, São Paulo, Brazil

^c Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2012

Received in revised form

28 December 2012

Accepted 4 January 2013

Keywords:

Xylanase

Solid-state fermentation

Bioreactor

Respirometric analysis

Bioprocess

Agro-industrial residues

Biofuels

ABSTRACT

Bioprocess studies towards improving the production of xylanases are of great value due to the importance of these enzymes on several industrial applications. This work evaluates the effects of operational conditions on xylanase production by a new strain of *Aspergillus oryzae* (P6B2) isolated from the Amazon Rain Forest. The fungus was cultivated under solid-state fermentation (SSF) using an instrumented lab-scale bioreactor equipped with an on-line automated monitoring and control system. The effects of initial substrate moisture content and temperature on xylanase production were evaluated and compared to static conditions. It was outstanding the positive effect on xylanase production by SSF cultivations under controlled conditions of forced over static aeration conditions. The conditions selected for further characterization resulted in the highest production of xylanase (2830.7 IU/g), which was achieved using an initial substrate moisture content of 80%, at 28 °C with an air flow rate of 20 mL/min and an inlet air humidity of 80%. Results of respirometric analysis showed good agreement with enzyme production, suggesting that these data could be very useful for optimization and scale-up studies.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The endo-1,4- β -xylanase (xylanase) enzymes cleave the β -1,4 glycosidic linkage between xylose residues in the backbone of xylans and is one of the most important enzymatic activities required for the depolymerization of the hemicellulosic constituent of plant cell walls (Dodd and Cann, 2009), since xylan represent the most abundant hemicellulose (Saha, 2003). Plant cell walls consist primarily of cellulose (20–50% on a dry weight basis), hemicellulose (15–35%) and lignin (10–30%) (Chundawat et al., 2011). Therefore, the deconstruction of hemicellulose to the constituent sugars is critical to efficient use of plant biomass to produce fuels and other chemicals (Dodd and Cann, 2009). The application of xylanases in conjunction with cellulolytic enzymes has been largely considered for the bioconversion of lignocellulosic materials. The action of xylanases, as well as other auxiliary enzymes, has been reported to improve cellulose conversion by removing hemicellulose and

increasing the substrate accessibility to cellulases (Gao et al., 2011). Xylanase enzymes have also several important applications in the food industry (fruit and vegetable processing, brewing, wine production, baking), as well as in other technical sectors (pulp and paper, textile, bioremediation/bioconversion) (Collins et al., 2005). On an industrial scale, xylanases are produced mainly by filamentous fungi of the genera *Aspergillus* and *Trichoderma* (Park et al., 2002).

Xylanases may be industrially produced in submerged liquid culture or on a solid substrate, being that about 80–90% of all xylanases are produced in submerged culture (Polizeli et al., 2005). Nevertheless, the use of solid-state fermentation (SSF) is particularly advantageous for enzyme production by filamentous fungi, since it simulates the natural habitat of these microorganisms (Holker and Lenz, 2005). Another advantage of SSF process is the use of agro-industrial residues (sugarcane bagasse, wheat bran, etc.) as solid substrate, thus acting both as carbon and energy sources. However, certain operational limitations of SSF, such as difficulty in controlling the moisture level of the substrate, and avoiding heat build-up, have limited its industrial application. In fact, the characterization of each particular microorganism in terms of the influence of temperature and substrate moisture content on the kinetics of growth and product formation is essential for SSF process scale-up. Previous studies have shown the importance

* Corresponding author at: Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970 São Carlos, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 2107 2908; fax: +55 16 2107 2902.

E-mail addresses: cristiane.farinas@embrapa.br, cristianefarinas@yahoo.com.br (C.S. Farinas).

of evaluating the influence of process operational parameters on cellulase production by *Aspergillus niger* cultivated under SSF using controlled conditions of forced aeration and inlet air relative humidity (Farinas et al., 2011).

Studies related to the production of xylanase by different *Aspergillus* strains cultivated under SSF have been extensively described in the literature. The strains considered include *A. tubingensis* (Pandya and Gupte, 2012), *A. niger* (Dhillon et al., 2012; Jin et al., 2012; Maciel et al., 2009; Ncube et al., 2012; Pal and Khanum, 2010; Rodriguez-Fernandez et al., 2011), *A. Awamori* (Umsza-Guez et al., 2011), *A. flavus* (Pal and Khanum, 2011), *A. foetidus* (Chapla et al., 2010; Valte et al., 2010), *A. carneous* (Fang et al., 2010), *A. terreous* (Lakshmi et al., 2009), *A. fumigatus* (Souza et al., 2012), *A. sulphureus* (Lu et al., 2003), among others. Szendefy et al. (2006) and Yamane et al. (2002) evaluated the production of xylanase by *A. oryzae* under SSF. However, to the best of our knowledge, there have been no studies concerning the characterization of *Aspergillus oryzae* strains for production of xylanase using SSF under controlled operated conditions. Given the potential of *A. oryzae* strains and its recognized application for industrial enzymes production, there is a great interest in the characterization of this fungus in terms of xylanase production using SSF.

The present work investigates the effects of operational conditions on the production of xylanase by a new Amazon Forest strain of *A. oryzae* (P6B2), cultivated under SSF using an instrumented lab-scale bioreactor. The influence of temperature and initial substrate moisture content on the efficiency of xylanase production was evaluated, and comparisons were made with static aeration conditions. The selected conditions were used for characterization of kinetic profiles and in respirometric analyses.

2. Materials and methods

2.1. Instrumented bioreactor

The bioreactor used was a lab-scale system consisting of 16 columns (2.5 cm diameter, 20 cm length) placed in a water bath. The bioreactor was equipped with an on-line system to control the air flow rate and the inlet air relative humidity, as previously described (Farinas et al., 2011). For this study, the air flow rate and inlet air relative humidity were kept constant during all cultivations, at 20 mL/min and 80%, respectively.

2.2. Microorganism selection

An initial screening of the 40 fungal strains isolated from the Amazon Forest (Delabona et al., 2012) was carried out in terms of xylanase production under SSF. In this preliminary step, a set of SSF cultivations was carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks for 240 h, using a solid substrate composed of wheat bran moistened at 60% with a nutrient medium (Mandels and Sternberg, 1976). Enzymes were extracted at 24-h intervals and analyzed as described in Sections 2.6 and 2.8, respectively. The selection criterion was based on maximum xylanase activity value (IU/g) of the different strains, calculated in terms of activity units per mass of initial dry solid substrate.

2.3. Selected strain identification

The selected microorganism used further in this study was a strain of *A. oryzae* (P6B2), deposited at Embrapa Food Technology collection (Rio de Janeiro, Brazil). The culture was maintained in PDA slants at 32 °C for 5 days before inoculation. The identification of the selected strain was performed by extraction of the genomic DNA according to the protocol described by (Specht et al., 1982), and amplification of the Internal Transcribed Spacer

(ITS) regions. The oligonucleotides used to identify and study the ITS regions were ITS1 (5'TTCCGTAGGTGACCTGCGG 3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). The extracted DNA was used for amplification of the spaces ITS1 and ITS4 by polymerase chain reaction (PCR). The amplicons were cloned in a pGEM-T Easy vector (Promega), following the manufacturer's instructions. Competent DH5 α *Escherichia coli* cells were used for the transformation. The amplicons were sequenced using T7 and SP6 promoter oligonucleotide, with a BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The electropherograms produced were analyzed by the Phred/Phrap program (Ewing and Green, 1998; Ewing et al., 1998) for the detection of the level of confidence for each sequenced base and the formation of the contigs. The identification was made by comparing the consensus sequence with the International Gene Bank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), using the BLASTN tool. The sequence of the ITS region corresponding to rDNA was submitted for registration at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and received the access number JX429926.

2.4. SSF cultivation conditions

Bioreactor cultivations were carried out for 72 h using wheat bran as solid substrate. The solid medium was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min before inoculation. A spore suspension volume corresponding to 10⁷ conidia/g of dry solid medium was inoculated into the solid medium by gently stirring with a glass rod until a uniform mixture was obtained. The strategy adopted for selection of SSF operational conditions was to evaluate each variable individually and then select the best value for incorporation in the next variable selection step. Initially, cultivations were carried out at 35 °C with different moisture levels of 50, 60, 70, and 80%. The moisture content was adjusted with a nutrient medium solution (Mandels and Sternberg, 1976). After selection of the most favorable moisture content, different temperatures (28, 30, 32, 35, and 37 °C) were evaluated using an initial moisture content of 80%. All cultivations were also carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks under similar conditions to enable comparison of the results obtained using forced aeration (bioreactor) with those achieved using the static aeration system. After the cultivation period of 72 h, the enzymes were extracted and analyzed as described in Sections 2.6 and 2.8, respectively.

2.5. Xylanase production kinetic profiles

The kinetic profile of xylanase production was evaluated during a 120-h cultivation period using the selected SSF operational conditions (28 °C, air flow rate of 20 mL/min, inlet air relative humidity of 80%, and initial substrate moisture content of 80%). Cultivations were also carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks under similar conditions in order to compare forced aeration (bioreactor) with the static aeration system. Samples were withdrawn at 24-h intervals, and the enzymes were extracted and analyzed as described in Sections 2.6 and 2.8, respectively.

2.6. Enzymes extraction

After the cultivation period, the solid medium was transferred to Erlenmeyer flasks (in the case of column cultivations) and the enzymes were extracted by adding a sufficient volume of 0.05 mol/L citrate/acetate buffer, at pH 4.8, to achieve a solid/liquid ratio of 1:10. The suspension was stirred at 120 rpm for 30 min at room temperature, and the enzymatic solution was recovered by filtration. The enzyme extracts were stored at –18 °C prior to the analyses.

