

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CAPIM-ELEFANTE PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A
VAPOR COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE
ENZIMAS, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

ANGÉLICA LUISI SCHOLL

Caxias do Sul

2014

ANGÉLICA LUISI SCHOLL

**CAPIM-ELEFANTE PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A
VAPOR COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE
ENZIMAS, HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Marli Camassola

Co-orientador: Dr. Aldo J. P. Dillon

Caxias do Sul

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S368c Scholl, Angélica Luisi, 1989-
Capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor como matéria-prima
para produção de enzimas, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica
/ Angélica Luisi Scholl. – 2014.
xii, 151 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola ; Coorientador: Prof. Dr.
Aldo J. P. Dillon.

1. Biocombustíveis. 2. Enzimas - Produção. 3. Fermentação. 4.
Gramínea – Capim elefante. I. Título.

CDU 2.ed.: 620.91

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biocombustíveis	620.91
2. Enzimas - Produção	604.4
3. Fermentação	663.14/.16
4. Gramínea – Capim elefante	582.542.11


Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

ANGÉLICA LUISI SCHOLL

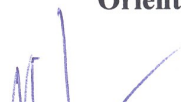
**Capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor como
matéria-prima para produção de enzimas, hidrólise
enzimática e fermentação alcoólica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11 DE DEZEMBRO DE 2014.




Prof. Dra. Marli Camassola
Orientadora



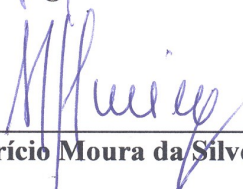
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Co-orientador



Prof. Dr. Rafal Marcin Lukasik



Prof. Dr. Jürgen Andreaus



Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar!”

(Anatole France)

*Dedico esse trabalho aos meus pais, **Alípio** e **Elisabeth**, pelo amor incondicional, as minhas irmãs **Bruna** e **Camila**, por todo apoio e carinho, e ao meu noivo **Rodrigo**, pelo amor e companheirismo!*

AGRADECIMENTOS

Deixo meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada e que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho:

- a Deus, pelo dom da vida e por me permitir a conquista de mais um sonho;
- aos meus orientadores Dra. Marli Camassola e Dr. Aldo J. P. Dillon, pelo conhecimento compartilhado e pela atenção prestada;
- à técnica do laboratório, Roselei C. Fontana, por toda a ajuda prestada;
- aos professores da banca de acompanhamento Dr. Maurício Moura da Silveira e Dra. Eloane Malvessi;
- aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários do Instituto de Biotecnologia;
- aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas, pela convivência e pelos momentos de descontração, em especial a Me. Daiane Menegol e ao Biol. Willian D. H. Schneider, pela amizade, pelo companheirismo nas conquistas e apoio nos momentos difíceis;
- aos meus pais Alípio J. Scholl e Elisabeth A. Scholl, pelo incentivo, carinho, confiança e, simplesmente, por serem os melhores pais do mundo;
- as minhas irmãs, Bruna e Camila, pelo carinho, apoio e confiança;
- ao meu noivo Rodrigo, por sempre me acompanhar na busca e realização dos meus sonhos;
- ao apoio estrutural e financeiro da UCS, FAPERGS, FINEP, CNPq e da Secretaria de Ciência, Inovação e Desenvolvimento Tecnológico do Estado do Rio Grande do Sul;
- ao Centro de Pesquisa em Química Aplicada da Universidade Federal do Paraná, em especial ao professor Dr. Luiz Pereira Ramos e à Dra. Ana Paula Pitarelo, pelo apoio e ensinamentos;
- ao Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA) do Instituto de Biotecnologia da UCS.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE QUADROS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Problemática ambiental e energias renováveis.....	3
2.2 Biomassa lignocelulósica: novas fontes de energias renováveis.....	5
2.2.1 Composição da biomassa lignocelulósica	6
2.3 Capim-elefante.....	9
2.4 Produção de enzimas.....	11
2.4.1 Celulases: características, produção e aplicações.....	12
2.4.2 Xilanases: características, produção e aplicações	15
2.5 Conversão da biomassa lignocelulósica em etanol.....	16
2.5.1 Métodos de pré-tratamento.....	18
2.5.2 Explosão a vapor	20
2.6 Hidrólise enzimática e fermentação.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Microrganismos.....	27
3.2 Biomassa lignocelulósica: capim-elefante.....	27
3.3 Pré-tratamento da matéria-prima.....	28
3.4 Produção de enzimas.....	29
3.4.1 Produção de celulases e xilanases em cultivo em estado sólido (CES)	29
3.4.2 Produção de celulases e xilanases em cultivos submerso (CS).....	29

3.5 Métodos Analíticos.....	30
3.5.1 Caracterização do capim-elefante	30
3.5.1.1 Determinação da massa seca de materiais celulósicos.....	30
3.5.1.2 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos.....	30
3.5.1.3 Determinação de extraíveis.....	30
3.5.1.4 Análise química do capim-elefante.....	31
3.5.1.5 Determinação de nitrogênio total e proteínas.....	32
3.5.2 Atividades enzimáticas.....	33
3.5.2.1 Determinação da atividade sobre papel filtro (FPA).....	33
3.5.2.2 Determinação de endoglicanases.....	34
3.5.2.3 Determinação de β -glicosidases.....	34
3.5.2.4 Determinação de xilanases.....	35
3.5.3 Determinação das proteínas solúveis	35
3.5.4 Estimativa da concentração fúngica	35
3.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	36
3.7 Hidrólise enzimática.....	37
3.8 Fermentação.....	37
3.9 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Steam-explosion pretreated elephant grass (<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.) as a carbon inducing source for cellulases and xylanases in submerged cultivation	40
Abstract.....	40
Keywords	41
1. Introduction	41
2. Material and methods.....	42
3. Results and discussion.....	46
4. Conclusion.....	65
Acknowledgements.....	65
References.....	65

Emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a indução da secreção de celulasas e xilanases por <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivos em estado sólido.....	69
Resumo.....	69
Palavras-chave.....	70
1. Introdução.....	70
2. Material e métodos.....	71
3 Resultados e discussão.....	75
4 Conclusões.....	93
Agradecimentos.....	93
Referências bibliográficas.....	93
Hidrólise enzimática de capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i>, Schum.) pré-tratado por explosão a vapor seguida de fermentação alcoólica.....	97
Resumo.....	97
Palavras-chave.....	98
1 Introdução.....	98
2 Material e métodos.....	99
3 Resultados e discussão	103
4 Conclusões.....	120
Agradecimentos.....	121
Referências Bibliográficas.....	121
DISCUSSÃO GERAL	125
5 CONCLUSÕES.....	1289
6 PERSPECTIVAS	1311
7 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituintes da parede da célula vegetal (Ilustração: M. Camassola, 2009).....	6
Figura 2. Estrutura da celulose, reproduzida de Dillon (2004)	7
Figura 3. Estrutura molecular da hemicelulose (Fonte: Polizeli <i>et al.</i> , 2011).....	8
Figura 4. Estrutura molecular da lignina (Fonte: Sarkanen <i>et al.</i> , 1971).....	9
Figura 5. Cultura de capim-elefante (Imagem da autora, 2010).....	10
Figura 6. Representação da atuação das celulasas e enzimas acessórias (Adaptado de Glass <i>et al.</i> , 2013).....	13
Figura 7. Esquema representando o efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico (Adaptado de Mosier <i>et al.</i> , 2005).....	17
Figura 8. Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) e exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Fonte: Lima <i>et al.</i> (2001).....	25
Artigo 1: Steam-explosion pretreated elephant grass (<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.) as a carbon inducing source for cellulases and xylanases in submerged cultivation	
Figure 1. Scanning electron microscopy (200×) images of untreated elephant grass and steam-explosion pretreated elephant grass under different time and temperature conditions	48
Figure 2. Filter Paper Activity (A - F) and endoglucanases activity (G - L) of <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 grown in submerged cultivations using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A - C and G - I) or unwashed (D - F and J - L) after the pretreatment.	55
Figure 3. β-glucosidase (A - F) and xylanase (G - L) activities from <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 grown in submerged cultivations using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A - C and G - I) or unwashed (D - F and J - L) after the pretreatment.	59
Figure 4. Soluble protein concentration (A - F) and the pH variation (G - L) in the <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 broth from the submerged cultivations using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and	

