

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DAS ATIVIDADES DE CELULASES E
XILANASES POR *Penicillium echinulatum* S1M29 EM CULTIVO SUBMERSO**

LAÍSA DOS REIS

Caxias do Sul

2017

LAÍSA DOS REIS

**ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DAS ATIVIDADES DE CELULASES E
XILANASES POR *Penicillium echinulatum* S1M29 EM CULTIVO SUBMERSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof Dr. Aldo J. P. Dillon

Co-orientadora: Prof^a Dra. Marli Camassola

Caxias do Sul

2017

R375e Reis, Laísa dos

Estratégias para incremento das atividades de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso / Laísa dos Reis. – 2017.

104 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Coorientação: Marli Camassola.

1. *Penicillium*. 2. Regime descontínuo alimentado. 3. Celulose. 4. Celulasas. 5. Xilanases. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Camassola, Marli, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LAÍSA DOS REIS

ESTRATÉGIAS PARA INCREMENTO DAS ATIVIDADES DE CELULASES E
XILANASES POR *Penicillium echinulatum* S1M29 EM CULTIVO SUBMERSO

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL,
VISANDO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

TESE APROVADA EM 07 DE ABRIL DE 2017.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Prof. Dr. Nei Pereira Júnior

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Profa. Dra. Eloane Malvessi

“Os desafios são o que tornam a vida interessante e superá-los é o que dá sentido à vida”

Joshua J. Marinho

“ A única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz”

Steve Jobs

Dedico este trabalho a minha família, meu
porto seguro, em especial ao meu esposo
Daniel e à minha filha Luísa.

AGRADECIMENTOS

Para desenvolver este trabalho tive muita ajuda e com toda certeza sozinha não teria chegado a lugar algum. Por isso tenho muito a agradecer:

a Deus por sempre iluminar meus caminhos;

ao meu orientador professor Dr. Aldo J. P. Dillon por acreditar em mim e sempre me alegrar e encorajar para alcançar meus objetivos;

à minha co-orientadora professora Dra. Marli Camassola pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento prático do trabalho;

à técnica do laboratório Roselei C. Fontana por acompanhar e auxiliar diariamente meu trabalho e contribuir na solução dos problemas;

ao empresário e engenheiro Carlos Fernandes pela contribuição no desenvolvimento do alimentador automático de celulose;

aos professores da banca de acompanhamento Dr. Maurício M. da Silveira e Dra. Eloane Malvessi;

aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e funcionários do Instituto de Biotecnologia;

aos funcionários do Departamento da Mecânica da UCS;

à Fernanda Roberta Rech pela amizade e colaboração no desenvolvimento prático deste trabalho;

a todos os colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas pela amizade e auxílio no desenvolvimento prático deste trabalho;

à Lucimara Serafini Rech, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo seu excelente trabalho e pela amizade;

à minha família que sempre proporcionou o melhor para mim, estando sempre ao meu lado e acreditando em mim;

ao apoio estrutural da UCS e financeiro da FAPERGS e CAPES.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Mercado de enzimas	3
2.2 Enzimas lignocelulolíticas	5
2.2.1 Celulases	5
2.2.2 Xilanases	8
2.2.3 Expansinas e swoleninas	9
2.4 Aplicação das celulases e xilanases	10
2.5 Microrganismos produtores de celulases e xilanases	11
2.6 Complexo lignocelulósico	14
2.7 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica	17
2.8 Matérias-primas para a produção de celulases e xilanases	19
2.9 Processos de produção de celulases e xilanases	21
2.9.1 Regime descontínuo alimentado para a produção de celulases e xilanases	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Linhagem	26
3.2 Meios de produção para celulases e xilanases	26
3.2.1 Meio de produção do inóculo para cultivo em biorreator de bancada	26
3.2.2 Meio de produção para cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca e em biorreator de bancada	26
3.3 Procedimentos experimentais	27
3.3.1 Crescimento e manutenção de linhagens	27
3.3.2 Obtenção do inóculo para o biorreator de bancada	28
3.3.3 Cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca	28
3.3.4 Cultivos em biorreator de bancada	29
3.3.5 Hidrólise enzimática	31

3.4 Métodos analíticos	32
3.4.1 Determinação da concentração micelial	32
3.4.2 Determinação do conteúdo de celulose	33
3.4.3 Determinação da concentração de sacarose	33
3.4.4 Determinação da atividade sobre papel filtro (FPA)	33
3.4.5 Determinação da atividade de endoglicanases	34
3.4.6 Determinação da atividade de β -glicosidases	35
3.4.7 Determinação da atividade de exoglicanases	35
3.4.8 Determinação da atividade de xilanases	35
3.5 Caracterização dos materiais celulósicos	36
3.5.1 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos	36
3.5.2. Extraíveis	36
3.5.3 Análise química dos substratos celulósicos	36
3.5.4 Determinação de nitrogênio total e proteínas	37
3.5.5 Extração e determinação da concentração de pectina	38
3.6 Zimogramas de atividades enzimáticas	38
3.6.1 Zimograma para endoglicanases	38
3.6.2 Zimograma para β -glicosidases	39
3.7 Análise dos resultados	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Efeito da concentração de celulose no crescimento micelial e na produção enzimática durante cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca	41
4.2 Emprego de fontes alternativas de celulose e hemicelulose para a produção de celulasas e xilanases em frascos mantidos sob agitação recíproca	45
4.3 Reuso da massa micelial como estratégia para aumentar a produção de celulasas e xilanases e reduzir os custos de produção das enzimas	52
4.4 Desenvolvimento de um sistema automático para adições de celulose em cultivos durante regime descontínuo alimentado	61
4.5 Seleção do tempo de início de adição da celulose durante o regime descontínuo alimentado empregando o alimentador automático	64
4.6 Aumento da concentração de celulose em regime descontínuo alimentado visando obter incrementos nas atividades de celulasas e xilanases	69
4.7 Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e de capim-elefante para obtenção de açúcares fermentescíveis	76

5 CONCLUSÕES	81
6 PERSPECTIVAS	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Celulases comerciais, respectivas empresas e atividades enzimáticas médias obtidas por espécies de <i>Trichoderma</i> e <i>Aspergillus</i> .	4
Tabela 2. Comparação da atividade de FPA de diferentes fungos crescidos em cultivos submersos constituídos de diferentes fontes de carbono e conduzidos em frascos.	51
Tabela 3. Composição química do bagaço de laranja (BL), do sabugo de milho (SM), do capim-elefante (CE) e do bagaço de cana-de-açúcar (BCA).	51
Tabela 4. Parâmetros utilizados durante ensaios em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29, para selecionar o tempo de início da alimentação da celulose (S).	64
Tabela 5. Comparativo das atividades enzimáticas obtidas durante ensaios em regime descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA) em biorreator com agitação mecânica empregando <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29.	69
Tabela 6. Parâmetros utilizados durante ensaios em regime descontínuo alimentado (RDA) com diferentes concentrações de celulose, empregando <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29.	70
Tabela 7. Comparação das atividades enzimáticas (FPA) obtidas em regime descontínuo alimentado com diferentes fungos e substratos.	73
Tabela 8. Produtividade volumétrica de celulases e xilanases obtidas em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29.	75
Tabela 9. Comparativo das atividades de celulases e xilanases de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 obtidas durante regime descontínuo (RD), formulado com celulose (Cel), bagaço de laranja (BL) e capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (CE), e regime descontínuo alimentado (RDA) formulado com celulose.	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo de ação do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*. As endoglicanases (EG) hidrolisam aleatoriamente a fibra de celulose, liberando regiões redutoras e não redutoras para a ação das exoglicanases (CBH I/CBH II), que liberam dímeros para a ação das β -glicosidases (β G), que por fim liberam como produto final a glicose. 6
- Figura 2. Estrutura química e indicação das regiões hidrolisadas pelas principais enzimas que degradam a hemicelulose. As endo- β -1,4-xilanase e as β -xilosidases degradam a cadeia polissacarídea principal, enquanto que as α -glicuronidase, α -arabinofuranosidase, acetilxilana esterase, feruloil esterase e ácido p -cumárico esterase atuam e liberam os grupos laterais. 9
- Figura 3. Modelo de ação da expansina atuando nas microfibrilas de celulose. A celulose apresenta glicanos aderidos em sua superfície e estes podem estar tensionados ou relaxados. A expansina interfere na ligação entre os glicanos, resultando no deslocamento do polímero da parede celular vegetal. 10
- Figura 4. Representação dos principais componentes da biomassa vegetal, contidos na parede celular vegetal. 15
- Figura 5. Representação da molécula de celulose contida na biomassa vegetal. 16
- Figura 6. Esquema representando o efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico. 18
- Figura 7. Esquema ilustrativo da hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose, contidas na biomassa lignocelulósica, com a liberação de hexoses e pentoses, que podem ser fermentadas a etanol, como produto final. 19
- Figura 8. Esquema de biorreator de tanque agitado piloto com representação das pás de agitação do tipo *Rushton* (A) e equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo (B). 22
- Figura 9. Biorreator com agitação mecânica, construído em parceria com a Universidade de Caxias do Sul e com o Senai/Mecatrônica. 30
- Figura 10. Valores da massa micelial (A) e pH (B) durante cultivos com diferentes concentrações de celulose em frascos mantidos sob agitação recíproca empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. 43
- Figura 11. Atividades de FPA (A), endoglicanases (B), xilanases (C) e β -glicosidases (D) durante cultivos com diferentes concentrações de celulose em frascos mantidos sob agitação recíproca empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. 44
- Figura 12. Variação do pH (A) e atividade de FPA (B) durante ensaios com combinação de fontes de carbono, conduzidos em frascos mantidos sob agitação recíproca, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A condição controle foi constituída apenas por celulose e nas outras condições a fonte de carbono foi composta por celulose (Cel) combinada com o bagaço de laranja (BL), ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou sabugo de milho (SM) e ou capim-elefante (CE). 47

- Figura 13. Atividade de endoglicanases (A) e xilanases (B) durante ensaios com combinação de fontes de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A condição controle foi constituída apenas por celulose e nas outras condições a fonte de carbono foi composta por celulose (Cel) combinada com o bagaço de laranja (BL), ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou sabugo de milho (SM) e ou capim-elefante (CE). 48
- Figura 14. Atividade de β -glicosidases (A) e exoglicanases (B) durante ensaios conduzidos com combinação de fontes de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A condição controle foi constituída apenas por celulose e nas outras condições a fonte de carbono foi composta por celulose (Cel) combinada com o bagaço de laranja (BL), ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou sabugo de milho (SM) e ou capim-elefante (CE). 49
- Figura 15. Valores de pH durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. 53
- Figura 16. Atividade de FPA durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. 54
- Figura 17. Atividade de endoglicanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. 55
- Figura 18. Atividade de β -glicosidases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. 56
- Figura 19. Atividade de exoglicanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. 56
- Figura 20. Atividade de xilanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. 57
- Figura 21. Perfil da atividade de endoglicanases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do filtrado enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 durante cultivos submersos de 96 horas inoculados com esporos (E) e com micélio residual (R1 a R5). 58

- Figura 22. Perfil da atividade de β -glicosidasas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do filtrado enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 durante cultivos submersos de 96 horas inoculados com esporos (E) e com micélio residual (R1 a R5). 59
- Figura 23. Produtividade volumétrica de celulasas e xilanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após cultivo de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. A produtividade volumétrica foi calculada a partir da atividade enzimática máxima obtida no cultivo com esporos e nos cultivos com reuso de micélio. 60
- Figura 24. Desenho do alimentador com corte longitudinal demonstrando a disposição do eixo de mistura (1) e da rosca transportadora (2) no interior do cilindro de inox. O número três (3) corresponde à saída da celulose para o biorreator e o quatro (4), local onde os motores elétricos são conectados. 62
- Figura 25. Representação do sistema empregado nos cultivos em regime descontínuo alimentado. (1) alimentador conectado ao biorreator; (2) tampa de vedação do cilindro de inox; (3) e (4) motores elétricos do sistema; (5) resistência elétrica que envolve a parte externa da comunicação entre alimentador e biorreator; (6) biorreator. 63
- Figura 26. Concentração de celulose (A) e sacarose (B) durante ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A linha tracejada no gráfico indica o término da alimentação. 65
- Figura 27. Concentração de açúcares redutores (A) e frequência de agitadores (B) durante ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A linha tracejada no gráfico indica o término da alimentação. 66
- Figura 28. Atividades enzimáticas de FPA (A), β -glicosidasas (B), endoglicanases (C) e xilanases (D) durante ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A linha tracejada no gráfico indica o término da alimentação. 67
- Figura 29. Concentração de celulose (A) e atividade de endoglicanases (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontínua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. 71
- Figura 30. Atividades de FPA (A) e xilanases (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontínua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. 72
- Figura 31. Atividades de β -glicosidasas (A) e exoglicanases (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontínua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. 74

- Figura 32. Frequência dos agitadores durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontinua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. 75
- Figura 33. Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas durante hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* empregando 15 FPU/g de substrato. As enzimas empregadas foram a comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes e as de *Penicillium echinulatum* S1M29 foram obtidas em RDA com adição intermitente de celulose (60 g/L) e em RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor. 77
- Figura 34. Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas durante hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* empregando 15 FPU/g de substrato. As enzimas empregadas foram a comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes e as de *Penicillium echinulatum* S1M29 foram obtidas em RDA com adição intermitente de celulose (60 g/L) e em RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor. 78
- Figura 35. Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas durante hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor empregando 15 FPU/g de substrato. As enzimas empregadas foram a comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes e as de *Penicillium echinulatum* S1M29 foram obtidas em RDA com adição intermitente de celulose (60 g/L) e em RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor. 79

RESUMO

As celulasas e xilanases são enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar a celulose e a hemicelulose, respectivamente, da biomassa vegetal, liberando açúcares fermentescíveis que podem ser convertidos em diversos produtos biotecnológicos. Entre os microrganismos produtores destas enzimas, destaca-se a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. O conhecimento da fisiologia do microrganismo é muito importante para alcançar estratégias que permitam obter aumentos nas atividades enzimáticas e assim, reduzir os custos de produção de enzimas. Entre estas estratégias, está o emprego de substratos lignocelulósicos de baixo custo, a reutilização da massa micelial e o emprego do regime descontínuo alimentado (RDA). Para os estudos em cultivos submersos com *P. echinulatum*, o meio de cultivo deste trabalho foi composto pela fonte de carbono hemicelulósica, sacarose, solução de sais, Tween 80®, farelo trigo e farelo de soja. Frascos Erlenmeyer foram empregados para avaliar o efeito da concentração de celulose no crescimento micelial e na produção enzimática, também para selecionar materiais lignocelulósicos quanto à capacidade de substituir 50% da celulose presente no meio de cultivo e avaliar a possibilidade de reutilização de massa micelial. Para a produção de celulasas e xilanases em biorreator de bancada em RDA, um sistema automático de adição da celulose microcristalina foi desenvolvido. As enzimas obtidas foram avaliadas quanto à capacidade de hidrólise de capim-elefante (CE) e bagaço de cana-de-açúcar (BCA). O aumento da concentração de celulose resultou em maior biomassa de *P. echinulatum*, entretanto, nessas condições, menores atividades de celulasas e xilanases foram obtidas. O bagaço de laranja e o capim-elefante pré-tratado podem substituir em 50% a celulose comercial e possibilitaram maior produção de β -glicosidases e exoglicanases. A reutilização da biomassa fúngica aumentou as atividades enzimáticas e pode ser empregada por pelos menos cinco ciclos de produção. O alimentador automático de celulose do tipo rosca transportadora mostrou-se um sistema prático e eficiente para adicionar a celulose durante o RDA e a velocidade de alimentação de celulose mais apropriada foi $0,26 \pm 0,02$ g/L/h. Atividades de FPA (14 UI/mL), endoglicanases (116 UI/mL), xilanases (1032 UI/mL), β -glicosidases (4,7 UI/mL) e exoglicanases (10,8 UI/mL) foram obtidas durante o RDA com celulose equivalente a 60 g/L e alimentação durante 192 horas de cultivo. O complexo enzimático de *P. echinulatum* foi mais eficiente na hidrólise de CE e BCA *in natura* quando comparados à enzima comercial Celluclast 1.5L® da Novozymes. Estes resultados contribuem com a produção econômica de enzimas por *P. echinulatum* em cultivo submerso.

Palavras-chave: celulasas, xilanases, celulose, *Penicillium echinulatum*.

ABSTRACT

Cellulases and xylanases are enzymes with ability to hydrolyze cellulose and hemicellulose, respectively, from plant biomass, releasing fermentable sugars that can be converted into various biotechnological products. Among the microorganisms that produce these enzymes, the strain S1M29 of *Penicillium echinulatum* distinguishes. Knowledge about physiology of the microorganism is very important for reaching strategies that lead to increases in the enzymatic activities and thus, reduce the costs of enzymes production. Among these strategies, there are the use of low cost lignocellulosic substrates, the reuse of the mycelial mass and the use of fed-batch cultivation (FBC). Regarding the studies on submerged cultures with *P. echinulatum*, the medium of this work was composed of hemicellulosic carbon source, sucrose, salt solution, Tween 80[®], wheat bran and soybean meal. Erlenmeyer flasks were used to evaluate the effect of cellulose concentration on mycelial growth and enzymatic production, also to select lignocellulosic materials for their ability to replace 50% of the cellulose present in the culture medium and to evaluate the possibility of reuse of mycelial mass. To produce cellulases and xylanases in a bench-bioreactor during the FBC, an automatic microcrystalline cellulose addition system was developed. The enzyme obtained were evaluated for their ability of hydrolysis of elephant grass and sugarcane bagasse. The increase of the cellulose concentration resulted in a higher level of biomass of *P. echinulatum*, however, under these conditions, lower activities of cellulases and xylanases were obtained. Orange pomace and pre-treated elephant grass can substitute commercial cellulose by 50% and enable greater production of β -glucosidases and exoglucanases. The reuse of fungal biomass has increased the enzymatic activities and can be employed for at least five production cycles. The automatic cellulose feeder type conveyor shaft proved to be a practical and efficient system for adding cellulose during the FBC and the most appropriate cellulose feed rate was 0.26 ± 0.02 g/L/h. Activities of FPA (14 IU/mL), endoglucanases (116 IU/mL), xylanases (1032 IU/mL), β -glucosidases (4.7 IU/mL) and exoglucanases (10.8 IU/mL) were obtained during FBC with cellulose equivalent to 60 g/L and feed during 192 hours of cultivation. The enzymatic complex of *P. echinulatum* obtained were more efficient in the hydrolysis of elephant grass and sugarcane bagasse *in natura* when compared to the commercial enzyme Celluclast 1.5L[®] from Novozymes. These results contribute to the economical production of enzymes by *P. echinulatum* in submerged culture.

Keywords: cellulases, xylanases, cellulose, *Penicillium echinulatum*.

1 INTRODUÇÃO

A busca por tecnologias sustentáveis e com menor impacto ambiental vem sendo objeto de estudos em diversas áreas de pesquisas. Entre estas tecnologias, destaca-se a produção de etanol a partir da hidrólise da biomassa vegetal. Este biocombustível, denominado de etanol de segunda geração (2G), é uma fonte de energia renovável e apresenta capacidade de substituir os combustíveis fósseis. Apesar de diversas contribuições nas áreas de processos fermentativos, de pré-tratamentos do material lignocelulósico e de seleção de microrganismos, poucas empresas no mundo dominam esta tecnologia. Desta forma, a produção do etanol 2G ainda é emergente.

As celulases e as xilanases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose e da hemicelulose, respectivamente, liberando como produto final açúcares fermentescíveis. Este complexo enzimático, além da aplicação na produção de etanol de segunda geração, está sendo amplamente empregado na alimentação humana e animal, na indústria têxtil e nas indústrias de polpa e papel. Diante da ampla aplicação industrial destas enzimas, verifica-se a importância de estudos na área de produção de preparações enzimáticas, constituídas por estas moléculas.

Os fungos filamentosos estão entre os microrganismos que secretam os maiores níveis destas enzimas. Entre os fungos produtores que se destacam na produção de elevadas atividades enzimáticas estão as espécies *Acremonium cellulolyticus*, *Trichoderma reesei* e *Penicillium echinulatum*. A linhagem mutante S1M29 de *P. echinulatum* apresenta as maiores secreções enzimáticas para esta espécie. Este microrganismo apresenta uma produção equilibrada das enzimas hemicelulolíticas, característica relevante para aplicação do complexo enzimático em hidrólise enzimática.

A produção das enzimas hemicelulósicas por microrganismos pode ser conduzida tanto em cultivo submerso como em cultivo em estado sólido. O cultivo submerso, processo comumente empregado na produção de enzimas comerciais, pode ser realizado em regime contínuo, regime semi-contínuo, regime descontínuo e descontínuo alimentado. O regime descontínuo (RD) é o processo mais estudado e empregado, entretanto, o regime descontínuo alimentado (RDA), em algumas situações, tem se mostrado mais adequado para a obtenção de maior produtividade enzimática.

Em relação à produção de celulases e xilanases, a vantagem do RDA tem sido explicada em função das maiores atividades enzimáticas obtidas em relação ao RD, quando massas equivalentes de celulose são empregadas. A adição intermitentemente da celulose

diminui os efeitos negativos da agitação, da aeração, da viscosidade aparente, da repressão catabólica devido à liberação de glicose, que são ocasionados pelo acúmulo de substrato, como ocorre no RD. Apesar dos benefícios deste processo, poucos trabalhos são desenvolvidos neste regime, devido à complexidade do sistema de alimentação, visto que o substrato indutor na maioria das vezes é a celulose.

A produção de celulases e de xilanases é induzida, portanto, é essencial que o meio de cultivo contenha celulose e hemicelulose de forma pura ou outros materiais que contenham estes polissacarídeos, indutores naturais destas enzimas. Diversas matérias-primas estão sendo empregadas e estudadas em processos fermentativos para a obtenção de maiores atividades enzimáticas e assim, reduzir os custos de obtenção das enzimas. Além do processo de produção e da fonte indutora de celulases e xilanases, a obtenção de maiores rendimentos enzimáticos está vinculada à adequação das condições físico-químicas (pH, temperatura, agitação, aeração, etc) ao microrganismo selecionado e à escolha de linhagens geneticamente modificadas com maior expressão de enzimas.

Em muitos processos fermentativos, como o de produção de etanol, são reutilizadas as células após o término da fermentação. Neste bioprocessos as leveduras são recuperadas, visando o reuso, entretanto, não se tem informações desta prática para a produção de celulases e xilanases, a qual poderia apresentar um grande potencial para aumentar a produtividade volumétrica em enzima.

O objetivo do presente trabalho foi contribuir com o conhecimento da fisiologia do microrganismo e aplicar diferentes estratégias na produção de celulases e xilanases pela linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* em cultivo submerso, buscando obter incrementos na atividade enzimática. Para tanto, foram desenvolvidos os seguintes estudos:

- * avaliar o efeito da concentração de celulose no crescimento micelial e na produção de celulases e xilanases;
- * selecionar fontes alternativas de celulose e hemicelulose para a produção de celulases e xilanases;
- * avaliar o reuso do micélio de *Penicillium echinulatum* como estratégia para reduzir os custos com a produção de enzima;
- * desenvolver um sistema automático para as alimentações de celulose no RDA;
- * selecionar o tempo de início de adição da celulose durante o RDA;
- * avaliar a produção de enzimas em RDA empregando diferentes concentrações de celulose;
- * verificar a capacidade de hidrólise dos filtrados enzimáticos sobre bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mercado de enzimas

A história das enzimas iniciou-se ao final do século XIX com as primeiras evidências científicas de que os microrganismos possuíam substâncias químicas capazes de catalisar reações químicas. Foi Eduard Buchner que descobriu o processo de fermentação na ausência de células íntegras de leveduras, o que conferiu a ele o Prêmio Nobel da Química, em 1907. Com o desenvolvimento industrial e a compreensão dos processos bioquímicos, a tecnologia enzimática ganhou grande enfoque e logo começou a ser empregada nas indústrias alimentícia e de detergentes (Sá-Pereira *et al.*, 2008).

O mercado de enzimas industriais está dividido em três grandes segmentos: enzimas técnicas, destinadas principalmente à indústria têxtil e de produtos de limpeza; enzimas para alimentos e bebidas, as quais estão em constante expansão devido à procura por novas aplicações nas áreas de laticínios e panificação; e enzimas para alimentação animal, cujo crescimento tem sido acelerado devido ao grande interesse dos criadores de aves e suínos em aumentar o valor nutricional e a digestibilidade das rações (Bon *et al.*, 2008).

Entre as enzimas com maior aplicação industrial estão as proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases (Mussatto *et al.*, 2007), sendo que as empresas que mais se destacam na produção mundial de enzimas correspondem à Novozymes, com sede na Dinamarca, à DuPont (E.I. Du Pont de Nemours and Company), com sede nos EUA e à DSM (Royal DSM), com sede na Holanda (Ferreira *et al.*, 2014).

O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial em consequência da enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel (Mussatto *et al.*, 2007). A empresa brasileira Bioenzima, situada em Caruaru no Estado de Pernambuco, é uma empresa brasileira de enzimas e atende às indústrias de ração animal, panificação e lavanderias de envelhecimento de *jeans* (Ramos, 2009).

A aplicação das celulasas e das xilanases iniciou-se na década de 80, inicialmente nas indústrias de rações animais, seguida pela adição em alimentos e, posteriormente, nas indústrias têxtil e de papel (Bhat, 2000). Diversas empresas destacam-se na produção de celulasas comerciais (Tabela 1) e depois das proteases e das amilases, as celulasas são o terceiro produto enzimático de maior valor na indústria biotecnológica (Singhania *et al.*, 2009; Singhania *et al.*, 2017).

Tabela 1. Celulases comerciais, respectivas empresas e atividades enzimáticas médias obtidas por espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* (Adaptado de Singhanian *et al.*, 2010).

Nome comercial	Empresa	Microrganismo	Atividades (FPU/mL)
Cellubrix (Celluclast)	Novozymes (Denmark)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>A. niger</i>	56
Novozymes 188	Novozymes (Denmark)	<i>A. niger</i>	< 5
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco (France)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	10
Rohament CL	Rohm-AB Enzymes (Finland)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	50
Viscostar 150L	Dyadic (Jupiter/EUA)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	33
Multifect CL	Genencor (DuPont/EUA)	<i>T. reesei</i>	64
Viscozyme L	Novozymes (Denmark)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	< 5
Cellulyve	50L Lyven (France)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	24
GC 880	Genencor (DuPont/EUA)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	< 5
Spezyme CP	Genencor (DuPont/EUA)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	49
GC 220	Genencor (DuPont/EUA)	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i>	116
Accelerase®1500	Genencor (DuPont/EUA)	<i>T. reesei</i>	ND
Cellulase AP30K	Amano Enzyme (Troy/EUA)	<i>A. niger</i>	0,17
Cellulase TRL	Solvay Enzymes (Elkhart/EUA)	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	95
Econase CE	Alko-EDC (New York/EUA)	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	40
Cellulase TAP106	Amano Enzyme (Troy/EUA)	<i>T. viride</i>	0,42
Biocellulase TRI	Quest Intl. (Flórida/EUA)	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	68
Biocellulase A	Quest Intl. (Flórida/EUA)	<i>A. niger</i>	0,29
Ultra-low microbial	Iogen (Ottawa, Canadá)	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	88

ND: atividade enzimática (FPU/mL) não disponibilizada.

Nos últimos anos, o emprego das celulases e xilanases vêm se destacando principalmente na obtenção de açúcares a partir da hidrólise da celulose e hemicelulose, provenientes da biomassa vegetal. Estes açúcares podem ser fermentados a etanol de segunda geração (2G) ou convertidos em outros produtos com valor agregado, como ácido láctico, ácido glutâmico, ácido succínico, ácido ferúlico, xilitol, butanol, 1,4-butanodiol, furfural, xilo-oligossacarídeos, etc (Ezeji *et al.*, 2007; John *et al.*, 2009; Menon & Rao, 2012; Albuquerque *et al.*, 2014). As tecnologias que empregam monossacarídeos provenientes da hidrólise da biomassa vegetal para a obtenção de uma gama de produtos se caracterizam como

biorrefinarias lignocelulósicas, as quais visam o aproveitamento integral dos resíduos agroindustriais gerados numa determinada cadeia produtiva, de modo a agregar valor à mesma (Patrick *et al.*, 2010).

Vários esforços estão sendo realizados para acelerar a produção do etanol 2G em larga escala, pois além de ser um combustível sustentável, diminui a dependência mundial por combustíveis fósseis (Wan & Li, 2012; Zabed *et al.*, 2016). Duas empresas brasileiras já operam na produção de etanol celulósico a partir da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar, a Raízen, situada em São Paulo, e a GranBio (Bioflex Agroindustrial), localizada em Alagoas.

Para Szwarc (2013) o etanol celulósico apresenta grande potencial de expansão, pois não depende da produção de alimentos para sua industrialização e sim do reaproveitamento de resíduos. Um dos principais desafios para o Brasil está na busca pela competitividade do combustível de segunda geração em relação ao de primeira. Entre os principais custos de produção do etanol celulósico, está a obtenção do complexo enzimático envolvido na hidrólise da biomassa lignocelulósica, que representa cerca de 40% do custo total de produção deste combustível (Balat, 2011; Deswal *et al.*, 2011). Estimativas divulgadas indicam que o custo das enzimas não deveria ultrapassar 10% para a obtenção viável do etanol celulósico (Jornal Cana, 2014). Segundo Pradella (2015), o custo de produção das enzimas estaria em torno de 20 a 25% do total do custo do etanol 2G.

2.2 Enzimas lignocelulolíticas

2.2.1 Celulases

O interesse pelas celulases se iniciou durante a Segunda Guerra Mundial, quando militares norte-americanos observaram um excessivo desgaste de roupas, fardas, barracas, bolsas e demais objetos dos acampamentos nas selvas do Pacífico Sul, em 1944. Preocupados, os soldados recolheram amostras de microrganismos suspeitos de serem os responsáveis pelo prejuízo e as levaram ao laboratório de pesquisas do exército, em Natick, Massachusetts. De milhares de amostras, uma, recolhida na Nova Guiné, apresentou um fungo – *Trichoderma viride* QM6a (atualmente denominado *Trichoderma reesei*, em homenagem ao seu descobridor, Dr. Elwyn T. Reese) – capaz de converter a celulose em seus monômeros (Bio & Farma, 2009).

As celulases são classificadas no grupo das glicosil hidrolases (GH) (Juturu & Wu, 2014) com base em sua sequência de aminoácidos e semelhanças de enovelamento (Cantarel

et al., 2009). Estas enzimas são glicoproteínas de massa molecular entre 20 e 250 KDa, que atuam em sinergia e são capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 de microfibrilas da celulose, liberando moléculas de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Kubicek *et al.*, 1993).

O complexo enzimático das celulases é constituído por um conjunto de três enzimas hidrolíticas: endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra da celulose; exo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.74/EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades reductoras e não reductoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; e β -1,4-glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000). Na Figura 1, pode-se visualizar o modo de ação sinérgica do complexo enzimático na hidrólise da celulose.

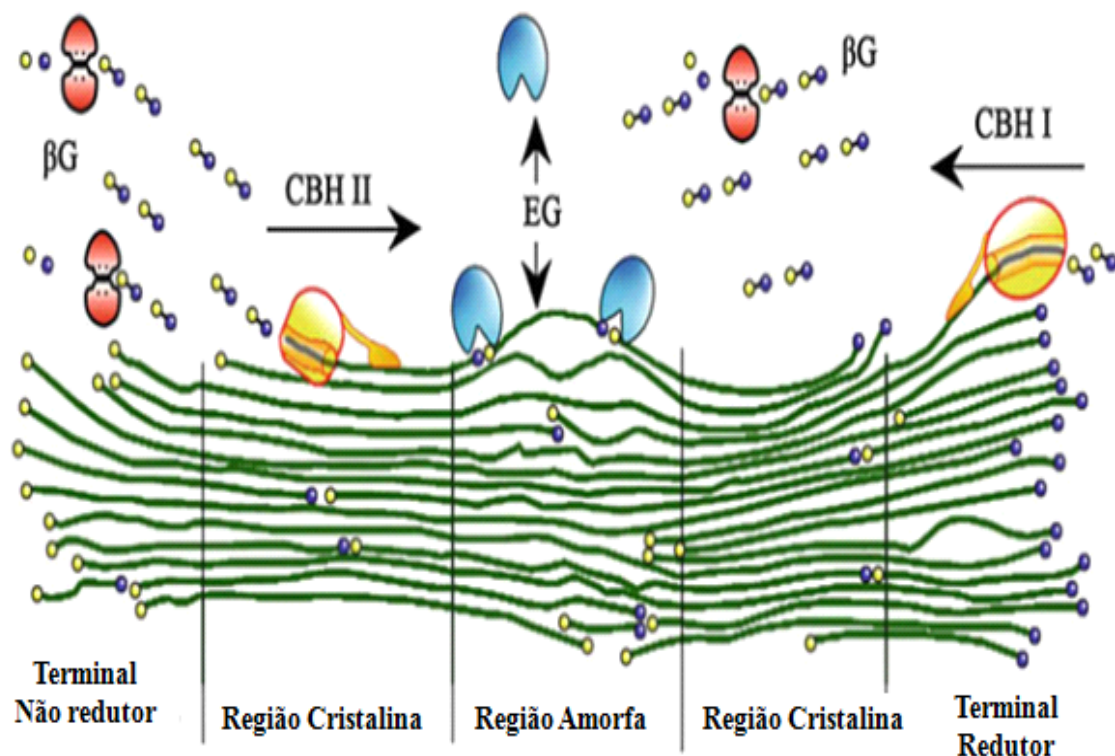


Figura 1. Mecanismo de ação do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*. As endoglicanases (EG) hidrolisam aleatoriamente a fibra de celulose, liberando regiões reductoras e não reductoras para a ação das exoglicanases (CBH I/CBH II), que liberam dímeros para a ação das β -glicosidases (β G), que por fim liberam como produto final a glicose. (Adaptada de Wang *et al.*, 2012).