2.7. Respirometric analysis

Respirometric analysis were carried out by measuring CO₂ in the outlet air stream from the columns of the bioreactor system, using a GMM 220 instrument (Vaisala, Finland). The cumulative amount of CO₂ produced was calculated from the area under the CO₂ vs. cultivation time curve. The data obtained for CO₂ production up to the end of the exponential phase (approximately 15 h after the end of the lag phase) were fitted to two different functions of cell growth behavior for comparison. These were the logistic and the deceleration equations, and the fitting was performed by means of non-linear regression using numerical software (Origin, version 8.0). The logistic equation (Eq. (1)) was chosen for estimation of the specific growth velocity (μ) for each experimental condition varying the initial substrate moisture content and the temperature, as well as the cultivation carried out for estimation of the kinetic profile under the selected operational conditions.

$$C = \frac{C_m}{1 + (C_m/C_0 - 1)e^{-\mu t}} \quad (1)$$

In Eq. (1), C is the biomass content (in terms of mmol CO₂), C_m is the maximum biomass content (in terms of mmol CO₂), C_0 is the initial biomass content (in terms of mmol CO₂), μ is the specific growth rate (1/h), and t is the time. Here, the CO₂ produced was used to describe cell growth. This assumption is reasonable, since in the exponential period the CO₂ derived from maintenance is much lower than the CO₂ produced from growth, which makes it possible to fit the CO₂ production during this period with a logistic curve, as for a biomass profile. The amount of initial CO₂ (C_0) was assumed to be the same (1.99E–04 mmol of CO₂) in each experiment, since the inoculum concentration was fixed for these studies. The maximum CO₂ (C_m) was estimated as the total amount of CO₂ produced up to the end of the exponential phase (which corresponded to approximately 15 h after the end of the lag phase).

2.8. Enzyme activity assay

The activity of xylanase was measured according to the methodology described by (Bailey and Poutanen, 1989). One unit of activity corresponds to 1 μ mol of xylose released per minute, at the reaction conditions. The quantification of the reducing groups was performed using the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959). The results were expressed as activity units per mass of initial dry solid substrate (IU/g).

3. Results and discussion

3.1. Screening of xylanase producing fungal strain

The efficiency of xylanase production by 40 fungal strains isolated from the Amazon Forest and cultivated under SSF on wheat bran is presented in Fig. 1. Cultivations were carried out over a period of 240 h and enzymatic activity was analyzed at 24-h intervals. The time to achieve the maximum value of xylanase activity varied for the different strains. The strain that presented higher xylanase activity value was P6B2, reaching 1076.9 IU/g after 72 h of cultivation. The strain P6B2 was also the best one in terms of productivity values, which takes into account the time of cultivation.

This selected strain P6B2 was identified as *A. oryzae*. For this, the ITS region of the fungal rRNA was amplified and sequenced. The ITS rDNA sequence of isolate P6B2 was submitted to alignment using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) program, and showed satisfactory homology of 100% with the *A. oryzae* species. The registration at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) is under the access number JX429926.

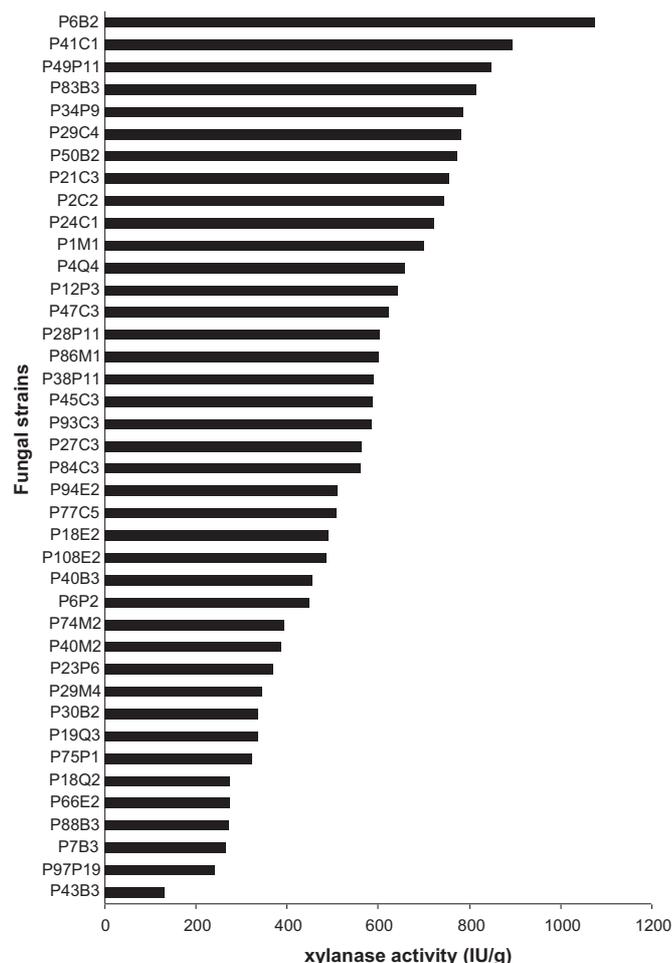


Fig. 1. Screening of 40 strains of Amazon Forest fungi for xylanase production under SSF in terms of maximum value of xylanase activity (IU/g). Cultivations were carried out over a period of 240 h using a solid substrate of wheat bran with an initial moisture content of 60%.

A. oryzae is considered to be a non-toxicogenic fungus with great potential as a new source of many industrial enzymes. It has a long history of extensive use in the food industry, which proves its safety (Abe et al., 2006). Furthermore, recent work on the genomics of *A. oryzae* has revealed that it is highly enriched with genes involved in biomass degradation (Kobayashi et al., 2007), emphasizing the importance of studies of its potential for xylanase production.

3.2. Initial moisture content effect on xylanase production

Characterization studies on xylanase production by *A. oryzae* P6B2 cultivated under SSF controlled conditions were carried out in an instrumented bioreactor. In order to compare the effectiveness of the bioreactor system used, a similar set of cultivations were conducted under static aeration conditions.

Firstly, the effect of initial moisture content on xylanase production was investigated by cultivating the fungus for 72 h at 35 °C using different initial substrate moisture contents (50, 60, 70, and 80%). The effect of the moisture content in terms of xylanase production by *A. oryzae* P6B2 cultivated under forced and static aeration is presented in Fig. 2A. The evolution of CO₂ during the SSF process under the cultivations carried out to evaluate the effects of initial moisture content is presented in Fig. 2B.

There was a positive effect of cultivation under controlled conditions of forced aeration, where xylanase production was higher than in cultivations carried out under static conditions (Fig. 2A).

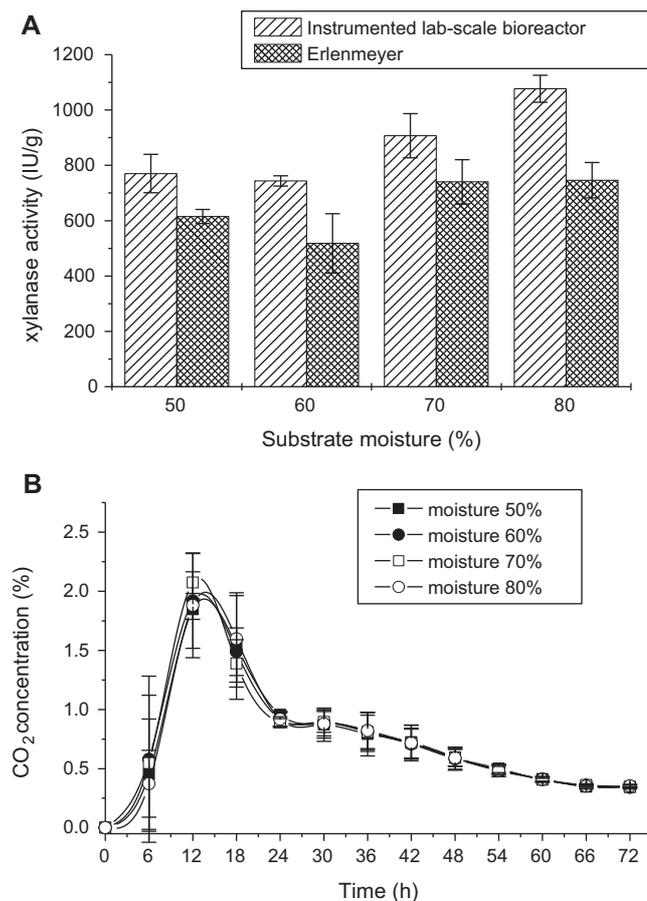


Fig. 2. (A) Effect of initial moisture content on xylanase production by *A. oryzae* P6B2 cultivated under SSF using forced (instrumented lab-scale bioreactor) and static aeration (Erlenmeyer). (B) CO₂ evolution of *A. oryzae* P6B2 cultivated under different initial moisture contents. All cultivations were carried out at 35 °C.

Xylanase production was also considerably affected by the initial moisture content used, under both aeration cultivations system used, since xylanase activity values varied from 743.5 to 1077.1 IU/g when using forced aeration and from 518.2 to 746.4 IU/g when using static aeration. Thus, a similar effect was observed for both static and forced aeration, since a 45% increase in xylanase was achieved by modulating the initial moisture content under static aeration, as compared to a 44% increase when using forced aeration. In terms of the effect of moisture content on xylanase production, the most favorable condition for *A. oryzae* P6B2 was using initial moisture content of 80% (Fig. 2A).

Lower enzyme production under static conditions is probably related to oxygen limitation during fungal growth since O₂ is transferred mainly by diffusion. Besides oxygen transfer, heat transfer and CO₂ dissipation are also favored under dynamic conditions of forced aeration. It can be observed that the CO₂ evolution curves depicted in Fig. 2B are very similar in terms of the effect of moisture content. This can imply that the fungi growth was not very much affected by the different moisture contents used.

In order to further evaluate the significance of the CO₂ evolution curves obtained using different initial moisture contents, the specific growth rate (μ) was obtained by regression analysis of Eq. (1). The growth profile was fitted very well by the logistic equation, as reflected by the good correlation coefficients achieved, which were all above 0.99 (Table 1). The deceleration equation was also evaluated and resulted in a similar good correlation (data not shown). However, the logistic equation was chosen due to its wider use in the literature concerning SSF (Mitchell et al., 2000). The

Table 1
Effect of initial moisture content on *A. oryzae* P6B2 fermentation parameters.

Initial moisture content (%)	CO ₂ produced in exponential phase (mmol)	(C _m /C ₀ - 1)	Lag phase (h)	μ (1/h)	R ²
50	7.31E-03	35.8	7	0.429	0.995
60	1.00E-02	49.6	6.8	0.467	0.993
70	1.10E-02	54.4	6.3	0.482	0.993
80	1.10E-02	54.4	6.2	0.480	0.995

calculated specific growth rates were similar for all conditions of initial moisture content investigated (Table 1). Nevertheless, the highest value of μ (0.48 1/h) was obtained using an initial moisture content of either 70% or 80%. This was in agreement with the moisture condition selected based on xylanase production. There was no significant effect of the initial substrate moisture content on the duration of the lag phase.