temperature conditions and was either washed (A - C and G - I) or unwashed (D - F and J - L) after the pretreatment.....63

Figure 5. Determination of the mycelial growth of *Penicillium echinulatum* S1M29 grown in submerged cultivations, on the fifth day of cultivation, using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A) or unwashed (B) after the pretreatment.....65

Artigo 2: Emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a indução da secreção de celulasas e xilanasas por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos em estado sólido

Figura 1. Composição química de capim-elefante não tratado (UtEG) e pré-tratado por explosão a vapor, sob diferentes condições de tempo e de temperatura.....75

Figura 2. Atividade sobre papel filtro de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura.....79

Figura 3. Atividade de endoglucanases de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura.....83

Figura 4. Atividade de β -glucosidasas de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura.....84

Figura 5. Atividade de xilanasas de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura.....86

Figura 6. Concentração de proteínas solúveis detectada nos caldos enzimáticos de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 obtidos em cultivo em estado sólido, utilizando 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A – F) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (G – L).....	88
Figura 7. Estimativa do crescimento micelial de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A – F) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (G – L).....	90
Figura 8. Variação do pH em cultivo em estado sólido, utilizando 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A – F) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (G – L).....	92

Artigo 3: Hidrólise enzimática de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pré-tratado por explosão a vapor seguida de fermentação alcoólica

Figura 1. Composição química (%) das amostras de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor lavado após o pré-tratamento (A) e não lavado após o pré-tratamento (B).....	104
Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura ($\times 50$ e $\times 1000$) de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor em diferentes condições de tempo e temperatura.....	107
Figura 3. Concentração (mg.g^{-1}) de açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática de celulose, Avicel, capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão, lavado (A a C) e não lavado (D a F), sob diferentes condições de tempo e temperatura, utilizando 4 % de substrato e 10 FPU.g⁻¹ de substrato.....	110
Figura 4. Concentração (mg.g^{-1}) de glicose (A) e xilose (B) liberadas a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante não tratado, pré-tratado por explosão a vapor, celulose e Avicel[®], em 24 e 48h de processo, para amostras lavadas (L) e não lavadas (NL).....	112
Figura 5. Concentração (mg.mL^{-1}) de açúcares (glicose e xilose) e as concentrações (mg.mL^{-1}) de etanol produzidas a partir da fermentação alcoólica dos hidrolisados de 48h de capim-elefante, nas amostras controle (capim-elefante não tratado, celulose e Avicel[®]) e nas diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento fatorial 2^2 para realização de pré-tratamentos por explosão a vapor das amostras de capim-elefante.....28

Artigo 1: Steam-explosion pretreated elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) as a carbon inducing source for cellulases and xylanases in submerged cultivation

Table 1. Factorial design (2^2) for steam-explosion pretreatment of the elephant grass...43

Table 2. Percent of mass recovery of steam-explosion pretreated elephant grass under different conditions47

Table 3. Chemical composition, in percent, of untreated and steam-explosion pretreated elephant grass under different temperature and residence times either washed or unwashed samples.....51

Table 4. Detected* substances in liquid obtained after washing of steam-explosion pretreated elephant grass under different temperature and time conditions.....52

Table 5. Comparison of enzymatic activities of different fungi grown in submerged cultivations using different steam-explosion lignocellulosic materials.....56

Table 6. Comparison of the maximum enzyme activities obtained from the submerged cultivation using steam-explosion pretreated elephant grass under different temperature and time conditions61

Artigo 2: Emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a indução da secreção de celulasas e xilanasas por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos em estado sólido

Tabela 1. Planejamento fatorial 2^2 para realização de pré-tratamento por explosão a vapor de capim-elefante.....72

Artigo 3: Hidrólise enzimática de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pré-tratado por explosão a vapor seguida de fermentação alcoólica

Tabela 1. Planejamento fatorial 2^2 , desenvolvido para identificar as condições mais adequadas de pré-tratamento por explosão a vapor para capim-elefante.....100

Tabela 2. Percentual de perda de massa das amostras de capim-elefante submetidas a diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor.....103

Tabela 3. Substâncias detectadas* no líquido obtido após o pré-tratamento por explosão a vapor (A) e na água de lavagem (B) das amostras de capim-elefante, em diferentes condições de tempo de residência e temperatura.....	108
Tabela 4. Substâncias detectadas (g/L) a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante não tratado, pré-tratado por explosão a vapor, celulose e Avicel[®]	114
Tabela 5. Substâncias detectadas (g/L) a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-elefante não tratado, pré-tratado por explosão a vapor, celulose e Avicel[®]	119
Tabela 6. Produção de etanol (mL/kg) empregando diferentes amostras de capim-elefante pré-tratado por explosão.....	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resíduos lignocelulósicos, origem e suas aplicações (Howard, 2003).....	5
Quadro 2. Sumário das vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (Alvira <i>et al.</i>, 2010).....	19

ABREVIATURAS

- AFEX:** *Ammonia Fiber Expansion*
AR: açúcares redutores
Cel: celulose
CES: cultivo em estado sólido
CS: cultivo submerso
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FPA: atividade sobre papel filtro – atividade celulásica total
FPU: unidades de papel filtro
FT: farelo de trigo
HMF: hidroximetilfurfural
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRENA: *International Renewable Energy Agency*
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
L: amostra submetida à lavagem após o pré-tratamento
n.d.: não detectado
NL: amostra não submetida à lavagem após o pré-tratamento
NOAAA: *National Oceanic and Atmospheric Administration*
NREL: *National Renewable Energy Laboratory*
SF: sacarificação e fermentação
SFS: sacarificação e fermentação simultâneas
SM: solução de sais minerais
ρNPG: ρ-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo
UW: *unwashed*
UtEG: *untreated elephant grass*
W: *washed*
WB: *wheat bran*