As celulasas fúngicas apresentam, na sua estrutura, um domínio catalítico (DC) e um domínio de ligação à celulose (DLC). O DLC é conectado por um “linker” (sequência de aminoácidos altamente glicosilados) ao DC e é responsável pelo aumento da interação entre as celulasas e a superfície celulósica da celulose através de interações não covalentes, no entanto, ele não está envolvido na hidrólise da celulose, mas sua remoção reduz significativamente a atividade da enzima (Bayer *et al.*, 1998). O DC abriga o sítio ativo da enzima e tem como função hidrolisar as ligações glicosídicas da celulose, sendo que cada classe de enzimas possui uma forma distinta de sítio ativo (Beckham *et al.*, 2011). O DLC está presente em algumas endoglicanases e nas exoglicanases, porém ausente nas β -glicosidases (Sipos *et al.*, 2010). Substratos como a carboximetilcelulose e formas amorfas de celulose não requerem DLC para a hidrólise, porém para a hidrólise da forma cristalina da celulose este apêndice é requerido (Rabinovich, 2002).

A endoglicanase (EG) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise e diminuir o grau de polimerização da fibra da celulose, com a liberação de oligossacarídeos de diferentes extensões (Kleman-Leyer *et al.*, 1996). Essas enzimas atuam nas regiões amorfas da celulose (Lynd *et al.*, 2002), liberando novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996).

O grupo das exoglicanases é constituído pelas celobiohidrolases (CBH) e pelas glicanoidrolases (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glicanoidrolase, é pouco reportada, mas apresenta função estratégica de hidrólise da fibra celulósica, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A CBH (EC 3.2.1.91), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glicana-celobiohidrolase, pode ser dividida em dois tipos: do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), e do tipo II (CBH II), que hidrolisa terminais não redutores (NR) (Lynd *et al.*, 2002). Essas enzimas, geralmente, sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (Awafo, 1997).

As β -glicosidases não são consideradas celulasas verdadeiras, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose, pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (Medve, 1997; Pryor & Nahar, 2015). Além da celobiose, algumas β -glicosidases podem hidrolisar longas celodextrinas (Zhang & Lynd, 2004).

As enzimas do complexo celulásico pertencem a várias famílias de glicosil hidrolase. O grupo das glicosil hidrolases se caracterizam por clivar ligações glicosídicas

contidas em glicanos, glicosídeos e glicoconjugados (Vuong & Wilson, 2010). As endoglicanases são classificadas nas famílias GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74 e GH124. As exoglicanases pertencem às famílias GH5, GH6, GH7 e GH9 e as β -glicosidases se incluem nas famílias GH1, GH3, GH5, GH9, GH30 e GH116 (Carbohydrate Active Enzymes database- CAZY: <http://www.cazy.org>). O número de celulases pertencente a diferentes famílias pode variar de acordo com o microrganismo. Por exemplo, para *T. reesei* foram identificadas 8 endoglicanases, 2 exoglicanases e 12 β -glicosidases (Foreman *et al.*, 2003; Ouyang *et al.*, 2006).

2.2.2 Xilanases

Várias hemicelulases atuam sinergicamente para hidrolisar completamente a hemicelulose (Figura 2). Estas enzimas incluem as endoxilanases (endo-1,4- β -xilanase, E.C.3.2.1.8), β -xilosidase (xilana-1,4- β -xilosidase, E.C.3.2.1.37), α -glicuronidase (E.C.3.2.1.139), α -arabinofuranosidase (α -L-arabinofuranosidase, E.C.3.2.1.55) e acetilxilana esterase (E.C.3.1.1.72) (Wang *et al.*, 2012).

As endoxilanases e β -xilosidases (coletivamente denominadas xilanases) são as enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, maior componente da hemicelulose (Juturu & Wu, 2012). As endoxilanases atuam nas ligações 1,4 da β -D-xilopiranosose produzindo xiloligômeros (Ahmed *et al.*, 2009b); estes são hidrolisados a xilose pela β -xilosidase (Knob *et al.*, 2010). As enzimas feruloil esterase e ácido *p*-cumárico esterase (EC 3.1.1.73) também estão envolvidas na degradação da xilana (Wang *et al.*, 2012).

As xilanases são classificadas na família das glicosil hidrolases GH5, GH7, GH8, GH10, GH11, GH26 e GH43 (<http://www.cazy.org>) (Collins *et al.*, 2005). Entretanto, as enzimas mais estudadas e relatadas na literatura pertencem às famílias GH10 e 11 (Liao *et al.*, 2015).

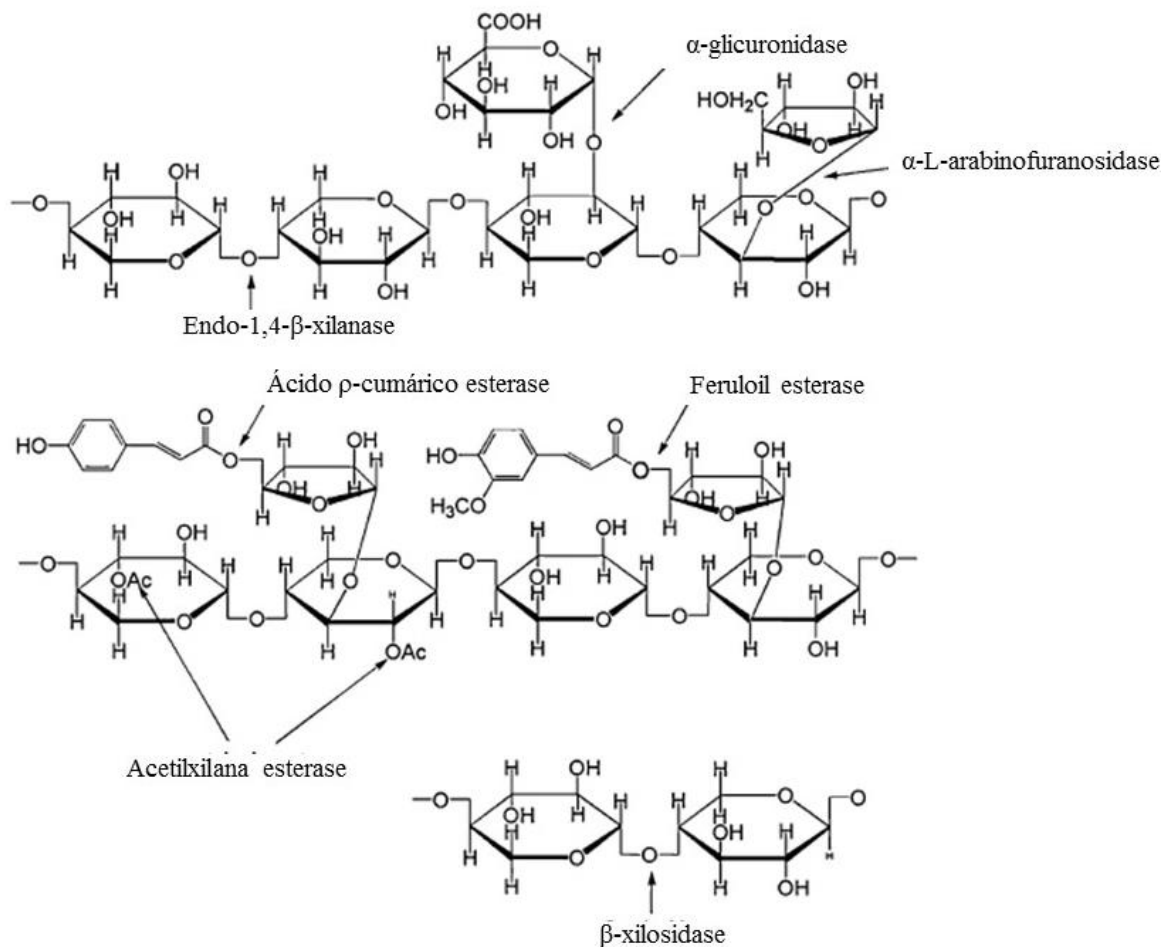


Figura 2. Estrutura química e indicação das regiões hidrolisadas pelas principais enzimas que degradam a hemicelulose. A endo-β-1,4-xilanase e a β-xilosidase degradam a cadeia polissacarídea principal, enquanto que a α-glicuronidase, α-arabinofuranosidase, acetilxilana esterase, feruloil esterase e ácido p-cumárico esterase atuam e liberam os grupos laterais (Wang *et al.*, 2012).

2.2.3 Expansinas e swoleninas

As expansinas são proteínas presentes na parede celular vegetal e tem a função de romper as ligações de hidrogênio entre as fibras de celulose por uma ação não enzimática. Este mecanismo de ação, apesar de ainda não está bem estabelecido, promove o relaxamento da fibra e aumenta a sua acessibilidade a enzimas (Cosgrove *et al.*, 2002). Na Figura 3 pode-se observar um modelo para a ação da expansina promovendo o entumescimento das fibras da parede celular vegetal. As expansinas foram inicialmente isoladas de plantas, onde sua ação enfraquecia as ligações não covalentes dos polissacarídeos da parede celular durante o crescimento da parede celular (Cosgrove, 2000).

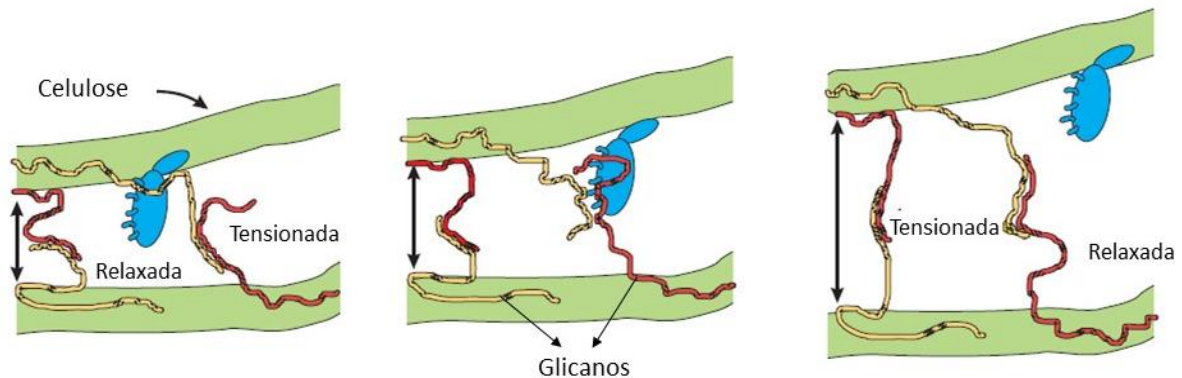


Figura 3. Modelo de ação da expansina atuando nas microfibrilas de celulose. A celulose apresenta glicanos aderidos em sua superfície e estes podem estar tensionados ou relaxados. A expansina interfere na ligação entre os glicanos, resultando no deslocamento do polímero da parede celular vegetal (Cosgrove, 2000).

A swolenina é uma proteína de origem fúngica com sequência semelhante às expansinas e apresenta também atividade de ruptura de ligações de hidrogênio na fibra de celulose (Saloheimo *et al.*, 2002b). Deste modo, a swolenina pode ter um papel importante na degradação enzimática da biomassa lignocelulósica (Arantes & Sadler, 2010). Zhou *et al.* (2011) purificaram uma swolenina com massa molecular de 75 KDa e verificaram que ao tratar a celulose com esta proteína, antes da hidrólise da celulose com celulases, a liberação de açúcares era maior. Entre os fungos descritos que produzem esta proteína estão as espécies *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, *T. viride*, *P. echinulatum*, etc (Brotman *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2012; Saloheimo *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2008).

2.4 Aplicação das celulases e xilanases

As celulases são empregadas na extração de óleos, essências e pigmentos vegetais, na produção de sucos, estimuladores de silagens, adjuvante para o malte da cerveja, componente farmacológico, na produção de protoplastos vegetais para a manipulação genética e, incluem-se essas enzimas na composição de rações animais e em detergentes de uso doméstico (Esterbauer *et al.*, 1991; Bhat, 2000; Han & He, 2010). Também podem ser empregadas na produção de xaropes de monossacarídeos que podem ser utilizados para diferentes fins biotecnológicos, como a produção de etanol por fermentação por leveduras (Martín *et al.*, 2007; López-Linares *et al.*, 2014; Zabed *et al.*, 2016).

Outra aplicação tecnológica das celulases que merece destaque é a bioestonagem que emprega as enzimas em tecidos e roupas de algodão tingidas com índigo, como os famosos *blue jeans*, proporcionando maciez e um aspecto desbotado no tecido. Nessa técnica emprega-se o complexo de celulases ao invés de pedra pomes em máquinas de lavar industriais para tratar os tecidos (Bhat, 2000).

As xilanases também apresentam várias aplicações industriais, como na indústria de polpa e papel, onde são empregadas em formulações livre de celulases, para hidrolisar a xilana presente na polpa e facilitar a extração da lignina. Ainda, a utilização destas enzimas reduz o consumo de reagentes tóxicos (cloro e peróxido de hidrogênio) requeridos no processo de branqueamento da polpa (Madlala *et al.*, 2001), além de possibilitar a obtenção de um papel com maior resistência (Damaso *et al.*, 2002).

No processamento de alimentos, as xilanases são empregadas na clarificação de sucos e vinhos, em processos de maceração de vegetais, na extração de aromas e pigmentos, óleos vegetais e amido (Biely, 1985; McCleary, 1986; Bhat, 2000), além de serem empregadas na indústria de panificação para aumentar a qualidade dos produtos, devido a melhorias mostradas na qualidade da massa de pão, deixando-a mais flexível e permitindo a obtenção de um produto com maior volume (Collins *et al.*, 2006). As xilanases, ao integrar um sistema multienzimático com celulases, podem ser empregadas na conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e outros produtos químicos (Delabona *et al.*, 2013).

As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes que não foram degradados ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por fibras. Isto resulta na diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento (Xiong *et al.*, 2005). Estas enzimas também são utilizadas para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999).

2.5 Microrganismos produtores de celulases e xilanases

O complexo enzimático das celulases é produzido na natureza por plantas, fungos, bactérias, protozoários, artrópodes, moluscos e nematoides (Kubicek *et al.*, 1993; Watanabe & Tokuda, 2001). As xilanases são produzidas por fungos, bactérias, algas marinhas e insetos (Biswas *et al.*, 2014). Ao longo dos anos, vários microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos têm sido estudados e caracterizados quanto a habilidade para degradar lignina, hemicelulose e celulose. No entanto, os fungos filamentosos são os microrganismos favoritos, devido à eficiência na degradação de material lignocelulósico (Valencia &

Chambergo, 2013). Os fungos filamentosos também são os de maior interesse industrial e as linhagens mais empregadas correspondem aos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (Singhania *et al.*, 2010). Empresas como a Genencor, atualmente Dyatic International-DuPont (Estados Unidos) e Novozymes (Dinamarca) empregam as espécies *T. longibrachiatum*, *T. reesei* e *A. niger* para a produção de celulases comerciais.

T. reesei é o microrganismo mais conhecido e empregado para a produção de celulases e xilanases (Ximenes *et al.*, 2007). A linhagem selvagem QM6a originalmente isolada por Elwin Reese vem sendo modificada geneticamente no decorrer dos anos, a fim de desenvolver linhagens com elevada capacidade de produção de enzimas celulolíticas. Pesquisas nos processos de produção de celulases geralmente utilizam as cepas de *T. reesei* modificadas: QM9414, RUT-C30 e MCG77 (Sukumaran *et al.*, 2005). Entre estas linhagens mutantes, a RUT-C30 é a mais estudada e citada como uma das melhores linhagens produtoras de celulases (Juhász *et al.*, 2004; Ahamed & Vermette, 2010). O complexo enzimático de *T. reesei* apresenta altos títulos de exoglicanases e endoglicanases, no entanto, os níveis de β -glicosidases são baixos (Zaldivar *et al.*, 2001). *T. harzianum* também é descrito por produzir um complexo enzimático eficiente na hidrólise da celulose (Ahmed *et al.*, 2009a).

Entre os microrganismos que se destacam na produção de β -glicosidases e xilanases, está a espécie *Aspergillus niger* (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2001). Outras espécies de *Aspergillus* são descritas como produtoras de celulases e xilanases, entre elas destaca-se *A. oryzae* (Chipeta *et al.*, 2008), *A. terreus* (Narra *et al.*, 2012) e *A. heteromorphus* (Singh *et al.*, 2009).

O fungo filamentoso *Acremonium cellulolyticus* está descrito pela elevada produção de celulases em cultivo submerso e com atividades semelhantes às de *T. reesei* (Fang *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011). Este fungo apresenta elevada atividade de β -glicosidases (Hideno *et al.*, 2011) e suas enzimas liberam glicose da biomassa lignocelulósica em menor tempo que as enzimas de *T. reesei* (Fujii *et al.*, 2009). Outro microrganismo que se destaca na produção de β -glicosidases é o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* (Leite *et al.*, 2008).

O gênero *Penicillium* também está entre os microrganismos com altas produções enzimáticas. A linhagem mutante Pol6 de *P. occitanis* se destaca por produzir um complexo enzimático comparável à linhagem RUT-C30 de *T. reesei*, com maiores níveis de β -glicosidases (Ellouz-Chaabouni *et al.*, 1995; Belghith *et al.*, 2001).

A espécie *P. echinulatum* também se destaca entre os microrganismos com grande potencial para a produção de celulases (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2011). Mutantes selecionados (9A02S1; S1M29) são capazes de secretar celulases com atividade de papel filtro maior do que 1,5 UI/mL, empregando 1% (m/v) de celulose como

fonte de carbono, e com valores superiores a 30 U/massa seca em fermentação no estado sólido, usando bagaço de cana-de-açúcar (Camassola & Dillon, 2007; Camassola & Dillon, 2010; Reis *et al.*, 2014). A importância do complexo enzimático de *P. echinulatum* deve-se também ao fato deste apresentar uma proporção equilibrada de FPA e β -glicosidase, além de estabilidade térmica até 48 horas a 50°C. Essas características são relevantes para a hidrólise da celulose (Camassola *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2008).

Os mutantes de *P. echinulatum* derivam da linhagem selvagem denominada 2HH, a qual foi isolada de larvas do coleóptero *Anobium punctatum*. A linhagem mutante 9A02S1 de *P. echinulatum* foi obtida a partir da linhagem selvagem 2HH após várias etapas de mutagênese com peróxido de hidrogênio e seleção de mutantes em meio suplementado com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2006). Este microrganismo está depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942. O mutante 9A02S1 foi submetido ao processo da mutagênese com peróxido de hidrogênio e originou o mutante S1M29 de *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2011), linhagem que apresenta as maiores produções enzimáticas para esta espécie. A linhagem S1M29 de *P. echinulatum* está sendo amplamente pesquisada e vários trabalhos sobre sua fisiologia (Reis *et al.*, 2014), secretômica (Schneider *et al.*, 2016), produção de enzimas lignocelulolíticas (Reis *et al.*, 2013; Scholl *et al.*, 2015a; Scholl *et al.*, 2015c) e dados do potencial hidrolítico de suas enzimas (Scholl *et al.*, 2015b) foram publicados nos últimos anos.

Outras espécies de *Penicillium* vem sendo selecionadas e empregadas na produção de enzimas lignocelulolíticas, como *P. decumbens* (Cheng *et al.*, 2009), *P. janthinellum* (Singhania *et al.*, 2014), *P. oxalicum* (Saini *et al.*, 2015) e *P. funiculosum* (Maeda *et al.*, 2013).

Pesquisas sugerem que para a obtenção de um complexo enzimático eficiente, é interessante que a produção de enzimas seja conduzida em cultura mista, para assim complementar a deficiência em determinadas enzimas (Stoilova *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2005b). Ahamed & Vermette (2008b) obtiveram aumentos nas atividades de celulases empregando co-cultura de *A. niger* e *T. reesei*.

Uma das alternativas para obter cepas fúngicas com alta produção de celulases e xilanases é a mutagênese (Singhania *et al.*, 2014). Os mutantes RUT-C30 de *T. reesei* (Montenecourt & Eveleigh, 1979), NCIM 1171 de *P. janthinellum* (Adsul *et al.*, 2007), S1M29 de *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2011) e CF-2612 de *A. cellulolyticus* (Fang *et al.*, 2009) foram obtidos por esta técnica e se destacam na produção de celulases (FPA).

2.6 Complexo lignocelulósico

A fotossíntese produz cerca de 200 bilhões de toneladas de biomassa vegetal por ano (Botella *et al.*, 2009), sendo o complexo lignocelulósico o principal componente da biomassa vegetal e o recurso renovável mais abundante na superfície da Terra. Grandes quantidades deste complexo estão disponíveis para exploração como fontes de combustíveis (etanol), reserva de alimentos, nutrição de herbívoros, etc (Broda, 1992; Sarkar *et al.*, 2012).

Estima-se que 50% de toda biomassa disponível no mundo seja composta pelo complexo lignocelulósico, o que comprova seu potencial como matéria-prima para a produção do etanol (Singhania *et al.*, 2010). Entre as fontes de biomassa lignocelulósica disponíveis para a produção do etanol e outros produtos, estão os resíduos agrícolas, como palhas de milho, de arroz, de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho; os resíduos florestais, como a madeira; os resíduos industriais, como a celulose do processamento de papel; os resíduos orgânicos urbanos e biomassa vegetal, como gramíneas (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

O complexo lignocelulósico é constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 4). Estas macromoléculas estão presentes na parede celular vegetal e são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa, resistente a ataques microbianos (Pérez *et al.*, 2002). Estes três componentes poliméricos das paredes celulares vegetais constituem 97-99% da massa seca do complexo lignocelulósico. Entretanto, as proporções podem ser distintas em diferentes lignocelulósicos (Mosier *et al.*, 2005b). Outros componentes poliméricos como amido, pectina e extratos estão presentes em menores quantidades (Martín *et al.*, 2007).

A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% em massa seca. É um heteropolímero amorfo de elevada massa molecular, formada pela polimerização de unidades fenilpropanóides, que atua como uma estrutura incrustante, conferindo rigidez às paredes celulares vegetais e resistência ao ataque dos microrganismos. Em função dessa propriedade, este biopolímero é de difícil degradação quando comparado aos polissacarídeos, permanecendo nos solos como componentes recalcitrantes do húmus (Silva & Gomes, 2004).

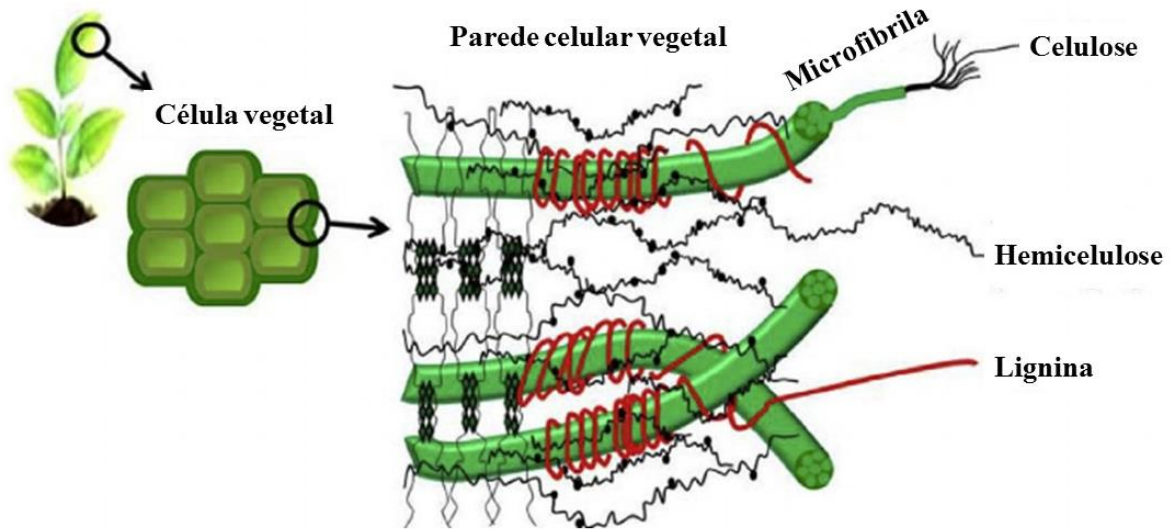


Figura 4. Representação dos principais componentes da biomassa vegetal, contidos na parede celular vegetal (Yan, *et al.*, 2015).

Estudos de degradação da lignina são de extrema importância, pois o polímero permanece sempre associado à celulose e à hemicelulose nos vegetais, dificultando o aproveitamento dessas últimas. Além disso, em processos fermentativos com matéria lignocelulósica, os fenóis, ou pelo menos alguns deles, são indesejáveis, pois alguns são inibidores de crescimento microbiano em concentrações superiores a 0,5 mg/L (Icidca-Geplacea-Pnud, 1990).

A celulose é o principal componente das fibras vegetais e é encontrada tanto em vegetais primitivos quanto em plantas evoluídas, representando entre 30 e 60% da sua massa seca total. Este carboidrato é um polissacarídeo linear formado por resíduos de β -glicopirranose (D-glicose) unidas por ligações do tipo β -1,4, formando longas cadeias estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das moléculas adjacentes (Fan *et al.*, 1980).

Apesar de a molécula de celulose ser hidrofílica, sua estrutura apresenta elevada impermeabilidade à água e a enzimas, apresentando ainda alta resistência à tensão. As regiões cristalinas, mais compactas devido à presença de ligações de hidrogênio, conferem resistências à degradação enzimática e são separadas por regiões de menor grau de organização, denominadas amorfas (Figura 5). As regiões de celulose amorfa apresentam baixa resistência aos ataques químicos e biológicos, sendo, portanto, pontos de degradação (Fan *et al.*, 1980).

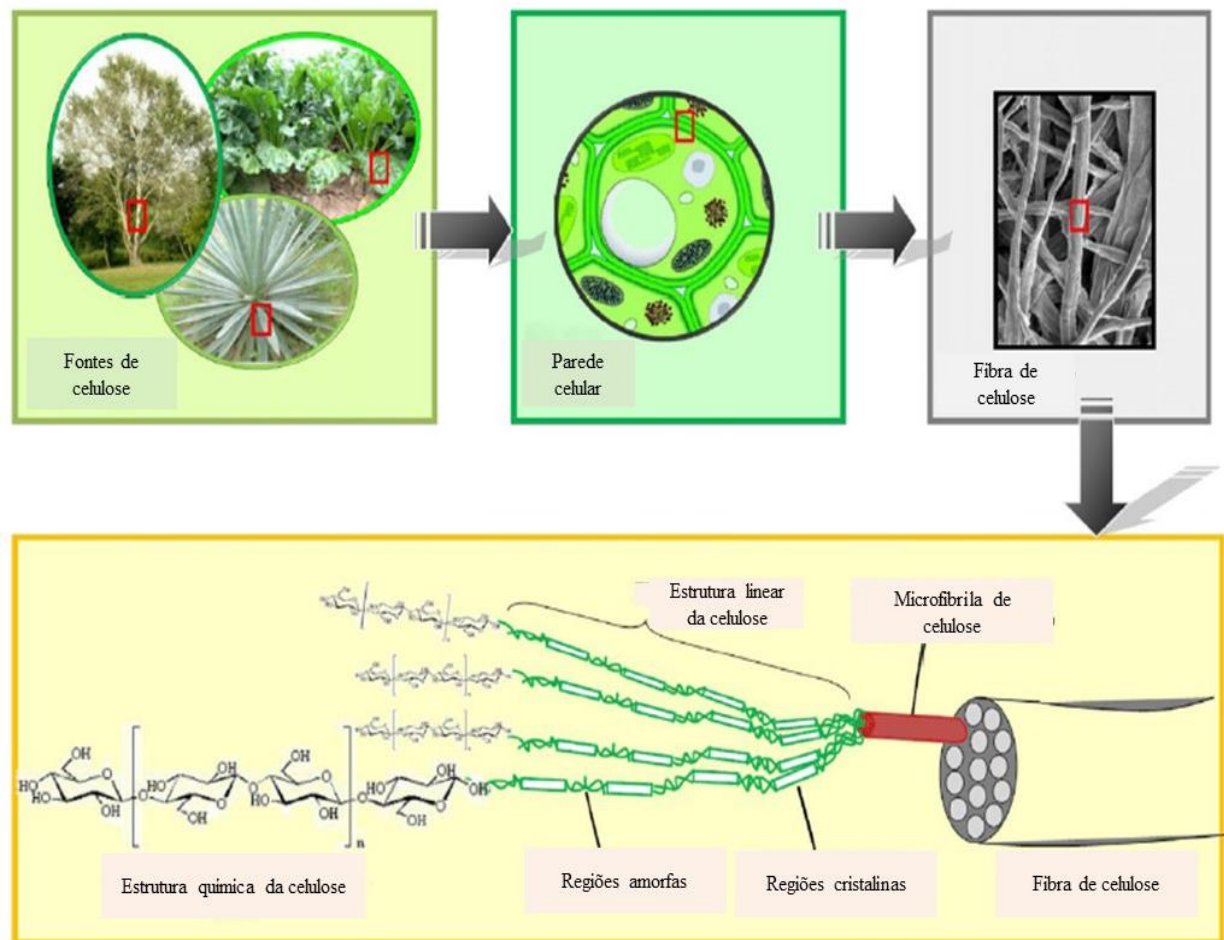


Figura 5. Representação da molécula de celulose contida na biomassa vegetal (Lavoine *et al.*, 2012).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de baixa massa molecular, compreendendo 30% a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, e apresenta-se ligando as microfibrilas de celulose (Coughlan & Hazlewood, 1993). Este polissacarídeo é estruturalmente mais parecido com a celulose do que com a lignina e deposita-se na parede celular em um estágio anterior à lignificação (Ramos, 2003).

Os componentes hemicelulósicos da parede celular vegetal incluem uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas, geralmente, classificados de acordo com o principal açúcar presente na sua composição (Beg *et al.*, 2001). Entre os monômeros constituintes estão as pentoses (xilose, ramnose, arabinose), as hexoses (manose, glicose, galactose) e os açúcares ácidos (ácidos urônicos). Estes açúcares estão ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Estas ligações entre os monômeros da hemicelulose são facilmente hidrolisáveis (Pérez *et al.*, 2002).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglicurono-xilanas, arabino-4-metil-glicurono-xilana, 4-metil-glicurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabino-glicurono-xilana, são diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (Biely, 1985).

As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e se constituem em heteropolissacarídeos formados por unidades de β -D-xilopiranosose unidas por ligações do tipo β -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo β -1,3. Além de xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido glucurônico, grupo acetil e 4-O-metil-éter (Saha, 2003). A xilana se localiza entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose (Beg *et al.*, 2001).

2.7 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Os polímeros de carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos necessitam ser hidrolisados em monômeros para a posterior fermentação a etanol (Taherzadeh & Karimi, 2008). Vários métodos de hidrólise da matriz hemicelulósica vêm sendo descritos e os mais comumente utilizados são classificados em dois grupos: hidrólise química (ácida) e hidrólise enzimática (Balat, 2011). A hidrólise enzimática emprega as celulasas e as xilanases e vários fatores influenciam na hidrólise, tais com a acessibilidade das enzimas à fibra, o grau de cristalinidade e polimerização da fibra, e a distribuição da lignina (Palonen *et al.*, 2004).

A hidrólise enzimática da celulose apresenta maiores rendimentos, além de apresentar menor formação de compostos tóxicos, quando comparada a hidrólise ácida (Szengyel, 2000). Entretanto, no processo enzimático, a biomassa lignocelulósica precisa ser pré-tratada. Geralmente, a hidrólise enzimática apresenta um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento pode alcançar até 90% (Ghosh & Ghose, 2003).

O pré-tratamento é requerido para alterar a estrutura da biomassa celulósica, permitindo que a celulose fique mais acessível às enzimas que convertem os polissacarídeos em açúcares fermentáveis, como representado na Figura 6 (Mosier *et al.*, 2005b). O objetivo da realização do pré-tratamento é desorganizar o complexo lignocelulósico e reduzir a cristalinidade da celulose, tornando-a fibra mais susceptível ao ataque enzimático. Porém, o pré-tratamento é considerado uma das etapas que agrega altos custos no processo de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, dependendo da tecnologia empregada (Mosier *et al.*, 2005b).

As principais tecnologias desenvolvidas para diminuir a recalcitrância da biomassa vegetal incluem pré-tratamentos físicos, caracterizados pela fragmentação do material através de ação mecânica, explosão a vapor (*Steam Explosion*), água quente (*Liquid Hot Water*), explosão por amônia (*Ammonia Fiber Explosion-AFEX*) (Meng & Ragauskas, 2014; Ramos, 2003; Yeh *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012); e os pré-tratamentos químicos, caracterizados por tratamentos com substâncias químicas que incluem o emprego de ácidos diluídos, álcalis, solventes orgânicos e líquido iônico (Cateto *et al.*, 2011; Galbe & Zacchi, 2002; Hamelinck *et al.*, 2005; Mosier *et al.*, 2005a; Singh *et al.*, 2013).

A eficiência de um complexo enzimático na hidrólise da biomassa depende de vários fatores como a estabilidade, inibição por produto, sinergismo entre as diferentes enzimas, condições físicas da hidrólise (temperatura e pH), composição da biomassa celulósica, adição de surfactantes e concentração do substrato (Bhat, 2000; Börjesson *et al.*, 2007; Sun & Cheng, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Além disso, o complexo celulásico ideal deve ser altamente ativo sobre a biomassa, capaz de hidrolisar grande parte da matéria-prima e ser rentável (Knauf & Moniruzzaman, 2004).

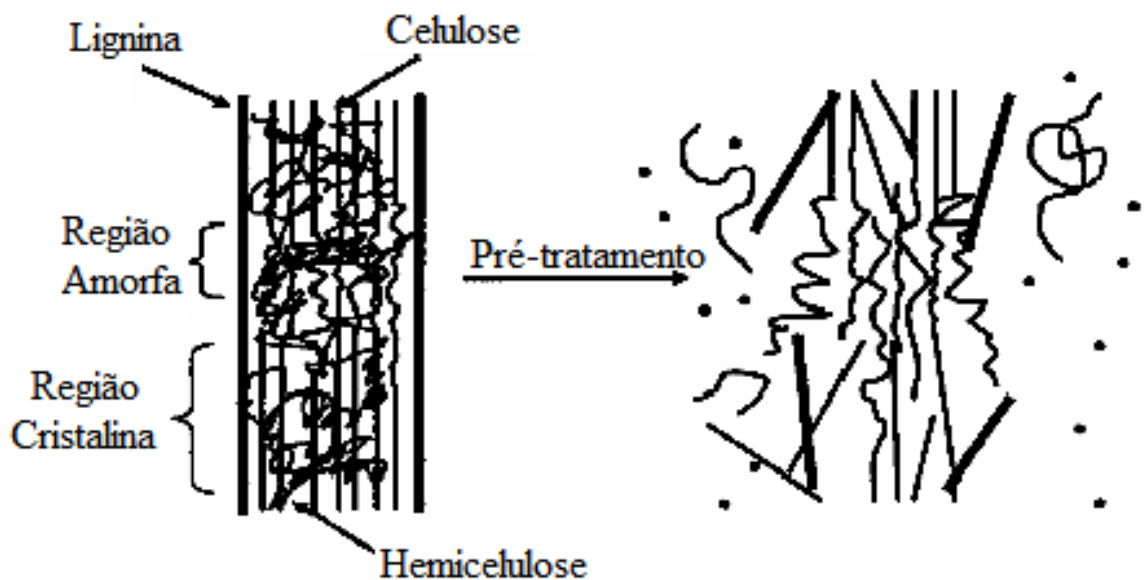


Figura 6. Esquema representando o efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico (Adaptado de Mosier *et al.*, 2005b).