Among the various operational parameters that affect SSF process efficiency, moisture content is one of the most important. If the moisture content is too high, the void spaces in the solids are filled with water, resulting in oxygen limitation. At the other extreme, if the moisture content is too low, the growth of the microorganism will be hindered (Raghavarao et al., 2003). Consequently, identification of the optimal moisture content for each solid substrate is crucial for the promotion of favorable growing conditions, and hence for satisfactory metabolite production. However, the optimal moisture content value depends on both the solid substrate and the microorganism used (Raimbault, 1998).

The effect of the initial substrate moisture content on the production of xylanase by other *Aspergillus* strains cultivated using SSF has been described previously. Souza et al. (2012) evaluated the production of endoxylanase by *A. fumigatus* FBSPE-05 cultivated in three different solid substrates under different levels of initial moisture and found that the highest production occurred after 8 days of incubation using sugar cane bagasse/liquid medium at 1:2 ratio, reaching a production of 219.5 IU/g. The authors also verified that the most favorable solid to liquid ratio varied for the different solid substrates used. Lu et al. (2003) studied the influence of moisture content on xylanase production by *A. sulphureus* in a pilot-scale SSF system and found that production was greatly affected by the moisture content. Pal and Khanum (2010) compared xylanase production by *A. niger* cultivated by SSF under six moisture levels ranging from 55% to 80%. The highest production of xylanase was obtained when the moisture was 70% and either low or high initial moisture significantly decreased the enzyme production.

Our results demonstrated that the initial moisture content also played an important role on xylanase production by *A. oryzae* P6B2. Based on these results, the initial moisture content of 80% was selected for further studies on the evaluation of the effect of temperature on xylanase production.

3.3. Temperature effect on xylanase production

Cultivations using temperatures of 28, 30, 32, 35, and 37 °C were carried out using both forced and static aeration systems, with fixed initial substrate moisture content of 80%. Comparison of the effect of temperature in terms of xylanase production, using forced and static aeration, is presented in Fig. 3A.

Fig. 3B presents the CO₂ evolution under the cultivations carried out to evaluate the effects of temperature.

In this set of cultivations, there was also a positive effect of controlled forced aeration, with xylanase production being significantly higher than under static conditions (Fig. 3A). In terms of the influence of temperature cultivations on *A. oryzae* P6B2, xylanase activities up to 68% higher were achieved when using forced aeration over static aeration, at a temperature of 32 °C. This result

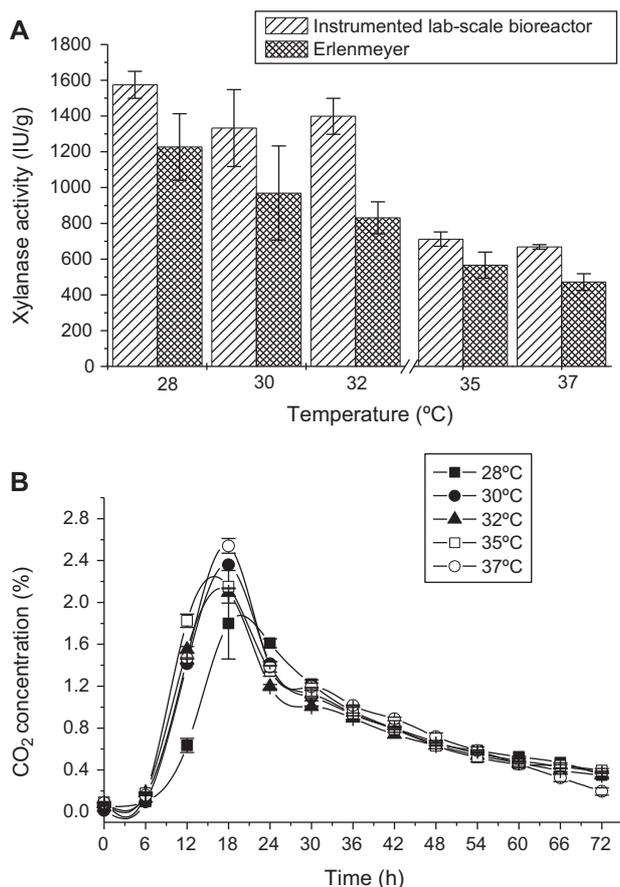


Fig. 3. (A) Effect of temperature on xylanase production by *A. oryzae* P6B2 cultivated under SSF using forced (instrumented lab-scale bioreactor) and static aeration (Erlenmeyer). (B) CO₂ evolution of *A. oryzae* P6B2 cultivated under different temperatures. All cultivations were carried out using an initial moisture content of 80%.

can be explained by the more favorable environmental conditions achieved in the bioreactor system, such as an efficient dissipation of heat, avoiding temperature gradients due to heat generated as a result of microbial activity.

The most favorable temperature for xylanase production was at 28 °C (Fig. 3A). Xylanase production was significantly affected by temperature, under both cultivations system used. Xylanase activity values varied from 668.4 to 1574.5 IU/g when using forced aeration and from 471.6 to 1227.0 IU/g when using static aeration. Thus, a more pronounced effect of temperature was observed for the static aeration, since a 160% increase in xylanase was achieved by modulating the temperature, as compared to a 136% increase when using forced aeration. In terms of bioprocess development, it is important to highlight that these results indicate that xylanase biosynthesis by *A. oryzae* was significantly sensitive to variations in temperature.

In terms of the effect of temperature on *A. oryzae* P6B2 growth, it can be observed that the CO₂ evolution curves depicted in Fig. 3B are

not very distinctive. The highest value of μ (0.474 1/h) was achieved using a temperature of 35 °C (Table 2), which is not in agreement with the temperature selected based on xylanase production. Temperature is an important variable that affects microbial growth under SSF, thereby influencing product formation, while the time at which a maximum enzyme activity level is reached will also vary according to cultivation temperature. Here, the activity value after a fixed period of cultivation (72 h) was considered in order to simplify the analysis. Thus, in order to draw a correlation between the influence of temperature on growth and enzyme production a more complete analysis over the total cultivation period would be required.

The influence of temperature on xylanase production by other *Aspergillus* strains cultivated under SSF has been reported. Pal and Khanum (2010) reported that the highest production of xylanase by *A. niger* was obtained at 40 °C after 6 days of cultivation and at higher temperatures its production decreased sharply. Gawande and Kamat (1999) studied the production of xylanase by *Aspergillus* strains cultivated in flasks at different temperatures and found that maximum production by both strains (*A. niger* and *A. terreus*) occurred at 35 °C. Lu et al. (2003) studied the influence of temperature on xylanase production by *A. sulphureus* and found that the ideal condition for production was maintaining the temperature at the range of 30–35 °C.

Similar to the effect of moisture content on SSF, the characterization of each particular microorganism in terms of the influence of temperature on the kinetics of growth and product formation is essential for SSF bioprocess development. Based on the results, an initial moisture content of 80% and a temperature of 28 °C were selected for evaluation of the kinetic profiles of xylanase production over a cultivation period of 120 h.

3.4. Xylanase production kinetic profiles under selected conditions

The kinetic profiles of xylanase production using the selected operational conditions (temperature of 28 °C, initial substrate moisture content of 80%, inlet air humidity of 80%, and flow rate of 20 mL/min) was evaluated over a period of 120 h. In order to compare the effectiveness of the system used, a similar set of cultivations were conducted under static aeration conditions (Fig. 4A). The analysis of the CO₂ evolution cultivation carried out to obtain the kinetic profiles of xylanase production is illustrated in Fig. 4B.

Xylanase activity reached its highest value after 24 h of cultivation, for both cultivation systems used (2830.7 and 1658.1 IU/g, respectively). Nevertheless, the advantages of SSF operated under forced against static aeration conditions can also be verified by comparing the results obtained under static conditions (Fig. 4A). Hence, the dynamic system used here was found to be very useful in controlling SSF operational conditions for higher enzyme production efficiency.

Fig. 4B illustrates the evolution of CO₂ over a period of 120 h during the cultivation carried out to obtain the kinetic profiles of xylanase production under the selected operational conditions. The total CO₂ produced during the exponential phase (9.65E–03 mmol),

Table 2
Effect of temperature on *A. oryzae* P6B2 fermentation parameters.

Temperature (°C)	CO ₂ produced in exponential phase (mmol)	(C _m /C ₀ - 1)	Lag phase (h)	μ (1/h)	R ²
28	9.29E–03	45.8	9.3	0.417	0.994
30 ^a	–	–	–	–	–
32	1.13E–02	55.7	6.8	0.460	0.996
35	1.24E–02	61.6	7.8	0.474	0.997
37	1.24E–02	61.3	7.3	0.465	0.997

^a CO₂ data from this condition did not result in good correlation.

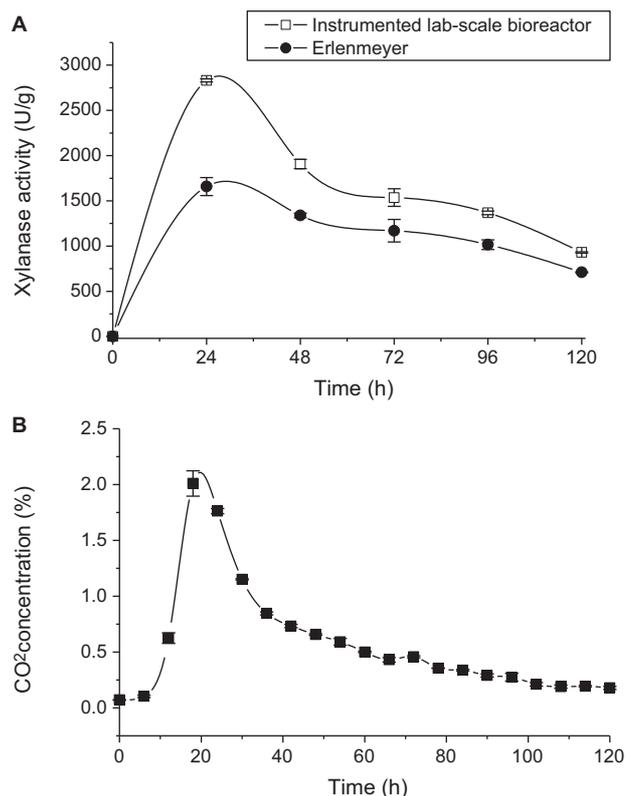


Fig. 4. (A) Xylanase profile by *A. oryzae* P6B2 cultivated under SSF over a period of 120 h, using the selected condition (temperature of 28 °C, initial substrate moisture content of 80%, an inlet air humidity of 80%, and a flow rate of 20 mL/min). (B) CO₂ evolution of *A. oryzae* P6B2 cultivated over a period of 120 h under the selected condition.

as well as the value of μ (0.39 1/h), are in agreement with the results described previously (Table 2), indicating the utility of these parameters for use in optimization and scale-up studies.