RESUMO

Com a crescente busca por fontes energéticas renováveis alternativas ao petróleo, o uso de biomassa lignocelulósica, como *Pennisetum purpureum* (capim-elefante), apresenta-se como uma alternativa para a produção de etanol de segunda geração. Entretanto, a matéria-prima necessita ser pré-tratada apropriadamente para facilitar a ação das enzimas ao material. Entre os métodos de pré-tratamento, explosão a vapor é considerado um dos mais eficientes. No presente trabalho, o capim-elefante foi pré-tratado por explosão a vapor em diferentes temperaturas (180, 190, 200 °C) e tempos de residência (6, 8 e 10 min). As amostras pré-tratadas foram empregadas para produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum*. Essas enzimas foram utilizadas para hidrolisar capim-elefante e posteriormente realizou-se a fermentação alcoólica dos açúcares liberados. Quanto à produção de enzimas em cultivo submerso (CS), verificou-se efeito positivo da realização do pré-tratamento da biomassa para celulases totais (*Filter Paper Activity* (FPA) e endoglucanases) e β -glucosidases, sendo os pré-tratamentos realizados a 190 °C / 8 e 190 °C / 6 min os mais promissores. Para os cultivos em estado sólido (CES), a substituição de 50 % do capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor e submetido à lavagem por farelo de trigo favoreceu as produções de FPA (190 °C / 8 min), de endoglucanases (200 °C / 6 min) e de β -glucosidases (180 °C / 6 min). Os meios formulados com capim-elefante não tratado apresentaram promissores títulos enzimáticos para FPA ($23,38 \pm 0,01 \text{ UI.g}^{-1}$), endoglucanases ($161,07 \pm 0,66 \text{ UI.g}^{-1}$) e xilanases ($505,95 \pm 39,23 \text{ UI.g}^{-1}$), todos no quinto dia de cultivo. Para xilanases as maiores produções foram obtidas com capim-elefante não tratado em ambas as formas de condução de processo (CS e CES). Nas hidrólises enzimáticas, os maiores rendimentos de açúcares redutores foram obtidos quando empregou-se capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor a 200 °C / 10 min, e não lavado após o pré-tratamento ($863,42 \pm 62,52 \text{ mg.g}^{-1}$). As maiores liberações de glicose foram obtidas para as amostras lavadas, pré-tratadas a 190 °C / 8 min ($243,29 \pm 6,19 \text{ mg.g}^{-1}$), a 190 °C / 10 min ($248,34 \pm 6,27 \text{ mg.g}^{-1}$) e a 200 °C / 10 min ($246,00 \pm 9,60 \text{ mg.g}^{-1}$), após 48 h de hidrólise. Para a produção de etanol, os pré-tratamentos a 200 °C / 6 min com amostras lavadas possibilitaram as maiores produções, atingindo valores de 110,45 μL por grama de capim-elefante pré-tratado, considerando-se a perda de massa durante o pré-tratamento. Os dados obtidos indicam o potencial do capim-elefante tanto como matéria-prima para a produção de enzimas como para a liberação de açúcares redutores. Os resultados também revelam a necessidade de remover substâncias inibitórias formadas durante o pré-tratamento por explosão a vapor por meio de lavagem com água antes do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

Palavras-chave: capim-elefante, explosão a vapor, hidrólise, celulases, xilanases, fermentação alcoólica, cultivo submerso, cultivo em estado sólido.

ABSTRACT

With the growing demand for sources of renewable energy as alternatives to petroleum, the use of lignocellulosic biomasses, such as *Pennisetum purpureum* (elephant grass), may provide a viable alternative to second generation ethanol production. However, the raw material must first be appropriately pretreated to facilitate the action of the enzyme on the material. Among pretreatment methods, steam explosion is considered one of the most efficient for biomass deconstruction. In the present study, elephant grass was pretreated by steam explosion at different temperatures (180, 190, 200 °C) and residence times (6, 8 and 10 min). The pretreated samples were used to produce cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. These enzymes were used to hydrolyse elephant grass and subsequently the released sugars were used for alcoholic fermentation. For enzyme production in submerged cultivation (SC), the pretreatment of biomass showed a positive effect on total cellulases (Filter Paper Activity (FPA)), endoglucanases and β -glucosidases, being pretreatments performed at 190 °C / 8 and 190 °C / 6 min were the most promising. For solid state cultivations (SSC), replacing 50 % of elephant grass pretreated by steam explosion and submitted to washing by wheat bran favoured the productions of FPA (190 °C / 8 min), endoglucanases (200 °C / 6 min) and β -glucosidase (180 °C / 6 min). The media formulated with untreated elephant grass showed promising enzymatic titles for FPA ($23.38 \pm 0.01 \text{ IU.g}^{-1}$), endoglucanases ($161.07 \pm 0.66 \text{ IU.g}^{-1}$) and xylanases ($505.95 \pm 39.23 \text{ IU.g}^{-1}$) all in the fifth day of cultivation. For xylanases, the highest productions were obtained for the untreated elephant grass for both forms of the conduction process (SSC and SC). In enzymatic hydrolysis, the highest yield of reducing sugars was obtained when elephant grass pretreated at 200 °C / 10 min and unwashed after the pretreatment ($863.42 \pm 62.52 \text{ mg.g}^{-1}$) was used. The highest release of glucose was obtained for the samples that were washed and pretreated at 190 °C / 8 min ($243.29 \pm 6.19 \text{ mg.g}^{-1}$), 190 °C / 10 min ($248.34 \pm 6.27 \text{ mg.g}^{-1}$) 200 °C / 10 min ($246.00 \pm 9.60 \text{ mg.g}^{-1}$) after 48 h of hydrolysis. For ethanol production, the pretreatments at 200 °C / 6 min and washed exhibited the highest production, up to 110.45 μL per gram of pretreated elephant grass, considering the loss of mass during pretreatment. These data support the use of elephant grass as a raw material for enzyme production as well for the release of reducing sugars. These results also reveal the need to remove inhibitory substances formed during steam explosion pretreatment by washing with water prior to enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation.

Keywords: elephant grass, steam explosion, hydrolysis, cellulase, xylanase, alcoholic fermentation, submerged cultivation, solid-state cultivation

1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de etanol se encontra em expansão devido à crescente busca por fontes energéticas alternativas aos combustíveis derivados do petróleo. Essas fontes alternativas possibilitam a redução da poluição e a preservação do meio ambiente por utilizarem matérias-primas renováveis como resíduos de milho, trigo, beterraba, cana-de-açúcar, entre outras.

Diversos países têm buscado autonomia energética, uma vez que a quantidade de etanol disponível no mundo não é suficiente para atender à demanda. Os EUA são os maiores produtores de etanol a partir de milho no mundo, enquanto o Brasil produz etanol de cana-de-açúcar. Atualmente, muitos estudos sobre a produção de etanol estão centrados na utilização de bagaço de cana-de-açúcar, por ser um subproduto abundante. A tecnologia para a produção de etanol a partir de lignocelulósicos, conhecido como etanol de segunda geração, ou etanol celulósico, antes da produção dos açúcares fermentescíveis uma etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico é requerida. Estima-se que, a cada tonelada de cana-de-açúcar moída, obtêm-se 280 kg de bagaço, que é queimado para a produção de energia elétrica, mas que também pode ser utilizado para a produção de etanol. Nesse contexto, o etanol brasileiro apresenta-se cada vez mais atrativo para o mercado mundial devido à sua sustentabilidade.