O desempenho enzimático de uma mistura de enzimas dificilmente é obtido a partir da hidrólise de um único substrato, devido às grandes variações da biomassa lignocelulósica. Estudos, baseados em estimativas empregando enzimas naturais e comerciais, indicam que as

proporções ideais das celulasas e xilanases contidas no filtrado enzimático para a efetiva hidrólise de materiais lignocelulósicos corresponde aproximadamente (com base na concentração de proteína) de 50-60% de CBH I, de 10-30% de CBH II, em torno de 1% de β -glicosidases e de 5-10% de xilanases (Viikari *et al.*, 2012).

A hidrólise enzimática é conduzida em condições brandas de pH (4,8) e de temperatura (45-50°C) e não leva a problemas de corrosão, como observado nas hidrólises com ácidos e/ou com bases (Duff & Murray, 1996). O filtrado obtido da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos pode conter tanto hexoses como pentoses, dependendo da fonte empregada. Estes açúcares podem ser fermentados a etanol (Figura 7) e, entre os microrganismos tradicionalmente utilizados para a fermentação de hexoses, estão a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*. Para a fermentação de pentoses (xilose), destacam-se as leveduras *Spathaspora arborariae* (Hickert *et al.*, 2013) e *Kluyveromyces marxianus* (Goshima *et al.*, 2013).

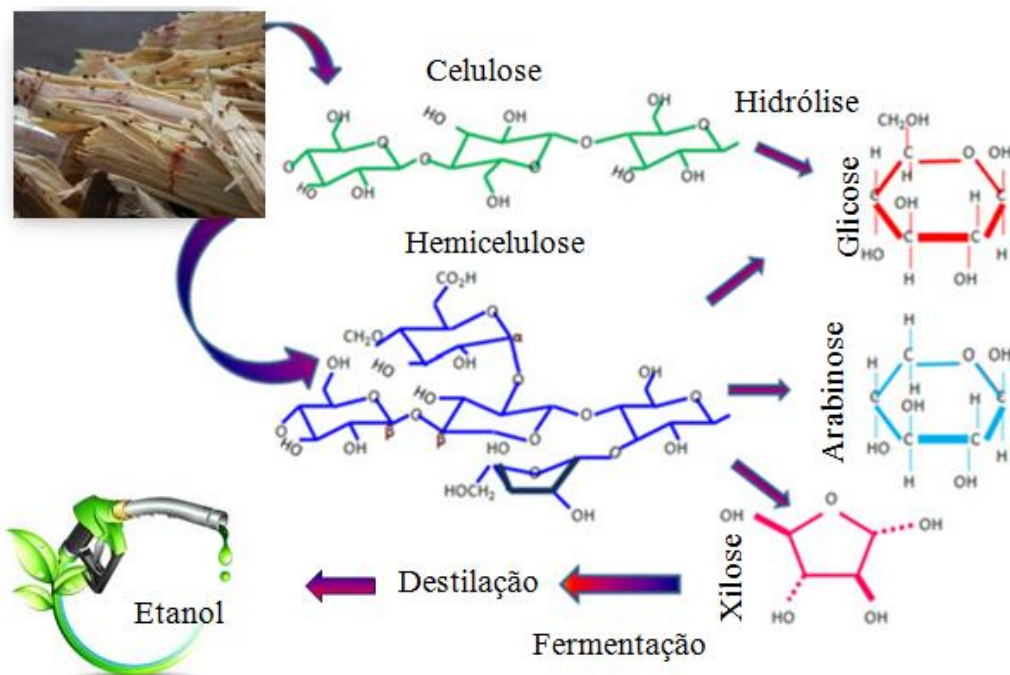


Figura 7. Esquema ilustrativo da hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose, contidas na biomassa lignocelulósica, com a liberação de hexoses e pentoses, que podem ser fermentadas a etanol, como produto final. Adaptado de Radhika & Murugesan (2012).

2.8 Matérias-primas para a produção de celulasas e xilanases

As celulasas e as xilanases são enzimas induzidas, sendo a celulose e a hemicelulose os indutores naturais, respectivamente. Estes polissacarídeos estão presentes na biomassa

vegetal e a principal fonte destas matérias primas são os resíduos agroindustriais, que apresentam baixo custo, são abundantes e, além de serem substratos para a produção de enzimas, são importantes fontes de açúcares que podem ser fermentados a etanol (Balat, 2011).

O emprego de resíduos lignocelulósicos e outras biomassas de baixo custo contribuem para a redução significativa do custo de produção das enzimas. Diante disto, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para identificar substratos com potencial indutor. Entre os resíduos e biomassas descritos como indutores do complexo hemicelulásico estão palha de arroz (Hideno *et al.*, 2011), palha e farelo de trigo (Dutta *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009), bagaço de cana-de-açúcar (Adsul *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; Camassola & Dillon, 2010), resíduo de milho (Ximenes *et al.*, 2007), esterco bovino (Wen *et al.*, 2005a), resíduos de embalagens de leite (Park *et al.*, 2011) e capim-elefante (Scholl *et al.*, 2015a).

O Brasil é um dos países que mais produz biomassa, sendo o bagaço de cana-de-açúcar considerado o maior resíduo da agroindústria nacional (Bon *et al.*, 2008). As indústrias de açúcar e de etanol geram cerca de 195 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar por ano. Este resíduo é aproveitado para a cogeração de energia, no entanto, um excedente de 12% não é explorado e poderia, então, ser usado como matéria-prima em bioprocessos (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010; Gottschalk *et al.*, 2010). O bagaço de cana-de-açúcar apresenta vantagens econômicas, devido aos teores de celulose (40 a 45%) e hemicelulose (30 a 35%) (Sun *et al.*, 2004) serem superiores aos encontrados em outros resíduos, como a palha de arroz (28,5% de celulose/24,7% de hemicelulose) e o farelo de trigo (30% de celulose/27,2% hemicelulose) (Gawande & Kamat, 1999).

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea cultivável em qualquer clima, solo ou altitude e sua cultura apresenta alto potencial produtivo, alcançando 10 toneladas de grãos por hectare no Brasil, quando cultivado em condições adequadas (Carvalho *et al.*, 2004). A geração de resíduos agrícolas a partir da cultura do milho inclui sabugo, colmo (caule), folhas e palha. O sabugo, resíduo gerado após o milho ser debulhado, representa 18% das espigas de milho, sendo considerado, juntamente com a palha, uma alternativa em pesquisas para geração de novas fontes de energia (Ziglio *et al.*, 2007).

O bagaço de laranja é o principal subproduto da indústria do processamento de citros e por ser um resíduo, geralmente se torna um problema para muitas empresas produtoras de suco. O bagaço é rico em pectina, celulose e hemicelulose e pode ser utilizado como substrato em processos fermentativos para a obtenção de enzimas pectinolíticas e hemicelulolíticas (Mamma *et al.*, 2008). Vários estudos na literatura reportam que o bagaço de laranja é uma

ótima matéria-prima para a produção de pectina (Kim *et al.*, 2008), carotenoides e flavonoides (Wang *et al.*, 2008), açúcares (Grohmann *et al.*, 1995), etanol (Wilkins *et al.*, 2007), ácido cítrico (Rivas *et al.*, 2008), ácido succínico (Li *et al.*, 2010), enzimas (Giese *et al.*, 2008), etc. Apesar de todas essas possibilidades, os resíduos das indústrias de suco de laranja permanecem em sua maior parte inutilizados, sendo que este material equivale a 50% da massa da laranja e tem uma umidade aproximada de 80% (Alexandrino *et al.*, 2007).

A espécie *Pennisetum purpureum* (Schum), conhecida como capim-elefante, caracteriza-se por ser uma planta perene, de porte ereto, com talos grossos de até 4,5 metros de altura. É uma gramínea forrageira amplamente cultivada e rende grandes quantidades de matéria seca e seu principal atributo é a alta produção de forragem quando submetida a cortes frequentes, adubação e irrigação. Esta gramínea é plantada da mesma forma que a cana-de-açúcar, entretanto, exige poucos nutrientes complementares para o crescimento e pode ser colhida até quatro vezes por ano (Osava, 2007). O capim-elefante tem apresentado, diante das pesquisas realizadas, enormes vantagens em relação às demais fontes de energia. Para Vicente (2007), o capim-elefante proporciona maior produtividade, menor extensão de áreas para produção, menor ciclo produtivo, melhor fluxo de caixa, possibilidade de mecanização total, energia renovável e maior assimilação de carbono. Cada hectare plantado com o capim-elefante produz em média 40 toneladas de biomassa seca, as quais podem virar energia ou substrato para produção de enzimas. Com o mesmo hectare plantado de cana-de-açúcar, obtêm-se entre 15 e 20 toneladas de biomassa. Já da mesma área plantada com eucalipto derivam entre 10 e 15 toneladas de massa seca (Mazzarella, 2011).

Em estudos com as linhagens 9A02S1 e S1M29 de *P. echinulatum* foi demonstrado o potencial de utilização de capim-elefante na indução do complexo das celulasas e xilanases em cultivo submerso e em cultivo em estado sólido, podendo ser empregado na produção das enzimas (Basso *et al.*, 2014; Scholl *et al.*, 2015a; Scholl *et al.*, 2015c).

2.9 Processos de produção de celulasas e xilanases

Os processos de cultivos utilizados para a produção de enzimas podem ser de dois tipos: cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES). O CS envolve o crescimento de um microrganismo suspenso em meio líquido, no qual vários nutrientes estão dissolvidos ou em suspensão (Said & Pietro, 2002). No CES, o microrganismo se desenvolve em substratos sólidos insolúveis na ausência (ou quase ausência) de água livre e o substrato é úmido o suficiente para o desenvolvimento do microrganismo (Pandey, 2003).

O CS domina a produção da maioria das enzimas microbianas comerciais, principalmente porque neste sistema o controle dos parâmetros físicos e químicos e a esterilização são facilitados (Minihane & Brown, 1986; Said & Pietro, 2002). As enzimas comerciais são obtidas em biorreatores de mistura por agitadores mecânicos (Hansen *et al.*, 2015). Estes sistemas com agitação mecânica consistem de um recipiente cilíndrico fechado, contendo um eixo interno com pás para agitação. As pás geralmente são do tipo *Rushton*, como pode ser visualizado na Figura 8A. O controle dos parâmetros físicos e químicos do CS é realizado através de dispositivos acoplados ao recipiente principal, conforme a Figura 8B, dessa forma, este processo permite um maior controle dos parâmetros, tais como pH, temperatura, suprimento de oxigênio e concentração de nutrientes (Nigam & Singh, 1994; Vaidyanathan *et al.*, 1999; Said & Pietro, 2002).

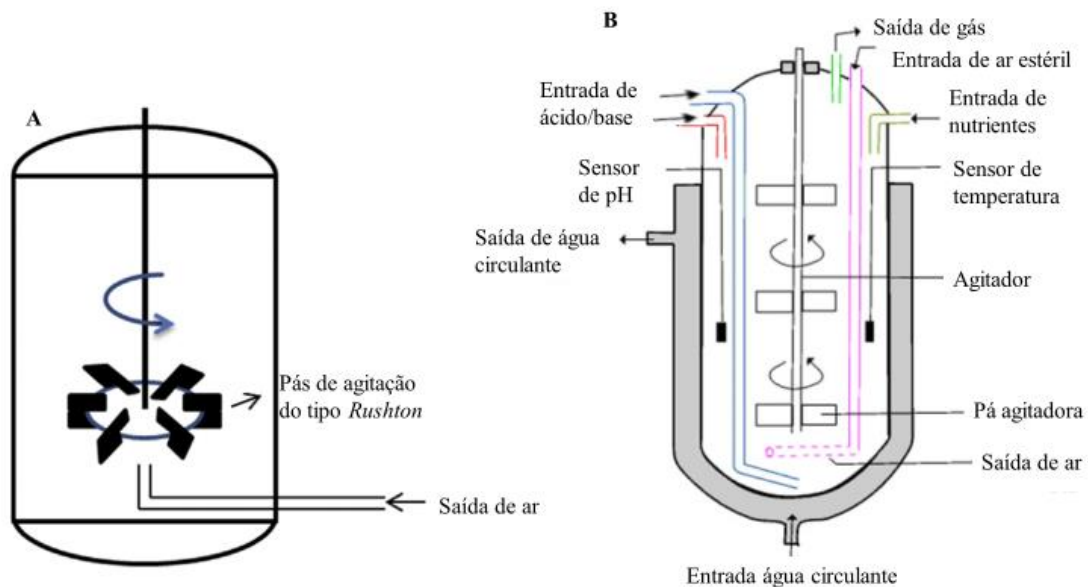


Figura 8. Esquema de biorreator de tanque agitado piloto com representação das pás de agitação do tipo *Rushton* (A) e equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo (B) (Adaptado de Hansen *et al.*, 2015 e <http://www.biotopics.co.uk/microbes/penici.html>).

No CS de fungos para a produção de celulases e xilanases, o crescimento celular e a formação de produtos são influenciados pelos parâmetros operacionais envolvidos na fermentação, como composição do meio de cultura, temperatura, pH, tamanho do inóculo, forças de cisalhamento, reologia do cultivo, morfologia do fungo, natureza e concentração do substrato, disponibilidade de nutrientes, presença de indutores e outros parâmetros como agitação do meio reacional e quantidade de oxigênio dissolvido (Ahmed *et al.*, 2009a; Patel *et*

al., 2009; Delabona *et al.*, 2012). Todos esses parâmetros podem variar durante o processo fermentativo e a produção em escala industrial de enzimas celulolíticas requer o adequado conhecimento acerca desses parâmetros (Singhania *et al.*, 2010).

Estudos de expressão de celulasas e xilanases em resposta a diferentes valores de pH e temperatura foram realizados com a linhagem S1M29 de *P. echinulatum*. Os resultados indicaram que o pH e a temperatura mais apropriada para a produção das enzimas é de 6,0 e 28°C, respectivamente (Reis, 2011; Reis *et al.*, 2013).

Os processos de cultivos submersos são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classificam em regime descontínuo (RD), descontínuo alimentado (RDA), contínuo (RC) e semicontínuo (RSC) (Schmidell & Facciotti, 2001). Estudos de produção de celulasas e xilanases são conduzidos principalmente em regime descontínuo e também em regime descontínuo alimentado. No RD uma suspensão celular é adicionada ao meio de cultivo e o processo transcorre sem adição de componentes do meio e também não há retirada de meio reacional durante o seu curso. Entre as desvantagens deste processo para a produção de celulasas e xilanases estão os problemas de inibição por substrato e dificuldades com a transferência de oxigênio, devido ao aumento da viscosidade do meio. O RDA se caracteriza pela adição intermitente de um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular, sem que ocorra retirada de material durante a operação. Este processo é uma alternativa para evitar a repressão catabólica de celulasas e xilanases, pois o substrato é mantido em baixas concentrações, além de contribuir com a reologia do meio (Hendy *et al.*, 1984; Pereira Jr *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2013).

2.9.1 Regime descontínuo alimentado para a produção de celulasas e xilanases

Estudos anteriores demonstram que o emprego de técnicas em regime descontínuo alimentado (RDA) diminui os problemas associados com suprimento de oxigênio, agitação, formação de espuma, inibição por substrato e produto, quando comparado ao regime descontínuo (RD) (McLean *et al.*, 1986; Esterbauer *et al.*, 1991). Como consequência, maiores atividades enzimáticas podem ser obtidas nos processos que apresentam a adição intermitente do substrato indutor.

Reis *et al.* (2013) demonstraram que em RDA a frequência dos agitadores empregada para manter em 30% a saturação de oxigênio é menor do que a empregada em RD, quando massas equivalentes de celulose são empregadas. Segundo os autores, no RD, a necessidade

de maiores agitações ocorre no início do cultivo, o que pode aumentar os riscos de cisalhamento do micélio, como verificado por Ganesh *et al.* (2000).

Um dos primeiros trabalhos realizados em processo descontínuo alimentado para a produção de celulases foi desenvolvido por Ghose & Sahai (1979) empregando *T. reesei* QM 9414. O trabalho foi realizado em duas etapas, na primeira etapa o microrganismo foi crescido em meio contendo glicose com 2 litros de volume operacional. Após o consumo da glicose, iniciou-se a segunda etapa, em que 1 litro de meio de cultivo contendo 42 g/L de celulose foi adicionado continuamente em vazões de 25 e 40 mL/h ao meio inicial. Cerca de 33% de aumento na produtividade enzimática foi atingido nos cultivos em regime descontínuo alimentado quando comparado ao regime descontínuo, no qual 1 litro de meio contendo 42 g/L de celulose foi adicionado de uma única vez.

Hendy *et al.* (1984) mostraram a vantagem de utilizar o processo de RDA para obter melhores títulos e rendimentos na produção de celulases, em relação aos processos descontínuo e contínuo. Os autores obtiveram, com a linhagem RUT-C30 de *T. reesei*, títulos próximos a 8 FPU/mL, com 50 g/L de celulose *Solka floc*[®] 200 como fonte de carbono, em cultivo em regime descontínuo. Quando concentrações de 75 a 100 g/L de fonte de carbono foram utilizadas neste mesmo processo, a secreção de celulases não foi alterada, mas houve diminuição da produtividade (FPU/L/h) devido à baixa velocidade de crescimento, ocasionada por dificuldades na agitação e suprimento de oxigênio. Entretanto, em regime descontínuo alimentado com celulose (*Solka Floc*[®]), adicionada em diferentes regimes de alimentação de forma contínua ou intermitente e totalizando 100g/L de celulose equivalente, foram obtidos títulos enzimáticos superiores a 25 UI/mL de FPA e produtividades maiores que 100 UI/L.h.

Watson *et al.* (1984) estudaram a produção de celulases de *T. reesei* RUT-C30 em RDA, sendo polpa sulfitada utilizada como fonte de celulose. Os melhores resultados de FPA, que chegaram a 57 UI/mL, foram obtidos em um regime de alimentação de 1g/L.h, totalizando adições de celulose equivalente a 250 g/L.

Allen & Roche (1989) também verificaram aumentos de produtividade em cultivos com RDA. O processo consistiu em inicialmente crescer a linhagem de *T. reesei* QM6a em lactose até o consumo total do açúcar. Posteriormente, foi adicionado um xarope concentrado (50%), constituído de um hidrolisado de celulose. Dessa forma, atividades de 11,8 FPU/mL foram obtidas após 290 horas de cultivo.

O processo descontínuo alimentado também leva à produção de maiores títulos enzimáticos e maiores produtividades com *P. occitanis*. Adições de *Avicel*[®], a cada 20 ou 48 horas, possibilitaram a obtenção de títulos enzimáticos maiores do que 20 FPU/mL e

produtividades de 128 FPU/L/h, enquanto o processo descontínuo apresentou apenas títulos de 9 FPU/mL e produtividade de 80 FPU/L/h (Ellouz-Chabouni *et al.*, 1995).

Ahamed & Vermette (2008a) obtiveram atividades 2 a 3 vezes maiores (5,02 FPU/mL) para *T. reesei* RUT-C30 empregando RDA. Os experimentos iniciaram com 5% (m/v) de celulose e a adição dos substratos indutores, 150 g/L de lactose e 1 g/L de ácido lactobiônico, iniciou após 48 horas de cultivo.

Quanto ao *P. echinulatum*, estudos mostraram que o RDA aumenta as atividades de celulasas e xilanasas (Pereira, *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2013). A atividade aumentou de 5,7 FPU/mL, no RD, para 8,3 FPU/mL, no RDA, empregando a mesma concentração final de celulose (40 g/L) (Reis *et al.*, 2013).

Diante deste contexto, a realização deste trabalho se justifica pela contribuição ao entendimento da fisiologia de *P. echinulatum* e sobre o conhecimento da produção de celulasas e xilanasas em cultivo submerso. Além disso, a obtenção de preparações com altos níveis enzimáticos contribui para expandir a tecnologia do etanol de segunda geração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem

Para a produção de celulases e xilanases foi utilizada a linhagem mutante S1M29 de *Penicillium echinulatum* obtida a partir da linhagem 9A02S1 (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942). A linhagem S1M29 foi obtida por meio de mutagênese empregando peróxido de hidrogênio e seleção dos mutantes em meio suplementado com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem 9A02S1 foi obtida após várias etapas de mutagênese, caracterizando-se por ser um mutante parcialmente desreprimido à glicose (Dillon *et al.*, 2006).

3.2 Meios de produção para celulases e xilanases

3.2.1 Meio de produção do inóculo para cultivo em biorreator de bancada

O meio de cultivo para a produção do inóculo, conforme Reis *et al.* (2013), foi composto de 5 g/L de celulose (*Celuflok E*[®], Cotia, São Paulo); 1 g/L de sacarose; 2 g/L de farelo de soja; 5 g/L de farelo de trigo; 0,5 g/L de *Prodex*[®] (extrato de levedura bruto); 1 mL/L de *Tween 80*[®]; 0,02 g/L do antibiótico ciprofloxacino; 5 mL da solução mineral de Mandels & Reese (1957) e água destilada para completar o volume final de 100 mL. A solução mineral foi composta por (g/L): KH₂PO₄, 40; (NH₄)₂SO₄, 28; MgSO₄.7H₂O, 6; CO(NH₂)₂ (ureia), 6; CaCl₂, 6; FeSO₄.7H₂O, 0,05; MnSO₄.H₂O, 0,0156; ZnSO₄.7H₂O, 0,014 e CoCl₂.6H₂O, 0,02.

3.2.2 Meio de produção para cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca e em biorreator de bancada

O meio de produção de enzimas em frascos mantidos sob agitação recíproca foi constituído pela fonte de carbono avaliada (celulose *Celuflok E*[®], bagaço de laranja, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar ou capim-elefante); 5 g/L de sacarose; 0,5 g/L de *Prodex*[®]; 1 mL/L de *Tween 80*[®]; 0,02 g/L do antibiótico ciprofloxacino; 5 mL da solução mineral adaptada de Mandels & Reese (1957) e água destilada para completar o volume final de 100 mL. A solução mineral foi composta por (g/L): KH₂PO₄, 40;(NH₄)₂SO₄, 28; MgSO₄.7H₂O, 6; CO(NH₂)₂ (ureia), 6; CaCl₂, 6; FeSO₄.7H₂O, 0,05; MnSO₄.H₂O, 0,0156; ZnSO₄.7H₂O, 0,014 e CoCl₂.6H₂O, 0,02.

O bagaço de laranja da variedade *Valencia* e o capim-elefante foram obtidos na cidade de Nova Petrópolis (RS). Após a retirada do suco da laranja, o bagaço foi seco em estufa a 60°C por 3 dias, moído e armazenado a -20°C. As amostras de capim-elefante foram trituradas em triturador forrageiro, secadas por 3 dias a 60°C e após foram explodidas a vapor em reator de inox por 190°C por 6 minutos, conforme Scholl *et al.* (2015a). O sabugo de milho foi obtido na cidade de Caxias de Sul (RS), após trituração em triturador forrageiro, o material, já seco, foi estocado em temperatura ambiente. O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido de Caruaru (PE). Após a moagem, foi pré-tratado por explosão a vapor numa condição de 15 Bar de pressão, por 7 minutos.

Para os ensaios em biorreator de bancada, o meio de cultivo foi formulado de acordo com Reis *et al.* (2013) e composto por diferentes concentrações de celulose *Celuflok E*[®], conforme o experimento; 5 g/L de sacarose; 2 g/L de farelo de soja; 5 g/L de farelo de trigo; 0,5 g/L de *Prodex*[®]; 1 mL/L de *Tween 80*[®]; 0,02 g/L do antibiótico ciprofloxacino; 500 mL da solução mineral de Mandels & Reese (1957), 500 mL de inóculo e água destilada para completar o volume de trabalho do biorreator de 5 litros. A solução mineral foi composta por (g/L): KH₂PO₄, 10; (NH₄)₂SO₄, 14; MgSO₄.7H₂O, 6; CO(NH₂)₂ (ureia), 6; CaCl₂, 6; FeSO₄.7H₂O, 0,05; MnSO₄.H₂O, 0,0156; ZnSO₄.7H₂O, 0,014 e CoCl₂.6H₂O, 0,02.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Crescimento e manutenção de linhagens

A linhagem foi crescida e mantida em ágar-celulose (C-ágar). Esta solução constituiu de 40 mL de suspensão de celulose intumescida, 10 mL de solução mineral, 0,1 g de proteose peptona, 2 g de ágar e água destilada para completar o volume final de 100 mL. A suspensão de celulose intumescida foi preparada em Erlenmeyer de 500 mL com 20 esferas de vidro (0,5 cm de diâmetro). No frasco foi adicionado 5 g de celulose e 60 mL de água, após a suspensão foi autoclavada por 15 minutos a 120°C e mantida sob agitação recíproca por 48 horas. Depois de dois dias foram adicionados 140 mL de água esterilizada e a suspensão foi mantida a 4°C. A linhagem foi inoculada com esporos e mantida em tubos inclinados com C-ágar por 7 dias a 28°C até a formação de conídios e então estocada a 4°C (Dillon *et al.*, 2006).

3.3.2 Obtenção do inóculo para o biorreator de bancada

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de produção, foram esterilizados (autoclave 1 atm, 15 min) e inoculados com uma suspensão com 1×10^7 conídios e mantidos a 28°C, em agitação recíproca de 180 rpm, por 48 horas, conforme Reis *et al.* (2013). Logo após, 500 mL da cultura foi inoculada no biorreator, correspondendo a 10% (v/v) do volume do bioreator.

3.3.3 Cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca

Estudos em frascos Erlenmeyer de 500 mL foram empregados para avaliar o efeito da concentração da celulose no crescimento de *P. echinulatum* e na produção de celulasas e xilanasas. Também foi avaliado o emprego de diferentes materiais lignocelulósicos na produção de enzimas lignocelulolíticas e o reuso de massa micelial como estratégias para incrementar a atividade enzimática. Os frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados em autoclave (1 atm, 15 min) e inoculados com uma suspensão de 1×10^7 conídios, mantidos a 28°C e em agitação recíproca de 180 rpm. As amostras foram coletadas diariamente e conservadas com azida sódica (0,2 g/L), sob refrigeração. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O efeito de diferentes concentrações de celulose no crescimento de *P. echinulatum* e na produção de celulasas e xilanasas foi avaliado a partir de experimentos constituídos por 5, 10, 15 e ou 20 g/L de celulose microcristalina (*Celuflok E*[®]). Os cultivos foram mantidos por 90 horas e alíquotas de 3 mL foram retiradas nos tempos 0, 16, 24, 40, 48, 64, 72 e 90 horas para acompanhar o crescimento micelial e a produção enzimática.

Diferentes materiais lignocelulósicos foram selecionados para identificar substratos indutores da produção de celulasas e xilanasas e com potencial para substituir em 50% a celulose comercial do meio de cultivo. As biomassas avaliadas foram o bagaço de laranja, o sabugo de milho, o bagaço de cana-de-açúcar e o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Para cada experimento foi adicionado 5 g/L do material lignocelulósico e 5 g/L de celulose, totalizando uma concentração de 10 g/L da fonte de carbono no meio de produção de celulasas e xilanasas. Como controle, foi realizado um ensaio com 10 g/L de celulose. Os cultivos foram mantidos por 120 horas e alíquotas de 3 mL foram retiradas nos tempos 0, 48, 72, 96 e 120 horas para acompanhar a produção enzimática e o perfil da variação dos valores de pH. Apesar do conteúdo de celulose ser diferente nas distintas biomassas empregadas, o

valor de 5 g/L foi definido como padrão para evitar problemas de reologia do meio, visto que as fontes de carbono lignocelulósicas são insolúveis.

O reuso da massa micelial para a produção de celulasas e xilanases foi avaliado por cinco ciclos com reaproveitamento de micélio de *P. echinulatum*. Os experimentos iniciaram com um cultivo contendo 10 g/L de celulose no meio de produção e inoculado com esporos (1×10^7 conídios) do microrganismo. O processo foi mantido por 96 horas e após este período, todo conteúdo dos frascos foi centrifugado a 4.000 rpm ($3.220 \times g$) por 30 minutos em condições assépticas, para obter a fração sólida do cultivo. O sobrenadante foi retirado e guardado sob refrigeração para a realização das posteriores dosagens enzimáticas e preparo de géis de eletroforese. O precipitado obtido, composto por micélio, além de celulose e farelos de trigo e soja residual, não foi lavado e foi transferido imediatamente para outros frascos Erlenmeyer contendo novo meio de cultura esterilizado. Desta forma, um novo ciclo de produção de enzimas foi iniciado, permanecendo por 96 horas. Após este período, foram aplicados os mesmos procedimentos experimentais para recuperar o micélio e iniciar um novo ciclo de produção de celulasas e xilanases com duração de 96 horas.

Durante todos os experimentos, alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 24 horas para acompanhar variações nos valores de pH e níveis enzimáticos. As amostras foram retiradas com auxílio de pipeta graduada para evitar variações de volume entre os processos de reuso da massa micelial.

3.3.4 Cultivos em biorreator de bancada

O biorreator de bancada empregado nos experimentos desenvolvidos no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul (Figura 9) foi construído em parceria entre a Universidade de Caxias do Sul e o Senai/Mecatrônica. Este apresenta um volume operacional de 5 L e a agitação do equipamento é feita com um inversor de frequência que comanda um motor que está conectado por um selo mecânico no eixo da pá de mistura. A cuba foi confeccionada em vidro e apresenta forma cilíndrica, tendo 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro. A turbina de agitação, as entradas para os eletrodos e as demais entradas e saídas são feitas de aço inoxidável. A turbina tem a forma de “U”, apresenta aletas no corpo e dimensões de 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura. O biorreator apresenta três chicanas distribuídas pelo sistema.

O biorreator contendo o meio de produção foi esterilizado em autoclave (1 atm) por 40 minutos e, após resfriamento, foi inoculado com 500 mL do inóculo contendo o fungo pré-

crecido por 48 horas. Os ensaios foram conduzidos em regime descontínuo (RD) e regime descontínuo alimentado (RDA). Os parâmetros físicos e químicos foram mantidos automaticamente, sendo a temperatura mantida a 28°C e o pH fixo em $6,00 \pm 0,1$ durante todos os experimentos, com adição de ácido sulfúrico 2 mol/L ou hidróxido de amônio 3 mol/L. A agitação das turbinas variou entre 150 e 300 rpm e aeração entre 0,5 e 0,8 vvm para a manutenção da saturação mínima de oxigênio em torno de 30%. A formação de espuma no meio foi controlada pela adição do antiespumante Fluent Cane 114 Polyglycol® (Dow Química S.A.).

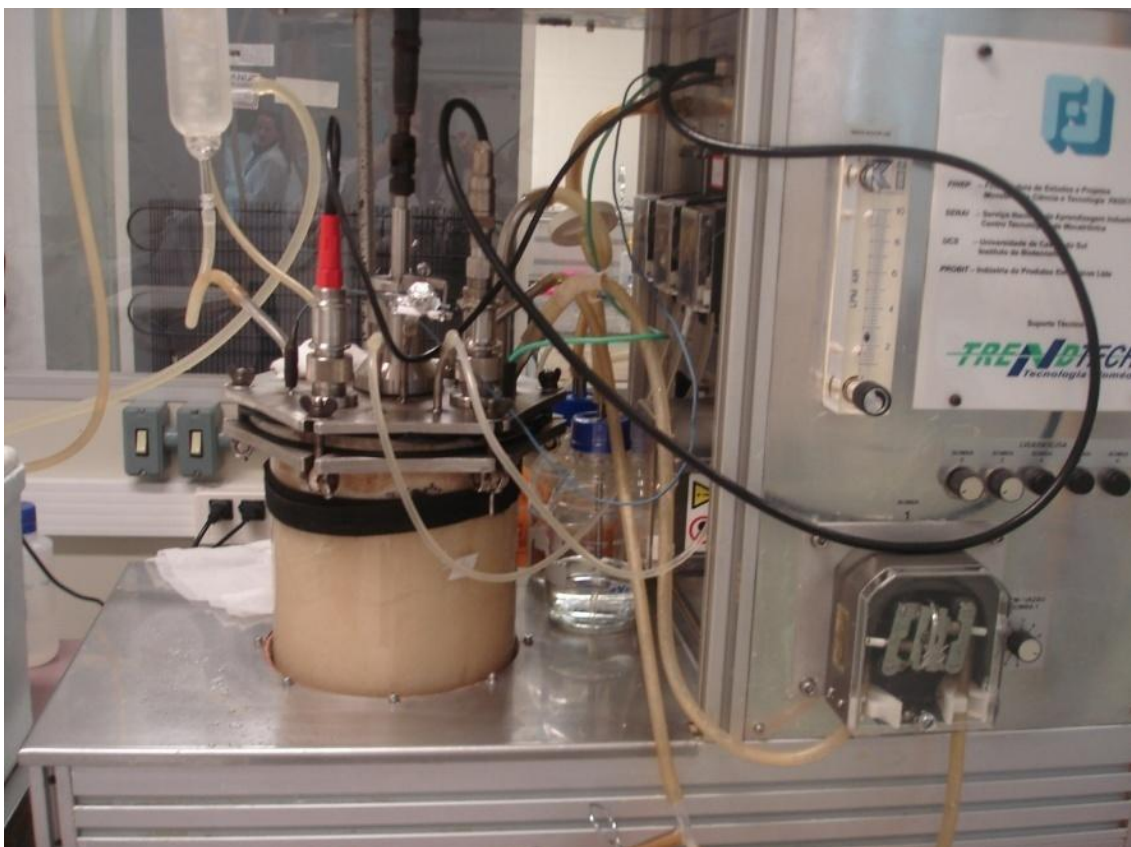


Figura 9. Biorreator com agitação mecânica, construído em parceria com a Universidade de Caxias do Sul e com o Senai/Mecatrônica.