4. Conclusions

The characterization of a new Amazon Forest strain of *A. oryzae* for xylanase production using SSF under controlled operation conditions was studied using a lab-scale instrumented bioreactor. The results obtained enabled selection of the variables that could be adjusted in order to improve xylanase production. Highest enzymatic activities were obtained using an initial substrate moisture content of 80%, an inlet air humidity of 80%, and an air flow rate of 20 mL/min and a temperature of 28 °C. Results of respirometric analyses showed good agreement with enzyme production, suggesting that these data could be very useful for optimization and scale-up studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank Embrapa, CNPq, Capes and Finep (all from Brazil) for their financial support and Dr. Georgia Barros for reviewing the manuscript.

References

Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M., 2006. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia* 162, 143–153.

Bailey, M.J., Poutanen, K., 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 5–10.

Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A., 2010. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. *Biochem. Eng. J.* 49, 361–369.

Chundawat, S., Beckham, G., Himmel, M., Dale, B., Prausnitz, J., 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 121–145.

Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3–23.

Delabona, P., Pirola, R., Codima, C., Tremacoldi, C., Rodrigues, A., Farinas, C., 2012. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass Bioenergy* 37, 243–250.

Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K., Gassara, F., Verma, M., 2012. Improved xylanase production using apple pomace waste by *Aspergillus niger* in koji fermentation. *Eng. Life Sci.* 12, 198–208.

Dodd, D., Cann, I., 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob. Change Biol. Bioenergy* 1, 2–17.

Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185.

Fang, T.J., Liao, B.C., Lee, S.C., 2010. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. *New Biotechnol.* 27, 25–32.

Farinas, C., Vitosque, G., Fonseca, R., Neto, V., Couri, S., 2011. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Ind. Crops Prod.* 34, 1186–1192.

Gao, D.H., Uppugundla, N., Chundawat, S.P.S., Yu, X.R., Hermanson, S., Gowda, K., Brumm, P., Mead, D., Balan, V., Dale, B.E., 2011. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnol. Biofuels* 4, 11.

Gawande, P.V., Kamat, M.Y., 1999. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J. Appl. Microbiol.* 87, 511–519.

Holker, U., Lenz, J., 2005. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 301–306.

Jin, N., Ma, S.H., Liu, Y., Yi, X.L., He, R., Xu, H., Qiao, D.R., Cao, Y., 2012. Thermophilic xylanase production by *Aspergillus terreus* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 2387–2394.

Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M., Machida, M., 2007. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 646–670.

Lakshmi, G.S., Rao, C.S., Rao, R.S., Hobbs, P.J., Prakasham, R.S., 2009. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: a statistical optimization. *Biochem. Eng. J.* 48, 51–57.

Lu, W.Q., Li, D.F., Wu, Y.B., 2003. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 305–311.

Maciell, G.M., Vandenberghe, L.P.D., Fendrich, R.C., Della Bianca, B.E., Haminiuk, C.W.I., Soccol, C.R., 2009. Study of some parameters which affect xylanase production: strain selection, enzyme extraction optimization, and influence of drying conditions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14, 748–755.

Mandels, M., Sternberg, D., 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* 54, 267–286.

Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.

Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M., Pandey, A., 2000. New developments in solid-state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochem.* 35, 1211–1225.

Ncube, T., Howard, R.L., Abotsi, E.K., van Rensburg, E.L.J., Ncube, I., 2012. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.* 37, 118–123.

Pal, A., Khanum, F., 2011. Identification and optimization of critical medium components using statistical experimental designs for enhanced production of xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 228–236.

Pal, A., Khanum, F., 2010. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 7563–7569.

Pandya, J.J., Gupte, A., 2012. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 769–779.

Park, Y.S., Kang, S.W., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W., 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 761–766.

Polizeli, M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577–591.

Raghavarao, K., Ranganathan, T., Karanth, N., 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 127–135.

Raimbault, R., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Eletron. J. Biotechnol.* 1 (3), 174–188.

Rodriguez-Fernandez, D.E., Rodriguez-Leon, J.A., de Carvalho, J.C., Sturm, W., Soccol, C.R., 2011. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 102, 10657–10662.

Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279–291.

- Souza, D.T., Bispo, A.S.R., Bon, E.P.S., Coelho, R.R.R., Nascimento, R.P., 2012. Production of thermophilic endo-beta-1,4-xylanases by *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05 using agro-industrial by-products. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1575–1585.
- Specht, C.A., Dirusso, C.C., Novotny, C.P., Ullrich, R.C., 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic-acid from fungi. *Anal. Biochem.* 119, 158–163.
- Szendefy, J., Szakacs, G., Christopher, L., 2006. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 1354–1360.
- Umsza-Guez, M.A., Diaz, A.B., de Ory, I., Blandino, A., Gomes, E., Caro, I., 2011. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. *Braz. J. Microbiol.* 42, 1585–1597.
- Valte, R.D., Borude, P.C., Hule, A.K., Juvekar, A.R., 2010. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 by solid state fermentation using statistical methods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 56, 75–80.
- Yamane, Y.I., Fujita, J., Shimizu, R.I., Hiyoshi, A., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S., 2002. Production of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 9–14.

Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps

Rosângela D. P. B. Pirola^{1,2}, Flávio C. F. Baleeiro^{3,4}, Cristiane S. Farinas^{1,2,*}

Article first published online: 15 OCT 2013

DOI: 10.1002/btpr.1811

© 2013 American Institute of Chemical Engineers

Issue



Biotechnology Progress
Volume 29, Issue 6, pages
1430–1440
November/December 2013

Abstract Article References Cited By

[View Full Article \(HTML\)](#) | [Get PDF \(548K\)](#)

Keywords:

enzymatic hydrolysis; cellulases; *Trichoderma reesei*; *Aspergillus niger*; biorefinery; saccharification; solid-state fermentation; whole medium; sugarcane bagasse

The enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse (SESB) was investigated using enzymatic extracts (EE) and whole fermentation media (WM), produced in-house, from *Aspergillus niger* 3T5B8 and *Trichoderma reesei* Rut-C30 cultivated on wheat bran under solid-state fermentation (SSF). A detailed and quantitative comparison of the different hydrolysis conditions tested was carried out using the Chrastil approach for modeling enzymatic reactions by fitting the experimental data of total reducing sugar (TRS) released according to hydrolysis time. Conversion of SESB using *A. niger* enzymatic complex were up to 3.2-fold higher (in terms of TRS) than *T. reesei* at similar enzyme loadings, which could be correlated to the higher β -glucosidase levels (up to 35-fold higher) of *A. niger* enzymatic complex. Conversion yields after 72 h exceeded 40% in terms of TRS when the WM was supplemented with a low dosage of a commercial enzyme preparation. When the combination of WM (from either *T. reesei* or *A. niger*) and commercial cellulase was used, the dosage of the commercial enzyme could be reduced by half, while still providing a hydrolysis that was up to 36% more efficient. Furthermore, SESB hydrolysis using either EE or WM resulted in similar yields, indicating that the enzyme extraction/filtration steps could be eliminated from the overall process. This procedure is highly advantageous in terms of reduced enzyme and process costs, and also avoids the generation of unnecessary effluent streams. Thus, the enzymatic conversion of SESB using the WM from SSF is cost-effective and compatible with the biorefinery concept. © 2013 American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 29:1430–1440, 2013

[View Full Article \(HTML\)](#) | [Get PDF \(548K\)](#)

More content like this

Find more content: [like this article](#)

Find more content written by: [Rosângela D. P. B. Pirola](#) | [Flávio C. F. Baleeiro](#) | [Cristiane S. Farinas](#) | [All Authors](#)

Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation

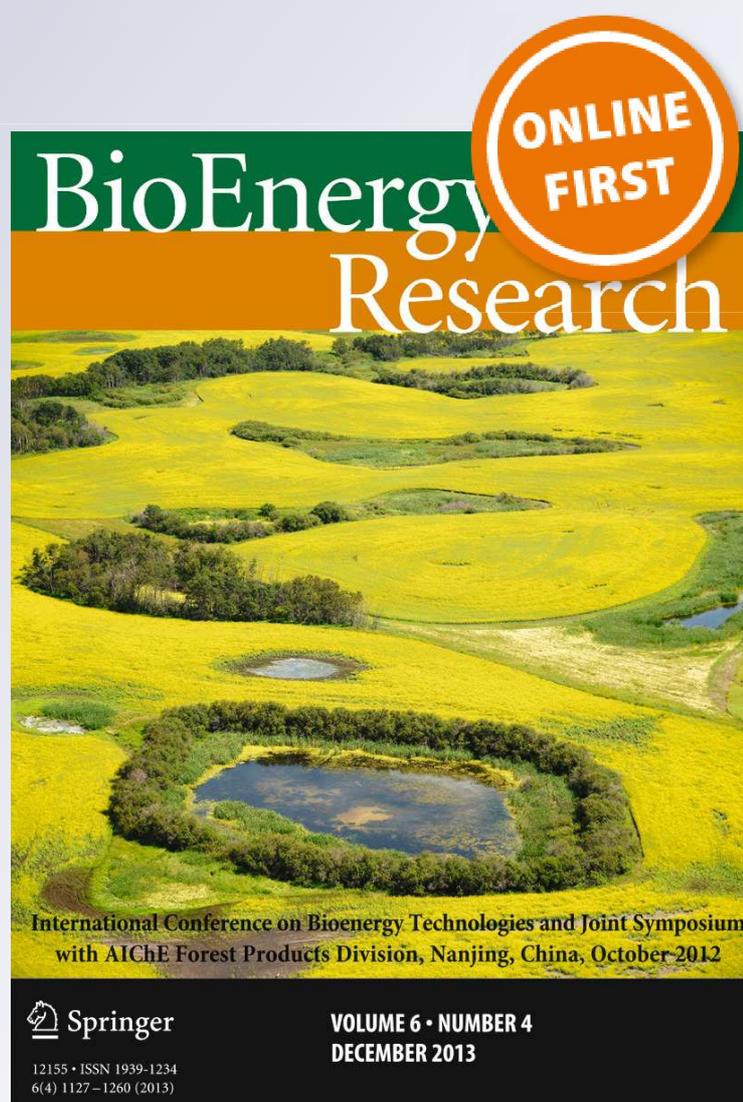
Rosangela D. P. B. Pirola, Priscila S. Delabona & Cristiane S. Farinas

BioEnergy Research

ISSN 1939-1234

Bioenerg. Res.