No Rio Grande do Sul, o etanol combustível utilizado é proveniente de outros estados, uma vez que, devido às condições climáticas, a cana-de-açúcar apresenta baixa produtividade. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) se apresenta como uma alternativa, pois trata-se de uma gramínea adaptável a diversos tipos de solos e que possui alta produtividade quando comparado a outras culturas. A produção de biomassa de cana-de-açúcar é de 22 t/ha/ano (massa seca), a de eucalipto é de 9 t/ha/ano (massa seca), enquanto que capim-elefante apresenta 40 t/ha/ano (massa seca) (Somerville *et al.*, 2010).

Essa biomassa, após hidrólise enzimática, pode ser empregada para a produção de etanol. No entanto, existem diversos gargalos na liberação de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática. Entre esses gargalos estão o pré-tratamento da biomassa para romper o invólucro de lignina, causar modificações estruturais na hemicelulose e tornar a celulose mais acessível às enzimas, a inibição causada pelos açúcares liberados durante a hidrólise sobre as enzimas e sobre as leveduras durante a fermentação, além do elevado custo das enzimas empregadas no processo de hidrólise.

Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo geral realizar estudos de produção de celulasas e xilanases por *P. echinulatum* S1M29, em cultivos submersos (CS) e em cultivo em

estado sólido (CES), empregando capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, visando à obtenção de preparações enzimáticas a serem empregadas na hidrólise do material lignocelulósico e fermentação alcoólica dos açúcares de capim-elefante, tendo como objetivos específicos:

- verificar a eficiência do pré-tratamento por explosão a vapor sobre capim-elefante, empregando diferentes tempos e temperaturas;

- verificar o efeito das diferentes condições do pré-tratamento por explosão a vapor sobre a composição química e morfológica do capim-elefante;

- avaliar a influência do emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, em diferentes condições de tempo e temperatura, para produção de enzimas em cultivos submersos e em estado sólido;

- avaliar a utilização de caldos enzimáticos de *P. echinulatum* produzidos com capim-elefante como matéria-prima, na hidrólise enzimática de capim-elefante;

- avaliar o efeito das diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor na fermentação alcoólica dos açúcares liberados na hidrólise enzimática, utilizando a linhagem CAT-1 de *Saccharomyces cerevisiae*;

- avaliar o efeito do processo de lavagem com água nas amostras de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, sob diferentes condições de tempo e temperatura, na produção de enzimas, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Problemática ambiental e energias renováveis

A crescente demanda de energia nos últimos anos é a principal consequência do uso indiscriminado de combustíveis fósseis pela humanidade e do consequente aumento da poluição e emissões desenfreadas de carbono na atmosfera. Nesse sentido, os projetos de geração de energia podem ter impactos ambientais significativos e irreversíveis (Fontoura *et al.*, 2014).

Segundo dados da Agência Internacional de Energias Renováveis (IRENA), as fontes de energias renováveis são cada vez mais significativas para a economia mundial, representando um importante setor de criação de empregos. Segundo a IRENA, 6,5 milhões de pessoas em todo o mundo trabalharam em 2013 em funções relacionadas à geração de energia. No geral, a China responde por 2,6 milhões dos empregos mundiais no setor. O Brasil aparece em segundo lugar, com 894 mil empregos, seguido pelos Estados Unidos, 625 mil e pela Índia, 391 mil. A União Europeia como um todo detém 1,2 milhões de empregos, sendo que a Alemanha é o destaque com 371 mil (Ávila, 2014).

As emissões de gases causadores do efeito estufa resultantes da utilização destes combustíveis, como por exemplo o dióxido de carbono, são a principal causa das mudanças climáticas globais (Buckeridge *et al.*, 2009), além de afetar negativamente a qualidade de vida.

Segundo o *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAAA, 2013), o dióxido de carbono permanece na atmosfera por centenas de anos e seu excessivo aumento está diretamente associado à queima de combustíveis fósseis. Alguns dados históricos mostram que, antes da Revolução Industrial, a concentração de CO₂ ficava em torno de 180 e 280 ppm (partes por milhão), enquanto atualmente superamos a concentração de 400 ppm de CO₂ na atmosfera (Ávila, 2014).

A redução dos problemas ambientais poderia ser favorecida por um uso mais eficiente da energia, através de mudanças na matriz de geração de energia do mundo, a previsão para serviços de energia, tais como a armazenagem, transporte e a distribuição de novas políticas regulatórias. Diversos governos adotaram políticas de incentivo e de expansão do uso de fontes de energia renováveis e sustentáveis (Andreoli, 2008). Essa área de pesquisa é motivada, principalmente, pelo despertar de uma maior consciência ecológica e ambiental nas atividades industriais (Ramos, 2000).

A produção de etanol combustível tem aumentado consideravelmente porque muitos países procuram reduzir as importações de petróleo, impulsionando as economias rurais e a melhoria da qualidade do ar (Sánchez & Cardona, 2008). Ao contrário dos combustíveis fósseis, o etanol é uma fonte de energia renovável produzida através da fermentação de açúcares (Sun & Cheng, 2002).

Na década de 1970, o Brasil iniciou um programa para substituir a gasolina pelo etanol, visando à diminuição da dependência política e econômica. Nesse programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para produzir etanol e, sendo assim, a intensificação de estudos agrícolas e tecnológicos levaram o Brasil a uma posição favorável em termos de segurança energética. No entanto, deve-se notar que somente parte da biomassa produzida é utilizada para a produção de bioenergia; um terço da planta é utilizada para a produção de açúcar, um terço é bagaço, que é queimado para produção de eletricidade e o terço restante é deixado no campo, sendo decomposto por microrganismos (Cortez *et al.*, 2008). Para a conversão dos polissacarídeos presentes nas folhas, palhas e bagaço de cana-de-açúcar em etanol, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o aumento da produção desse combustível sem ocupar novas áreas de terras (Soccol *et al.*, 2010).

A produção de etanol a partir de açúcares ou amido impacta de forma negativa na economia do processo, tornando o etanol mais oneroso em comparação aos combustíveis fósseis. O foco no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol lignocelulósico foi deslocado para a utilização de materiais residuais para reduzir os custos de produção (Howard *et al.*, 2003).

Assim, as enormes quantidades de biomassa vegetal residual, que não são comumente utilizadas, podem potencialmente ser convertidas em diversos produtos de valor agregado, incluindo os biocombustíveis, produtos químicos, fontes de energia com custo reduzido para a fermentação, rações animais, entre outros. Estes recursos podem ser usados para criar novos biomateriais e isso requer uma compreensão da composição da matéria-prima ou de toda a planta, de modo que os elementos funcionais desejados possam ser obtidos para a produção de bioprodutos (Howard *et al.*, 2003).

O Brasil possui uma vasta extensão de áreas agrícolas disponíveis, radiação solar intensa, grande disponibilidade de água, diversidade climática e interação entre os centros de pesquisa agrícola, como a Embrapa e de agronegócio (EPE, 2007). Além disso, o país também tem cerca de 30 milhões de hectares de áreas com baixa produtividade para alimentação animal, que poderiam ser usados por diferentes biomassas, inclusive capim-elefante (MAPA, 2013). As iniciativas do governo brasileiro contribuíram fortemente para o

investimento em fontes alternativas de energia, e dessa forma, a utilização de biomassas na matriz energética brasileira aumentou nos últimos anos, de 5,4 % em 2009 para 6,8 % em 2012 (EPE, 2013).