O RD foi realizado para fins comparativos com o RDA. A concentração de celulose empregada foi de 40 g/L e o experimento foi mantido por 160 horas. Também foi realizado um RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado, totalizando 40 g/L de fonte de carbono. O cultivo contendo bagaço de laranja e capim-elefante foi realizado apenas para a obtenção de caldo enzimático a ser utilizado na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante.

Para os ensaios em RDA, foi desenvolvido um sistema para adicionar a celulose automaticamente ao biorreator, durante períodos de tempo reduzidos entre cada alimentação. Vários modelos de alimentador automático foram avaliados e os critérios para selecionar o equipamento ideal foram: custo reduzido para a construção, praticidade durante a operação e possibilidade de ampliação em escala industrial. O sistema selecionado, em aço inoxidável, é composto por uma rosca transportadora para direcionar e adicionar a celulose ao biorreator. Este equipamento foi desenvolvido no Laboratório de Enzimas e Biomassas em parceria com a empresa Bioenzima[®] de Caruaru (PE).

Após a construção do alimentador automático foi avaliado o tempo de início de adição da celulose ao biorreator. Foram realizados três experimentos e em cada ensaio a alimentação iniciou em horários distintos, zero, 24 e 48 horas de cultivo. O intervalo entre cada alimentação foi de uma hora e as adições mantidas até 108 horas de processo para todos os ensaios. Após definir o tempo de início da adição da celulose ao biorreator, foi avaliada a concentração de celulose (40 e 60 g/L) que permitiria a obtenção de incrementos nas atividades de celulasas e xilanasas e maior produtividade volumétrica. Somente a celulose foi adicionada pelo alimentador automático ao meio de cultivo e este substrato se apresentava na forma de pó seco.

Para a amostragem durante os cultivos em RD e RDA, foram retiradas duas alíquotas (15 mL) diariamente com um intervalo mínimo de 8 horas. As amostras foram conservadas com azida sódica (0,2 g/L) e sob refrigeração. Para os procedimentos analíticos, 10 mL da amostra foram centrifugados por 30 minutos a 4.000 rpm (3.220 x g). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e armazenado em placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL) e em microtubos de reação para as dosagens enzimáticas e determinação do consumo de sacarose. O *pellet* foi utilizado para determinar o conteúdo de celulose residual.

3.3.5 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com Adsul *et al.* (2005), com algumas modificações. Em frascos *Duran*[®] de 50 mL foram adicionados 50 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mmol/L) e 1 grama do substrato a ser hidrolisado. Logo após, as misturas foram incubadas com filtrado enzimático obtido em RD e/ou RDA, com uma carga de 15 FPU/g na presença de 0,1 g/L de azida sódica, em banho agitado a 150 rpm e a 50°C, que é a condição ótima para a atividade enzimática de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004).

Foram coletados 1 mL de amostra em diversos intervalos de tempo: 0, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas de hidrólise, para análises dos açúcares em cromatografia líquida, realizada em um equipamento Shimadzu modelo LC20AD. As hidrólises foram realizadas em triplicata.

Os substratos empregados na hidrólise foram o bagaço de cana-de-açúcar e o capim-elefante, ambos *in natura* e também o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (200°C/8 minutos). O filtrado enzimático empregado na hidrólise enzimática, obtido em RD com duração de 160 horas, foi produzido com 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, totalizando 40 g/L de material lignocelulósico. O filtrado enzimático do RDA foi obtido após 232 horas de cultivo e o meio foi composto por 60 g/L de celulose equivalente, com alimentação em intervalos de uma hora até 192 horas de cultivo. A eficiência hidrolítica das enzimas obtidas com *P. echinulatum* S1M29 foi comparada com a enzima comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes. Os resultados foram expressos em mg de açúcar liberado por g de substrato.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Determinação da concentração micelial

A biomassa fúngica foi determinada indiretamente pela liberação de N-acetil-D-glicosamina da hidrólise enzimática da quitina da parede celular (Bittencourt *et al.*, 2002). Para tal metodologia, 1 mL da amostra foi centrifugada com 5 mL de água destilada por 30 minutos a 4.000 rpm (3.220 x g). Este procedimento tem como objetivo lavar a amostra para a retirada de açúcares que podem interferir na metodologia. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado 3 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8; 0,05 mol/L) e as amostras foram tratadas em ultrassom por 60 minutos. Em cada amostra foi adicionado 2 mL da enzima Viscozyme L[®] (diluída em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8 a 30% (v/v)) e esta mistura foi mantida por 24 horas a 45°C. Após este período, as amostras foram fervidas por 10 minutos para desativação da enzima. As amostras foram resfriadas e centrifugadas (3.220 x g) por 30 minutos.

Para a determinação do teor de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise da quitina foi utilizada a metodologia descrita em Aidoo *et al.* (1981). Em tubos contendo 1 mL da amostra hidrolisada e centrifugada foi adicionado 1 mL da solução de 30 g/L de acetilacetona em solução de carbonato de sódio 1,25 mol/L. As amostras foram fervidas por 20 minutos e após o resfriamento, adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL 4-dimetilaminobenzaldeído - DMAB (3,2 g de DMAB diluído em 20 mL de etanol e 20 mL de

HCl concentrado). Os tubos foram incubados a 65°C por 10 minutos e a absorvância lida a 530 nm. As concentrações miceliais foram obtidas a partir de curva padrão construída com micélio seco com concentrações entre 0 e 30 g/L.

3.4.2 Determinação do conteúdo de celulose

O conteúdo de celulose residual nas amostras foi determinado pelo método de Updegraff (1969) modificado por Ahamed *et al.* (2008a). Este método emprega 10 mL do meio de cultura, que é centrifugado a 4.000 rpm (3.220 x g) por 30 minutos. Após, o sobrenadante é removido e os *pellets* resultantes são suspensos em 3 mL de uma solução com ácido acético (80% (v/v)) e ácido nítrico concentrado, permanecendo esta mistura em banho a 100°C por 30 minutos. Após o resfriamento, os *pellets* são transferidos para um papel filtro seco e com massa conhecida e, lavados com água destilada (10 + 10 mL). A celulose residual é seca a 50°C por 48 horas e em seguida a massa resultante é averiguada.

3.4.3 Determinação da concentração de sacarose

A determinação de sacarose foi realizada após hidrólise ácida de acordo com o método preconizado por Falcone & Marques (1965), com modificações. Para tanto, 0,5 mL da amostra foi hidrolisada com 0,5 mL de HCl 2 mol/L por 10 minutos a 65°C. Após resfriamento das amostras, foi acrescentado 1,25 mL de NaOH 1 mol/L para a neutralização e 2,75 mL de água destilada para obter uma diluição final de 1:10. Um volume de 0,25 mL da amostra hidrolisada e diluída, acrescida de 0,75 mL de DNS, foi fervido por 5 minutos para reação com os açúcares redutores. Em seguida, foi acrescentado 4 mL de água destilada, para posterior leitura no espectrofotômetro a 545 nm. A concentração de sacarose foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de sacarose, que passaram pelo mesmo tratamento, com concentrações de 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg/mL, por meio de regressão linear, utilizando o programa Origin 6.0.

3.4.4 Determinação da atividade sobre papel filtro (FPA)

Para a dosagem de celulasas totais foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), adaptada de Ghose (1987) de acordo com Camassola & Dillon (2012). As fibras de celulose que constituem o papel têm uma estrutura complexa e para sua hidrólise substancial é necessário um sistema celulósico complexo (celobiohidrolases, endoglicanases e

β -glicosidases). O teste em papel filtro é recomendado pela Comissão de Biotecnologia da IUPAC para se avaliar a atividade total de um sistema de celulasas (Ghose, 1987; Medve, 1997).

Foram empregadas placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL). Em cada poço da placa, foi adicionado 10 μ L de solução enzimática ou diluição apropriada e 140 μ L de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. A placa foi colocada em banho a 50°C, durante 10 minutos, com a finalidade de ambientar o meio contendo a enzima e o tampão citrato de sódio. Em seguida, foram adicionados a cada poço 5 mg de papel filtro (Whatman nº1) em tiras dobradas de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho a 50°C. Logo após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μ L da solução do reagente DNS (Miller, 1959) e a placa colocada em banho a 100°C, por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μ L de amostra em placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL) e adicionado 200 μ L de água destilada para a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 545 nm.

A determinação das atividades sobre papel filtro presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose com concentrações de 0, 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. As unidades de FPA foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol/L de açúcar redutor por minuto.

3.4.5 Determinação da atividade de endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases, segundo Ghose (1987) com modificações, foi realizada empregando-se 1 μ L da solução enzimática ou diluição apropriada e 49 μ L de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi colocada em banho a 50°C, por 10 minutos, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50 μ L de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8 e previamente aquecida a 50°C. As placas foram mantidas por 30 minutos em banho a 50°C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μ L da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos. A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases foram procedidas tal como para FPA. As unidades de endoglicanases foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol/L de açúcar redutor por minuto.

3.4.6 Determinação da atividade de β -glicosidases

Para a determinação da atividade de β -glicosidases foi empregada a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Nesta análise, uma mistura reacional (100 μ L) contendo 10 μ L de solução enzimática com diluição apropriada e 90 μ L de p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p NPG 4 mg/mL em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8) foi incubada a 50°C por 30 minutos numa placa de poliestireno cristal de 96 poços (com volume individual de 0,4 mL), sendo interrompida com a adição de 200 μ L de uma solução 100 g/L de Na₂CO₃. A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância de p NPG a 405 nm. A determinação da atividade foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de p -nitrofenol (p NP) com concentrações de 0; 0,04; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mmol/L, por meio de regressão linear, utilizando o programa Origin 6.0. Uma unidade de β -glicosidases foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol/L de p -nitrofenol por minuto.

3.4.7 Determinação da atividade de exoglicanases

Para determinação da atividade de exoglicanases foi utilizado como substrato o p -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (p NPC), empregando-se a metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). Uma mistura reacional contendo 10 μ L de solução enzimática e 90 μ L de p -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (p NPC 1mg/mL em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8) foi incubada a 50°C por 30 minutos numa placa de poliestireno cristal de 96 poços, sendo interrompida com a adição de 200 μ L de uma solução 100 g/L de Na₂CO₃. As amostras foram estimadas espectrofotometricamente por leitura da absorbância de p -nitrofenol, a 405 nm.

As concentrações de exoglicanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de p -nitrofenol 2 mmol/L em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, com concentrações de 0; 0,04; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2 1,6 e 2,0 mmol/L, por meio de regressão linear. Uma unidade de atividade de exoglicanases foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 μ mol/L de p -nitrofenol por minuto.

3.4.8 Determinação da atividade de xilanases

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10 μ L de filtrado enzimático com

diluição apropriada e 90 μL de uma solução de xilana de madeira de faia (*Fagus*) 10 g/L, preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L (pH 4,8) e previamente aquecida a 50°C. A placa foi mantida em banho a 50°C por 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 300 μL de DNS, após, a placa permaneceu em banho a 100°C por 5 minutos.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μL de amostra em placa de 96 poços e 200 μL de água destilada, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de xilanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de xilose 0,01 mol/L com concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mmol/L, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol/L}$ de xilose por minuto.

3.5 Caracterização dos materiais celulósicos

3.5.1 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos

Quantidades de 300 mg dos materiais lignocelulósicos foram acondicionados em cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinados em mufla a uma temperatura de 575°C por 2 horas, de acordo com as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42622 (National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter *et al.*, 2008a). O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

3.5.2. Extraíveis

O teor de sólidos solúveis do bagaço de cana-de-açúcar, da celulose *Celuflok E*[®], do sabugo de milho, do bagaço de laranja e do capim-elefante foi determinado com o uso do extrator Tecnal TE-044-8/50 a partir de uma quantidade conhecida de amostra empregando-se uma sequência de dois solventes, etanol 95% (v/v) e água quente, seguindo as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.*, 2008b) com adaptações. O percentual de cada extrato foi calculado pela perda de massa em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

3.5.3 Análise química dos substratos celulósicos

A composição química dos substratos utilizados nos cultivos foi realizada de acordo

com o relatório técnico NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2011). Uma quantidade de 100 mg foi tratada com 1 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v) a 25°C por um período de 1 hora sob agitação constante. Após este tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave (1 atm) por 1 hora para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch de porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até massa constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra (Gomide & Demuner, 1986). O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectrofotometria na luz ultravioleta (Dence, 1992).

A composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante. Alíquotas dos hidrolisados foram filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 20A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-20A com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético, levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glicose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidro. Os resultados obtidos foram expressos em relação à massa seca do material original.

3.5.4 Determinação de nitrogênio total e proteínas

A análise de proteínas totais foi realizada no Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA), IB-UCS, de acordo com método Kjeldahl - AOAC INTERNATIONAL (2011).

Inicialmente foi feita a digestão de 1g de amostra com 12 mL de ácido sulfúrico e mistura catalítica (7 g de K₂SO₄ e 0,8 g de CuSO₄), onde ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio. Após, fez-se a destilação da amostra para liberação de amônia, que foi fixada em solução ácida (ácido bórico 4% (m/v)) e titulada com

uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L até atingir a cor violeta.

As análises foram realizadas em duplicata e foi feito um branco com os reagentes e sem amostra. Para obtenção dos resultados, utilizou-se a equação a seguir:

$$\text{Equação 1: \% proteínas} = \frac{(V-V_b) \cdot M \cdot f \cdot F \cdot 0,0140067 \cdot 100}{m}$$

onde:

V= volume de solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gasto na amostra em mL;

V_b= volume de solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gasto na prova em branco;

M= molaridade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

f= fator de correção a solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

m= massa da amostra em gramas;

F= fator de conversão da relação nitrogênio/proteína (para vegetais=5,75).

3.5.5 Extração e determinação da concentração de pectina

A extração e quantificação das substâncias pécticas contidas no bagaço de laranja foi realizada conforme a metodologia proposta por Canteri-Schemin *et al.* (2005) com modificações. Para a extração da pectina, 2 g do bagaço de laranja triturado e peneirado foram adicionados a um Becker. Após, foram preparados 100 mL de uma solução de ácido cítrico 100 mmol/L, que foi submetida a aquecimento e quando a temperatura de ebulição foi atingida, adicionou-se o bagaço de laranja que permaneceu em ebulição por 10 minutos. Ao final deste tempo, a mistura do ácido cítrico com o bagaço de laranja hidrolisado foi resfriada em banho de gelo.

Para a precipitação das pectinas solúveis, o bagaço de laranja foi filtrado em tecido sintético de poliéster e o filtrado foi recolhido num Becker contendo 200 mL de etanol a 66% (v/v) para ocorrer a floculação da pectina. O bagaço de laranja foi lavado com a solução de ácido cítrico (100 mmol/L) aquecido a 50°C. Após a filtração, a pectina floculada foi recuperada em papel filtro e seca em estufa a 50°C até atingir massa constante para posterior quantificação.

3.6 Zimogramas de atividades enzimáticas

3.6.1 Zimograma para endoglicanases

A metodologia para a detecção de atividade de endoglicanases em gel de poliacrilamida foi baseada em Sun *et al.* (2008a), a partir de um sistema semidesnaturante

com o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS). As proteínas foram inicialmente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com 0,15% (m/v) de carboximetilcelulose (CMC-Na). Foi utilizado um volume de 2 μ L das amostras obtidas do experimento com reuso de micélio de *P. echinulatum* crescido por 96 horas, sendo o mesmo completado para 30 μ L com o tampão de amostra. Após a corrida, o gel foi lavado em solução contendo de isopropanol 25% (v/v) em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, por 30 minutos. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo somente tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, por 10 minutos, e incubado a 40°C. O gel foi corado com uma solução 0,2% (m/v) de vermelho de congo, por 30 minutos e descorado com 1 mol/L de solução de NaCl. As bandas claras em fundo vermelho é a indicação da atividade despolimerizante em carboximetilcelulose.

3.6.2 Zimograma para β -glicosidases

Para detectar atividade de β -glicosidases a metodologia baseou-se em Kwon *et al.* (1994). O gel de poliacrilamida (8,5 cm x 7,5 cm x 0,1 cm) contendo 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), com 1,5 cm de gel de concentração 4% e 6,0 cm de gel para separação das proteínas com concentração de 12%, foi submetido à corrida eletroforética após a aplicação das amostras.

As amostras foram precipitadas com acetona gelada na proporção volumétrica 1:2, sendo 80 μ L de amostras obtidas do experimento com reciclo de micélio de *P. echinulatum* crescido por 96 horas. Esta mistura foi mantida a -20°C por pelo menos 15 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm (10.621 x g) e o sobrenadante descartado (Blum *et al.*, 1987). O *pellet* foi solubilizado em 30 μ L de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel. Após a corrida, o gel foi submerso em solução de isopropanol 25% (v/v) por 30 minutos, sendo em seguida lavado com tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8. Após a lavagem o gel foi incubado sob agitação de 60 rpm, por 40 minutos, em solução de 0,2% (m/v) de esculina em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8 e, em seguida, em solução 1% (m/v) de cloreto férrico por 10 minutos, a 37°C. Bandas escuras em um fundo claro são indicativas da atividade de β -glicosidase, sendo os géis fotodocumentados imediatamente.

3.7 Análise dos resultados

As atividades enzimáticas foram calculadas no programa Microsoft Office Excel 2007 e os gráficos foram elaborados no software GraphPad Prism 5.01. A análise estatística foi feita por análise da variância e pós-teste de Tukey para um $p < 0,05$, empregando o software GraphPad Prism 5.01.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados de cultivos submersos com *P. echinulatum* S1M29, obtidos em frascos Erlenmeyer mantidos sob agitação recíproca e em biorreator com agitação mecânica. Em relação aos resultados obtidos em frascos Erlenmeyer são apresentados dados de efeito da concentração de celulose no crescimento micelial e na produção enzimática; emprego de fontes alternativas de celulose e hemicelulose para a produção de celulases e xilanases e dados de reuso da massa micelial como estratégia para obter incrementos nas atividades de celulases e xilanases.

Em seguida, são discutidos os resultados obtidos em biorreator com agitação mecânica, iniciando com a descrição do desenvolvimento de um sistema automático de alimentação de celulose durante o regime descontínuo alimentado (RDA), seguido dos dados de seleção do tempo de início de adição da celulose e aumento da concentração da celulose durante o RDA, empregando o alimentador automático. Por fim, são descritos os resultados de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e de capim-elefante, empregando enzimas obtidas com *P. echinulatum* (S1M29) e a enzima comercial da Novozymes (Celluclast 1.5L®).

4.1 Efeito da concentração de celulose no crescimento micelial e na produção enzimática durante cultivos em frascos mantidos sob agitação recíproca

A concentração da celulose no cultivo líquido interfere na produção enzimática e pode influenciar no crescimento do microrganismo (Sternberg & Dorval, 1979). Visto que o meio de cultivo utilizado neste trabalho apresenta componentes insolúveis, não foi possível dosar o crescimento pelo método direto de gravimetria. Ao testar os métodos indiretos da dosagem do crescimento, por DNA e N-acetilglicosamina, verificou-se que o farelo de soja (2 g/L), o farelo de trigo (5 g/L) e a sacarose (5 g/L) interferem nos resultados finais.

Para avaliar o efeito da concentração de celulose no crescimento micelial do microrganismo e na produção enzimática, realizou-se ensaios com diferentes concentrações de celulose inicial ($S_0 = 5, 10, 15$ e 20 g/L), sendo que os farelos de trigo e soja foram retirados do meio de cultivo. O ensaio foi conduzido em frascos mantidos sob agitação recíproca e a metodologia utilizada foi baseada no teor de N-acetilglicosamina. Antes da análise, as amostras foram lavadas para a retirada da sacarose, que estava presente na concentração de $S_0 = 5$ g/L.

Na Figura 10A apresenta o crescimento do microrganismo, representado pela massa micelial. Pode-se observar em todos os cultivos com as diferentes concentrações de celulose inicial, que há dois picos máximos de crescimento, um em torno de 16 horas e outro em 48 horas de cultivo. Ma *et al.* (2013) também observaram 2 picos na curva de biomassa em cultivos com *T. reesei*. Segundo os autores, os dois picos ocorrem devido a duas formas de micélio, a primária e a secundária. O primeiro pico no crescimento se refere ao micélio primário que após 20 horas de cultivo é convertido em micélio secundário, resultando no segundo maior crescimento da biomassa fúngica. Conforme discutido no trabalho de Li *et al.* (2013), o micélio secundário está envolvido na produção enzimática e a secreção das enzimas ocorre no ápice das hifas.

O primeiro pico de crescimento observado pode ser explicado pelo rápido consumo da sacarose presente no meio de cultivo e, após o esgotamento desta fonte de carbono, que ocorre em até 24 horas de cultivo (Reis *et al.*, 2013), ocorre uma diminuição na concentração de massa micelial, possivelmente devido à autólise celular. Logo após o término da sacarose, se inicia o consumo da celulose por celulases constitutivas, o que desencadeia também o processo de indução das celulases, como descrito por Gong & Tsao (1979). Com o início da produção das celulases e xilanas, ocorre o consumo das formas amorfas da celulose, culminando no segundo pico de massa micelial em 48 horas. Seguidamente, ocorre novamente uma diminuição dos valores de massa micelial, provavelmente devido ao esgotamento das regiões de fácil assimilação da celulose. Em 90 horas, verifica-se novamente o aumento da concentração celular; sugere-se que este crescimento seja decorrência do consumo da celulose cristalina, visto que neste período obtêm-se as maiores produções enzimáticas.

Como pode ser verificado, a massa micelial não se diferenciou em valores no crescimento primário, porém no pico de massa do micélio secundário, com o uso de maiores concentrações de celulose, maior crescimento micelial foi atingido (Figura 10A). Os valores da biomassa em 48 horas de cultivo obtidos nas condições com $S_0 = 15$ e 20 g/L foram em torno de 9 g/L, sendo que para a condição de $S_0 = 5$ g/L o crescimento máximo foi de $5,4$ g/L.

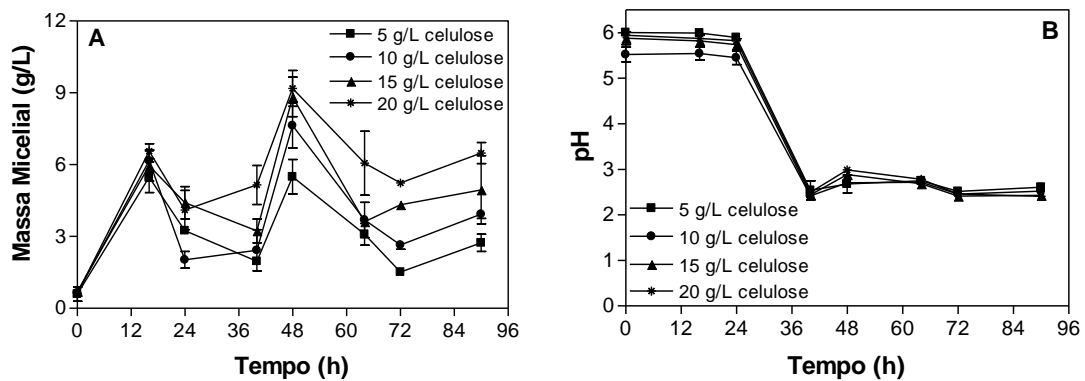


Figura 10. Valores da massa micelial (A) e pH (B) durante cultivos com diferentes concentrações de celulose em frascos mantidos sob agitação recíproca empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Em relação à variação de pH durante o experimento (Figura 10B), verifica-se que há correlação com o crescimento do microrganismo, visto que os menores valores de pH obtidos antecedem o segundo pico de crescimento micelial. Assim como reportado por Schneider *et al.* (2014) para *P. echinulatum*, sugere-se que com o aumento do metabolismo para a produção da biomassa, há uma diminuição dos valores de pH. Entretanto, o emprego de diferentes concentrações de celulose, demonstrou não ter relação com a variação de pH, visto que o perfil foi semelhante para todas as condições testadas.

As maiores atividades de celulases e xilanases (Figura 11A-D) foram obtidas na condição com as menores biomassas e menores concentrações de celulose ($S_0 = 5$ g/L e 10g/L) empregada. Estes dados não apresentam relação entre a maior atividade enzimática e o maior crescimento micelial para *P. echinulatum*, embora outras interferências podiam estar atuando, como diferenças no suprimento de oxigênio e possíveis danos ao metabolismo causados pelas variações dos valores de pH. Oliveira *et al.* (2006) também verificaram maiores atividades de xilanases em cultivos com menor crescimento micelial de *P. janthinellum*. Possivelmente, nas condições com maior concentração de celulose ($S_0 = 15$ e 20 g/L), a liberação de glicose foi maior e mais rápida, o que resultou num maior crescimento, no entanto, a síntese de celulases pode ter sido interrompida por repressão catabólica por glicose, tal como sugerem Domingues *et al.* (2001).

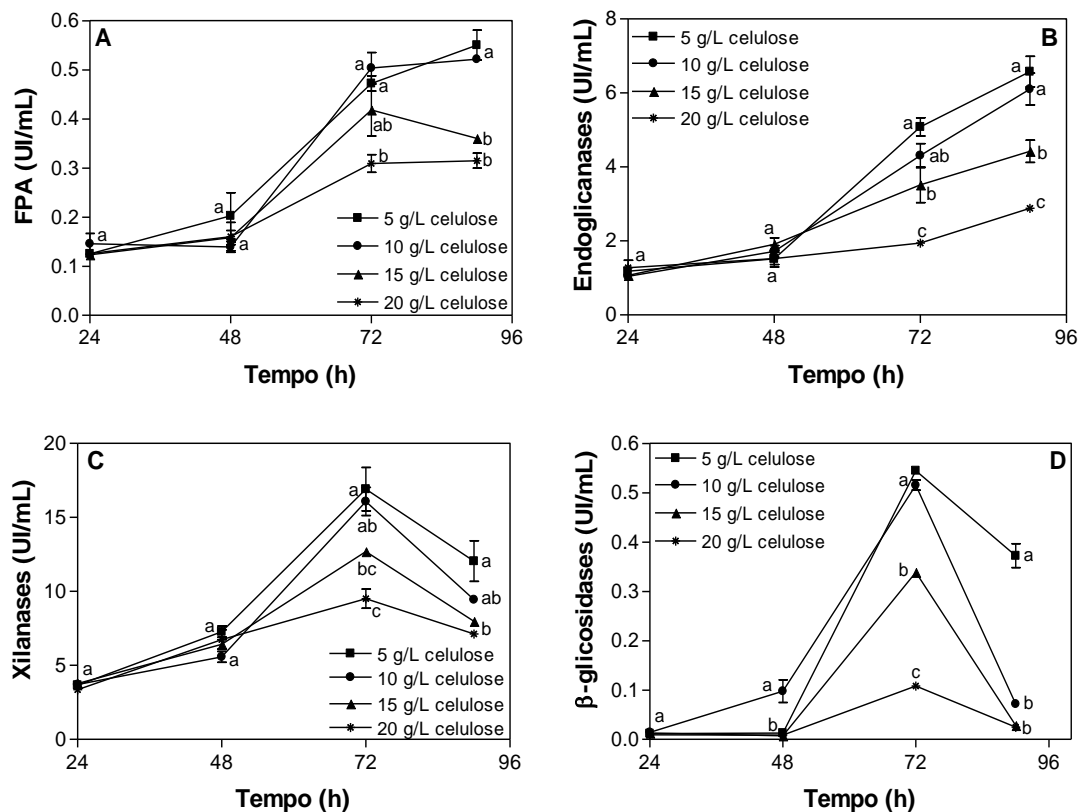


Figura 11. Atividades de FPA (A), endoglucanases (B), xilanases (C) e β -glucosidases (D) durante cultivos com diferentes concentrações de celulose em frascos mantidos sob agitação recíproca empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Estudos publicados com a linhagem parental 2HH de *P. echinulatum* e as mutantes 9A02S1 e S1M29, crescendo em diferentes fontes de carbono, também demonstraram que maiores atividades enzimáticas são obtidas com a menor concentração de biomassa fúngica (Novello *et al.*, 2014).

As maiores atividades de FPA e endoglucanases foram obtidas em 90 horas de ensaio para a condição com $S_0 = 5$ e 10 g/L de celulose (Figuras 11 A-B). Estes resultados foram semelhantes às atividades de FPA (0,59 UI/mL) e endoglucanases (5,84 UI/mL) obtidas por Schneider *et al.* (2014) para a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* em meio contendo celulose (Celuflok E[®]-10 g/L) como única fonte de carbono.

As atividades de FPA (0,55 UI/mL) e endoglucanases (6,5 UI/mL) obtidas para *P. echinulatum* foram superiores às obtidas por Juhász *et al.* (2005) empregando *T. reesei* RUT-C30. Os autores empregaram celulose Solka Floc[®] como única fonte de carbono e as atividades máximas foram verificadas em 168 horas de processo, sendo que nos cultivos com *P. echinulatum* atividades superiores foram obtidas em 90 horas de ensaio.

As atividades máximas de xilanases (16,5 UI/mL) e β -glicosidases (0,54 UI/mL) foram obtidas em 72 horas de processo, para as condições $S_0= 5$ e 10 g/L de celulose (Figura 11C-D). Schneider *et al.* (2014) obtiveram atividades de xilanases (28,8 UI/mL) e de β -glicosidases (1,15 UI/mL) superiores em cultivos com 10 g/L de *Celuflok E*[®] com a mesma linhagem mutante de *P. echinulatum*, embora os autores tenham suplementado o meio com *Prodex*[®] e peptona, no entanto não utilizaram sacarose. Adsul *et al.* (2004) realizaram estudos com *P. janthinellum* e verificaram atividades de β -glicosidases (0,58 UI/mL) semelhantes às obtidas no presente trabalho. Entretanto, a atividade de xilanases (28,1 UI/mL) obtida por estes autores foi superior durante os cultivos constituídos por 10 g/L celulose.

Estes resultados indicam que concentrações de celulose de até 5 g/L (S_0) no meio de cultivo, em frascos mantidos sob agitação recíproca, favorecem a atividade enzimática, apesar do crescimento do microrganismo ser menor nessas condições.

4.2 Emprego de fontes alternativas de celulose e hemicelulose para a produção de celulasas e xilanases em frascos mantidos sob agitação recíproca

O sucesso da tecnologia enzimática depende, principalmente, do menor tempo de produção do produto de interesse e do emprego de um meio de cultivo de baixo custo. Conforme descrito por Singhanian *et al.* (2014), a produção de celulasas em larga escala demanda por substratos mais econômicos para contribuir com a indústria de etanol lignocelulósico. Além disso, o emprego de diferentes substratos lignocelulósicos aos meios de cultura pode contribuir na produção de diferentes enzimas, característica que melhora os rendimentos da hidrólise (Castro *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2011).

Em vista disto, avaliaram-se diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, que poderiam substituir 50% da celulose comercial durante ensaios de produção de celulasas e xilanases, para reduzir os custos de produção destas enzimas. Foram testados o bagaço de laranja, o bagaço de cana-de-açúcar, o sabugo de milho, como resíduos lignocelulósicos e o capim-elefante como uma biomassa de baixo custo de produção. O bagaço de cana-de-açúcar e o capim-elefante foram pré-tratados por explosão a vapor, e os demais materiais foram utilizados *in natura*.

A concentração da fonte de carbono no meio de cultivo constituída por 50% do material lignocelulósico e 50% de celulose foi assim definida, visto que estudos de produção de celulasas e xilanases com lactose (Sehnm *et al.*, 2006) e sorbitol (Ritter *et al.*, 2013) demonstraram que a celulose comercial pode ser substituída em 50% por estas fontes de

carbono solúveis. Os cultivos foram conduzidos em cultivo submerso e a linhagem empregada por estes autores foi a mutante 9A02S1 de *P. echinulatum*. Além disso, estudos prévios com as biomassas lignocelulósicas empregadas indicaram baixos níveis de expressão de enzimas quando estas fontes foram usadas separadamente.

A variação de pH durante os ensaios em frascos Erlenmeyer com a condição controle (10 g/L de celulose) e com a celulose combinada com o bagaço de laranja e com capim-elefante foi semelhante, com diminuição dos valores até 48 horas de cultivo e aumento do pH até o final do experimento. Nas condições que continham sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar na composição do meio, o pH diminui lentamente até 72 horas de cultivo, seguida de elevação dos valores até o término do cultivo (Figura 12A). Visto que a queda nos valores de pH não foi tão brusca, sugere-se que o sabugo de milho e o bagaço de cana-de-açúcar contenham em sua composição algum agente tamponante, tal como sugerido por Schneider *et al.* (2014) para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Além disso, sugere-se que a disponibilidade de glicose foi mais limitada ao microrganismo, devido à dificuldade de hidrólise da celulose nestes resíduos, acarretando um menor metabolismo.

Estudos anteriores com *P. echinulatum* crescendo em meios formulados com celulose, também demonstraram a diminuição do pH até às 48 horas de cultivo, seguido de elevação nos valores (Reis *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2014). Conforme sugerido por Sternberg & Dorval (1979), o decréscimo dos valores de pH ocorre devido à liberação de íons H^+ durante o *uptake* de amônia do sulfato de amônio, presente no meio de cultivo. Bailey & Tahtiharju (2003) verificaram para *T. reesei* RUT-C30 que ocorre um decréscimo no valor de pH no meio de cultivo durante o crescimento do microrganismo e um aumento nos valores de pH, após o consumo da fonte de carbono. A redução dos valores de pH também pode ser devido à produção e liberação no meio de ácidos orgânicos, decorrentes do metabolismo fúngico (Carlile & Watkinson, 1997). Sugere-se que o aumento do pH, observado até o final dos experimentos, ocorra devido à absorção dos íons H^+ dissolvidos no meio de cultivo ou devido à liberação de compostos que contribuem para o aumento dos valores após o esgotamento das regiões de fácil assimilação da celulose.

O emprego de bagaço de laranja no meio de cultivo resultou em atividades de FPA superiores, quando comparado à condição controle. As maiores atividades foram obtidas a partir das 96 horas, com pico de 1,65 UI/mL em 120 horas de experimento (Figura 12 B). Na condição controle verificaram-se atividades de 1,3 UI/mL em 120 horas, sendo que na condição contendo capim-elefante as atividades foram semelhantes (1,25 UI/mL). Ao

combinar a celulose com o sabugo de milho, as atividades de FPA obtidas (0,8 UI/mL) foram inferiores em relação à condição controle (Figura 12 B).