DOI 10.1007/s12155-013-9406-4



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation

Rosangela D. P. B. Pirota · Priscila S. Delabona ·
Cristiane S. Farinas

© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract A novel simplified configuration is proposed for the conversion of biomass to ethanol using whole medium enzymatic cocktails (WM) and enzymatic extracts (EE) from different filamentous fungi (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus oryzae*) cultivated under solid-state fermentation (SSF) for the hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse (SESB). The hydrolyzed material derived from the saccharification of SESB using the combinations *A. niger* WM + *T. reesei* EE, *A. oryzae* WM + *A. niger* EE, and *A. niger* EE + *T. reesei* WM resulted in the best biomass conversion yields (66, 65, and 64 % of the theoretical reducing sugar yields, respectively). The best ethanol production (84 % of the theoretical yield) was obtained using the material hydrolyzed by a combination of *A. oryzae* WM + *A. niger* EE. The enzymatic conversion of SESB using on-site produced enzymes from the whole SSF cultivation medium, followed by an ethanol production step, is a potential configuration for the biomass to ethanol conversion process. This novel simplified configuration would enable the use of a single reactor system, avoiding the need for additional separation steps.

Keywords Enzymatic hydrolysis · Cellulases · *Trichoderma reesei* · *Aspergillus niger* · *Aspergillus oryzae* ·

R. D. P. B. Pirota · C. S. Farinas (✉)
Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452,
13560-970 São Carlos, SP, Brazil
e-mail: cristiane.farinas@embrapa.br

R. D. P. B. Pirota · P. S. Delabona · C. S. Farinas
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal
de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

P. S. Delabona
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE),
Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000, 13083-970 Campinas, SP,
Brazil

Saccharification · Ethanol · Solid-state fermentation · Whole medium · Sugarcane bagasse

Introduction

Biomass is one of the most promising renewable resources for energy supply. Bioprocess engineering developments aimed at improving the efficiency of biomass conversion into fuels and chemicals can make an important contribution to an environmentally sustainable society. The impact of such developments can be seen from the growing contribution of renewables to energy supplies worldwide. A good example is the case of Brazil, where 45.2 % of the energy consumed is renewable [1]. Here, the sugar/bioethanol sector is a major contributor to renewable energy, and the production of first-generation ethanol using sugarcane as feedstock has resulted in the country becoming one of the world's most competitive producers of ethanol [2]. The production of second generation ethanol from sugarcane bagasse is an important sustainable means of increasing both yields and the share of renewables in the energy matrix. Among the processes used to convert biomass into biofuel, the biochemical route using enzymes for the saccharification step is especially attractive [3].

Different process configurations, using either commercial enzymes or locally produced enzymatic preparations, have been described for the hydrolysis of sugarcane bagasse [4–7]. However, for the conversion of biomass into ethanol to be economically feasible, it is necessary to improve the efficiency of the enzyme production step since the cost of the enzymatic cocktails significantly influences the viability of the entire process. According to a recent report [8], the cost of enzyme production is much higher than generally assumed, and a significant effort is still required to lower the contribution of these costs to the overall expenditure.

Filamentous fungi of the genera *Trichoderma* and *Aspergillus* are recognized as important sources of industrial cellulases, xylanases, and other cell wall-degrading enzymes [9]. However, enzyme-prospecting research continues to identify opportunities to enhance the activity of enzyme preparations by supplementation with enzymatic diversity from other microbes [10]. A potential strategy to improve the hydrolytic efficiency of enzyme preparations is the combination of different fungal cocktails to obtain enzyme formulations that are not deficient in any of the individual enzymes needed for complete biomass degradation. Berlin et al. [11] achieved a twofold reduction in the total protein required for hydrolysis of pretreated corn stover using an optimized mixture of commercial enzymes. Ximenes et al. [12] reported 99 % yields for the conversion of a coproduct from corn dry-grind ethanol plants into glucose using the combined enzymes produced by *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. Kovacs et al. [13] evaluated the performance of mixed enzymes from *T. reesei* and *Trichoderma atroviride* for the hydrolysis of steam-pretreated spruce and found that the hydrolytic efficiency of the mixed enzymes exceeded that of commercial preparations and enzymes from cultures of *T. reesei* alone. Lu et al. [14] obtained higher conversion of pretreated corn stover using the fermentation broth from a mixed culture of *T. reesei* and *A. niger* compared to the individual cultures.

In a previous study [15], we showed the feasibility of using the whole solid-state fermentation (SSF) medium, containing enzymes, mycelia, and residual solid substrate, for the saccharification of lignocellulosic biomass such as sugarcane bagasse. By using the whole SSF medium, the enzyme extraction/filtration steps could be omitted from the overall process, offering advantages in terms of reduced enzyme and process costs and avoiding the generation of unnecessary effluent streams. In terms of ethanol production, Schell et al. [16] found that use of the whole submerged fermentation (SmF) broth of *T. reesei* improved the performance of a process for the simultaneous saccharification and fermentation of pure cellulose compared to the use of cellulase filtrate. Whole SmF broth produced using *T. reesei* and *T. atroviride* has also been employed for the simultaneous saccharification and fermentation of pretreated spruce [13]. Another similar process configuration [17] used *Acremonium cellulolyticus* to produce cellulase under SmF followed by the saccharification of solka-floc and fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in a single reactor. However, to the best of our knowledge, there have been no studies concerning ethanol production from biomass using the enzymes present in the whole SSF cultivation medium. The use of the SSF process for industrial enzyme production by filamentous fungi is particularly advantageous since it simulates the natural habitat of these microorganisms, hence providing higher productivities and enables the use of agro-industrial residues as the solid substrate, which helps to reduce costs [7, 18, 19].

The present work investigates the feasibility of ethanol production from steam-exploded sugarcane bagasse (SESB) that had first been hydrolyzed using an enzyme preparation produced in-house. This preparation contained a combination of whole fermentation media (WM) and enzyme extracts (EE) obtained from different filamentous fungi (*T. reesei*, *A. niger*, and *Aspergillus oryzae*) cultivated on wheat bran under selected SSF conditions. We therefore propose a novel simplified process for the conversion of biomass to ethanol in which the on-site enzyme production step is included by using the enzymes from the whole SSF cultivation medium for the saccharification and fermentation process to obtain ethanol. This configuration would enable the use of a single reactor system, avoiding the need for additional separation steps (Fig. 1).

Materials and Methods

Microorganisms

The microorganisms used in this study were a mutant strain of *A. niger* (*A. niger* 3T5B8) and two wild-type strains of *A. oryzae* (*A. oryzae* P6B2 and P27C3A) isolated from the Amazon rainforest [20], all from the Embrapa Food Technology Collection (Rio de Janeiro, Brazil) and a strain of *T. reesei* (*T. reesei* Rut-C30) from the American Type Culture Collection. Stock cultures were stored at 4 °C on potato dextrose agar (PDA) slants. The cultures were revitalized and maintained on PDA slants at 32 °C for 5 days prior to inoculation. The commercial yeast strain *S. cerevisiae* CAT-1, acquired from Jalles Machado Mill (Goias, Brazil), was used for the ethanol production step.

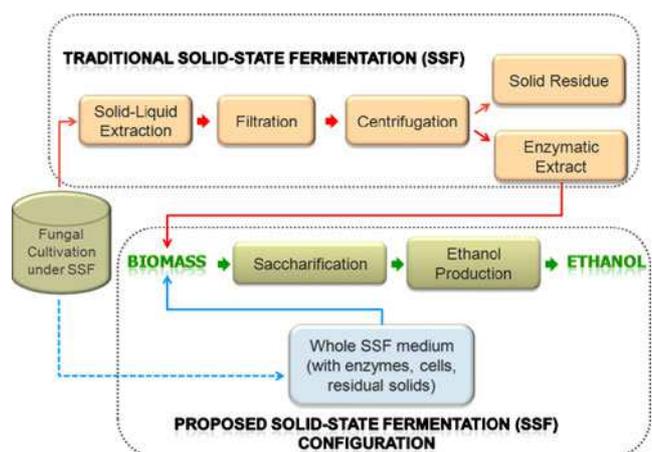


Fig. 1 Schematic illustration of a simplified biomass-to-ethanol conversion process. On-site enzyme production is included by using the enzymes from the whole medium of fungal cultivation under SSF in the configuration of the saccharification and fermentation process to obtain ethanol. Conceptually, this process could be carried out in a single reactor system, avoiding the need for additional separation steps

Lignocellulosic Materials

SSF cultivations were carried out using wheat bran (Claro Agricopecuária, São Carlos, Brazil) as solid substrate. The enzymatic hydrolysis experiments employed SESB, kindly provided by CTBE (Campinas, Brazil). The composition of the SESB used in all hydrolysis experiments was 51.7 ± 0.6 of cellulose, 8.9 ± 0.1 of hemicellulose, and 34.3 ± 0.3 % of lignin [21].

SSF Cultivations for Enzyme Production

SSF cultivations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks using wheat bran as solid substrate. The solid medium was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min before inoculation. A spore suspension volume corresponding to 10^7 conidia per g of dry solid medium was inoculated into the solid medium by gently stirring with a glass rod until a uniform mixture was obtained. Substrate moisture level was adjusted using a nutrient solution [22]. Cultivations were carried out using different moisture levels, temperatures, and periods, according to previously selected conditions for each strain [15, 23] as follows: *A. niger* 3T5B8 (80 % moisture, 28 °C for 48 h), *A. oryzae* P6B2 (80 % moisture, 28 °C for 24 h), *A. oryzae* P27C3A (70 % moisture, 28 °C for 48 h), and *T. reesei* Rut-C30 (60 % moisture, 35 °C for 48 h). After the cultivation period, the enzymes were extracted by adding a sufficient volume of 0.05 mol L^{-1} sodium citrate buffer at pH 4.8 to achieve a solid/liquid ratio of 1:10 (w/v). The suspension was stirred at 120 rpm for 30 min at room temperature, and the crude enzymatic solution was recovered by filtration followed by centrifugation at $10,000 \times g$ at 4 °C for 20 min. Alternatively, the whole fermentation media containing the enzymes, mycelia, and residual solid substrate were used in the hydrolysis experiments, as described in “Enzymatic hydrolysis step”. All cultivation experiments were carried out in triplicate, and the data were calculated as means \pm standard deviations. The mean values obtained for each condition were analyzed statistically using Origin (v. 8.0) software.