2.2 Biomassa lignocelulósica: novas fontes de energias renováveis

A biomassa desempenhou um importante papel até parte do século XIX, onde em torno de 85 % de toda a energia utilizada pelo homem tinha como fonte a madeira, o carvão e outros produtos de origem vegetal. Dessa forma, tornou-se a principal fonte de energia da humanidade (Goldemberg, 2010).

O combustível derivado da biomassa tem sido foco de interesse em pesquisas por suas vantagens sobre os combustíveis fósseis. A biomassa é renovável e amplamente utilizada (Xuan *et al.*, 2009), tornando-se matéria-prima atrativa para a produção de etanol e outros combustíveis alternativos (Szengyel, 2000; Kalogeris *et al.*, 2003; Adsul *et al.*, 2004; Menegol *et al.*, 2014a).

Nesse contexto, vários governos começaram a desenvolver estratégias enfatizando a importância de novas fontes de energias renováveis para suprir a crescente demanda energética, além dos preços instáveis das energias. Entre as diversas fontes de energia - biomassa, solar, eólica, geotérmica, das marés - a biomassa possui grande prioridade, uma vez que é a única fonte que pode ser diretamente utilizada para a produção de combustíveis, especialmente o etanol (Dwivedi *at al.*, 2009).

Diversos recursos de biomassas lignocelulósicas estão disponíveis em nosso planeta para conversão em bioprodutos e energia (Howard, 2003), conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Resíduos lignocelulósicos, origem e suas aplicações (Howard, 2003).

Resíduos	Origem	Aplicações
Palhas, espigas de milho, talos, cascas	Trigo, arroz, cevada, aveia e milho	Alimentação animal, queimado como combustível, adubo orgânico
Águas residuais, farelos	Milho, trigo, arroz e soja	Alimentação animal
Bagaços	Cana-de-açúcar e outros produtos de açúcar	Energia térmica
Resíduos de fibra, licor de sulfito	Fábricas de celulose e papel	Reutilizado na indústria de celulose e painéis
Jornais velhos, papel, papelão, placas antigas, móveis em desuso	Resíduos lignocelulósicos	Pequeno percentual reciclado, outros queimados
Gramíneas não utilizáveis como fonte de alimento	Gramíneas	Queima

2.2.1 Composição da biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são compostos de polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e em menor quantidade amido, pectina, extraíveis e minerais em uma estrutura intrínseca, que é recalcitrante à desconstrução. Embora a composição deste tipo de biomassa seja bastante variável, a celulose e a hemicelulose normalmente compreendem até dois terços e são matérias-primas que potencialmente serão utilizados para a produção de etanol de segunda geração (Gírio, 2010).

Os três maiores componentes poliméricos (celulose, hemicelulose e lignina) constituem 97-99 % da massa seca dos lignocelulósicos (Mosier *et al.*, 2005).

Na Figura 1 observa-se um esquema da distribuição da lignina, hemicelulose e celulose de um tecido vegetal.

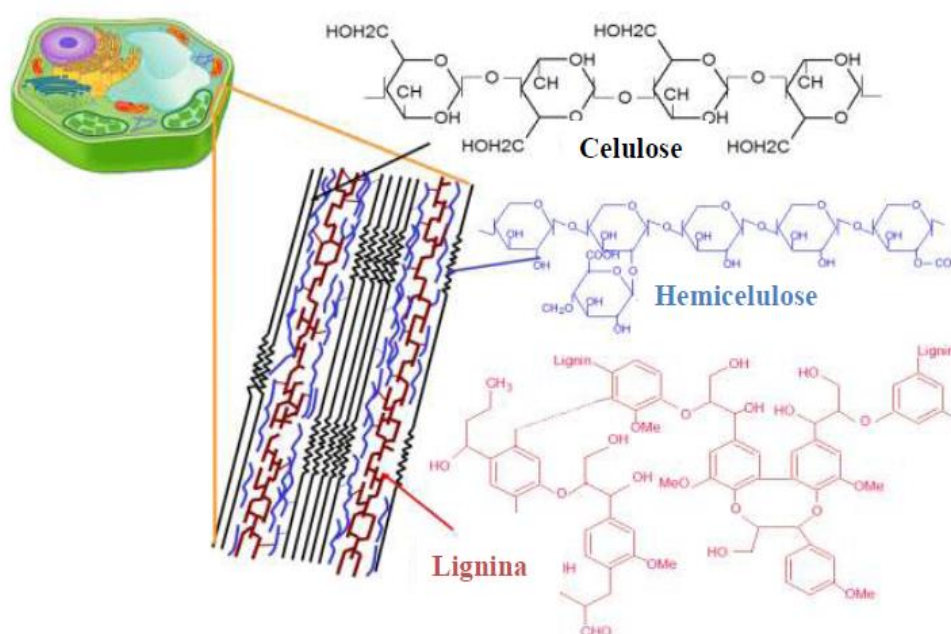


Figura 1. Constituintes da parede da célula vegetal (Ilustração: M. Camassola, 2009).

- Celulose

A celulose é o composto orgânico mais abundante da Terra e a maior parte da celulose utilizada na indústria provém da madeira – 40 % a 50 % de celulose - e das fibras do algodão – 98 % de celulose (Medve, 1997). A celulose é um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações do tipo β (1-4) (Galdeano, 2001). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água,

que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Essa estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose (Fengel & Wegener, 1989), quando liberada da celulose.

As cadeias de celulose agregam-se formando fibrilas e apresentam ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose. Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (Galdeano, 2001) (Figura 2). As regiões de celulose amorfa exibem baixa resistência, constituindo-se em pontos para ataques químicos e biológicos (Fan *et al.*, 1980).

A celulose é geralmente organizada em microfibrilas, cada uma medindo cerca de 3-6 nm de diâmetro e contendo até 36 cadeias de glicano, tendo milhares de resíduos de glicose (Zheng *et al.*, 2009).