A combinação da celulose com o bagaço de cana-de-açúcar não foi favorável para a atividade de FPA, visto que a atividade foi a menor obtida (0,52 UI/mL) entre as condições testadas (Figura 12B). Essa atividade foi menor que a obtida por Schneider *et al.* (2014) para *P. echinulatum* (6,9 UI/mL) em meios contendo apenas bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor como fonte de carbono na concentração de 10 g/L. Delabona *et al.* (2012) obtiveram atividades de FPA superiores para *T. harzianum* às obtidas para *P. echinulatum* com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. No trabalho, esses autores obtiveram atividades de 0,8 UI/mL empregando o bagaço de cana-de-açúcar explodido com vapor combinado com sacarose, numa proporção de 3:1 (m/m), totalizando concentração de 10 g/L das duas fontes de carbono.

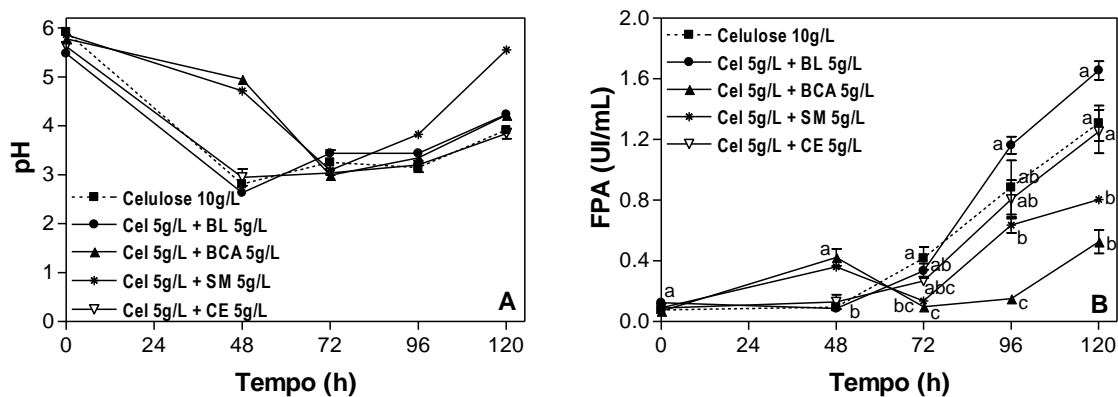


Figura 12. Variação do pH (A) e atividade de FPA (B) durante ensaios com combinação de fontes de carbono, conduzidos em frascos mantidos sob agitação recíproca, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A condição controle foi constituída apenas por celulose e nas outras condições a fonte de carbono foi composta por celulose (Cel) combinada com o bagaço de laranja (BL), ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou sabugo de milho (SM) e ou capim-elefante (CE).

Para endoglicanases, a atividade máxima obtida em 120 horas de cultivo para a condição formulada com bagaço de laranja foi em torno de 11,5 UI/mL (Figura 13A). Essa atividade foi semelhante às obtidas no ensaio controle (11,3 UI/mL) e na combinação que continha capim-elefante (10,6 UI/mL). Menores atividades foram obtidas nos meios formulados com sabugo de milho (7,5 UI/mL) e bagaço de cana-de-açúcar (4,5 UI/mL). Os diferentes materiais lignocelulósicos empregados no meio de produção de enzimas podem ter influenciado a produção de endoglicanases por *P. echinulatum* a nível de indução, pois como

demonstrado por Soni *et al.* (2010) para *A. fumigatus*, diferentes isoformas de endoglicanases são expressas de acordo com fonte de carbono empregada.

As atividades de endoglicanases obtidas foram superiores às obtidas por Schneider *et al.* (2014) para a mesma linhagem de *P. echinulatum*. Esses autores verificaram atividades de 5,8 UI/mL e 5,2 UI/mL em filtrados enzimáticos obtidos em meios contendo celulose e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente, como fontes de carbono. Porém, no presente trabalho, o emprego do bagaço de cana-de-açúcar proporcionou as menores atividades de endoglicanases.

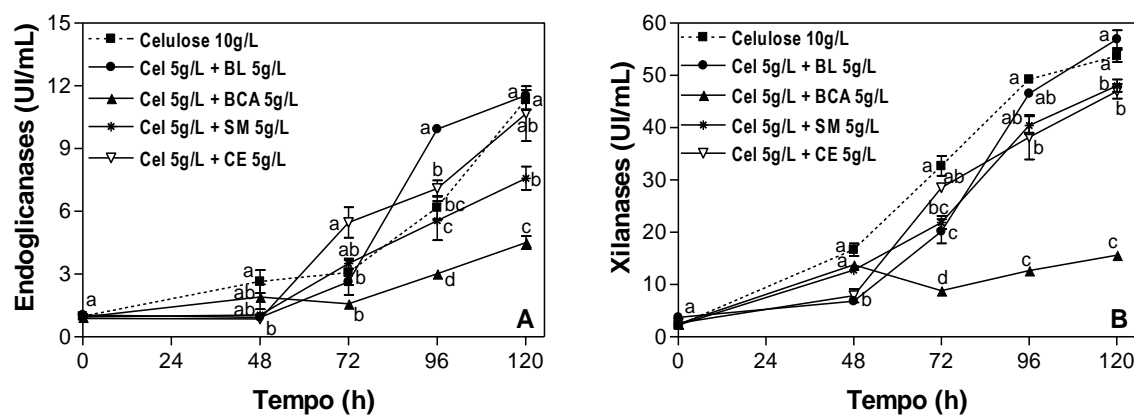


Figura 13. Atividade de endoglicanases (A) e xilanases (B) durante ensaios com combinação de fontes de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A condição controle foi constituída apenas por celulose e nas outras condições a fonte de carbono foi composta por celulose (Cel) combinada com o bagaço de laranja (BL), ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou sabugo de milho (SM) e ou capim-elefante (CE).

Com exceção do bagaço de cana-de-açúcar, todas as fontes de carbono testadas e combinadas com celulose mostraram-se favoráveis para a produção de xilanases (Figura 13B). A maior atividade desta enzima (56,9 UI/mL) foi obtida em 120 horas de cultivo, para a condição que continha o bagaço de laranja. Díaz *et al.* (2012) também obtiveram aumentos nas atividades de endoglicanases e xilanases, ao suplementar o meio de cultivo com casca de laranja, empregando *A. awamori*. No entanto, Terrasan *et al.* (2010) realizaram cultivos líquidos com *P. janczewskii* e obtiveram baixas atividades de xilanases com bagaço de laranja, porém esse resíduo proporcionou as maiores atividades de α -arabinofuranosidase, enzima importante na hidrólise dos grupos laterais da xilana (Zhang *et al.*, 2013).

Oliveira *et al.* (2006) avaliaram o emprego de diferentes resíduos lignocelulósicos na produção de xilanases por *P. janthinellum* em cultivo submerso. Os autores também

verificaram menores atividades de xilanases nos meios com bagaço de cana-de-açúcar e as maiores atividades foram obtidas com sabugo de milho (54,8 UI/mL) e com casca de aveia (55,3 UI/mL).

O emprego do bagaço de laranja no meio de cultivo aumentou em torno de 93% a atividade de β -glicosidases (5,2 UI/mL) em relação ao meio controle (2,7 UI/mL), composto somente por celulose (Figura 14A). O capim-elefante também apresentou atividades superiores ao controle (4,3 UI/mL) e o bagaço de cana-de-açúcar induziu as menores atividades de β -glicosidases (1,5 UI/mL) e exoglicanases (0,8 UI/mL) (Figura 14A-B). As máximas atividades de exoglicanases também foram obtidas em 120 horas com valor de 2,7 UI/mL para a condição com bagaço de laranja. Esse resíduo e o capim-elefante (2,5 UI/mL) proporcionaram atividades superiores à condição controle (1,8 UI/mL) a partir das 72 horas de experimento (Figura 14B). Juhász *et al.* (2005) obtiveram atividades inferiores para *T. reesei* RUT-C30 do que às obtidas para *P. echinulatum*. Os autores empregaram como fonte de carbono celulose (*Solka Floc*[®]) e diferentes matérias lignocelulósicos pré-tratados, sendo que a atividade de β -glicosidases foi menor que 1 UI/mL e a de celobiohidrolases atingiu o valor de 2,3 UI/mL.

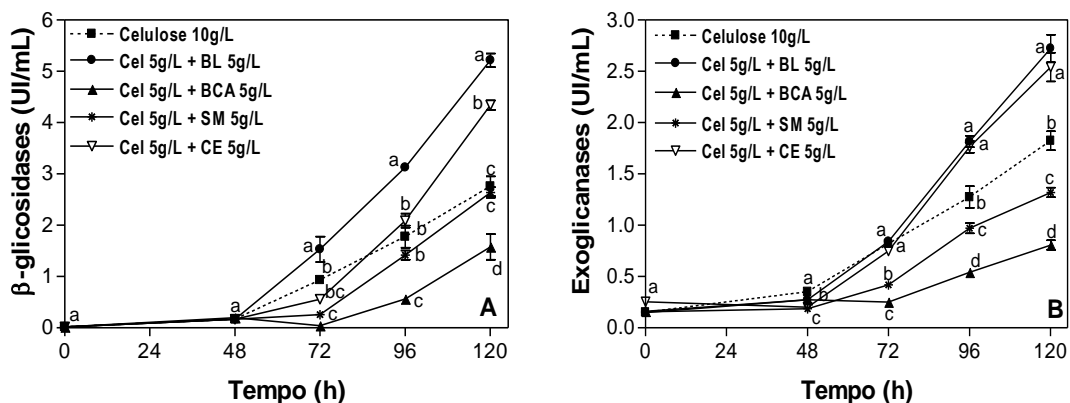


Figura 14. Atividade de β -glicosidases (A) e exoglicanases (B) durante ensaios conduzidos com combinação de fontes de carbono, em frascos mantidos sob agitação recíproca, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A condição controle foi constituída apenas por celulose e nas outras condições a fonte de carbono foi composta por celulose (Cel) combinada com o bagaço de laranja (BL), ou bagaço de cana-de-açúcar (BCA), ou sabugo de milho (SM) e ou capim-elefante (CE).

Delabona *et al.* (2013) também adicionaram bagaço de laranja em cultivos com *A. niger* e *A. fumigatus*. Os ensaios foram conduzidos em estado sólido e a presença do bagaço de laranja não aumentou as atividades enzimáticas como às verificadas no presente trabalho.

Os autores até sugerem que as menores atividades obtidas foram devido à alta recalcitrância deste resíduo, porém para *P. echinulatum* este material lignocelulósico demonstrou ser um bom indutor de enzimas.

As atividades de FPA, endoglicanases, xilanases e β -glicosidases obtidas com celulose e capim-elefante foram três vezes superiores em relação às obtidas por Scholl *et al.* (2015a), empregando a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* em cultivos constituídos de apenas celulose e ou de capim-elefante pré-tratado, na concentração de 10 g/L. Isto indica a importância de combinar diferentes fontes de carbono para se obter maiores níveis enzimáticos. Muthuvelayudham & Viruthagiri (2006) também obtiveram maiores atividades de celulases quando diferentes substratos foram combinados em cultivos com *T. reesei*. Para as espécies *P. pinophilum* e *P. persicinum* a mistura de celulose e de diferentes fontes de xilana ao meio de cultivo também proporcionou maiores atividades de FPA (Jorgensen *et al.*, 2005).

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o bagaço de laranja, em combinação com a celulose, apresenta capacidade de indução de celulases e xilanases. Conforme pode ser visualizado na Tabela 2, a atividade de FPA obtida com este substrato se destaca entre as atividades descritas na literatura. Muitos trabalhos de produção de enzimas utilizam resíduos lignocelulósicos pré-tratados (Tabela 2), no entanto, o bagaço de laranja demonstrou ser um substrato que pode ser utilizado sem pré-tratamento físico e/ou químico, possivelmente devido conter uma menor quantidade de lignina quando comparado a outros materiais (Tabela 3).

Ao comparar a composição destes materiais (Tabela 3), não há nenhum componente que predomine e que possa ser o indutor principal das enzimas lignocelulolíticas, pois, enquanto que a pectina é o composto majoritário no bagaço de laranja, no capim-elefante é a celulose (anidroglicose) que se destaca. O sabugo de milho apresentou a maior concentração de xilose quando comparado aos outros materiais (Tabela 3), no entanto, as maiores atividades de xilanases não foram obtidas nos meios formulados com este resíduo, mas sim com o bagaço de laranja que é rico em pectina. Sugere-se que a pectina e seus monômeros atuam como indutores das celulases e xilanases, visto que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando este substrato foi empregado como coadjuvante na produção das enzimas.

Tabela 2. Comparação da atividade de FPA de diferentes fungos crescidos em cultivos submersos constituídos de diferentes fontes de carbono e conduzidos em frascos.

Microrganismo	Substrato/ Concentração (g/L)	FPA (UI/mL)	Referência
<i>A. cellulolyticus</i>	Palha de arroz*/100	10,8	Hideno <i>et al.</i> (2011)
<i>A. cellulolyticus</i>	<i>Solka Floc 200</i> [®] (celulose)/50	7,5	Hideno <i>et al.</i> (2011)
<i>A. heteromorphus</i>	Palha de trigo/40	3,2	Singh <i>et al.</i> (2009)
<i>A. niger</i>	Resíduo de côco*/30	2,3	Mrudula & Murugammal (2011)
<i>P. citrinum</i>	Farelo de trigo/20	1,72	Dutta <i>et al.</i> (2008)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Bagaço de laranja/ <i>Celuflok E</i> [®] /10	1,65	Presente trabalho
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Bagaço de cana-de-açúcar*/10	0,69	Schneider <i>et al.</i> (2014)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Capim-elefante*/10	0,40	Scholl <i>et al.</i> (2015a)
<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	<i>Celuflok E</i> [®] /Sorbitol/10	1,95	Ritter <i>et al.</i> (2013)
<i>P. janthinellum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar*/10	0,48	Adsul <i>et al.</i> (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc 200</i> [®] (celulose)/10	1,50	Juhász <i>et al.</i> (2004)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Esterco bovino/10	1,72	Wen <i>et al.</i> (2005a)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Palha de arroz*/10	1,07	Sun <i>et al.</i> (2008b)
<i>T. viride</i> NCIM 1051	Bagaço de cana-de-açúcar*/10	0,88	Adsul <i>et al.</i> (2004)

*Substrato apresenta algum tipo de pré-tratamento físico e/ou químico

Tabela 3. Composição química do bagaço de laranja (BL), do sabugo de milho (SM), do capim-elefante (CE) e do bagaço de cana-de-açúcar (BCA).

Caracterização	BL	SM	CE	BCA
Extraíveis	36,70%	4,77%	ND	7,40%
Cinzas	3,4± 0,33%	2,47± 0,25%	4,70 ± 0,83%	5,87± 0,96%
Lignina insolúvel em ácido	1,33± 0,5%	15,33± 1,44%	19,31 ± 1,46%	27,67± 0,47%
Lignina solúvel em ácido	4,22± 0,29%	2,94± 0,04%	1,18 ± 0,41%	2,07± 0,11%
Anidroglicose	11,1± 3,42%	29,53± 1,01%	51,29 ± 0,44%	48,29± 0,36%
Anidroxilose	ND	16,64± 0,5%	11,07 ± 0,29%	3,14± 0,4%
Anidroarabinose	2,7± 0,63%	12,7± 0,08%	0,05%	ND
Proteínas	5,65%	2,52%	6,90%	1,56%
Pectina	35,77± 5,39%	ND	ND	ND
Total	100,87%	86,90%	94,50%	94,66%

Ao comparar os dados da caracterização com os obtidos por Dobrev *et al.* (2007) para o sabugo de milho, verifica-se que além de glicose, xilose e arabinose, a manose e a galactose também estão entre os açúcares constituintes deste material, sendo a galactose o segundo maior açúcar. Entretanto, estes açúcares não foram identificados no sabugo de milho utilizado no presente trabalho pela metodologia empregada.

A combinação da celulose com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado apresentou a menor indução de enzimas lignocelulolíticas entre os materiais testados, isto pode ter ocorrido devido ao bagaço de cana-de-açúcar conter maior quantidade de lignina (Tabela 3). Como já demonstrado por Berlin *et al.* (2006), as celulasas e as xilanases podem ficar adsorvidas à lignina. Além disso, o pré-tratamento por explosão a vapor pode redistribuir a lignina na superfície da celulose, dificultando a ação das enzimas (Chen & Wang, 2008).

Os dados obtidos com os diferentes materiais lignocelulósicos indicam que o bagaço de laranja é um substrato promissor na produção de preparações enzimáticas a serem aplicadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica, visto que maiores atividades de β -glicosidases são obtidas com este material.

4.3 Reuso da massa micelial como estratégia para aumentar a produção de celulasas e xilanases e reduzir os custos de produção das enzimas

A otimização da produção de enzimas que degradam a celulose e hemicelulose da biomassa vegetal é sem dúvida um dos maiores desafios na obtenção econômica de açúcares fermentescíveis, pois aumenta a viabilidade de instalação de biorefinarias para um fornecimento sustentável de produtos energéticos e químicos (Hansen *et al.*, 2015). O cultivo submerso é o processo mais empregado na produção das celulasas e xilanases, sendo que vários parâmetros influenciam a atividade enzimática, como o tipo de regime empregado, a temperatura, o pH, a agitação, o meio de cultivo, tamanho do inóculo, emprego de indutores, etc (Hendy *et al.*, 1984; Liming & Xueliang, 2004; Singhania *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2012).

A biomassa resultante após o cultivo submerso para a produção de celulasas e xilanases geralmente é descartada e para iniciar um novo processo existe a necessidade de um novo inóculo. A possibilidade de reutilização da biomassa poderia ser relevante desde que mantivesse as características do microrganismo e contribuísse para a redução dos custos para a produção das enzimas. Experimentos neste sentido foram realizados e são apresentados a seguir. Os ensaios foram iniciados a partir de um experimento inoculado com esporos e a

partir desse cultivo foram realizados cinco ciclos de reaproveitamento, denominados de reuso 1 a 5.

A Figura 15 apresenta os valores de pH durante os ensaios com a reutilização do micélio. Verifica-se que quando o cultivo é iniciado com esporos, os valores de pH diminuem até as 48 horas de cultivo e após este período, permanecem constantes até o final do processo. No entanto, os experimentos iniciados com a massa micelial que seria descartada, os valores de pH diminuem até as primeiras 24 horas, seguido de elevação até o final do processo. Estes dados podem sugerir que quando os experimentos são iniciados com micélio, pelo fato de não haver as etapas de germinação de esporos e adaptação ao meio de produção, o metabolismo torna-se mais rápido e a produção de enzimas se inicia nas primeiras horas de cultivo (Figura 16).

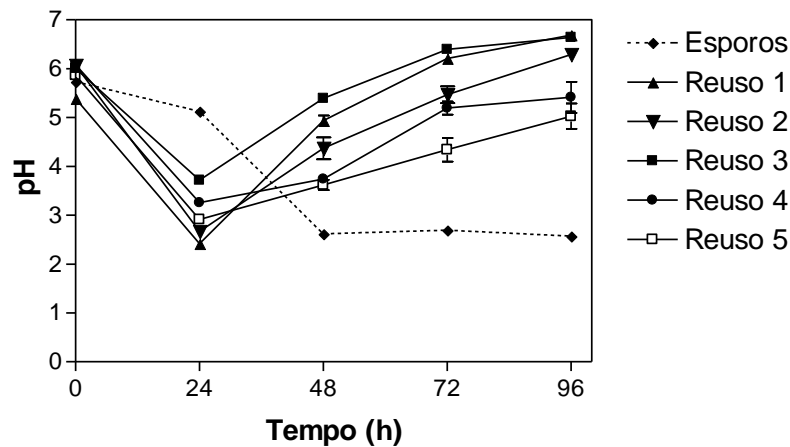


Figura 15. Valores de pH durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a concentração de celulose (S_0) empregada foi de 10 g/L em todos os ensaios.

Maiores valores de FPA foram obtidos já nos primeiros ciclos de reaproveitamento do micélio (Figura 16). As atividades máximas de 2,9 UI/mL para o micélio 1 e 2 foram obtidas em 72 horas de cultivo, 4,8 vezes superior às verificadas na condição em que foi utilizado esporos no início do experimento. Trabalhos como o de Krishna *et al.* (2000) demonstraram que o emprego de inóculo vegetativo aumenta a atividade enzimática quando comparado a meios inoculados com esporos.

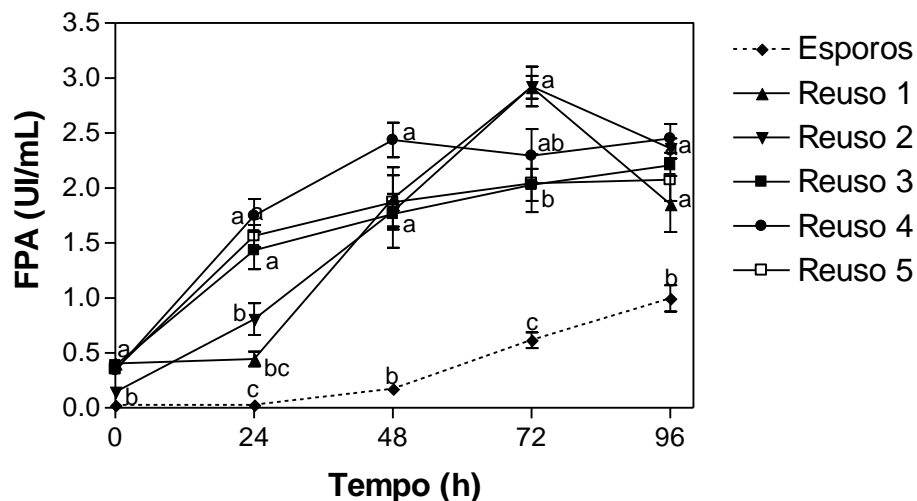


Figura 16. Atividade de FPA durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a concentração de celulose (S_0) empregada foi de 10 g/L em todos os ensaios.

Nas condições com micélio reaproveitado mais de duas vezes (reuso 3 a 5) os valores de FPA não passaram de 2,4 UI/mL, no entanto, as atividades enzimáticas foram 50 a 60 vezes superiores que às verificadas na condição controle, em 24 horas de ensaio. Após este período, as atividades tiveram pouco incremento, mantendo-se constantes até o final do cultivo. Isto indica a vantagem de reutilizar a biomassa fúngica, pois além de reaproveitar o material que seria descartado, há ganhos em termos de produtividade. Krishna *et al.* (2000) testaram o efeito de três diferentes idades do inóculo (0-30h; 30-120h; 120-160h) na produção de celulases e os autores obtiveram maiores atividades de FPA ao inocular o meio com inóculo crescido por mais de 120 horas. Estes resultados justificam as elevadas atividades obtidas com o reaproveitamento do micélio, pois a massa micelial empregada nos inóculos cresceu por 96 horas.

Maiores atividades de endoglicanases também foram obtidas nos ensaios com reutilização do micélio residual (Figura 17). A variação da atividade entre os ciclos de reuso da massa micelial foi menor em relação aos dados de FPA e os valores máximos foram em torno de 20 UI/mL em apenas 48 horas de processo. Para a condição iniciada com esporos, a atividade máxima de 15,9 UI/mL foi obtida em 96 horas de cultivo.

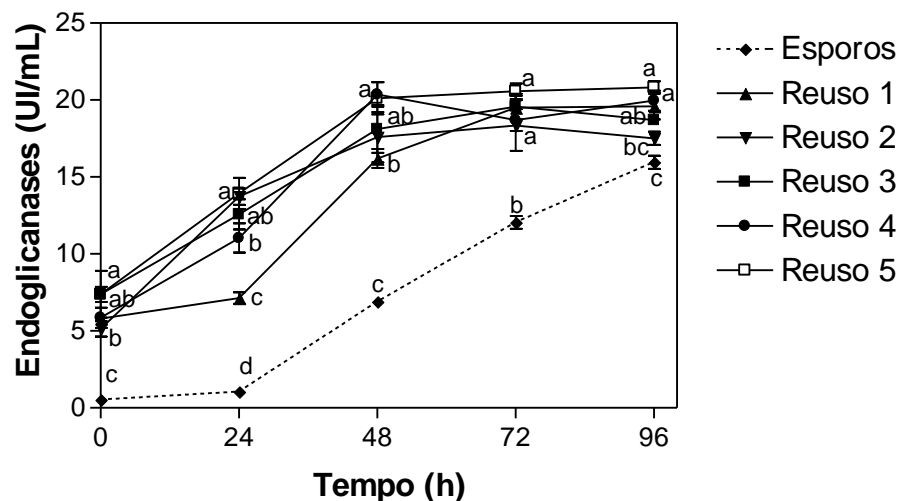


Figura 17. Atividade de endoglicanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a concentração de celulose (S_0) empregada foi de 10 g/L em todos os ensaios.

Para β -glicosidases e exoglicanases observou-se que, quanto maior o número de ciclos de reaproveitamento do micélio, maior a atividade enzimática (Figuras 18 e 19). As atividades de β -glicosidases variaram de 5,0 a 6,6 UI/mL em 96 horas de ensaio, enquanto que para a condição inoculada com esporos a atividade foi de apenas 3,0 UI/mL. Nas condições com micélio reutilizado no quarto e quinto ciclo, as atividades máximas foram obtidas em apenas 24 horas, mantendo-se constantes até o final do cultivo.

As atividades de β -glicosidases máximas obtidas durante os cultivos de reutilização do micélio foram superiores às obtidas em estudos em biorreator com agitação mecânica com a mesma linhagem de *P. echinulatum* (Reis *et al.*, 2013). Os autores verificaram valores de 5,8 UI/mL em cultivos com 60 g/L de celulose empregando o regime descontínuo alimentado. Para exoglicanases, as atividades máximas obtidas em 96 horas foram de 5,9 e 6,1 UI/mL para as condições com reuso 3 e 5, respectivamente. Estes valores foram 5 vezes maiores que as verificadas na condição inoculada com esporos (1,2 UI/mL).

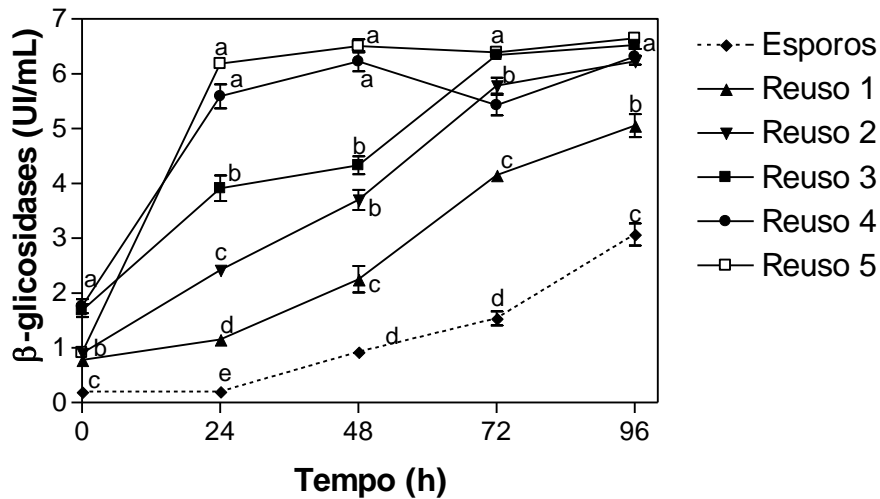


Figura 18. Atividade de β -glicosidases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a concentração de celulose (S_0) empregada foi de 10 g/L em todos os ensaios.

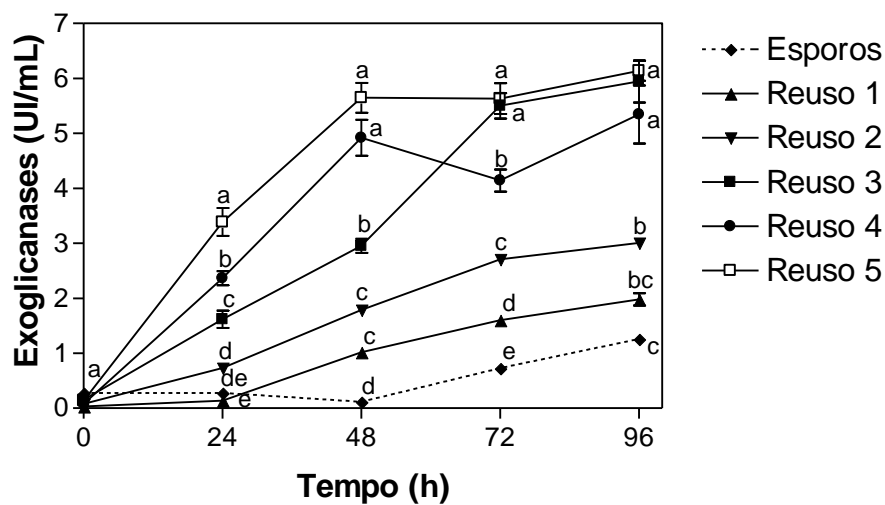


Figura 19. Atividade de exoglicanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a concentração de celulose (S_0) empregada foi de 10 g/L em todos os ensaios.

A possibilidade de reuso do micélio fúngico permite iniciar um cultivo com maior biomassa e como consequência ter aumentos nas atividades enzimáticas. A influência do tamanho do inóculo foi observado anteriormente por Maeda *et al.* (2013), que obtiveram

aumentos de 88%, 84% e 42% nas atividades de FPA, Avicelases e endoglicanases, respectivamente, aumentando o tamanho do inóculo de 5 para 10%. Os ensaios foram conduzidos em biorreator com agitação mecânica e inóculo foi pré-crescido por 72 horas em frascos Erlenmeyer. O emprego de maior inóculo antecipou em 12 horas a obtenção das atividades máximas para *P. funiculosum*. Para *P. echinulatum* também se verificou que a etapa do inóculo é fundamental na obtenção de maiores atividades enzimáticas e produtividade volumétrica.

O reaproveitamento da massa micelial também proporcionou a obtenção de maiores atividades para xilanases (Figura 20). Os maiores incrementos foram obtidos a partir do segundo ciclo de reuso do micélio e valores máximos foram entre 170 e 200 UI/mL. Para a condição que empregou esporos a atividade máxima foi de 90 UI/mL.

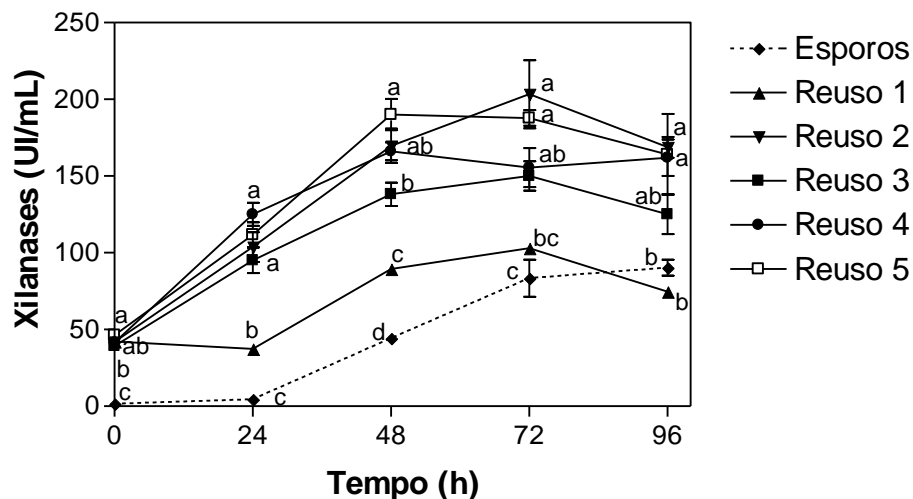


Figura 20. Atividade de xilanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após fermentação de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata e a concentração de celulose (S_0) empregada foi de 10 g/L em todos os ensaios.

Após analisar os perfis enzimáticos, verificou-se atividades de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases no início dos cultivos inoculados com a massa micelial. Possivelmente, parte das enzimas ficam retidas no substrato ou no interior do micélio após a retirada do sobrenadante, visto que a fração sólida não era lavada antes de ser inoculada. Dessa forma, as enzimas são liberadas no novo meio de cultivo. Outra explicação para as maiores atividades enzimáticas com a reutilização da biomassa fungica é de que o micélio, ao ser coletado, já se encontra em estado induzido para a secreção de enzimas.

Os perfis das atividades de endoglicanases e β -glicosidasas de *P. echinulatum*, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), indicam que a diversidade enzimática é mantida durante os ciclos de reuso da massa micelial residual (Figuras 21 e 22). Além disso, verifica-se que a intensidade da atividade de algumas enzimas aumenta, conforme os ciclos de aproveitamento. Isto comprova que o reciclo da massa micelial mantém as características do microrganismo e permite obter maiores atividades enzimáticas.