Enzymatic Hydrolysis Step

The enzymatic hydrolysis experiments were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 5 g of SESB and 50 mL of sodium citrate buffer at pH 4.8. The suspension was initially acclimatized at 50 °C for 4 h with 200 rpm agitation. Subsequently, 5 g of the previously fermented wheat bran SSF material (as described in “SSF cultivations for enzyme production”) and 50 mL of the enzymatic extract were added, and the mixture was incubated at 50 °C for 72 h with agitation at 200 rpm. Evaluations were made of the

hydrolytic capacities of different combinations of fungal enzyme cocktails obtained by mixing the WM and EE from *A. niger*, *A. oryzae*, and *T. reesei*. For that, all possible combinations of WM and EE from each two different strains (a total of 12 combinations) were evaluated on SESB hydrolysis. Samples were removed at 0, 6, 12, 24, 48, and 72 h for quantification of the glucose and total reducing sugar released. In all experiments, sodium azide (0.1 %, w/v) was added in order to prevent fungal development during the hydrolysis step. All hydrolysis experiments were carried out in triplicate, and the data were calculated as means \pm standard deviations. The mean values obtained for each condition were analyzed statistically using the Tukey comparison test ($p < 0.05$) of Origin software.

Alcoholic Fermentation Step

The enzymatic hydrolysis conditions that resulted in higher biomass conversion were further evaluated for ethanol production. After the saccharification step, the glucose content was measured, and glucose was added to a concentration of 100 g/L. The medium was inoculated with a suspension of 25 g/L dry yeast cells (*S. cerevisiae* CAT-1). Experiments were conducted in a shaker at 31 °C and 100 rpm until consumption of glucose was complete, as measured using an enzymatic kit (Doles, Goiânia, Brazil). Ethanol production at the end of the cultivation was measured by HPLC. All experiments were carried out in triplicate, and the data were calculated as means \pm standard deviations. The mean values obtained for each condition were analyzed statistically using Origin software. Calculation of the ethanol yield assumed that 100 g/L of glucose theoretically gives 51 g/L of ethanol.

Analytical Measurements

The activities of FPase and endoglucanase were determined according to the procedure recommended by the IUPAC Commission on Biotechnology with modifications [20]. The activity of xylanase was measured according to the methodology described by [24]. Here, one unit of activity corresponds to 1 μmol of reducing sugar released per minute per milliliter under the reaction conditions. Quantification of the reducing groups employed the dinitrosalicylic acid (DNS) method [25]. The β -glucosidase activity was determined using cellobiose (Sigma, St. Louis, USA) as substrate and quantifying the sugars released using an enzymatic kit for glucose measurement (Doles, Goiânia, Brazil). The results were expressed as activity units per mass of initial dry solid substrate (IU/gds). In the hydrolysis experiments, glucose and total reducing sugar were measured using the enzymatic kit for glucose measurement and the DNS method, respectively.

Results

Enzyme Production Under Selected SSF Conditions

The enzyme production in terms of endoglucanase, β -glucosidase, FPase, and xylanase activities is presented in Table 1 for the four different strains (*A. niger* 3T5B8, *A. oryzae* P6B2, *A. oryzae* P27C3A, and *T. reesei* Rut-C30) cultivated separately under previously selected SSF conditions [15, 23]. The endoglucanase activity produced by *A. niger* (219.2 IU/gds) was almost twofold higher than the amount secreted by the other *Aspergillus* strains and 1.5-fold higher than for the *T. reesei* strain. The synthesis of β -glucosidase by *A. niger* (22.3 IU/gds) was also superior compared to the other strains, but the differences between the amounts of enzyme secreted were much larger: the production of β -glucosidase by *A. niger* was almost 20-fold higher than for *T. reesei* and around tenfold higher than for the other *A. oryzae* strains. The same trend was observed for xylanase enzymes, with *A. niger* secreting 4.4-fold more xylanase than *T. reesei*, twofold more than *A. oryzae* P6B2, and 6.7-fold more than *A. oryzae* P27C3A. However, in terms of FPase, this trend was true only for comparison with the *A. oryzae* strains, while the FPase activity for *T. reesei* was twofold higher than for *A. niger*.

Considering that the combination of different fungal cocktails is a potential strategy to improve the hydrolytic efficiency of enzyme preparations, it was therefore logical to evaluate the hydrolytic effect of combining the enzymes from the different fungal sources used here. For that, a set of hydrolysis experiments with SESB were conducted using combinations of the enzymes from the strains *A. niger* 3T5B8, *A. oryzae* P6B2, *A. oryzae* P27C3A, and *T. reesei* Rut-C30. The enzymes from the whole SSF medium (WM), obtained without separating the enzymes from the fungal mycelia, were used in combination with the EE in order to evaluate the influence of mycelia-bound enzymes during the biomass saccharification step.

Biomass Saccharification

The catalytic efficiencies of the enzymes produced by the four fungal strains during cultivation under SSF were evaluated for the hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse (SESB). For this step of the study, the SESB was mixed with the WM obtained after cultivation under the selected conditions,

without separating the enzymes from the fungal mycelia, in combination with the EE obtained after extraction and filtration. Table 2 presents a list of the different enzymatic mixtures used, as well as the resulting enzyme loadings per gram of SESB for each reaction condition. The enzymatic activity was only measured in the EE of the cultivations. For the WM, it was assumed that 20 % of the active enzymes was lost during a single extraction from SSF [26], so the activity in the WM was considered to be that obtained for the EE plus 20 %. This assumption was necessary because of the uncertainty in measurement of the enzymes in the whole medium due to the presence of solids. Finally, for estimation of the enzyme loadings listed in Table 2, these two values (EE and WM) for the corresponding fungi were summed and divided by the total mass of solids (5 g of SESB) added to the reaction system.

Figure 2 presents the temporal profiles of total reducing sugar (TRS) and glucose released during the hydrolysis of SESB, as well as the total conversion after 72 h for the different enzyme mixtures evaluated. From Fig. 2a, b, it can be seen that the amount of TRS and glucose increased with time, and that the effect was much more pronounced when the *A. niger* enzymes were present in the combination with either *T. reesei* or *A. oryzae* enzymes. In terms of total conversion after 72 h (Fig. 2c), the use of the enzymatic complexes from *A. niger* for SESB hydrolysis (conditions C, I, and L) resulted in similar higher biomass conversion yields. In terms of TRS, these were 66, 65, and 64 % of the theoretical yields, respectively, while for glucose the corresponding values were 28, 33, and 30 %. These values were not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$). Considering the relatively high SESB content (50 g/L) and the low enzyme loading (around 1 FPU/g SESB), the conversion yields were very promising.

It is interesting to note that the combination of *A. niger* and *T. reesei* enzymes was highly favorable for SESB hydrolysis, independent of the source (EE or WM), with no statistically significant difference between conditions C and L. The combination of WM from *A. oryzae* P6B2 and EE from *A. niger* (condition I) was more efficient than condition A, indicating that the mycelia-bound enzymes of *A. oryzae* P6B2 cells were able to improve the hydrolysis. Based on these results, the hydrolyzed SESB obtained using enzyme combinations C, I, and L (Table 2) were used in the subsequent alcoholic fermentation experiments.

Table 1 Enzymatic activities obtained from the cultivation of different fungi under the selected SSF conditions

Enzymatic activity (IU/gds)	<i>A. niger</i> 3T5B8	<i>A. oryzae</i> P6B2	<i>A. oryzae</i> P27C3A	<i>T. reesei</i> Rut C-30
Endoglucanase	219.2±22.2	115.9±5.3	113.4±0.7	142.1±0.0
β -glucosidase	22.3±5.8	2.7±0.10	2.0±0.2	1.2±0.1
FPase	0.4±0.06	0.13±0.01	0.25±0.07	0.8±0.1
Xylanase	3,382.5±414.3	1,658.1±98.7	507.9±14.0	768.4±49.2

Table 2 Overview of the different combinations of enzyme sources used for SESB hydrolysis

Experiment	Estimated enzyme loading (IU/g SESB)				
	Combination	Endoglucanase	β -glucosidase	FPase	Xylanase
A	<i>A. niger</i> WM + <i>A. oryzae</i> P6B2 EE	378.9	29.5	0.6	5,717.1
B	<i>A. niger</i> WM + <i>A. oryzae</i> P27C3A EE	376.4	28.8	0.7	4,566.9
C	<i>A. niger</i> WM + <i>T. reesei</i> EE	405.1	28.0	1.3	4,827.4
D	<i>A. oryzae</i> P27C3A WM + <i>A. oryzae</i> P6B2 EE	251.9	5.1	0.4	2,267.6
E	<i>A. oryzae</i> P27C3A WM + <i>A. niger</i> EE	355.2	24.7	0.7	3992.0
F	<i>A. oryzae</i> P27C3A WM + <i>T. reesei</i> EE	278.1	3.6	1.1	1,377.9
G	<i>A. oryzae</i> P6B2 WM + <i>T. reesei</i> EE	281.2	4.4	1.0	2,758.1
H	<i>A. oryzae</i> P6B2 WM + <i>A. oryzae</i> P27C3A EE	252.4	5.3	0.4	2497.7
I	<i>A. oryzae</i> P6B2 WM + <i>A. niger</i> EE	358.3	25.5	0.6	5,372.2
J	<i>T. reesei</i> WM + <i>A. oryzae</i> P6B2 EE	286.4	4.1	1.1	2,580.2
K	<i>T. reesei</i> WM + <i>A. oryzae</i> P27C3A EE	283.9	3.5	1.2	1,430.0
L	<i>T. reesei</i> WM + <i>A. niger</i> EE	389.7	23.7	1.4	4,304.6

WM whole medium obtained after SSF cultivation, EE enzymatic extract obtained after SSF cultivation, *Bold* entries indicate the conditions that were further evaluated for Ethanol Production

Ethanol Production Step

After saccharification using combinations C, I, and L (Table 2), the hydrolyzed materials (containing the residual solids from SESB, wheat bran, enzymes, fungal mycelium, and soluble sugars) were further evaluated for ethanol production by *S. cerevisiae*. The sugar concentration in the hydrolyzed material was supplemented with glucose to a concentration of 100 g/L. This strategy was adopted here based on the fact that a monosaccharide concentration of 100 g/L results in an ethanol titer of 50 g/L, while distillation becomes energy inefficient below 45 g/L [27]. It has also been suggested that the feasibility of the production of second generation ethanol can be improved by mixing the hydrolyzed biomass with a stream of sugar cane juice from a first-generation ethanol production plant [28].