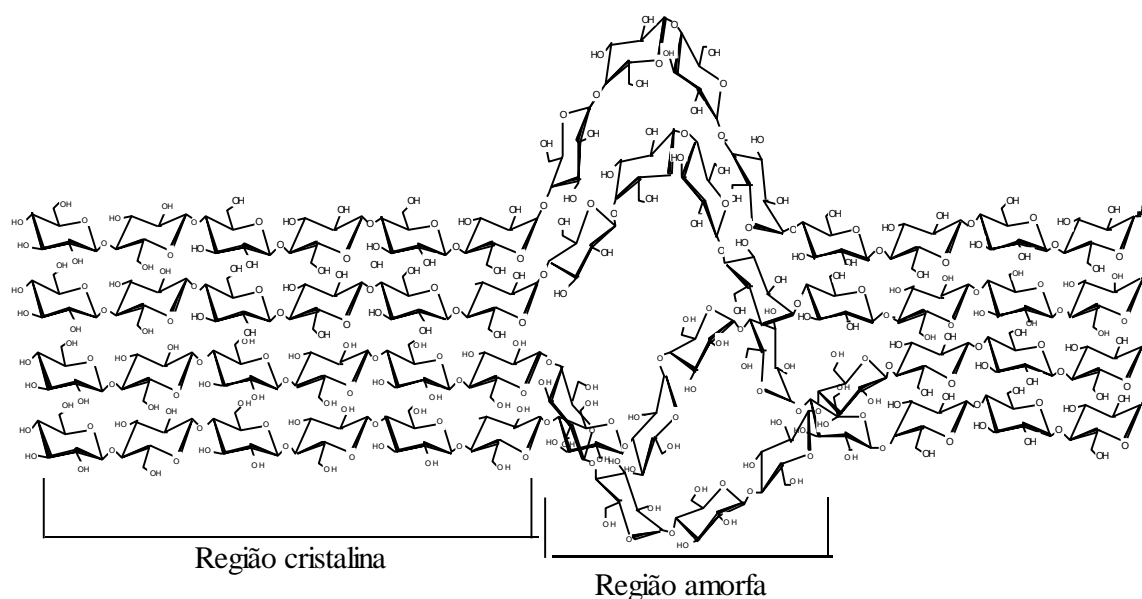


Figura 2. Estrutura da celulose, reproduzida de Dillon (2004).

- Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos. As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e se constituem em heteropolissacarídeos formados por unidades de β -D-xilopirranose 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 e seu 4-O-metil-éter e grupo acetil (Saha, 2003). Todos os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis (Pérez *et al.*, 2002).

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose (Figura 3), dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003).

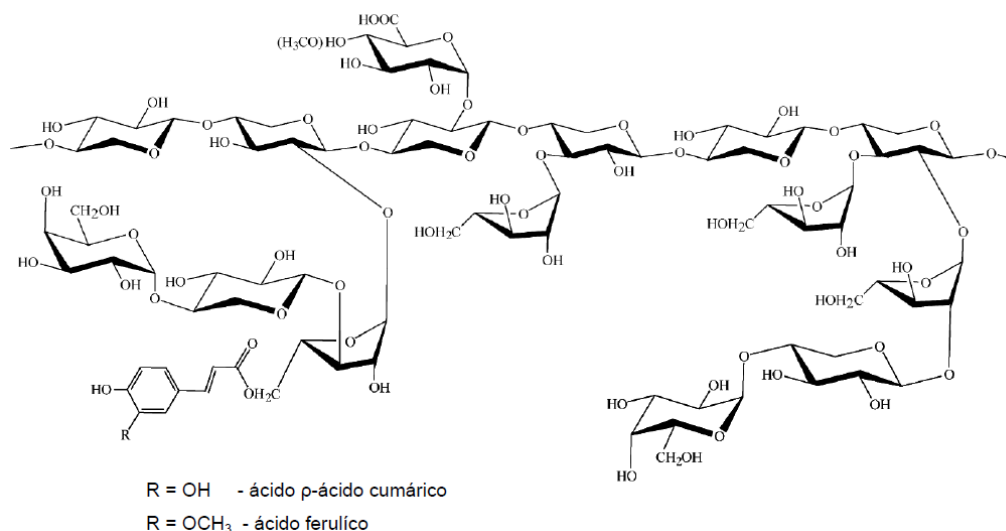


Figura 3. Estrutura molecular da hemicelulose (Fonte: Polizeli *et al.*, 2011).

- Lignina

A lignina é uma das macromoléculas mais abundantes na Terra e apresenta uma estrutura molecular bastante complexa (Figura 4). É um heteropolímero amorfo de alto peso molecular, constituído por unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações. Devido à sua composição química, a lignina é hidrofóbica e extremamente resistente à decomposição (Pérez *et al.*, 2002). Está presente na parede celular, constituindo uma estrutura de suporte, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano (Pérez *et al.*, 2002).

A lignina associa-se covalentemente com a hemicelulose, prevenindo assim o acesso de agentes hidrolíticos à celulose. Dessa forma, estudos da biodegradação da lignina são de grande importância para possibilitar aplicações biotecnológicas, visto que esses polímeros são o maior obstáculo para a eficiente utilização de materiais lignocelulósicos em uma ampla faixa de processos industriais (Eggert *et al.*, 1996).

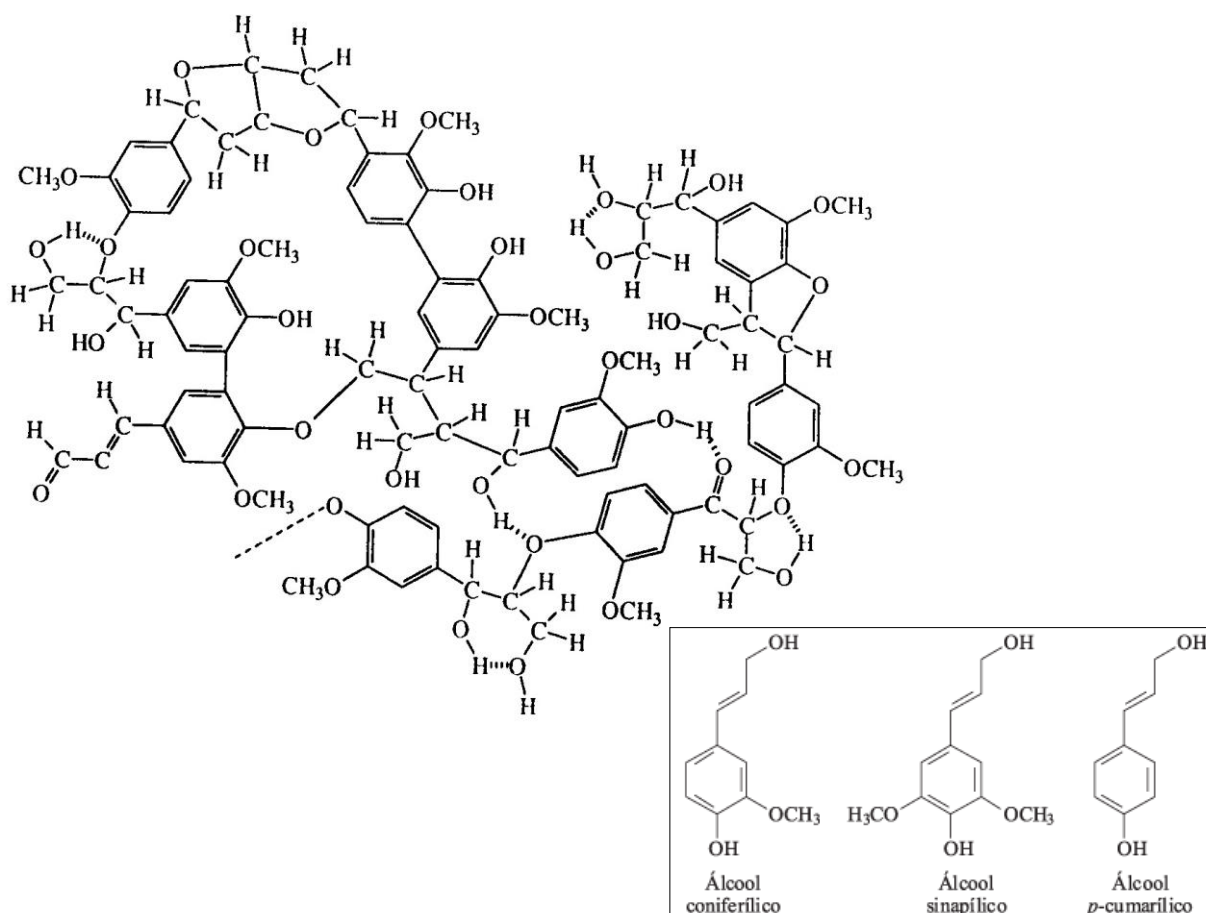


Figura 4. Estrutura molecular da lignina (Fonte: Sarkanen *et al.*, 1971).