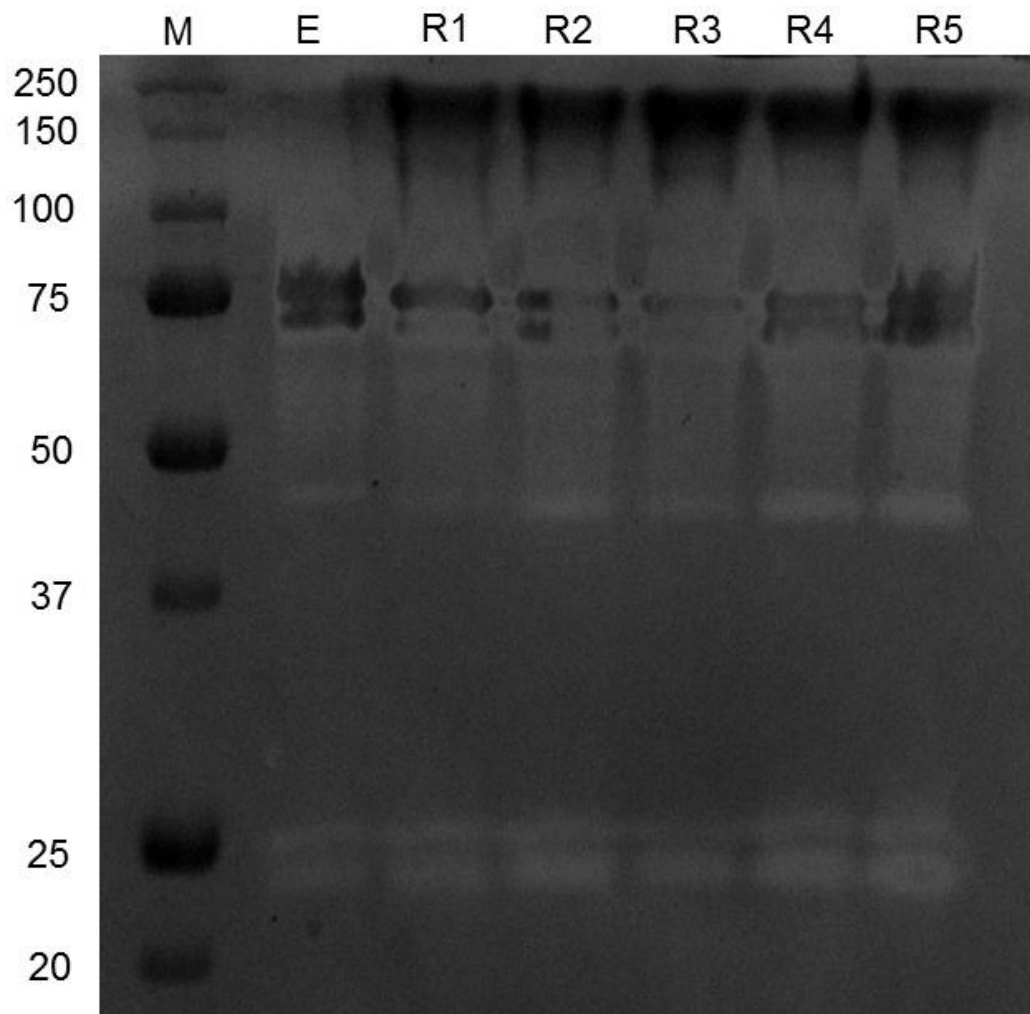


Figura 21: Perfil da atividade de endoglicanases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do filtrado enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 durante cultivos submersos de 96 horas inoculados com esporos (E) e com micélio residual (R1 a R5).

Embora o reuso de micélio para a produção de celulases e xilanases não seja relatado, este processo é amplamente empregado para leveduras durante a fermentação alcoólica (Kumar *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015). A literatura apresenta vários depósitos de patentes com reciclo de células de leveduras para a fermentação alcoólica, entre eles estão

IN2012MU01960, US4310629, BR8702590, IN2010CH0199, GB2065699, JP60087783, WO2013082682, WO 2014078924 A1 (www.inpi.gov.br). Estes documentos relatam a recuperação das células através de tanques separadores, centrífugas, emprego de leveduras imobilizadas ou de leveduras floculantes que decantam e são recuperadas. Nestes processos, as células precisam ser reativadas e reatores em série são empregados.

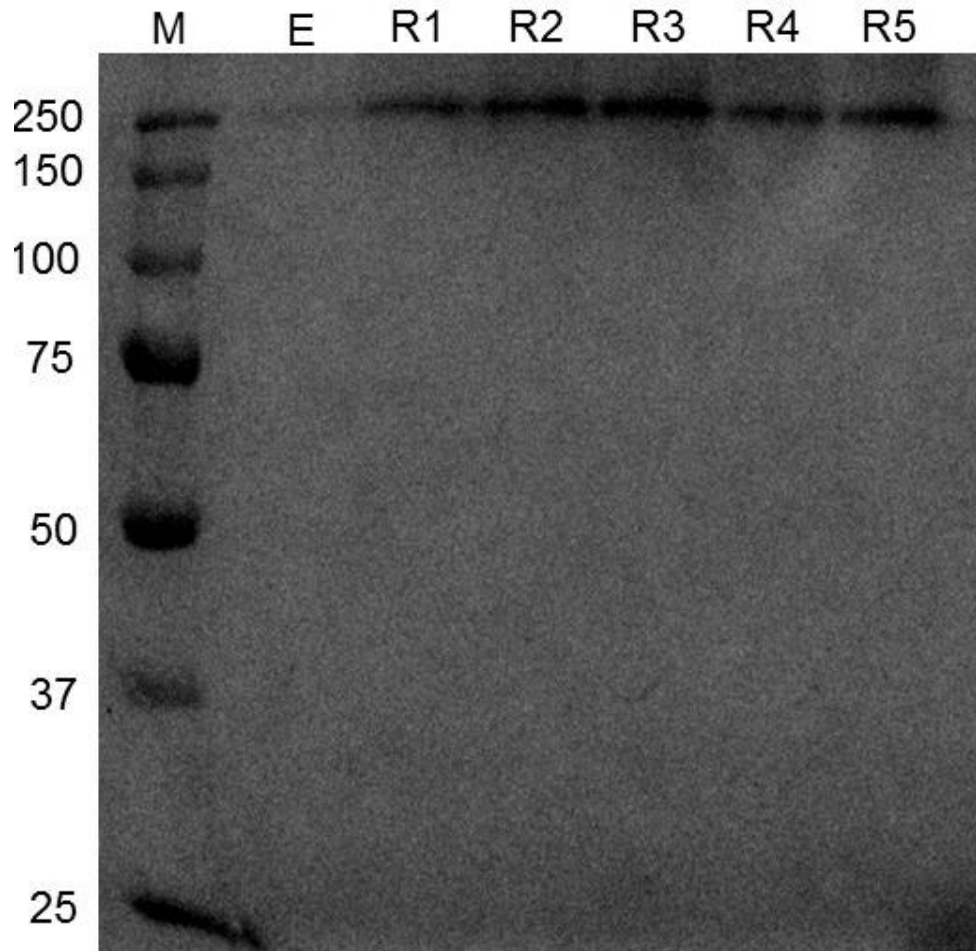


Figura 22. Perfil da atividade de β -glicosidases separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtido a partir do filtrado enzimático produzido por *Penicillium echinulatum* S1M29 durante cultivos submersos de 96 horas inoculados com esporos (E) e com micélio residual (R1 a R5).

O reaproveitamento do micélio fúngico residual demonstra ser um procedimento técnico que contribui na redução dos custos de produção das celulases e xilanases, pois além de ser um processo que reutiliza a massa micelial, proporciona produção das enzimas lignocelulolíticas em menor tempo de processo, apresentando atividades superiores já em 24 horas de cultivo, o que leva à maior produtividade volumétrica quando comparado à condição

inoculada com esporos (Figura 23). Entre outras vantagens desta técnica, destacam-se o reaproveitamento do meio de cultivo residual e a recuperação de enzimas que ficam adsorvidas no micélio ou até mesmo na celulose residual.

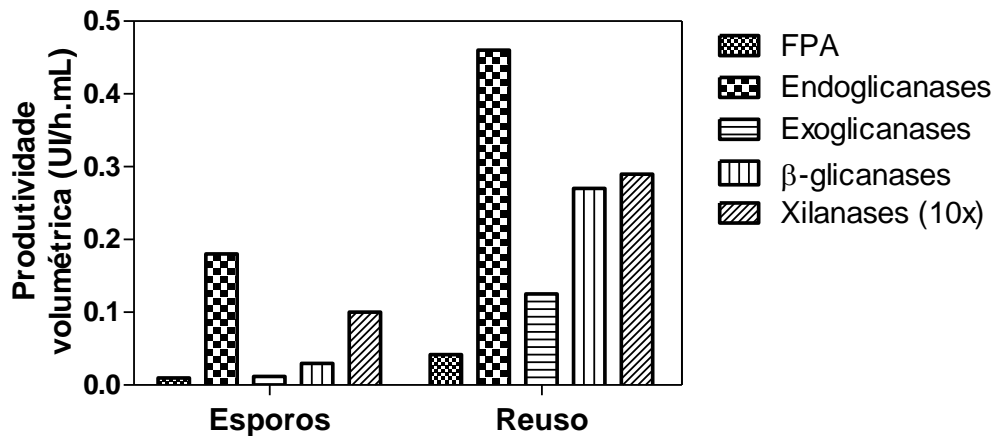


Figura 23. Produtividade volumétrica de celulases e xilanases durante experimentos com reutilização da massa micelial após cultivo de 96 horas, empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. Após inóculo com esporos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, o emprego da massa micelial residual foi avaliada em cinco ciclos. A produtividade volumétrica foi calculada a partir da atividade enzimática máxima obtida no cultivo com esporos e nos cultivos com reuso de micélio.

A reutilização de massa micelial poderia ser empregada tanto em regime descontínuo como em descontínuo alimentado e em diferentes tanques de produção de enzimas. Além disso, sugere-se que o micélio está sempre ativo, pois, como demonstrado por Righelato *et al.* (1968) o envelhecimento não é controlado pela idade do micélio, mas sim pela quantidade de energia disponível. Os autores identificaram que a concentração de glicose mínima para a manutenção do metabolismo básico era de 0,022 g/g de micélio seco, abaixo dessa quantidade inicia a autólise celular. Dessa forma, a lise da biomassa é determinada pelas condições do cultivo. Sendo assim, no presente trabalho, o reaproveitamento da massa micelial manteve o metabolismo do microrganismo eficaz por no mínimo cinco ciclos, devido a renovação do meio de cultivo.

Um dos fatores limitantes do reuso de micélio para a produção de celulases poderia ser a contaminação por outros microrganismos ou a desintegração do micélio; entretanto, nas condições avaliadas, estes aspectos negativos não foram observados. Sugere-se que a fase ácida nas primeiras 24 horas de crescimento impede o desenvolvimento de contaminantes no

sistema e a renovação do meio de cultivo em até 96 horas de processo evita a degradação celular.

4.4 Desenvolvimento de um sistema automático para adições de celulose em cultivos durante regime descontínuo alimentado

O regime descontínuo alimentado (RDA) se destaca por proporcionar incrementos na atividade enzimática, sem aumentar os gastos com substâncias indutoras, quando comparado ao regime descontínuo (RD). Como já descrito para *T. reesei*, menores intervalos de adição de celulose, resultam em maiores títulos enzimáticos (Hendy *et al.*, 1984; Watson *et al.*, 1984). Para *P. echinulatum*, também foi demonstrado, em estudos prévios, que a alimentação do substrato indutor proporciona a obtenção de maiores atividades de celulases e xilanases (Reis *et al.*, 2013). Em vista disto, desenvolveu-se um sistema que adiciona celulose automaticamente ao biorreator em períodos programados por um temporizador digital.

O alimentador automático foi proposto para viabilizar o RDA, principalmente quando este é submetido a pequenos intervalos de alimentação, como por exemplo de hora em hora ou a cada 30 minutos. Este sistema também diminui os riscos de contaminação, pois há menor manipulação manual no processo. O sistema é composto por um cilindro de inox com uma rosca transportadora na sua base conectada num motor elétrico que, quando acionado, movimenta mecanicamente a rosca (Figura 24). Na parte central do cilindro há um eixo de mistura que também está ligado a um motor elétrico. Este é acionado no momento em que a rosca transportadora recebe a força mecânica para empurrar a celulose até a saída do alimentador para o biorreator. Este eixo misturador foi projetado para impedir que a celulose se acomode no interior do sistema, evitando assim, a compactação.

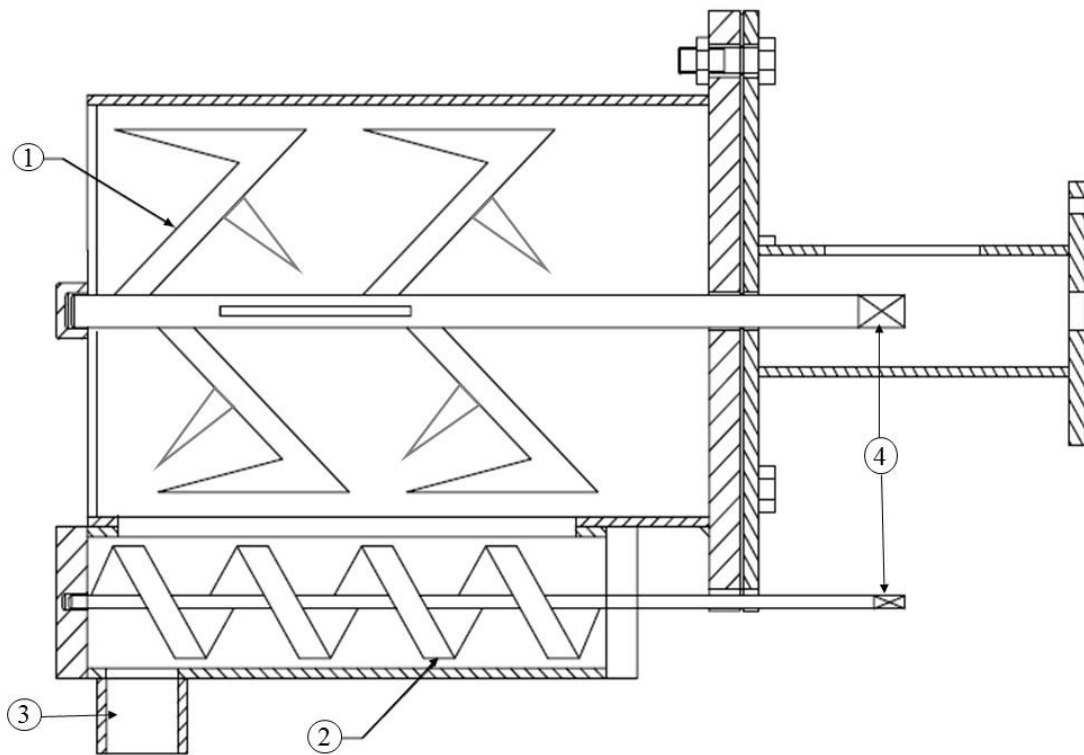


Figura 24. Desenho do alimentador com corte longitudinal demonstrando a disposição do eixo de mistura (1) e da rosca transportadora (2) no interior do cilindro de inox. O número três (3) corresponde à saída da celulose para o biorreator e o quatro (4), local onde os motores elétricos são conectados.

Os motores elétricos são do tipo motor universal de 12 Volts (V) com redução e estão conectados a um temporizador digital INV-31101 (Inova[®]), o qual pode ser programado para ligar e desligar o trabalho do alimentador em horas, minutos ou segundos. Para evitar a entrada de umidade do biorreator no alimentador automático de celulose e como consequência a formação de blocos compactos de celulose umida, foi instalada uma resistência elétrica para manter a saída da celulose em torno de $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. A resistência envolve a parte externa da conexão entre o biorreator e o alimentador, aquecendo apenas a celulose próxima da saída do sistema de alimentação (Figura 25).

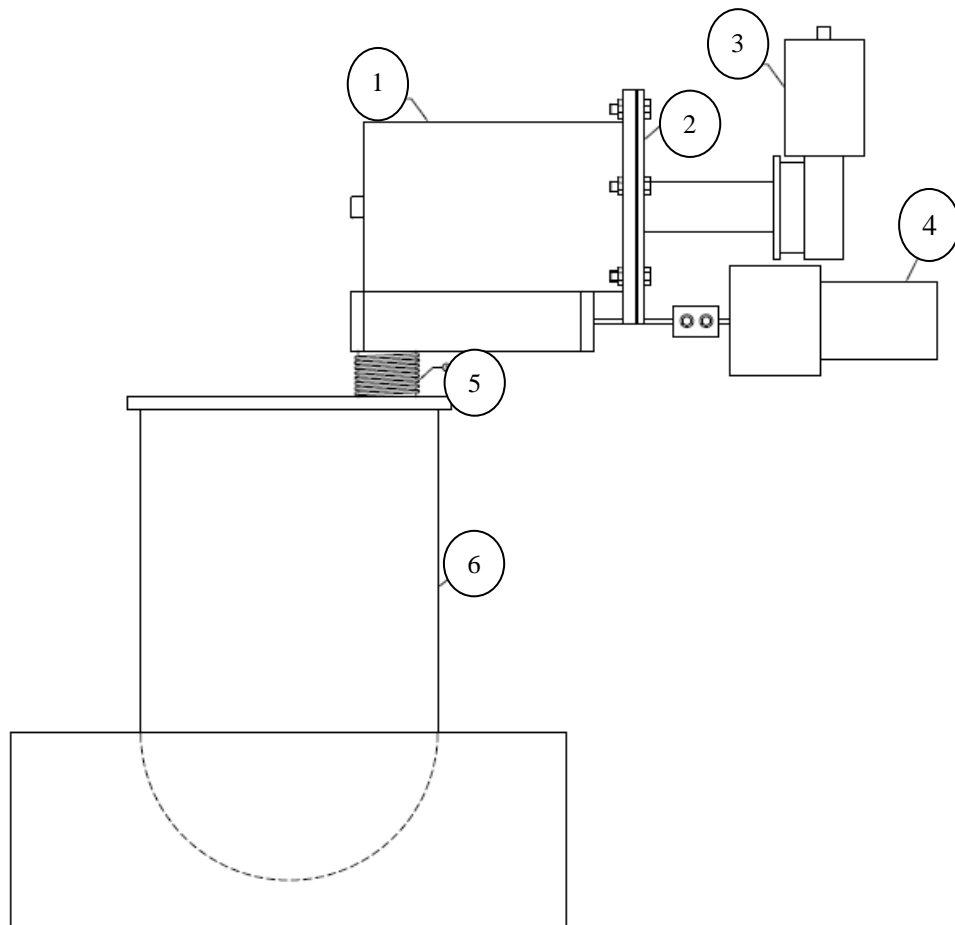


Figura 25. Representação do sistema empregado nos cultivos em regime descontínuo alimentado. (1) alimentador conectado ao biorreator; (2) tampa de vedação do cilindro de inox; (3) e (4) motores elétricos do sistema; (5) resistência elétrica que envolve a parte externa da comunicação entre alimentador e biorreator; (6) biorreator.

O alimentador é de fácil montagem e é sustentado por um suporte móvel que pode ser fixado na bancada do biorreator. Ele apresenta anéis o-ring entre a tampa e o cilindro para a vedação e pode ser autoclavado para eliminar contaminantes. Por ele ser todo de aço inoxidável, a limpeza do equipamento é facilitada.

Neste trabalho, o intervalo utilizado entre as alimentações foi de uma hora. Maiores intervalos não foram testados, pois observou-se, em testes preliminares, que o aumento no tempo de espera para cada alimentação acarretava na absorção de umidade do biorreator pela celulose acumulada na saída do alimentador, o que ocasiona entupimento do sistema. O tempo de acionamento do alimentador foi fixado em segundos, sendo que a cada um segundo de trabalho uma quantidade de $0,65 \pm 0,5$ gramas de celulose eram adicionados ao biorreator.

Na literatura, ainda não há registros de um sistema que adicione automaticamente celulose ou outros substratos insolúveis ao biorreator durante o RDA. Trabalhos publicados

que relatam alimentações durante cultivos de produção de enzimas lignocelulolíticas empregam intervalos maiores entre cada alimentação (Fang *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013) ou utilizam substratos insolúveis (Fang & Xia, 2015), sendo que as adições nestes trabalhos foram realizadas manualmente.

A obtenção do alimentador automático de celulose resultou num Modelo de Utilidade junto ao INPI-Instituto Nacional da Propriedade Intelectual, sob número de Processo: BR 10 2016 028777 4 (07/12/2016).

4.5 Seleção do tempo de início de adição da celulose durante o regime descontínuo alimentado empregando o alimentador automático

Em estudos anteriores realizados com a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* empregando o regime descontínuo alimentado (RDA), o início da alimentação ocorria a partir de 48 horas de cultivo e o processo se iniciava com 10 g/L de celulose (Reis *et al.*, 2013). No presente trabalho, avaliou-se três condições distintas, em que a alimentação iniciava a partir do tempo zero, ou 24 e ou 48 horas de cultivo. O término da alimentação foi em 108 horas para todas as condições testadas e a alimentação do substrato ao biorreator foi de $0,65 \pm 0,5$ gramas de celulose por segundo. Considerando-se o volume de 5 litros do biorreator, a velocidade de alimentação foi de $0,13 \pm 0,01$ g/L de celulose por segundo. Na Tabela 4 pode-se observar as variáveis empregadas durante os cultivos com os diferentes tempos de início da alimentação.

Tabela 4. Parâmetros utilizados durante ensaios em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando *Penicillium echinulatum* S1M29, para selecionar o tempo de início da alimentação da celulose (S).

RDA	Início alimentação (h)	S_0 (g/L)	Celulose equivalente (g/L)	Tempo de adição (s)	Término da alimentação (h)
1	0	5	35	2	108
2	24	5	30	2	108
3	48	10	40	4	108

No RDA 3, com início da alimentação em 48 horas de cultivo, empregou-se uma maior concentração inicial de celulose e maior tempo de trabalho do alimentador em cada intervalo, pois como o período de alimentação seria menor, de 48 a 108 horas, a concentração

da celulose final seria muito inferior aos demais experimentos. A Figura 26A apresenta a variação da concentração de celulose durante as três diferentes condições de RDA, utilizando o alimentador automático. Pode-se observar no RDA 3 que o consumo da celulose, apesar de lento, se inicia antes das primeiras 16 horas de cultivo e após 24 horas, quando a sacarose é totalmente consumida (Figura 26B), há um aumento no consumo. Reis *et al.* (2013) também verificaram que a sacarose é consumida em até 24 horas de cultivo.

Nos ensaios onde a alimentação se inicia logo no início do cultivo e com menor tempo de alimentação, a concentração da celulose permanece constante durante todo o experimento, variando entre 5 e 10 g/L. Este comportamento não pode ser observado no RDA 3, pois em 48 horas de processo, grande parte da celulose já havia sido consumida e quando a alimentação iniciou, houve um aumento na concentração de celulose no biorreator de 3,6 g/L em 48 horas para 16,2 g/L em 96 horas (Figura 26A).

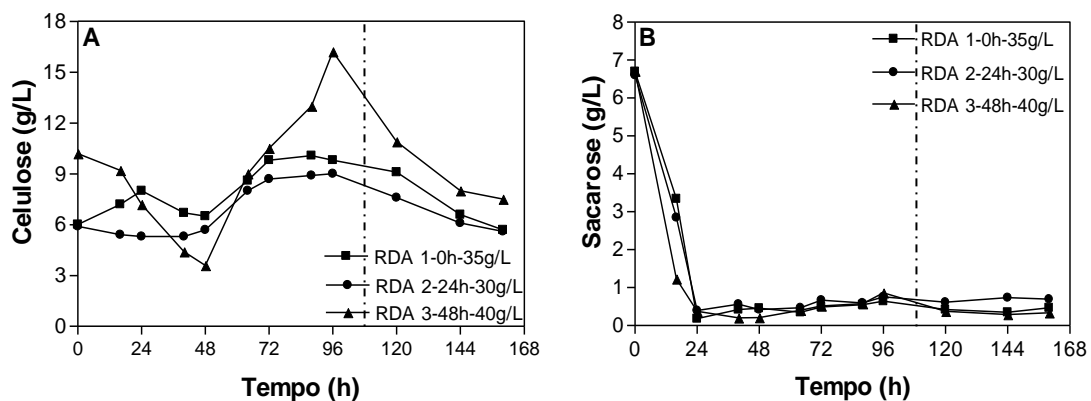


Figura 26. Concentração de celulose (A) e sacarose (B) durante ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A linha tracejada no gráfico indica o término da alimentação. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

O perfil da concentração dos açúcares redutores (AR) foi semelhante em todas as condições avaliadas, sendo que maiores valores de AR são verificados no início do cultivo, devido aos componentes do meio (Figura 27A). O RDA 3 apresentou uma menor concentração de AR entre as 24 e 48 horas de cultivo, pois neste intervalo observou-se o maior consumo da celulose inicial e as adições do substrato iniciaram após este período. Durante os distintos RDA, verificou-se que as concentrações de AR permaneceram em torno de $0,5 \pm 0,2$ g/L durante as alimentações. Estes dados demonstram que o RDA mantém os

níveis de glicose baixos e, segundo Ma *et al.* (2013), a concentração de açúcares redutores menor que 2,5 g/L não desencadeia a inibição da síntese das celulases.

A manutenção do oxigênio dissolvido (O_2) em torno de 30% da saturação foi mantida com aumento da agitação mecânica do biorreator e/ou com aumento do suprimento de ar comprimido (0,5 e 0,8 vvm). A frequência da agitação variou entre 150 e 275 rpm (Figura 27B), sendo que maiores frequências foram necessárias nas primeiras 24 horas de cultivo. Possivelmente, neste período ocorre o rápido crescimento do microrganismo, visto que a sacarose é totalmente consumida em até 24 horas de processo. Entretanto, no RDA 3, o emprego das maiores frequências de agitação, após 48 horas de cultivo, foi imprescindível para manter o oxigênio dissolvido em 30% da saturação. A demanda por maiores agitações ocorreu devido ao acúmulo de celulose no meio de cultivo, que foi adicionada numa maior concentração em relação aos RDA 1 e 2.

Reis *et al.* (2013) durante estudos em RDA com *P. echinulatum* (S1M29), verificaram que o oxigênio dissolvido no início do cultivo é em torno de 90% da saturação e após 12 horas de processo, o valor é reduzido para 30%. Assim, como no presente trabalho, os autores aumentaram a frequência dos agitadores até as 24 horas de processo e também constaram que quanto maior a concentração de celulose adicionada, maior é agitação necessária para a manutenção dos 30% da saturação de oxigênio.

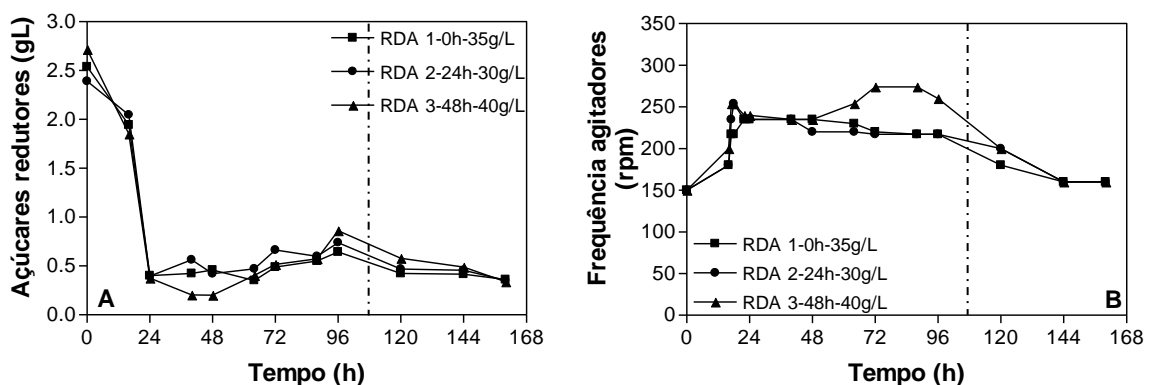


Figura 27. Concentração de açúcares redutores (A) e frequência de agitadores (B) durante ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A linha tracejada no gráfico indica o término da alimentação. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

Ao avaliar a concentração final do substrato indutor, esperava-se que o RDA 3 proporcionasse a maior atividade enzimática, visto que o aumento na concentração da celulose pode aumentar a atividade enzimática para *P. echinulatum* (Reis *et al.*, 2013). No

entanto, as atividades foram semelhantes e até inferiores aos ensaios que totalizaram quantidades menores de celulose ao final do cultivo (Figura 28A-D). Pereira *et al.* (2013) comparam as atividades de FPA obtidas com *P. echinulatum* em RDA, com concentração de 31 e 49 g/L de celulose equivalente. Esses autores também observaram maiores atividades no RDA que empregou a menor concentração de substrato e sugerem que a repressão catabólica pode ter interferido na produção de celulases no RDA com a maior concentração de celulose.

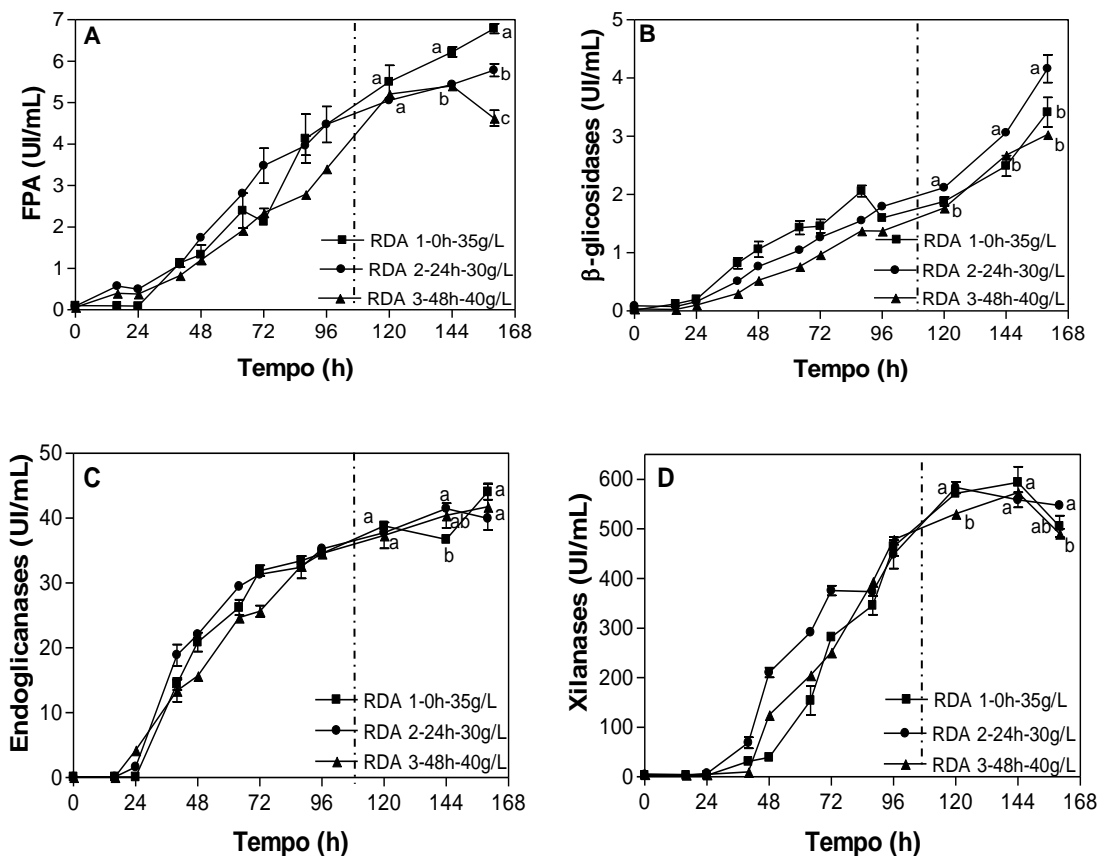


Figura 28. Atividades enzimáticas de FPA (A), β -glicosidases (B), endoglicanases (C) e xilanases (D) durante ensaios conduzidos em regime descontínuo alimentado (RDA) empregando a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*. A linha tracejada no gráfico indica o término da alimentação. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

O perfil da atividade enzimática obtido durante os três experimentos foi semelhante em quase todos os períodos de amostragem (Figura 28A-D). As atividades máximas de FPA foram obtidas em 160 horas de cultivo no RDA 1, com valores de 6,8 UI/mL (Figura 28A). Essas atividades foram superiores às obtidas por Pereira *et al.* (2013) para a linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* em RDA. Os autores avaliaram o RDA para a celulose, empregando 10 g/L de substrato inicial, e as alimentações foram realizadas em diferentes horários. As atividades

máximas obtidas foram de 1,5 e 1,4 UI/mL para as condições que totalizaram 31 g/L (alimentações: 29 e 54 horas) e 49 g/L (alimentações: 43, 69, 94 e 143 horas) de celulose, respectivamente. Possivelmente, o maior intervalo entre cada alimentação no trabalho de Pereira *et al.* (2013) deve ter prejudicado a produção de enzimas no RDA.

O RDA 2 proporcionou as maiores atividades de β -glicosidases (4,2 UI/mL) em 168 horas, sendo que este foi o cultivo que empregou a menor concentração de celulose final (Figura 28B). Estes dados estão de acordo com os obtidos por Reis *et al.* (2013) para a mesma linhagem de *Penicillium*. Os autores obtiveram atividades de 4,8 e 4,5 UI/mL para os processos de RDA que totalizaram 20 e 40 g/L de celulose, respectivamente. Entretanto, quando 60 g/L de celulose foi empregada, maiores atividades (5,8 UI/mL) foram verificadas no final do processo (168 horas).

As máximas atividades de endoglicanases e xilanases foram de 44 e 595 UI/mL, respectivamente, para o RDA 1. Porém, estes valores foram muito semelhantes aos obtidos no RDA 2 e 3 (Figura 28C-D). Estas atividades foram superiores às verificadas por Reis *et al.* (2013) durante alimentações de celulose a cada 12 horas de cultivo, que totalizaram 40 g/L de substrato ao final do processo. A celulose inicial foi de 10 g/L e as atividades máximas foram de 37,3 e 177 UI/mL para endoglicanases e xilanases, respectivamente.

A análise destes resultados permite concluir que as adições com o substrato indutor podem ser realizadas a partir do início do cultivo, desde que a velocidade de alimentação seja reduzida, em torno de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h. Como verificado na condição do RDA 3, as alimentações de $0,52 \pm 0,04$ g/L/h de celulose parecem ter interferido negativamente na produção de celulasas e xilanases, resultando em menores rendimentos. Um dos motivos para a diminuição da atividade enzimática pode ser a existência de inativação da enzima pela agitação, conforme sugerido por Reese & Ryu (1980), Ganesh *et al.* (2000) e Gunjekar *et al.* (2001), pois quanto maior a concentração de celulose adicionada a cada hora, maior foi a agitação necessária para manter a saturação de oxigênio em torno de 30% (Figura 27B). Outra explicação para a diminuição da atividade enzimática durante o cultivo é que as enzimas podem ficar adsorvidas na celulose, conforme relatado por Velkovska *et al.* (1997) e Bansal *et al.* (2009).

A adição de maiores concentrações de celulose ao meio de cultivo ocasiona problemas de reologia, decorrentes da homogeneização do meio, aeração e agitação, sendo que estes fatores influenciam a transferência de oxigênio. No entanto, quando a celulose é adicionada intermitentemente, a reologia do meio é favorecida, com consequentes mudanças na transferência de oxigênio, o que pode ser comprovado com os dados de agitação empregada

em RD e RDA, apresentados na Tabela 5. Ao comparar as atividades obtidas no RDA com as obtidas no RD 40 g/L, verifica-se que, independente da estratégia de adição da celulose empregada, maiores atividades enzimáticas são obtidas no RDA, comprovando mais uma vez a importância desse processo.