Figure 3a illustrates the glucose uptake by *S. cerevisiae* over a total period of 8 h. For the three hydrolyzed materials (experiments C, I, and L), there was virtually complete consumption of glucose after 7 h of fermentation. The total yield of ethanol after 7 h is shown in Fig. 3b. The production of ethanol by *S. cerevisiae* using the hydrolyzed material from combination I was 42.9 g/L (equivalent to 84 % of the theoretical value), while the hydrolyzed material from combinations C and L produced 31.2 and 29.5 g/L (61.1 and 57.7 % of the theoretical value, respectively). Application of Tukey's test showed that these results were significantly different, leading to the conclusion that the material that had been hydrolyzed using combination I (WM of *A. oryzae* P6B2 + EE from *A. niger*) promoted higher ethanol yields compared to the other hydrolyzed materials.

Discussion

For the conversion process of biomass into ethanol to be economically feasible, it is necessary to improve the efficiency of the enzyme production step, specially focusing on developments towards process integration. Here, we investigated the feasibility of ethanol production from SESB that had first been hydrolyzed using an enzyme preparation produced in-house. This preparation contained a combination of whole fermentation media (WM) and EE obtained from different filamentous fungi (*T. reesei*, *A. niger*, and *A. oryzae*) cultivated under SSF. Initially, the activities of endoglucanase, β -glucosidase, FPase, and xylanase enzymes produced by four different strains (*A. niger* 3T5B8, *A. oryzae* P6B2, *A. oryzae* P27C3A, and *T. reesei* Rut-C30) cultivated separately under SSF conditions were evaluated. Overall, it was found that the synthesis of β -glucosidase and xylanases by *A. niger* was significantly superior compared to the other strains. The superiority of *A. niger* strains for β -glucosidase production is a significant finding since β -glucosidase plays a role in reducing the inhibition effects generated by the accumulation of cellobiose in the reaction system [29]. Furthermore, the importance of large amounts of β -glucosidase in cellulose hydrolysis is also to circumvent the loss due to inhibition and deactivation of β -glucosidase by the phenolic compounds generated during biomass pretreatment, which are often present in the hydrolysis reaction medium [30]. Besides the quantitative difference observed here between β -glucosidase production from *A. niger* and *T. reesei*, it has been previously reported that β -glucosidase from *T. reesei* is more susceptible to inhibition as well as deactivation by phenolic compounds compared to β -glucosidase from *A. niger* [27, 31]. A higher

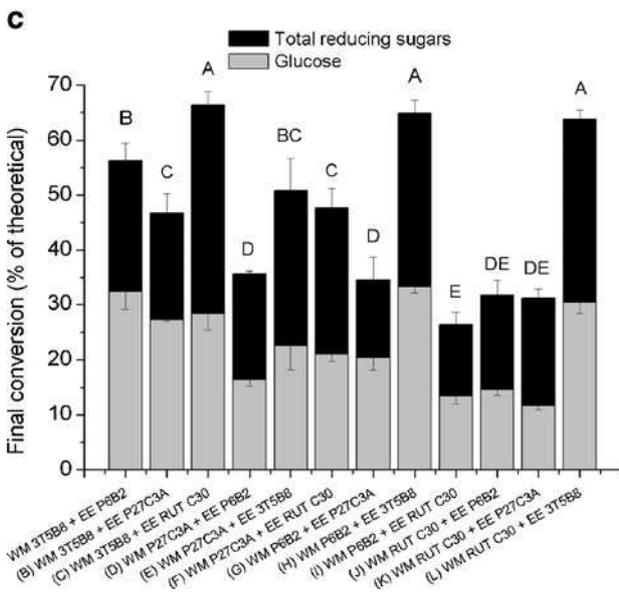
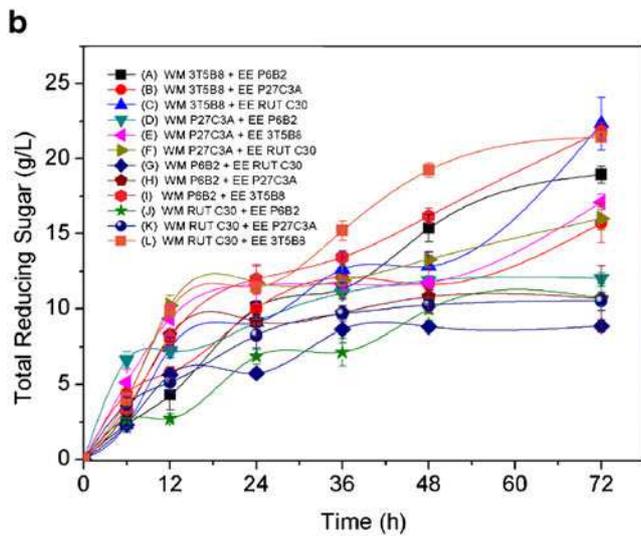
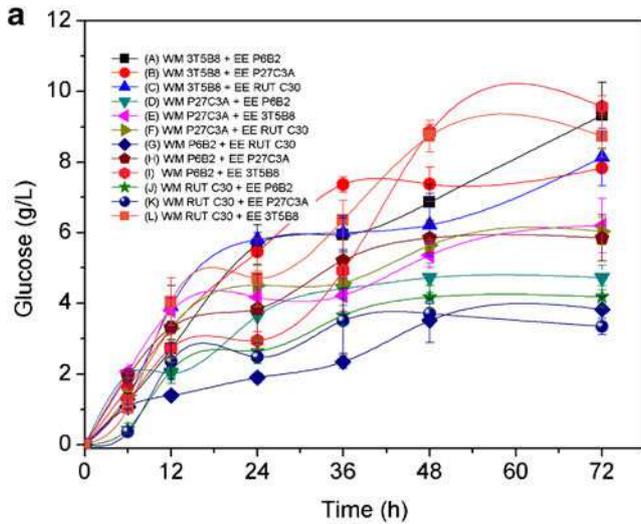


Fig. 2 Temporal profiles of the concentrations of total reducing sugar (a) and glucose (b) released during the hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse (SESB) and (c) the total conversion of SESB after 72 h of hydrolysis using enzymes from the different combinations of whole medium and enzymatic extract. Means with different letters are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$)

tolerance to glucose of β -glucosidase from *A. niger*, compared to *T. reesei*, was also observed by Sukumaran et al. [7]. Thus, the combination of *Trichoderma* and *Aspergillus* enzymatic extracts may also result in an enzyme mixture that is more resistant to inhibition and deactivation compared to the enzymes derived from *Trichoderma* alone. Moreover, β -glucosidase production by *Aspergillus* strains such as *A. niger* has often been used to supplement commercial enzymatic cocktails [9, 29]. Improvement in the hydrolysis of biomass

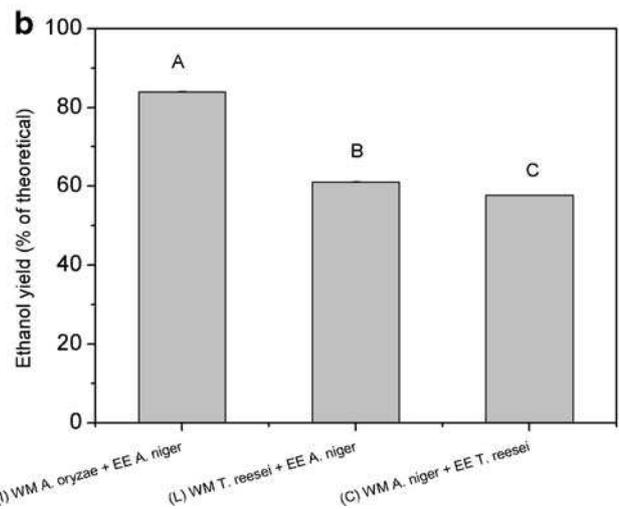
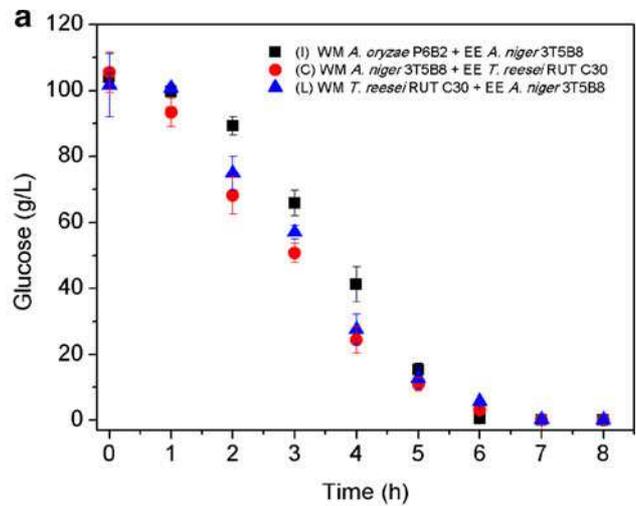


Fig. 3 Temporal profiles of glucose consumed during alcoholic fermentation of hydrolysates from combinations C, I, and L (a) and theoretical ethanol yields after 7 h of fermentation (b). Means with different letters are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$)

using the mixed enzymes of *T. reesei* and *A. niger* has also been reported [7, 12, 14].

Besides the well-known capacity of the fungi *T. reesei* and *A. niger* for biomass-degrading enzymes production, enzyme-prospecting research continues to identify opportunities to enhance the activity of enzyme preparations by supplementation with enzymatic diversity from other microbes [10]. Given the potential of *A. oryzae* strains and their recognized ability to produce industrial enzymes, there is great interest in the evaluation of this fungus in terms of xylanase and cellulase production. Among the *Aspergillus* genera, *A. niger* and *A. oryzae* are the two most important fungi used in biotechnological applications [32]. It has been found that the genome of *A. oryzae* is highly enriched in genes related to biomass degradation [33]. In addition to the well-established applications of *A. oryzae* in the food industry, this fungus has considerable potential for the production of industrial enzymes, which needs to be further investigated. The two wild-type strains of *A. oryzae* used here (P6B2 and P27C3) were previously isolated from the Amazon rainforest and showed superior capacities for xylanase and cellulase production [20, 23]. It was therefore logical to evaluate the hydrolytic effect of combining the enzymes from the different fungal sources used here.