2.3 Capim-elefante

O capim-elefante da espécie *Pennisetum purpureum* (Figura 5), pertence à família Graminae (Poaceae), subfamília Panicoideae, tribo: Paniceae, gênero: *Pennisetum* L. Rich e espécie: *P. purpureum*, Schumacher (Stebbins & Crampton, 1961).

Apresenta elevada produtividade quando comparado ao eucalipto e à cana-de-açúcar, produzindo cerca de 40 toneladas de matéria seca por hectare por ano (Woodard e Prine, 1993). É uma gramínea plantada da mesma forma que a cana-de-açúcar, exigindo poucos nutrientes complementares para o crescimento (Osava, 2007).

Comparando-se o teor de celulose entre diferentes biomassas, verifica-se que o capim-elefante apresenta 36 % de celulose (Menegol *et al.*, 2014b), o bagaço de cana-de-açúcar 50,5 % (Kansoh *et al.*, 1999) e a palha de milho 14,2 % (Mosier *et al.*, 2005).

Essa espécie tem despertado grande interesse para a geração de energia (Menegol *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2014; Pérez-Boada *et al.*, 2014). Segundo Rodrigues *et al.* (2001), o capim-elefante foi introduzido no Brasil há quase um século, por volta do ano de 1920 após ter sido descoberto pelo Coronel Napier em 1905 na África Tropical, sendo que hoje ele é encontrado em todas as regiões do país. São conhecidos, pelo menos, 85 diferentes genótipos

de capim-elefante, destacando-se as variedades Cameron, Roxo, Napier, Anão, Pioneiro, Merker, além de híbridos (Basso *et al.*, 2014). Inicialmente, esta espécie era utilizada como alimento para o gado e atualmente, apresenta um alto potencial como fonte alternativa de energia e também para a obtenção de carvão vegetal (Urquiaga *et al.*, 2006). Além disso, diversos estudos apontam seu potencial para a produção de etanol de segunda geração (Cardona *et al.*, 2014; Menegol *et al.*, 2014a,b).



Figura 5. Cultura de capim-elefante (Imagem da autora, 2010).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) essa espécie se caracteriza por ser perene, de porte ereto, com talos grossos de até 4,5 m de altura. É encontrada em áreas de solo úmido com mais de 1000 mm de precipitação anual. Cresce melhor em solos profundos, de textura moderada a bastante pesada e tolera secas breves. É a gramínea forrageira mais amplamente cultivada e rende grandes quantidades de matéria seca. Seu principal atributo é a alta produção de forragem quando submetida a cortes frequentes, após adubação e irrigação. Seus rendimentos de biomassa variam entre 12 e 150 t/ha/ano, dependendo da fertilidade, manejo e cultivares, e além disso, pode ser colhido até quatro vezes por ano, o que torna esta planta uma das mais potenciais culturas para o uso de energia (Strezov *et al.*, 2008).

Na maioria das regiões produtoras do Brasil, seu cultivo anual concentra-se no período chuvoso, com um grande crescimento e perda do valor nutritivo (Deresz, 2001). Nesse

sentido, além da influência dos efeitos climáticos, sua produtividade pode ser influenciada pela quantidade de nutrientes no solo, com destaque para o nitrogênio (Abreu *et al.*, 2006). O capim-elefante é especialmente eficaz na redução da contaminação de nitrogênio presente em águas subterrâneas e solos com excretas animais que contenham quantidades elevadas de nitrogênio e sais (Wang *et al.*, 2002).

O cultivo do capim-elefante depende da temperatura e da precipitação, sendo que a faixa de temperatura exigida é de 18 °C a 30 °C, sendo 24 °C a temperatura ideal, enquanto a faixa de precipitação anual é de 800 a 4.000 mm (IBGE, 2002).

Para Vicente (2007), o capim-elefante proporciona maior produtividade, requer menor extensão de áreas para produção, menor ciclo produtivo, melhor fluxo de caixa, possibilidade de mecanização total, energia renovável e maior assimilação de carbono.

2.4 Produção de enzimas

Vários fatores influenciam na produção de enzimas microbianas, incluindo-se o microrganismo produtor das enzimas de interesse, o meio de cultivo e o controle adequado de parâmetros físico-químicos durante o processo (Dillon, 2004).

Para a produção de uma determinada enzima microbiana, é de grande importância a formulação de um meio efetivo, de baixo custo e que permita a manutenção e o crescimento do microrganismo (Smits *et al.*, 1996). Assim, para que o crescimento ocorra, é preciso que o microrganismo encontre os elementos básicos e indispensáveis para seu metabolismo. Deste modo, elementos como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e cálcio, além de ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês e molibdênio, são todos requeridos pelos microrganismos e devem estar presentes no meio (Smits *et al.*, 1996).

Existem dois tipos de processos que são utilizados para a produção de enzimas: cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS) (Schmidell & Facciotti, 2001).

O CES é qualquer processo de cultivo realizado em material insolúvel, que atua tanto como suporte físico, como fonte de nutrientes para o microrganismo, e o meio de cultura não contém água livre (Chahal, 1985, Pandey, 1992). O crescimento do microrganismo e a formação de produtos ocorrem na superfície e/ou dentro do sólido (Considine *et al.*, 1987).

Esse processo apresenta diversas vantagens, como volume reduzido do meio de cultivo, menores custos de manipulação, rendimento do produto - que pode ser maior do que o obtido em cultivos submersos - uso direto do produto concentrado no substrato, menor quantidade da solução extratora para a extração de substâncias, maior simplicidade na formulação final do meio de cultura, redução no risco de contaminação bacteriana e

equipamentos menos complexos que os dos cultivos submersos (Cannel & Moo-Young, 1980; Tergerdy, 1985). No entanto, o CES também apresenta algumas desvantagens, entre estas, destacam-se a utilização de microrganismos restrita àqueles capazes de desenvolver-se em baixos níveis de umidade, a dificuldade de transferência de calor, de controle dos níveis de umidade, pH, O₂, CO₂ e produtos formados, além da necessidade de grande quantidade de inóculo (Cannel & Moo-Young, 1980).

Apesar das vantagens oferecidas pelo CES, 5 % das enzimas comercialmente importantes são produzidas em estado sólido. Os processos de cultivo submerso (CS) dominam a produção da maioria das enzimas microbianas comerciais, principalmente porque o controle e a esterilização são facilitados neste sistema (Said & Pietro, 2002), além de permitir maior controle de parâmetros como pH, temperatura e concentração nutrientes (Nigam & Singh, 1994).