Tabela 5. Comparativo das atividades enzimáticas obtidas durante ensaios em regime descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA) em biorreator com agitação mecânica empregando *Penicillium echinulatum* S1M29.

Processo do cultivo	Frequência agitadores (máx-rpm)	FPA (UI/mL)	Endoglicanases (UI/mL)	β -glicosidases (UI/mL)	Xilanases (UI/mL)
RD 40 g/L	300	3,3	33,0	3,0	290,0
RDA 1-0h-35 g/L	235	6,8	44,0	3,4	595,0
RDA 2-24h-30 g/L	255	5,9	41,0	4,2	572,0
RDA 3-48h-40 g/L	275	5,4	40,0	3,1	580,0

RD: Regime descontínuo

RDA: Regime descontínuo alimentado

Ma *et al.* (2013) realizaram estudos em RD com 50 g/L de celulose microcristalina e verificaram que 30 g/L da celulose era consumida em até 30 horas de cultivo pelo fungo *T. reesei* RUT-C30. Com isto, a proposta dos autores para o RDA foi de iniciar o experimento com 30 g/L e adicionar 20 g/L parceladamente ao meio a partir das 30 horas. Com esta estratégia, os autores obtiveram 82% de aumento nas atividades de FPA. No presente trabalho, a atividade de FPA aumentou em 106%, quando a adição da celulose foi realizada a partir do tempo inicial de cultivo (Tabela 5). Indubitavelmente, a condução do processo em RDA leva ao aumento dos níveis de expressão das enzimas que degradam o complexo hemicelulósico, em particular as atividades FPásica e xilanásica.

4.6 Aumento da concentração de celulose em regime descontínuo alimentado visando obter incrementos nas atividades de celulasas e xilanases

O aumento na concentração de celulose durante o regime descontínuo alimentado (RDA) para *P. echinulatum* foi avaliado em três experimentos distintos. Todos os experimentos iniciaram com $S_0 = 5$ g/L de celulose e as alimentações foram programadas desde o tempo zero, com intervalo de uma hora. As concentrações de celulose equivalentes

empregadas, a velocidade de alimentação, bem como o término das adições podem ser visualizados na Tabela 6.

O perfil do consumo da celulose (Figura 29A) durante os experimentos indica que, quando a velocidade de alimentação do substrato é maior que $0,26 \pm 0,02$ g/L/h, a celulose tende a acumular-se no meio de cultivo. Nesta condição, a entrada de celulose se equilibra com o consumo do substrato, logo no início do cultivo. No experimento com adições de $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose, verifica-se que a concentração do substrato no meio ultrapassa os 15 g/L, valores que podem interferir na atividade enzimática, conforme já verificado para *P. echinulatum* no item 4.5.

Tabela 6. Parâmetros utilizados durante ensaios em regime descontínuo alimentado (RDA) com diferentes concentrações de celulose, empregando *Penicillium echinulatum* S1M29. A concentração de celulose inicial foi de $S_0 = 5$ g/L em todos os experimentos.

RDA	Celulose equivalente (g/L)	Tempo de adição (s)	Término da alimentação (h)	Velocidade de alimentação (g/L/h)
1	40	2	144	$0,26 \pm 0,02$
2	60	2	192	$0,26 \pm 0,02$
3	60	3	144	$0,39 \pm 0,03$

As maiores atividades de endoglicanases foram obtidas nos experimentos com a menor velocidade de alimentação ($0,26 \pm 0,02$ g/L/h), entretanto, o incremento na massa de celulose, adicionada em maior tempo de processo, não aumentou proporcionalmente as atividades para esta enzima (Figura 29B). As atividades máximas de endoglicanases foram de 97 e 116 UI/mL para as condições com 40 e 60 g/L de celulose equivalente, respectivamente, durante o RDA com alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h. Em comparação com o experimento que também totalizou 60 g/L, porém a celulose adicionada numa maior velocidade ($0,39 \pm 0,03$ g/L/h), a atividade enzimática reduziu em torno de 50% (59 UI/mL).

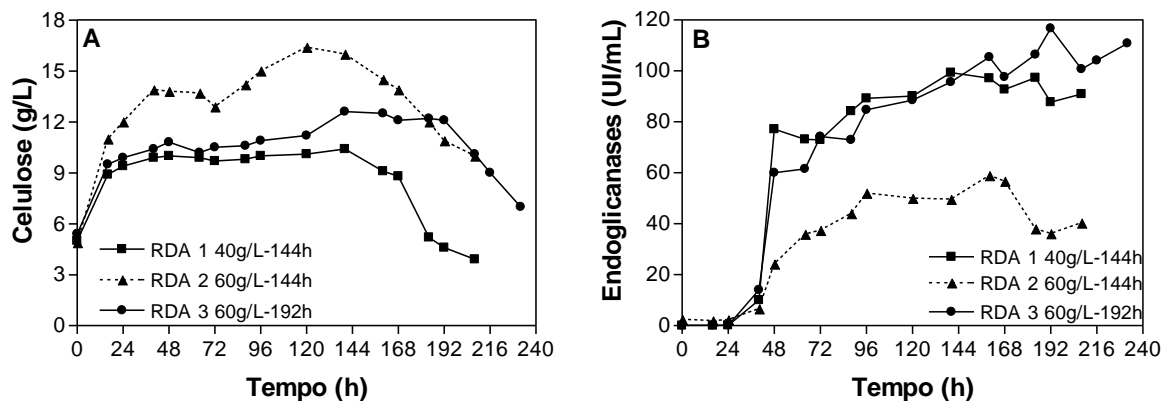


Figura 29. Concentração de celulose (A) e atividade de endoglicanases (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontínua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

As atividades de endoglicanases obtidas no presente trabalho foram as maiores entre às descritas para o gênero *Penicillium* (Belghith *et al.*, 2001; Krogh *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2013; Singhvi *et al.*, 2011). Entretanto, para outros fungos, atividades superiores já foram relatadas, como no trabalho de Hidenó *et al.* (2009) com *A. cellulolyticus*, em que valores de 353 UI/mL foram obtidas com palha de arroz pré-tratada e no trabalho de Saqib *et al.* (2010) com *A. fumigatus*, onde foram obtidas 321 UI/mL em meios contendo palha de trigo.

As maiores atividades de FPA também foram obtidas nos experimentos com a menor velocidade de alimentação ($0,26 \pm 0,02$ g/L/h). Para o ensaio que totalizou 40 g/L de celulose, a atividade máxima foi de 11,5 UI/mL em 168 horas de cultivo, 24 horas após o término da alimentação. Para o RDA com celulose equivalente a 60 g/L, a obtenção da atividade máxima foi em 216 horas de experimento, com atividades de 14 UI/mL (Figura 30A). Estes valores foram obtidos 24 horas após o término da alimentação (192 horas).

Em trabalhos com *T. reesei* RUT-C30, Watson *et al.* (1984) empregaram uma velocidade de alimentação de 0,25 g/L/h, semelhante à utilizada no presente trabalho, entretanto a concentração final de celulose foi maior (70 g/L) e a atividade máxima foi obtida em torno das 260 horas de cultivo. O pico enzimático obtido pelos autores foi mais tardio, possivelmente devido à alimentação ter iniciado apenas em 42 horas de cultivo e a atividade de FPA foi de 15,5 UI/mL, valor próximo ao obtido para *P. echinulatum* no RDA com 60 g/L de celulose.

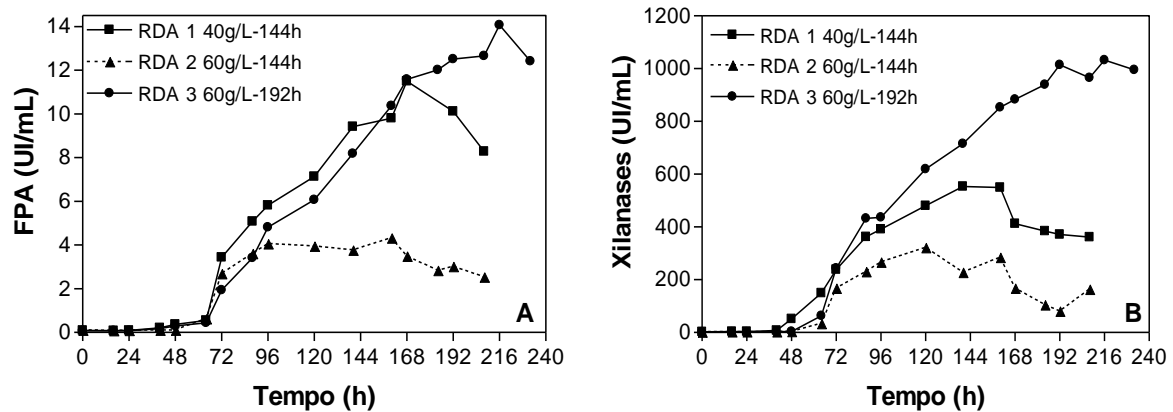


Figura 30. Atividades de FPA (A) e xilanases (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontinua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

Após o pico enzimático de FPA, inicia-se uma diminuição na atividade enzimática, embora o meio ainda conter celulose. Sugere-se que neste momento tenha ocorrido uma diminuição da fonte de nitrogênio, pois enquanto a celulose é adicionada, verifica-se diminuição nos valores do pH e conseqüente adição de $(\text{NH}_4)\text{OH}$. Após o término da alimentação, queda nos valores de pH não são mais observados, desta forma, a adição da fonte de nitrogênio por $(\text{NH}_4)\text{OH}$ também cessa, podendo afetar a produção enzimática, visto que não há suplementação de outras fontes de nitrogênio durante o processo. Sternberg & Dorval (1979) já demonstraram que quando maiores concentrações de celulose são empregadas, maior é o requerimento de nitrogênio.

A atividade de 14 UI/mL para FPA obtida neste trabalho foi a maior entre as descritas para *P. echinulatum* (Tabela 7). Ao comparar os resultados de FPA obtidos com outros estudos em RDA publicados na literatura (Tabela 7), verifica-se que a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* apresenta grande potencial de produção de celulases em RDA.

Em estudos com RDA empregando *T. reesei* RUT-C30, Hendy *et al.* (1984) verificaram que maiores adições de celulose (*Solka Floc*[®]) resultaram em maiores títulos enzimáticos. Neste trabalho, os autores observaram que a concentração de celulose não ultrapassava o valor de 20 g/L após cada alimentação, e atividades de 10, 20 e 30 FPU/mL foram obtidas com o emprego de 50, 100 e 150 g/L de celulose equivalente, respectivamente, em cultivos de 240 horas. Para *P. echinulatum*, o aumento na concentração de celulose alimentada a cada hora, não foi tão benéfica para a produção enzimática, visto que a atividade

de FPA chegou a reduzir 70% quando a adição de celulose foi realizada numa maior velocidade ($0,39 \pm 0,03$ g/L/h).

Tabela 7. Comparação das atividades enzimáticas (FPA) obtidas em regime descontínuo alimentado com diferentes fungos e substratos.

Microrganismo	Substrato	FPA (UI/mL)	Referência
<i>A. cellulolyticus</i> C-1	<i>Solka Floc</i> (50 g/L)	34,6	Fang <i>et al.</i> (2009)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E</i> [®] (60 g/L)	14	Presente trabalho
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok E</i> [®] (40 g/L)	8,3	Reis <i>et al.</i> (2013)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	<i>Celuflok 200TM</i> [®] (49 g/L)	1,4	Pereira <i>et al.</i> (2013)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (46 g/L)	3,7	Pereira <i>et al.</i> (2013)
<i>P. occitanis</i> Pol6	<i>Avicel PH 101</i> [®] (>100 g/L)	23	Belghith <i>et al.</i> (2001)
<i>T. reesei</i> QM6a	Celulose hidrolisada (120 g/L)	11,8	Allen & Roche (1989)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Celulose (42 g/L)	3,2	Ghose & Sahai (1979)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Polpa de madeira (250 g/L)	57	Watson <i>et al.</i> (1984)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc BW 200</i> [®] (100 g/L)	26,2	Hendy <i>et al.</i> (1984)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Solka Floc</i> [®] (80 g/L)	31	McLean & Podruzny (1985)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Celulose (80 g/L)	19,07	Ma <i>et al.</i> (2013)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	<i>Avicel</i> [®] (80 g/L)	16,3	Li <i>et al.</i> (2013)
<i>T. reesei</i> RUT-C30	Resíduo de milho fermentado (53 g/L)	1,9	Ximenes <i>et al.</i> (2007)

A adição de menores quantidades de celulose a cada hora durante o RDA, favoreceu as atividades de xilanases e valores máximos de 1.030 UI/mL foram obtidos em 216 horas de cultivo para o RDA que totalizou 60 g/L (Figura 30B). O RDA que totalizou 60 g/L de celulose na maior velocidade de alimentação, apresentou a atividade xilanásica reduzida em 70%. A indução da produção de xilanases pela celulose *Celuflok E*[®] ocorre devido a este substrato conter hemicelulose em sua composição, conforme já descrito por Zampieri (2015). Além disso, a presença de celulose pode não só induzir celulasas como também xilanases, pois a regulação de celulasas está associada à de xilanases (Aro *et al.*, 2001).

As atividades de xilanases máximas obtidas no presente trabalho são superiores às descritas para outras espécies de *Penicillium* em cultivo submerso, conforme referenciadas em

Hansen *et al.* (2015). A presença de atividade xilanásica nos coquetéis enzimáticos é muito importante durante a hidrólise enzimática, pois como demonstrado por Cianchetta *et al.* (2012) as xilanases melhoraram significativamente o desempenho das celulases durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica e são fatores limitantes quando se trata de substratos recalcitrantes, materiais sem pré-tratamento.

Para β -glicosidases e exoglicanases as maiores atividades obtidas foram no ensaio que totalizou 60 g/L de celulose adicionada numa velocidade de alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e valores de 4,7 e 10,8 UI/mL, respectivamente, foram verificados em 216 horas de cultivo (Figura 31A-B). O maior acúmulo de celulose durante o cultivo, também não foi favorável para estas enzimas. Li *et al.* (2013) obtiveram atividades de β -glicosidases de 4,5 UI/mL com *T. reesei* em menor tempo de processo (135 horas), no entanto, a concentração de celulose equivalente empregada no RDA foi maior, totalizando 80 g/L.

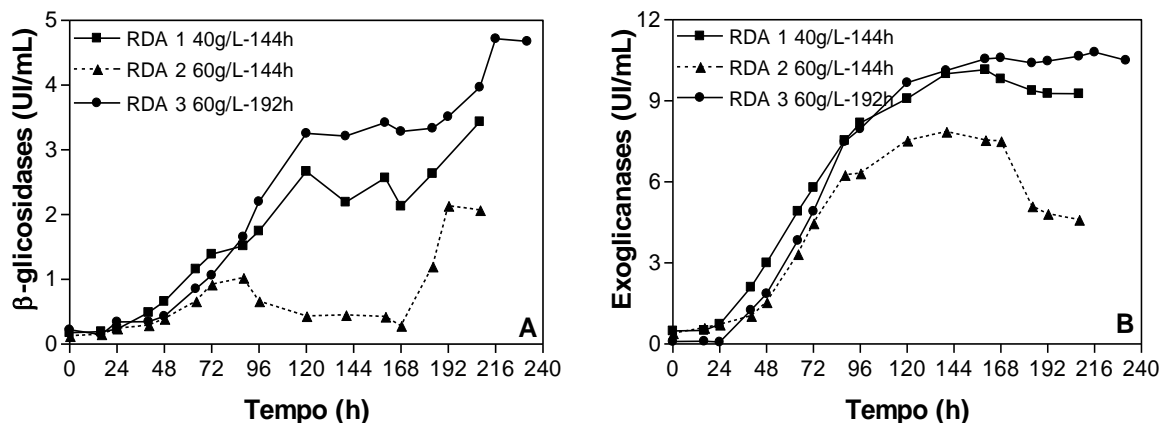


Figura 31. Atividades de β -glicosidases (A) e exoglicanases (B) durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontínua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

A partir destes resultados, conclui-se que a alimentação não deve ser superior a $0,26 \pm 0,02$ g/L/h de celulose, pois adições acima destes valores interferem negativamente na produção de todas as enzimas avaliadas, como já discutido no item 4.5. O acúmulo da celulose no experimento com a maior velocidade de alimentação ($0,39 \pm 0,03$ g/L/h) aumentou a viscosidade do meio, acarretando no aumento da agitação (Figura 32) e, conseqüentemente, na redução das atividades enzimáticas.

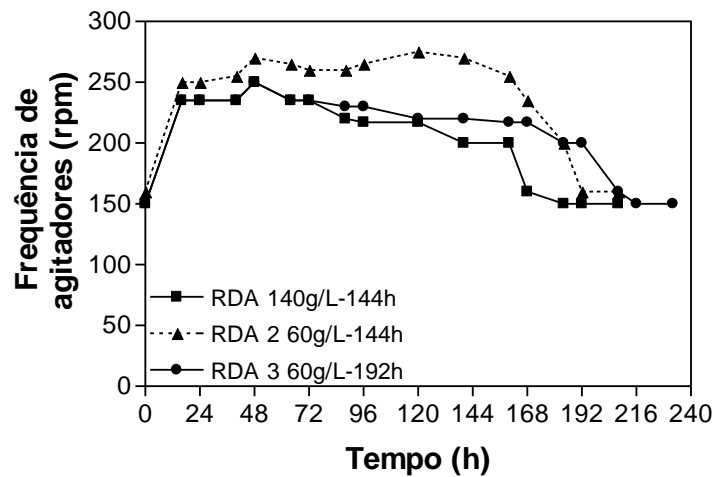


Figura 32. Frequência dos agitadores durante cultivos com *Penicillium echinulatum* S1M29, alimentados a cada hora de cultivo empregando alimentador automático de celulose. A linha contínua indica alimentação de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h e a linha descontinua, $0,39 \pm 0,03$ g/L/h de celulose. Os resultados foram obtidos a partir de um único experimento.

A análise dos resultados, nas condições testadas, também permite sugerir que a concentração máxima de celulose equivalente seja em torno de 60 g/L, pois acima desta concentração o tempo de cultivo acaba sendo prolongado, o que diminui a produtividade do processo, como pode ser visualizado para FPA e exoglicanases (Tabela 8).

Tabela 8. Produtividade volumétrica de celulasas e xilanases obtidas em regime descontinuo alimentado (RDA) empregando *Penicillium echinulatum* S1M29.

Produtividade volumétrica (UI/L.h)	RDA 40g/L-144h	RDA 60g/L-144h	RDA 60g/L-192h
FPA	68,45	26,8	64,8
Endoglicanases	527,2	368,7	557,7
Xilanases	3.950	2.683	4.778
β -glicosidases	16,35	11,1	21,75
Exoglicanases	65,6	55,7	50,9

4.7 Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e de capim-elefante para obtenção de açúcares fermentescíveis

Para testar a eficiência hidrolítica do complexo enzimático de *P. echinulatum* S1M29, foram empregadas enzimas obtidas em RD e RDA. As enzimas em RD foram produzidas com 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, totalizando 40 g/L de material lignocelulósico. O filtrado enzimático do RDA foi obtido com 60 g/L de celulose, com alimentação até as 192 horas de cultivo, conforme descrito no item 4.6. As atividades obtidas em cada processo podem ser visualizadas na Tabela 9 e a carga enzimática para a hidrólise foi baseada no teor de FPA (15 FPU/g de substrato).

As enzimas foram aplicadas em condições ideais de hidrólise enzimática e as matérias-primas testadas foram: bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante, ambos *in natura* e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Os resultados das hidrólises com enzimas de *P. echinulatum* foram comparados com os dados obtidos com a hidrólise empregando a enzima comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes. Durante todas hidrólises utilizou-se uma carga enzimática de 15 FPU/g de substrato e a mistura reacional não foi suplementada com β -glicosidases para a conversão de celobiose a glicose.

Tabela 9. Comparativo das atividades de celulases e xilanases de *Penicillium echinulatum* S1M29 obtidas durante regime descontínuo (RD), formulado com celulose (Cel), bagaço de laranja (BL) e capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (CE), e regime descontínuo alimentado (RDA) formulado com celulose.

Atividades enzimáticas	RD Cel + BL + CE (40 g/L)	RDA Celulose (60 g/L)
FPA	4,5 UI/mL	14 UI/mL
Endoglicanases	42 UI/mL	116 UI/mL
Xilanases	350 UI/mL	1032 UI/mL
β -glicosidases	4,0 UI/mL	4,7 UI/mL
Exoglicanases	8,2 UI/mL	10,8 UI/mL

As hidrólises enzimáticas foram realizadas apenas com o objetivo de avaliar a eficiência das enzimas obtidas com celulose como única fonte de carbono indutora em RDA e às obtidas em RD contendo celulose, bagaço de laranja e capim-elefante como materiais indutores.

Na Figura 33A-B, pode-se observar os valores de glicose e xilose obtidos durante a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. As maiores concentrações de açúcares foram obtidas em até 24 horas de hidrólise com as enzimas de *P. echinulatum* obtidas no RD com a mistura de celulose, bagaço de laranja e capim-elefante. Os resultados para a enzima comercial foram inferiores aos obtidos com as enzimas de *P. echinulatum*.

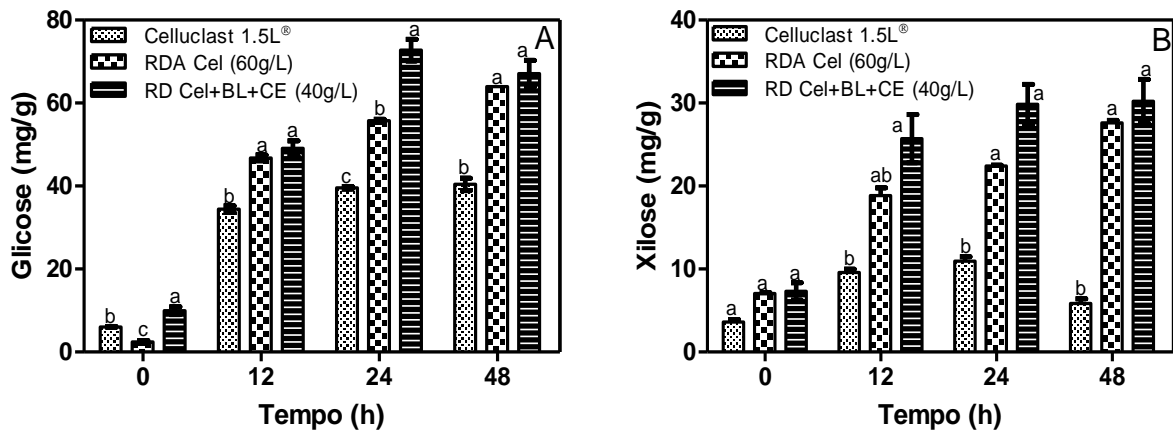


Figura 33. Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas durante hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* empregando 15 FPU/g de substrato. As enzimas empregadas foram a comercial Celluclast 1.5L® da Novozymes e as de *Penicillium echinulatum* S1M29 foram obtidas em RDA com adição intermitente de celulose (60 g/L) e em RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor.

Durante a hidrólise do capim-elefante *in natura* (Figura 34) com as enzimas de *P. echinulatum*, as maiores concentrações de açúcares foram obtidas em 48 horas. O complexo enzimático obtido no cultivo com o RD com a mistura de celulose, bagaço de laranja e capim-elefante se destacou, pois, as liberações de glicose e xilose foram mais rápidas e maiores durante todo o processo de hidrólise, quando comparada a enzima obtida em RDA com celulose.

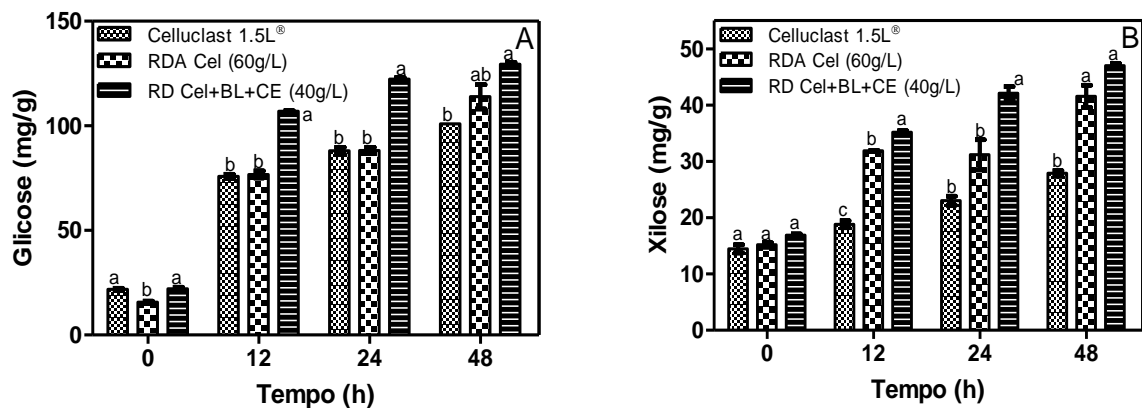


Figura 34. Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas durante hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* empregando 15 FPU/g de substrato. As enzimas empregadas foram a comercial Celluclast 1.5L® da Novozymes e as de *Penicillium echinulatum* S1M29 foram obtidas em RDA com adição intermitente de celulose (60 g/L) e em RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor.

A maior eficiência das enzimas obtidas com *P. echinulatum* durante o RD com a mistura de mais de uma fonte de carbono pode ter sido devido ao filtrado enzimático apresentar uma maior proporção de β -glicosidases/FPA, quando comparado ao cultivo em RDA com celulose, visto que a quantidade de enzima empregada na hidrólise foi baseada apenas no teor de FPA (15 FPU/mL). O equilíbrio na concentração de β -glicosidases/FPA é um fator importante durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, pois assim, menor será o acúmulo de celobiose no meio reacional, que é um inibidor das exoglicanases (Maeda *et al.*, 2011).

Estes dados mostram a importância de empregar diferentes fontes de carbono para aumentar a concentração de diferentes enzimas e assim aumentar a eficiência hidrolítica do filtrado enzimático. Para Wang *et al.* (2012) uma das estratégias para reduzir os custos de produção do bioetanol é otimizar a composição do complexo celulásico para melhorar o efeito sinérgico de diferentes componentes enzimáticos durante a hidrólise da celulose, de modo que a atividade específica é melhorada e a dose de enzimática reduzida. A eficiência de otimizar as preparações enzimáticas foi constatada por Bussamra *et al.* (2015). Estes autores obtiveram um composto enzimático constituído por 80% de extrato enzimático de *T. reesei*, suplementado com 10% de endoglicanases e 10% β -glicosidases, o qual proporcionou um aumento de 40% a conversão da celulose quando comparado à enzima comercial Celluclast 1.5L®.

Enquanto que as enzimas de *P. echinulatum* resultaram em maiores liberações de açúcar do que a enzima comercial durante a hidrólise dos materiais *in natura*, a Celluclast 1.5L[®] foi mais eficiente na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, como pode ser observado na Figura 35. O pré-tratamento é conhecido por tornar a biomassa mais acessível às enzimas, devido às alterações na composição química ou na estrutura física da biomassa (Zhao *et al.*, 2012). Dessa forma, o complexo enzimático comercial deve ter enzimas com maior especificidade para este material. Como já descrito por Meyer *et al.* (2009), as misturas enzimáticas para maximizar a hidrólise enzimática são específicas para cada tipo de matéria-prima empregada e divergem também conforme o pré-tratamento empregado.

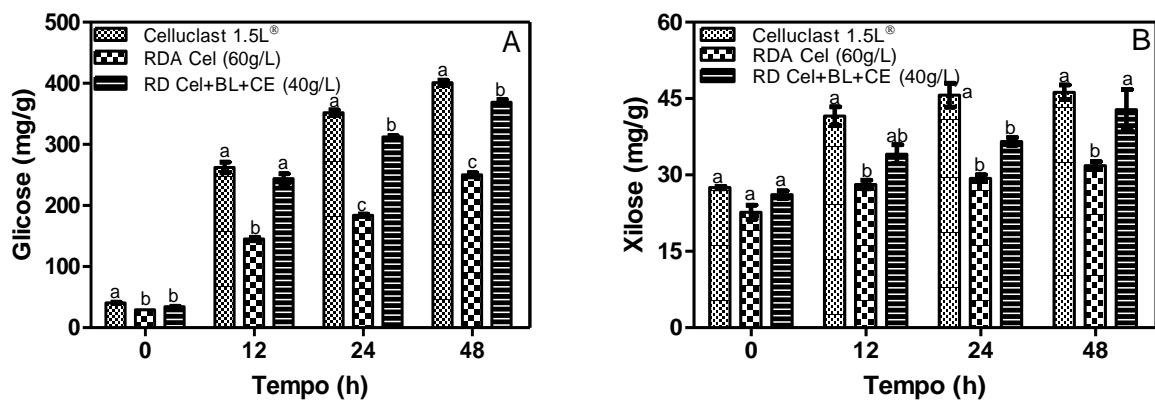


Figura 35. Concentrações de glicose (A) e xilose (B) obtidas durante hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor empregando 15 FPU/g de substrato. As enzimas empregadas foram a comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes e as de *Penicillium echinulatum* S1M29 foram obtidas em RDA com adição intermitente de celulose (60 g/L) e em RD constituído de 20 g/L de celulose, 10 g/L de bagaço de laranja e 10 g/L de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor.

A eficiência das enzimas obtidas com *P. echinulatum* durante hidrólise de materiais *in natura* pode ser devido ao complexo enzimático conter uma maior variabilidade de enzimas, quando comparado à formulação comercial, que são exigidas para a hidrólise do material *in natura*. Estudos realizados por Schneider *et al.* (2016) demonstram que o complexo enzimático de *P. echinulatum* apresenta várias hidrolases, incluindo esterases que estão envolvidas na degradação e na alteração de vários polímeros. Além disso, Zampieri (2015) identificou que a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* expressa genes para swoleninas, quando o fungo é crescido em celulose. As swoleninas são proteínas com ação de afrouxamento da

fibra da celulose, ao atuar nas ligações de hidrogênio, o que facilita o acesso das enzimas ao substrato (Saloheimo *et al.*, 2002b). Gourlay *et al.* (2013) observaram um forte sinergismo entre xilanases e swoleninas, pois o afrouxamento das fibras tornou mais acessível a hemicelulose às xilanases e, como consequência, a celulose às celulasas. Segundo os autores, isto justifica que é fundamental a presença de swoleninas num coquetel enzimático.

Os resultados da hidrólise enzimática obtidos no presente trabalho indicam a importância da otimização do complexo enzimático para aumentar a liberação de açúcares fermentescíveis. Ainda, confirmam os dados da literatura que os preparados enzimáticos variam de acordo com a matéria-prima empregada e também conforme o pré-tratamento que os materiais são submetidos.

O presente trabalho ampliou os conhecimentos sobre a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* e apresenta práticas inovadoras que aumentam a produção de celulasas e xilanases em cultivo submerso. Dessa forma, preparações enzimáticas com menor custo de obtenção podem ser desenvolvidas para aplicação nas biorrefinarias lignocelulósicas.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e a partir da análise destes, pode-se concluir que:

- as maiores concentrações de celulose disponíveis durante o cultivo resultam em maior biomassa de *P. echinulatum*;
- a obtenção de maior crescimento micelial de *P. echinulatum* não está associado com as maiores atividades de celulasas e xilanases;
- a adição de bagaço de laranja e o capim-elefante pré-tratado ao meio de cultivo com celulose induzem maior produção de β -glicosidases e exoglicanases;
- o reuso da biomassa fúngica é uma estratégia que aumenta a produção de celulasas e xilanases para *P. echinulatum* e diminui o tempo do processo para a obtenção das enzimas;
- o emprego de massa micelial de *P. echinulatum* após cultivo de 96 horas, como inóculo, demonstrou ser uma técnica viável para no mínimo cinco ciclos de produção de enzimas.
- o alimentador automático de celulose do tipo rosca transportadora demonstrou ser um sistema prático e eficiente para adicionar a celulose durante o regime descontínuo alimentado;
- as alimentações de celulose no regime descontínuo alimentado podem ser iniciadas a partir das primeiras horas de cultivo com a linhagem S1M29 de *P. echinulatum*;
- as adições de celulose devem ser em torno de $0,26 \pm 0,02$ g/L/h, acima desta concentração ocorre o acúmulo de substrato, o que interfere negativamente na produção de celulasas e xilanases durante o regime descontínuo alimentado;
- a celulose pode ser adicionada com intervalo de uma hora por até 192 horas de cultivo no regime descontínuo alimentado;
- a concentração de celulose final sugerida para ser adicionada no regime descontínuo alimentado nas condições testadas é de 60 g/L;
- as enzimas obtidos com *P. echinulatum* foram mais eficientes na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante *in natura* quando comparado à enzima comercial Celluclast 1.5L[®] da Novozymes. Entretanto, a situação inverte-se quando o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas sobre a produção de enzimas em regime descontínuo alimentado, sugerem-se as seguintes:

- obtenção das condições ideais de alimentação automática dos materiais lignocelulósicos para o regime descontínuo alimentado;
- desenvolvimento de um sistema de alimentação automática associado às variações de pH do meio de cultivo;
- avaliação do reciclo de massa micelial em biorreator e em regime descontínuo alimentado;
- desenvolvimento de um biorreator com sistema de recuperação de células acoplado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M. G.; Ghule, J. E.; Singh, R.; Shaikh, H.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D. V.; Varma, A. J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carb. Polym.** 57: 67-72.
- Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Shaikh, H.; Singh, R.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma A.J. (2005). Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carb. Polym.** 62: 6-10.
- Adsul, M. G.; Bastawde, K. B.; Varma, A. J.; Gokhale, D.V. (2007). Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. **Bioresour. Technol.** 98: 1467-1473.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008a). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochem. Eng. J.** 40: 399-407.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008b). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 42: 41-46.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2010). Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 49: 379-387.
- Ahmed, S.; Bashir, A.; Saleem, H.; Saadia, M.; Jamil, A. (2009a). Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pak. J. Bot.** 41: 1411-1419.
- Ahmed, S.; Riaz, S.; Jamil, A. (2009b). Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 84: 19-35.
- Aidoo, K. E.; Hendry, R.; Wood., B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12: 6-9.
- Albuquerque, T. L.; Silva Jr, I. J.; Macedo, G. R.; Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochem.** 49: 1779-1789.
- Alexandrino, A. M.; Faria, H. G.; Souza, C. G. M.; Peralta, R. M. (2007). Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27: 364-368.