In the second part of this study, the catalytic efficiencies of the enzymes produced by the four fungal strains were evaluated for the hydrolysis of SESB. In order to investigate the effect of mycelia-bound enzymes, the SESB was mixed with the WM obtained after cultivation, without separating the enzymes from the fungal mycelia, in combination with the EE obtained after extraction and filtration. It was interesting to note that the combination of *A. niger* and *T. reesei* enzymes was highly favorable for SESB hydrolysis, independent of the source (EE or WM), with no statistically significant difference between conditions C and L (Fig. 2c). In contrast, the combination of WM from *A. oryzae* P6B2 and EE from *A. niger* (condition I) was more efficient than condition A, indicating that the mycelia-bound enzymes of *A. oryzae* P6B2 cells were able to improve the hydrolysis. Overall, the use of the enzymatic complexes from *A. niger* for SESB hydrolysis (conditions C, I, and L) resulted in similar higher biomass conversion yields (Fig. 2). A possible explanation for the superior SESB hydrolysis achieved using the combinations C, I, and L could be that the mixed enzymatic cocktails were well balanced in terms of the activities of endoglucanase, β -glucosidase, FPase, and xylanase (Table 2). Using a combination of *A. niger* and *T. reesei* enzymes (conditions C and L), it was possible to improve the SESB hydrolysis efficiency by up to sixfold, compared to hydrolysis using *T. reesei* enzymes alone, and twofold in comparison to *A. niger* enzymes alone, as previously reported [15]. The β -glucosidase deficiency of *T. reesei* Rut C-30 was therefore resolved by mixing the extracts with those from *A. niger* 3T5B8, which is a good β -

glucosidase producer. Kovacs et al. [13] were also able to improve the hydrolysis efficiency of the enzymes from *T. reesei* by mixing them with enzymes from *T. atroviride*, which was also a better β -glucosidase producer.

The performance of the different mixtures of enzymes in SESB hydrolysis may also have been influenced by the presence of other accessory enzymes, such as xylanase. Due to the nature of the steam-explosion pretreatment, a residual hemicelluloses fraction remains in the material so that xylanase and other hemicellulases are required to improve cellulose accessibility [11]. From Table 2, it can be observed that the three best conditions for SESB hydrolysis (conditions C, I, and L) were associated with high xylanase activities, which probably contributed to the yield of reducing sugars. The superior performance of the *Aspergillus* enzymatic cocktail might also have been related to the characteristics of the enzymes in terms of the extent of their inhibition or deactivation caused by the phenolic compounds present in the SESB. Considering that the SESB material was used here without washing, it is possible that lignin degradation products and other inhibitory compounds might have been present in the reaction medium. Another interesting observation concerned the efficiency of SESB hydrolysis using the combination of *A. niger* 3T5B8 and *A. oryzae* P6B2, a wild-type strain (experiment I), which resulted in a conversion equivalent to 64 % of the theoretical yield in terms of TRS. This finding emphasizes the importance of enzyme-prospecting research to identify opportunities for enhancing the activity of enzyme preparations by supplementation with enzymatic diversity from other microbes, as highlighted by King et al. [10].

In the third part of this study, the hydrolyzed materials (containing the residual solids from SESB, wheat bran, enzymes, fungal mycelium, and soluble sugars) using combinations C, I, and L (Fig. 2) were further evaluated for ethanol production by *S. cerevisiae*. The material that had been hydrolyzed using combination I (WM of *A. oryzae* P6B2 + EE from *A. niger*) promoted higher ethanol yields compared to the other hydrolyzed materials. Considering that the hydrolyzed materials (experiments C, I, and L) were compared based on the same initial glucose concentration (100 g/L of glucose), it is possible that some components inhibitory to *S. cerevisiae* might have been present in the materials produced using combinations C and L, leading to lower ethanol yields compared to hydrolysate I obtained using enzymes from *A. oryzae* P6B2. The better ethanol production performance of the hydrolyzed material from combination I (WM of *A. oryzae* P6B2 + EE from *A. niger*) emphasizes the importance of microbe-prospecting research. The strain *A. oryzae* P6B2 is a wild-type strain isolated from the Amazon rainforest [23] and showed performance superior to that of the *T. reesei* Rut C-30 mutant that is widely used for the conversion process of biomass into ethanol.

It was previously demonstrated that the whole broth from SmF can be used in the biomass to ethanol conversion process

[13, 16]. In our previous study [15], we showed the feasibility of using the whole SSF medium, containing enzymes, mycelia, and residual solid substrate, for the saccharification of sugarcane bagasse, demonstrating that the enzyme extraction/filtration steps could be omitted from the overall process. The present findings suggest that the use of enzymes present in the whole medium of filamentous fungi cultivated under SSF may be of great potential interest for biotechnological processes involving the conversion of biomass into ethanol. Moreover, our results corroborate the benefits of using a combination of different fungal cocktails to obtain enzyme formulations that are more efficient on biomass degradation. To the best of our knowledge, this is the first study where the whole medium from solid-state fermentation has been used in the biomass to ethanol conversion process.

Conclusions

Enzymatic cocktails from the WM and EE of filamentous fungi cultivated under SSF were used for SESB hydrolysis. Ethanol production equivalent to 84 % of the theoretical yield was obtained after hydrolysis using a combination of WM from *A. oryzae* P6B2 and EE from *A. niger*. Conceptually, the SSF enzyme production step, saccharification, and alcoholic fermentation can be carried out in a single reactor, avoiding the need for filtration steps. The findings highlight the potential of in-house SSF enzyme production, followed by application of the whole medium in the saccharification step, as an alternative process configuration worthy of further investigation.

Acknowledgments The authors would like to thank Embrapa, CNPq, Capes, and FAPESP (all from Brazil) for their financial support. We also acknowledge Dr. Sonia Couri as the researcher responsible for the isolation and mutation studies of the *A. niger* 3T5B8 strain and are grateful to Dr. Sandra C. Pereira for the internal review of this paper.

References

- Pottmaier D, Melo CR, Sartor MN, Kuester S, Amadio TM, Fernandes CAH, Marinha D, Alarcon OE (2013) The Brazilian energy matrix: from a materials science and engineering perspective. *Renew Sust Energy Rev* 19:678–691
- Amorim HV, Lopes ML, Oliveira JVD, Buckeridge MS, Goldman GH (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1267–1275
- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5:45
- Giese EC, Pierozzi M, Dussan KJ, Chandel AK, da Silva SS (2013) Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. *J Chem Technol Biotechnol* 88:1266–1272
- Delabona PD, Cota J, Hoffmann ZB, Paixao DAA, Farinas CS, Cairo J, Lima DJ, Squina FM, Ruller R, Pradella JGD (2013) Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and alpha-L-arabinofuranosidase. *Bioresour Technol* 131:500–507
- Rodriguez-Zuniga UF, Couri S, Neto VB, Crestana S, Farinas CS (2013) Integrated strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioenerg Res* 6:142–152
- Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A (2009) Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renew Energy* 34:421–424
- Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA, Blanch HW (2012) The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol Bioeng* 109:1083–1087
- Gusakov AV (2011) Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol* 29:419–425
- King BC, Waxman KD, Nenni NV, Walker LP, Bergstrom GC, Gibson DM (2011) Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol Biofuels* 4:14
- Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J (2007) Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 97:287–296
- Ximenes EA, Dien BS, Ladisch MR, Mosier N, Cotta MA, Li XL (2007) Enzyme production by industrially relevant fungi cultured on coproduct from corn dry grind ethanol plants. *Appl Biochem Biotechnol* 137:171–183
- Kovacs K, Szakacs G, Zacchi G (2009) Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. *Process Biochem* 44:1323–1329
- Lu J, Weerasiri RR, Liu Y, Wang W, Ji SW, Lee I (2013) Enzyme production by the mixed fungal culture with nano-shear pretreated biomass and lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 110:2123–2130
- Pirota RSPB, Baleeiro FC, Farinas CS (2013) Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. *Biotechnol Prog* 29:1430–1440
- Schell DJ, Hinman ND, Wyman CE, Werdene PJ (1990) Whole broth cellulase production for use in simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 24–5:287–297
- Park EY, Naruse K, Kato T (2012) One-pot bioethanol production from cellulose by co-culture of *Acremonium cellulolyticum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 5:64
- Raimbault R (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Eletron J Biotechnol* 1:3–45
- Singhanian RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzym Microb Technol* 46:541–549
- Delabona P, Pirota R, Codima C, Tremacoldi C, Rodrigues A, Farinas C (2012) Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass Bioenergy* 37:243–250
- Delabona P, Farinas C, da Silva M, Azzoni S, Pradella J (2012) Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresour Technol* 107:517–521
- Mandels M, Sternberg D (1976) Recent advances in cellulase technology. *J Ferment Technol* 54:267–286
- Pirota R, Tanelotto M, Delabona PD, Fonseca RF, Paixao DAA, Baleeiro FCF, Neto VB, Farinas CS (2013) Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. *Ind Crop Prod* 45:465–471

24. Bailey MJ, Poutanen K (1989) Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 30:5–10
25. Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
26. Pirota R, Miotto LS, Delabona PS, Farinas CS (2013) Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Braz J Chem Eng* 30:117–123
27. Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Inhibition of cellulases by phenols. *Enzym Microb Technol* 46:170–176
28. Soccol CR, Vandenberghe LPD, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, Pitarelo AP, Ferreira-Leitao V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Bon EPD, de Moraes LMP, Araujo JD, Torres FAG (2010) Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol* 101:4820–4825
29. Lynd L, Weimer P, van Zyl W, Pretorius I (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:506–577
30. Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, Ladisch MR (2011) Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzym Microb Technol* 48:408–415
31. Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzym Microb Technol* 48: 54–60
32. Hu H, van den Brink J, Gruben B, Wosten H, Gu J, de Vries R (2011) Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:248–252
33. Kobayashi T, Abe K, Asai K, Gomi K, Juvvadi P, Kato M, Kitamoto K, Takeuchi M, Machida M (2007) Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:646–670