- Allen, A. L.; Roche, C. D. (1989). Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. Bioeng.** 33: 650-656.
- Arantes, V.; Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol. Biofuels.** 3:4. doi:10.1186/1754-6834-3-4.
- Aro, N., Saloheimo, A.; Ilmén, M.; Penttilä, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.** 276: 24309-24014.
- Awafo, V. A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. (1997). **Tese de Doutorado**. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Quebec, Canadá.
- Bailey, M. J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270.
- Bailey, M. J.; Tahtiharju, J. (2003). Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 62: 156-162.
- Bayer, E. A.; Chanzy, H.; Lamed, R.; Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 8: 548-557.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. **Energy Conv. Manag.** 52: 858-875.
- Bansal, P.; Hall, M.; Realff, M. J.; Lee, J. H.; Bommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Adv.** 27: 833-848.
- Basso, V.; Machado, J. C.; Léo, F. J. S.; Carneiro, J. C.; Fontana, R. C.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2014). Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. **Biomass Bioenerg.** 71: 155-161.
- Beckham, G. T.; Bomble, Y. J.; Bayer, E. A.; Himmel, M. E.; Crowley, M. F. (2011). Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. **Curr. Opin. Biotechnol.** 22: 231-238.
- Beg, Q. K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Belghith, H.; Ellouz-Chaabouni, S.; Gargouri, A. (2001). Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. **J. Biotechnol.** 89: 257-262.

- Berlin, A.; Balakshin, M.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Maximenko, V.; Kubo, S.; Saddler, J. (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **J. Biotechnol.** 125: 198-209.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. **Trends. Biotechnol.** 3: 286-290.
- BIO & Farma. Celulase: calcanhar-de-aquiles. **Disponível (online)** http://www.quimica.com.br/revista/qd467/biofarma/bio_farma02.html (06 de abril, 2009).
- Bisaria, V. S.; Ghose, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-104.
- Bittencourt, L. R.; Silveira, M. M.; Dillon, A. J. P. (2002). In: VII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Brazil: **Resumos**, p. 209.
- Biswas, R.; Persad, A.; Bisaria, V S. (2014). Chapter 5: **Production of Cellulolytic Enzymes**. Nova Jersey. Ed: John Wiley & Sons.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** 8: 93-99.
- Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. (2008). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência.
- Botella, C.; Diaz, A. B.; Wang, R.; Koutinas, R. A.; Webb, C. (2009). Particulate bioprocessing: a novel strategy for biorefineries. **Process Biochem.** 44: 546-555.
- Börjesson, J.; Peterson, R.; Tjerneld, F. (2007). Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 754-762.
- Broda, P. (1992). Biotechnology in the degradation and utilisation of lignocellulose. In: **Biodegradation.** 3: 219-238.
- Brotman, Y.; Briff, E.; Viterbo, A.; *et al* (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiol** 147: 779-789.
- Bussamra, B. C.; Freitas, S.; Costa, A. C. (2015). Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresour. Technol.** 187: 173-181.
- Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Shenem, N. T.; Andraus, J.; Dillon, A. J. P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396.

- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **J. Appl. Microbiol.** 103:2196-2204.
- Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2010). Cellulases and Xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2012). Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **J. Anal. Bioanal. Techniq.** 1:125. doi:10.4172/scientificreports.125.
- Cantarel, B. L.; Coutinho, P. M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrisst, B. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): na expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res.** 37: 233-238.
- Canteri-Schemin, M. H.; Fertoni, H. C. R.; Waszczynskyj, N; Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 48: 259-266.
- Carlile, M. J.; Watkinson, S. C. (1997). **The fungi.** London: Academic Press, 460 p.
- Carvalho, M. A. C.; Soratto, R. P.; Athayde, M. L. F.; Arf, O.; Sá, M. E. (2004). Produtividade do milho em sucessão a adubos verdes no sistema de semeadura direta e convencional. **Pesq. Agropec. Bras.** 39: 47-53.
- Castro, A. M.; Carvalho, M. L. A.; Leite, S. G. F.; Pereira Jr, N. (2010). Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 37: 151-158.
- Cateto, C.; Hu, G.; Ragauskas A. (2011). Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. **Energy Environ Sci.** 4: 1516-1521.
- Chen, H. Z.; Wang, L. (2008). Research progress on key process and integrated ecoindustrial chains of biobased product-proposal of biobased product process engineering. **Chinese J. Process Eng.** 8: 676-681.
- Cheng, Y.; Song, X.; Qin, Y.; Qu, Y. (2009). Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. **J. Appl. Microbiol.** 107: 1837-1846.
- Chipeta, Z. A.; Preez, J.; Christopher, L. (2008). Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 587-594.

- Cianchetta, S.; Galletti, S.; Burzi, P. L.; Cerato, C. (2012). Hydrolytic potential of *Trichoderma* sp. strains evaluated by microplate-based screening followed by switchgrass saccharification. **Enzyme Microb. Technol.** 50: 304-310.
- Collins, T.; Gerday, C.; Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 3-23.
- Collins, T.; Hoyoux, A.; Dutron, A.; Georis, J.; Genot, B.; Dauvrin, T.; Arnaut, F.; Gerday, C.; Feller G. (2006). Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. **J. Cereal Sci.** 43: 79-84.
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature.** 407: 321-326.
- Cosgrove, D. J.; Li, L. C.; Cho, H-T.; Hoffmann-Benning, S.; Moore, R. C.; Blecker, D. (2002). The Growing World of Expansins. **Plant Cell Physiol.** 43: 1436-1444.
- Coughlan, M. P.; Hazlewood, G. (1993). β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 17: 259-289.
- Cunha, F. M.; Esperança, M. N.; Zangirolami, T. C.; Badino, A. C.; Farinas, C. S. (2012). Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresour. Technol.** 112: 270-274.
- Damaso, M. C. T.; Andrade, C. M. M. C.; Pereira Jr, N. (2002). Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Braz. J. Microbiol.** 33: 333-338.
- Daroit, D. J.; Simonetti, A.; Hertz, P. F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 933-941.
- Delabona, P. S.; Farinas, C. S.; Silva, M. R.; Azzoni, S. F.; Pradella, J. G. C. (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.
- Delabona, P. S.; Pirota R. D. P. B.; Codima C. A.; Tremacoldi, C. R.; Rodrigues, A.; Farinas, C. S. (2013). Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Ind. Crops Prod.** 42: 236-242.
- Dence, C. W. (1992) The determination of lignin. In: Methods in lignin chemistry. Lin, S. Y.; Dence, C. W. New York: **Springer Verlag.** 33-61.

- Deshpande, M. V.; Eriksson, K. E.; Pettersson, L. G. (1984). An assay for selective determination of exo-1,4-B-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. **Anal. Biochem.** 238: 481-487.
- Deswal, D.; Khasa, Y. P.; Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresour. Technol.** 102: 6065-6072.
- Díaz, A. B.; Ory, I.; Caro, I.; Blandino, A. (2012). Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food Bioprod. Process.** 90: 72-78.
- Dillon, A.J.P.; Paesi-Toresan, S.; Barp, L.B. (1992). Isolation of cellulase - producing mutants from *Penicillium* sp. strains denominated 3MUV3424. **Rev. Bras. Gen.** 15: 491-498.
- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- Dillon, A. J. P.; Bettio, M.; Pozzan, F. G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111: 48-53.
- Domingues, F. C.; Queiroz, J. A.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. (2001). Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnol. Lett.** 23: 771-775.
- Dobrev, G. T.; Pishtiyski, I. G.; Stanchev, V. S.; Mircheva, R. (2007). Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresour. Technol.** 98: 2671-2678.
- Duff, S. J. B., Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 55: 1-33.
- Dutta, T.; Sahoo, R.; Sengupta, R.; Ray, S. S.; Bhattacharjee, A.; Ghosh, S. (2008). Novel cellulases from an extremophilic fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 275-282.

- Ellouz-Chaabouni, S.; Belghith, H.; Hassairi, I.; Mrad, K.; Ellouz, R. (1995). Optimization of cellulases production by *Penicillium occitanis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 267-269.
- Esterbauer, H.; Steiner, W.; Labudova, I.; Hermann, A.; Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresour. Technol.** 36: 51-65.
- Ezeji, T.; Qureshi, N.; Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 97: 1460-1469.
- Falcone, M.; Marques, A. B. (1965). Estudo sobre condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Technol. Ali. Beb.** 4: 24-30.
- Fan, L. T.; Lee, Y-H.; Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 177-199.
- Fang, H.; Xia, L. (2015). Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. **Fuel.** 143: 211-216.
- Fang, X.; Yano, S.; Inoue, H.; Sawayama, S. (2009). Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. **J. Biosci. Bioeng.** 107: 256-261.
- Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; Nepomuceno, A. L.; Molinari, H. B. C.; Bon, E. P. S. (2010). Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valorization.** 1: 65-76.
- Ferreira, N. L.; Margeot, A.; Blanquet, S.; Berrin, J-G. (2014). **Use of cellulases from *Trichoderma reesei* n the twenty-first century-Part I: Current industrial uses and future applications in the production of second ethanol generation.** In: Gupta, V. K.; Schmoll, M.; Herrera-Estrella, A.; Upadhyay, R.; Druzhinina, I.; Tuohy, M. (editores). **Biotechnology and Biology of *Trichoderma*.** The Netherlands: Elsevier Ltd, p. 245-261.
- Foreman, P. K.; Brown, D.; Dankmeyer, L.; Dean, R.; Diener, S.; Dunn-Coleman, N. S.; Goedegebuur, F.; Houfek, T. D.; England, G. J.; Kelley, A. S.; Meerman, H. J.; Mitchell, T.; Mitchinson, C.; Olivares, H. A.; Teunissen, P. J. M.; Yao, J.; Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.** 278: 31988-31997.
- Fujii, T.; Fang, X.; Inoue, H.; Murakami, K.; Sawayama, S. (2009). Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. **Biotechnol. Biofuels.** 2:24, doi:10.1186/1754-6834-2-24.

- Galbe, M.; Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 618-628.
- Ganesh, K.; Joshi, J. B.; Sawant, S. B. (2000). Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochem. Eng. J.** 4: 137-141.
- Gawande, P. V., Kamat, M. Y., (1999). Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **J. Appl. Microbiol.** 87: 511-519.
- Ghose, T. K.; Sahai, V. (1979). Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 283-296.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Ghosh, P.; Ghose, T. K. (2003). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.** New York. Ed. Springer.
- Giese, E. C.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M. (2008). Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB 05 in submerged and solid state fermentation. **Bioresour.** 3: 335-345.
- Gomide, J. L.; Demuner, B. J. (1986). Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. **O papel.** 47: 36-38.
- Gong, C. S.; Tsao, G. T. (1979) Cellulase and biosynthesis regulation. **Annu. Rep. Ferment. Processes.** 3:111-140.
- Goshima, T.; Negi, K.; Tsuji, M.; Inoue, H.; Yano, S.; Hoshino, T.; Matsushika, A. (2013). Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus*. **J. Biosci. Bioeng.** 116: 551-554.
- Gottschalk, L. M. F.; Oliveira, R. A.; Bon, E. P. S. (2010). Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochem. Eng. J.** 51: 72-78.
- Gourlay, K.; Hu, J.; Arantes, V.; Andberg, M.; Saloheimo, M.; Penttilä, M.; Saddler, J. (2013). Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresour. Technol.** 142: 49-503.
- Grohmann, K.; Cameron, R. G.; Buslig, B. S. (1995). Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 54: 129-141.
- Gunjekar, T. P.; Sawant, S. B.; Joshi, J. B. (2001). Shear deactivation of cellulase, exoglucanase, endoglucanase, and β -glucosidase in a mechanically agitated reactor. **Biotechnol. Prog.** 17: 1166-1168.

- Hamelinck, C. N.; van Hooijdonk, G.; Faaij, A. P. C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle and long-term. **Biomass Bioenerg.** 28: 384-410.
- Han, W., He, M. (2010). The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw composition. **Bioresour. Technol.** 101: 3724-3731.
- Hansen, G. H.; Lübeck, M.; Frisvad, J. C.; Lübeck, P.S.; Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry** 50: 1327-1341.
- Hendy, N. A.; Wilke, C. R.; Blanch, H. W. (1984). Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 73-77.
- Hickert, L. R.; Souza-Cruz, P. B.; Rosa, C. A.; Ayub, M. A. Z. (2013). Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresour. Technol.** 143: 112-116.
- Hideno, A.; Inoue, H.; Tsukahara, K.; Yano, S.; Fang, X.; Endo, T.; Sawayama, S. (2011). Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme Microb. Technol.** 48: 162-168.
- Icidca-Geplacea-Pnud. (1990). **Manualde los derivados de la cana de azucar.** Bagazo. (eds). Cuban Institute of Research on Sugarcane, México, p.62.
- Ikram-ul-Haq; Khurshid, S.; Ali, S.; Ashraf, H.; Qadeer, M. A.; Rajoka, M. I. (2001). Mutation of *Aspergillus niger* for hiper production of citric from black strap molasses. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 17: 35-37.
- John, R. P.; Anisha, G. S.; Nampoothiri, K. M.; Pandey, A. (2009). Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnol. Adv.** 27: 145-152.
- Jorgensen, H.; Morkeberg, A.; Krogh, K. B. R.; Olsson, L. (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 42-48.
- Jornal da Cana (2014). Enzimas ganham destaque no mercado. **Disponível (online)** <https://www.jornalcana.com.br/enzimas-ganham-destaque-mercado/>(26 de novembro de 2014).

- Juhász T.; Szengyel Z.; Szijártó N.; Réczey, K. (2004). Effect of pH on Cellulase Production of *Trichoderma reesei* RUT-C30. **App. Biochem. Biotechnol.** 113-116: 201-211.
- Juhász T.; Szengyel Z.; Réczey, K.; Siika-Aho, M.; Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochem.** 40: 3519-3525.
- Juturu, V.; Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnol. Adv.** 30: 1219-1227.
- Juturu, V.; Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 33: 188-203.
- Kim, D. H.; Kim, D. G.; Lee, D. Y.; Kim, K. E.; Kim, C. W. (2008). Physicochemical characterization of pectin extracted from *Cheju mandarin* (*Citrus unshiu*) peels with citric acid. **Food Sci. Biotechnol.** 9: 95-98.
- Kleman-Leyer, K. M.; Siika-Aho, M.; Teeri, T. T.; Kirk, T. K. (1996). The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. **App. Environ. Microbiol.** 62: 2883-2887.
- Knauf, M.; Moniruzzaman, M. (2004). Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective. **Int. Sugar J.** 106: 147-150.
- Knob, A. Terrasan, C.; Carmona, E. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26: 389-407.
- Krishna, S. H.; Rao, K. C. S.; Babu, J. S.; Reddy, D. S. (2000). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM9414. **Bioprocess Eng.** 22: 467-470.
- Krogh, K. B. R.; Mørkeberg, A.; Jørgensen, H.; Frisvad, J.C.; Olsson, L. (2004). Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 113-116: 389-401.
- Kubicek, C. P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R. L.; Kubicek-Pranz, E. M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 90-99.
- Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 411-456.
- Kumar, S.; Dheeran, P.; Singh, S. P.; Mishra, I. M.; Adhikar, D. K. (2015). Continuous ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate at high temperature with cell recycle and in-situ recovery of ethanol. **Chem. Eng. Sci.** 138: 524-530.

- Kwon, K-S.; Lee, J.; Kang, H. G.; Hah, Y. C. (1994). Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4584-4586.
- Lavoine, N.; Desloges, I.; Dufresne, A.; Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydr. Polym.** 90: 735-764.
- Leite R. S. R.; Alves-Prado, H. F.; Cabral, H.; Pagnocca, F. C.; Gomes, E.; Da-Silva R. (2008). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme Microb. Technol.** 43: 391-395.
- Li, C.; Yang, Z.; Zhang, R. H. C.; Zhang, D.; Chen, S.; Ma, L. (2013). Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **J. Biotechnol.** 168: 470-477.
- Li, Q.; Siles, J. A.; Thompson, I. P. (2010). Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentation of *Fibrobacter succinogenes* S85. **App. Microbiol. Biotechnol.** 88: 671-678.
- Liao, H.; Zheng, H.; Li, S.; Wei, Z.; Mei, X.; Ma, H.; Shen, Q.; Xu, Y. (2015). Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Sci. Rep.** 30: 5:12631 DOI: 10.1038/srep12631.
- Liming, X.; Xueliang, S. (2004). High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresour. Technol.** 91: 259-262.
- López-Linares, J. C.; Romero, I.; Cara, C.; Ruiz, E.; Moya, M.; Castro, E. (2014). Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel.** 122: 112-118.
- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; van Lyl, W. H.; Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol.** 66: 506-577.
- Ma, L.; Li, C.; Yang, Z.; Jia, W.; Zhang, D.; Chen, S. (2013). Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. **J. Biotechnol.** 166: 192-197.
- Madlala, A. M.; Bissoon, S; Singh, S.; Christov, L. (2001). Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. **Biotechnol. Lett.** 23: 345-351.

- Maeda, R. N.; Serpa, V. I.; Rocha, V. A. L.; Mesquita, R. A. A.; De Santa Anna, L. M. M.; Castro, A. M.; Driemeier, C. E.; Pereira Jr, N.; Polikarpov, I. (2011). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochem.** 46: 1196-1201.
- Maeda, R. N.; Barcelos, C.; A.; Anna, L. M. M. S.; Pereira Jr, N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **J. Biotechnol.** 163: 38-44.
- Mamma, D.; Kourtoglou, E.; Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresour. Technol.** 99: 2373-2383.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Martín, C.; Klinke, H. B.; Thomsen, A. B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 426-432.
- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008). Comparison between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99: 1417-1424.
- Mazzarella, V. (2011) O capim que gera energia. **Disponível (online)** <http://agrofartura.wordpress.com/2011/04/18/o-capim-que-gera-energia/> (26 de novembro, 2011).
- McCleary, B. V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 349-354.
- McLean, D. D.; Abear, K.; Podruzny M. F. (1986). Fed-batch production of cellulases using *Trichoderma reesei* Rutgers C30. **Can. Chem. Eng.** 64: 588–597.
- Medve, J. (1997). Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II. **Tese de Doutorado**. Department of Biochemistry, Lund University, Sweden.
- Meng, X.; Ragauskas, A. J. (2014). Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Curr. Opin. Biotechnol.** 27: 150-158.

- Menon, V.; Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Prog. Energ. Combust.** 38: 522- 550.
- Meyer, A. S.; Rosgaard, L.; Sørensen, H. R. (2009). The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **J. Cereal Sci.** 50: 337–344.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chemis.** 31: 426-428.
- Minihane, B. J.; Brown, D. E. (1986). Fed-batch culture technology. **Biotech. Adv.** 4: 207-218.
- Montenecourt, B. S.; Eveleigh, D. E. (1979). Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. In Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis. **Adv. Chem. Series.** 181: 289-301.
- Mosier, N.; Hendrickson, R.; Ho, N.; Sedlak, M.; Ladisch, M. R. (2005a). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresour. Technol.** 96: 1986-1993.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005b). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Mrudula, S.; Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Braz. J. Microbiol.** 42: 1119-1127.
- Mussatto, S. I.; Fernandes, M.; Milagres, A. M. F. (2007). Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje.** 41: 28-33.
- Muthuvelayudham, R.; Viruthagiri, T. (2006). Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **Afr. J. Biotechnol.** 5: 1873-1881.
- Narra, M.; Dixit, G.; Divecha, J.; Madamwar, D.; Shah, A. R. (2012). Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. **Bioresour. Technol.** 121: 355-361.
- Nigam, P.; Singh, D. (1994). Solid-state substrate fermentation systems and their applications in biotechnology. **J. Basic Microbiol.** 34: 405-423.
- Novello, M.; Vilasboa, J.; Schneider, W. D. H.; Reis, L.; Fontana, R. C.; Camassola, M. (2014). Enzymes for second generation ethanol: exploring new strategies for the use of xylose. **RSC Adv.** 4: 21361-21368.

- Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL (2011). EUA, 18ª edição, 4ª revisão. Método 2001, 11.
- Olsson, L.; Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 312-331.
- Oliveira, L. A.; Porto, A. L. F.; Tambourgi, E. B. (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. **Bioresour. Technol.** 97: 862-867.
- Osava, M. (2007). Elephant Grass for Biomass. **Inter Press Service News Agency**. October 10.
- Ouyang, J.; Yan, M.; Kong, D.; Xu, L. (2006) A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnol. J.** 1: 1266-1274.
- Palonen, H.; Tjerneld, F.; Zacchi, G.; Tenkanen, M. (2004). Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **J. Biotechnol.** 107: 65-72.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 81-84.
- Park, E. Y.; Naruse, K.; Kato, T. (2011). Improvement of cellulase production in cultures of *Acremonium cellulolyticus* using pretreated waste milk pack with cellulase targeting for biorefinery. **Bioresour. Technol.** 102: 6120-6127.
- Patel, N.; Choy, V.; Malouf, P.; Thibault, J. (2009). Growth of *Trichoderma reesei* RUT-C30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. **Process Biochem.** 44: 1164-1171.
- Patrick, M. F.; Champagne, P.; Cunningham, M. F.; Whitne, R. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresour. Technol.** 23: 8915-8922.
- Pereira, B. M. P.; Alvarez, T. M.; Delabona, P. S.; Dillon, A. J. P.; Squina, F. M.; Pradella, J. G. C. (2013). Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **Bioenerg. Res.** 6: 1052-1062.
- Pereira Jr, N.; Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A. (2008). **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ. p.63.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.** 5: 53-63.

- Pradella, J. G. (2015). Etanol celulósico: CTBE e Novozymes atacam o custo das enzimas. **Disponível (online)** <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/etanol-celulosico-ctbe-novozymes-atacam-custo-enzimas-030315/> (2 de dezembro de 2015).
- Pryor, S. W.; Nahar, N. (2015). β -glucosidase supplementation during biomass hydrolysis: How low can we go? **Biomass Bioenerg.** 80: 298-302.
- Rabinovich, M. L.; Melnick, M. S.; Bolobova, A. V. (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochem.** 67: 850-871.
- Radhika, D.; Murugesan, A. G. (2012). Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxy butyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as sole carbon source. **Bioresour. Technol.** 121: 83-92.
- Ramos, E. Empresa desenvolve enzimas. 28 Jun. 2009. **Disponível (online)** http://www.bioenzima.com.br/page_4.html (12 de novembro, 2012).
- Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quim. Nova.** 26: 863-871.
- Reese, E. T.; Ryu, D. Y. (1980). Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*. **Enzyme Microb. Technol.** 2: 239-240.
- Reis, L. (2011). Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Reis, L.; Fontana, R. C.; Delabona, P. S.; Lima, D. J. S.; Camassola, M.; Pradella, J. G. C.; Dillon, A. J. P. (2013). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresour. Technol.** 146: 597-603.
- Reis, L.; Schneider, W. D. H.; Fontana, R. C.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2014). Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **Bioenerg. Res.** 7: 60-67.
- Ribeiro, D. A.; Cota, J.; Alvarez, T. M.; Brüchli, F.; Bragato, J.; Pereira, B. M. P.; Pauleti, B. A.; Jackson, G.; Pimenta, M. T. B.; Murakami, M. T.; Camassola, M.; Ruller, R.; Dillon, A. J. P.; Pradella, J. G. C.; Lema, A. F. P.; Squina, F. M. (2012). The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **PLOS ONE** 7(2): e50571.
- Righelato, R. C.; Trinci, A. P. J.; Pirt, S.; Peat, A. (1968). The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. **J. Gen. Microbiol.** 50: 399- 412.

- Ritter, C. E. T.; Camassola, M.; Zampieri, D.; Silveira, M. M.; Dillon, A. J. P. (2013). Cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged media containing cellulose amended with sorbitol. **Enzyme Res.** <http://dx.doi.org/10.1155/2013/240219>.
- Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Converti, A.; Dominguez, J. M. (2008). Submerged citric acid fermentation in orange peel autohydrolysate. **J. Agric. Food Chem.** 56: 2380-2387.
- Sá-Pereira, P.; Duarte, J. C.; Ferrara, M. A.; Lacerda, P. S. B.; Alves, F. C. (2008). **Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados.** In: Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M. L. (Editores). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Ed Interciência, p. 431-462.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microb. Biotechnol.** 30: 279-291.
- Said, S.; Pietro, R. (2002). Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. **Ed. Eventos.** p. 35-36.
- Saini, R.; Saini, J. K.; Adsul, M.; Patel, A. K.; Mathur, A.; Tuli, D.; Singhanian, R. R. (2015). Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. **Bioresour. Technol.** 188: 240-246.
- Saloheimo, M.; Kuja-Panula, J.; Ward, M.; Pentillä, M. (2002a). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cell1A). **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 4546-4563.
- Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyssonen, E. (2002b). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **Eur. J. Biochem.** 269: 4202-4211.
- Santos, L. D.; Sousa, M. D. B.; Guidini, C. Z.; Resende, M. M.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J. (2015). Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochem.** 11:1725-1729.
- Saqib, A. A. N.; Hassan, M.; Khan, N.F.; Baig, S. (2010). Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochem.** 45: 641-646.
- Sarkar, N.; Ghosh, S. K.; Bannerjee, S.; Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renew. Energ.** 37: 19-27.
- Schell, D. J.; Harwood, C. (1994). Milling of lignocellulosic biomass: Results of pilot-scale testing. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 45-46: 159-168.

- Schmidel, W.; Facciotti, M. C. R. (2001). **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: Schmidel, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Editores). **Biotechnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda, p.179-190.
- Schneider, W. D. H.; Reis, L.; Camassola, M.; Dillon, A. J.P. (2014). Morphogenesis and production of enzymes by *Penicillium echinulatum* in response to different carbon sources. **BioMed Res. Int.** doi.org/10.1155/2014/254863.
- Schneider, W. D. H.; Gonçalves, T. A.; Uchima, C. A.; Couger, M. B.; Prade, R.; Squina, F.M.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2016). *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potentialfor degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnol. Biofuels**. 9:66DOI 10.1186/s13068-016-0476-3.
- Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2015a). Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Ind. Crops Prod.** 70: 280-291.
- Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2015b). Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresour. Technol.** 192: 228-237.
- Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. (2015c). Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Ind. Crops Prod.** 23: 97-107.
- Sehnm, N. T.; Bittencourt, L. R.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 163-167.
- Silva, R., Gomes, E. (2004). **Ligninases**. In.: Said, S.; Pietro, R. C. L. R. (Editores). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa. p. 349-379.
- Silva, R.; Lago, E. S.; Merheb, C. W.; Macchione, M. M.; Park, Y. K.; Gomes, E. (2005). Production of xylanase and CMCcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Braz. J. Microbiol.** 36: 235-241.
- Singh, A.; Singh, N.; Bishnoi, N. R. (2009). Production of cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. **Int. J. Civil Environ. Eng.** 1:1.

- Singh, S.; Varanasi, P.; Singh, P.; Adams, P. D.; Auer, M.; Simmons, B. A. (2013). Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on cellulose and lignin via thermochemical analysis. **Biomass Bioenerg.** 54: 276-283.
- Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A. K. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 44: 13-18.
- Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 541-549.
- Singhania, R. R.; Saini, J. K.; Saini, R.; Adsul, M.; Mathur, A.; Gupta, R.; Tuli, D. K. (2014). Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. **Bioresour. Technol.** 169: 490-495.
- Singhania, R. R.; Adsul, M.; Pandey, A.; Patel A. K. (2017). **Cellulases**. In: Pandey, A.; Negi, S.; Soccol, C. R. (Editores). **Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Amsterdam: Ed Elsevier, p. 73-101.
- Singhvi, M. S.; Adsul, M.G.; Gokhale, D.V. (2011). Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresour. Technol.** 102: 6569-6572.
- Sipos, B.; Dienes, D.; Schleicher, A.; Perazzini, R.; Crestini, C.; Siika-Aho, M.; Réczey, K. (2010). Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). **Enzyme Microb. Technol.** 47: 84-90.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008a). Determination of ash in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42622. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008b). Determination of extratives in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42619. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42618. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Soni, R.; Nazir, A.; Chadha, B. S. (2010). Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of *Solka floc* and bagasse. **Ind. Crops Prod.** 31: 277- 283.

- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Stoilova, I. S.; Gargova, S. A.; Krastanov, A. I. (2005). Production of enzymes by mixed culture from mycelial fungi in solid-state fermentation. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.** 19: 103-108.
- Sukumaram, R. K.; Singhanian, R. R.; Pandey, A. (2005). Microbial cellulases- Production, applications and challenges. **J. Sci. Ind. Res.** 64: 832-844.
- Sun, J. X.; Xu, F.; Sun, X. F.; Sun, R. C.; Wu, S. B. (2004). Comparative study of lignins from ultrasonic irradiated sugar-cane bagasse. **Polym. Int.** 53: 1711-1721.
- Sun, X.; Liu, Z.; Zheng, K.; Song, X.; Qu, Y. (2008a). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 560-567.
- Sun, W-C.; Cheng, C-H.; Lee, W-C. (2008b). Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* RUT-C30 on rice straw. **Process Biochem.** 43: 1083-1087.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002.) Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Szabó, I. J.; Johansson, G.; Pettersson, G. (1996). Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: control of catabolite repression by fed-batch cultivation. **J. Biotechnol.** 48: 221-230.
- Szengyel, Z. (2000). Ethanol from wood cellulase enzyme production. PhD Tesis. **Lund University.** Sweden, p. 54.
- Szwarc, A. (2013). Usina pioneira de etanol celulósico coloca Brasil entre líderes globais no uso da nova tecnologia. **Disponível (on line)** <http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/> (14 de dezembro, 2015).
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.** 9: 1621-1651.
- Terrasán, C. R. F.; Temer, B.; Duarte, M. C. T.; Carmona, E. C. (2010). Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresour. Technol.** 101: 4139-4143.
- Updegraff, D. M. (1969). Semi micro determination of cellulose in biological materials. **Anal. Biochem.** 32: 1577-1583.
- Vaidyanathan, S.; Macaloney, G.; Vaughan, J.; McNeil, B.; Harvey, L. M. (1999). Monitoring of submerged bioprocesses. **Crit. Rev. Biotechnol.** 19: 277-316.

- Valencia, E. Y.; Chambergo, F. S. (2013). Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Gen. Biol.** 60: 9-18.
- Velkovska, S.; Marten, M. R.; Ollis, D. F. (1997). Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30. **J. Biotechnol.** 54: 83-94.
- Vicente, N. G. Mazzarella. (2007). Jornada Madeira Energética- Capim-elefante como fonte de energia no Brasil: Realidade Atual e Expectativas. IPT-BNDS - Rio de Janeiro. **Disponível (online)**
<http://www.gestaouniversitaria.com.br/index.php?view=article&catid=175:194&id=21082:c:apim-elefante-fonte-de-energia-alternativa&format=pdf> (18 de novembro, 2011).
- Viikari, L.; Vehmaanpera, J.; Koivula, A. (2012). Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass Bioenerg.** 46: 13-24.
- Vuong, T. V.; Wilson, D. B. (2010). Glycoside Hydrolases: Catalytic Base/Nucleophile diversity. **Biotechnol. Bioeng.** 2: 195-205.
- Wan, M.; Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnol. Adv.** 30: 1447-1457.
- Wang, M.; Cai, J.; Huang, L.; Lv, Z.; Zhang, Y.; Xu, Z. (2010). High-level expression and efficient purification of bioactive swollenin in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 2027-2036.
- Wang, M.; Li, Z.; Fang, X.; Wang, L.; Qu, Y. (2012). Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 128: 1-24.
- Wang, Y. C.; Chuang, Y. C.; Hsu, H. W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. **Food Chem.** 106: 277-284.
- Watanabe, H.; Tokuda, G. (2001). Animal cellulases. **Cell. Mol. Life Sci.** 58: 1167-1178.
- Watson, T. G.; Nelligan, I.; Lessing, L. (1984). Cellulase production by *Trichoderma reesei* (RUT-C30) in fed-batch culture. **Biotechnol. Lett.** 6: 667-672.
- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. (2005a). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresour. Technol.** 96: 491-499.
- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. (2005b). Production of cellulases/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochem.** 40: 3087-3094.
- Wilkins, M. R.; Widmer, W. W.; Grohmann, K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochem.** 42: 1614-1619.

- Ximenes, E. A.; Dien, B. S.; Ladisch, M. R.; Mosier, N.; Cotta, M. A.; Li, X. L. (2007). Enzyme production by industrially relevant fungi cultured on coproduct from corn dry grind ethanol plants. **App. Biochem. Biotechnol.** 136-140: 171-184.
- Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinen, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 96: 753-759.
- Yan, K.; Yang, Y.; Chai, J.; Lu, Y. (2015). Catalytic reactions of gamma-valerolactone: A platform to fuels and value-added chemicals. **Appl. Catal. B.** 179: 292-304.
- Yao, Q.; Sun, T.T.; Liu, W.F.; *et al* (2008). Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72: 2799-2805.
- Yeh, A-I.; Huang, Y-C.; Chen, S. H. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydr. Polym.** 79:192-199.
- Zabed, H.; Sahu, J. N.; Boyce, A. N.; Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renew. Sust. Energ.Ver.** 66: 751-774.
- Zaldivar, M.; Velasquez, J. C.; Contreras, I.; Perez, L. M. (2001). *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. **Eletronic. J. Biotechnol.** 1-7.
- Zampieri, D. (2015). Expressão gênica e atividades de celulasas, β -glicosidases, xilanases e swolleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 277: 581-588.
- Zhang, J.; Pakarinen, A.; Viikari, L. (2013). Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. **Bioresour. Technol.** 129: 302-307.
- Zhang Y-H. P.; Lynd L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng.** 88: 797-824.
- Zhang, Y-H. P.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnol. Adv.** 24: 452-481.

- Zhao X.; Zhang L.; Liu D. (2012). Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels Bioprod. Biorefin.** 6: 561-579.
- Zhou, Q.; Lv, X.; Zhang, X.; Meng, X.; Chen, G.; Liu, W. (2011). Evaluation of swollenin from *Trichoderma pseudokoningii* as a potential synergistic factor in the enzymatic hydrolysis of cellulose with low cellulase loadings. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27: 1905-1910.
- Ziglio, B. R.; Bezerra, J. R. M. V.; Branco, I. G.; Bastos, R.; Rigo, M. (2007). Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. **Rev. Ciênc. Exatas Nat.** 9: 115-128.