O CS envolve crescimento de um microrganismo em suspensão em meio líquido, no qual vários nutrientes estão dissolvidos ou suspensos como partículas sólidas. Existem muitos tipos de reatores disponíveis para CS, mas as produções de enzimas comerciais realizam-se, predominantemente, em sistema de misturas por agitadores mecânicos internos, dentro de um recipiente cilíndrico fechado constituído de aço inoxidável e contendo um eixo interno com pás para agitação. O controle do CS é realizado através de dispositivos acoplados ao recipiente principal (Said & Pietro, 2002).

Os processos de cultivo submerso são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classificam em processos descontínuos, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (Schmidell & Facciotti, 2001).

2.4.1 Celulases: características, produção e aplicações

As celulases constituem um complexo de enzimas encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias, e estão presentes também no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes. Nos ruminantes e em alguns insetos xilófagos, a degradação da celulose é consequência da atividade enzimática proveniente da secreção de fungos e bactérias simbiotes. Esse complexo enzimático é capaz de hidrolisar a celulose em moléculas de glicose (Figura 6) (Kubicek *et al.*, 1993; Rolle, 1998).

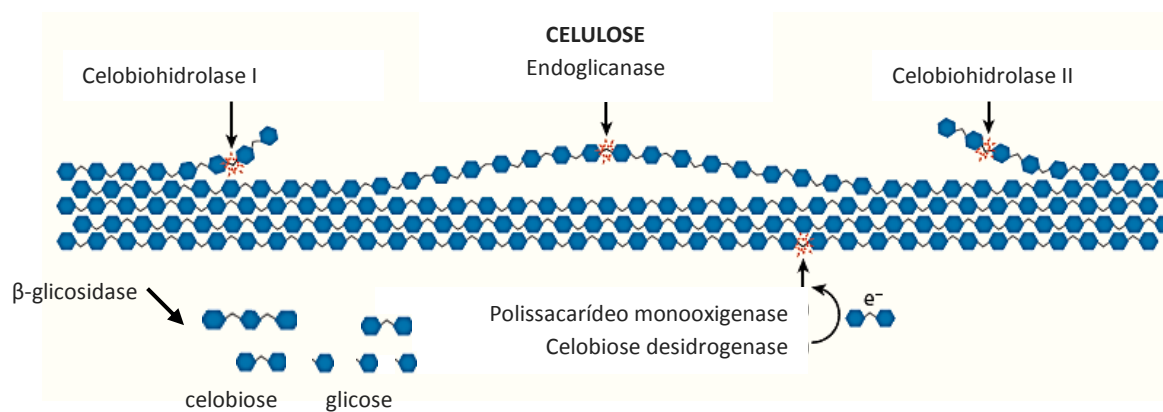


Figura 6. Representação da atuação das celulases e enzimas acessórias (Adaptado de Glass *et al.*, 2013).

Devido a sua ação hidrolítica, as celulases atacam diretamente a estrutura da celulose, causando perda de massa e diminuindo seu grau de polimerização (Andreaus, 2001). As celulases são proteínas com uma estrutura tridimensional, sensíveis a mudanças de pH e temperatura. Especialmente em pH alcalino e a temperaturas acima de 80° C, desnaturam e perdem a sua atividade catalítica (Andreaus, 2001).

O complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglicanases, as celobiohidrolases (exoglicanases) e as β -glicosidases, que não são consideradas como celulases legítimas, pois não agem diretamente na molécula de celulose (Medve, 1997).

Os métodos de separação de moléculas e os estudos sobre a ação dos componentes das celulases têm mostrado que esse complexo enzimático é constituído por um conjunto de três enzimas hidrolíticas: as endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; as exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades reductoras e não reductoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases liberando oligossacarídeos e celobiose; e as β -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000). Estes três componentes atuam de forma sinérgica na hidrólise da celulose (Dillon, 2004).

Diversos fatores interferem no crescimento fúngico e dessa forma, o controle de parâmetros como temperatura e pH são importantes, principalmente quando se visa a produção de celulases (Xiong *et al.*, 2004). Para *Trichoderma reesei* a faixa de temperatura de crescimento está entre 32-35 °C, enquanto a temperatura de produção de enzima está entre 25-28°C. O controle da temperatura pode ser utilizado para otimizar tanto o crescimento celular

como a produção de celulases, sendo que a fase de crescimento antecede à da secreção enzimática (Ryu & Mandels, 1980).

As celulases, assim como as demais enzimas hidrolíticas, são induzidas, havendo a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek *et al.*, 1993). Entre os complexos celulolíticos de bactérias e fungos já estudados, o mais conhecido é o de *T. reesei* (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000). O complexo enzimático produzido pelo *T. reesei*, é conhecido por possuir baixa atividade β -glicosidásica e uma grande quantidade de exoglucanases (Teeri, 1997). De acordo com Martins *et al.* (2005), o complexo enzimático de *P. echinulatum* apresenta uma quantidade de β -glucosidase superior ao de *T. reesei*. Este fato demonstra a sua potencialidade para processos de sacarificação total da celulose, pois a manutenção da celobiose em níveis reduzidos evita o efeito inibitório desta sobre as celulases. Portanto, se o interesse é obter alta produtividade nas secreções de celulases, é de grande importância o uso de microrganismos alterados geneticamente, que apresentem desrepressão a açúcares (Dillon, 2004).

As principais aplicações das celulases destinam-se à área têxtil e de detergentes. Na área têxtil, as celulases são utilizadas para desenvolver o aspecto de usado e desbotado (bioestonagem) em tecidos de algodão tingidos com índigo e, também, para a retirada das regiões de desorganização de microfibrilas de celulose (“*peeling*”) e amaciamento dos tecidos. Como componentes de detergentes, as celulases são utilizadas para remover extremidades de microfibrilas que são retiradas do tecido juntamente com a sujeira e, ainda, proporcionam maior brilho aos tecidos. As celulases também vêm sendo utilizadas como aditivos na preparação do malte de cerveja, em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. Na área de alimentação animal, são comercializadas como componentes de indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose (Dillon, 2004). No entanto, a área de maior potencial de utilização é para produção de etanol de segunda geração (Reis *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que a degradação enzimática de celulose é facilitada pela ação de monooxigenases - CBM33 e GH61, que são oxidases Cu-dependentes (Horn *et al.*, 2012), as quais podem acelerar a conversão enzimática de biomassa, reduzindo a carga enzimática e o tempo de hidrólise. Celobiose-desidrogenase (CDH), em combinação com as monooxigenases, também facilitam a degradação de celulose (Henriksson *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2012). Outras proteínas também podem estar envolvidas na degradação do material lignocelulósico, como as swoleninas, que auxiliam no afrouxamento da parede

celular (Saloheimo *et al.*, 2002).

2.4.2 Xilanases: características, produção e aplicações

As xilanases são produzidas por diversos organismos, tais como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Fungos filamentosos produtores de xilanases são particularmente interessantes, uma vez que secretam maiores quantidades de enzima em relação a bactérias e leveduras. Ainda, as xilanases fúngicas são produzidas associadas às celulases (Menegol *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2014; Sunna & Antranikian, 1997; Beg *et al.*, 2001).

As xilanases (1,4-β-D-xilana xilanoidrolase, EC 3.2.1.8) constituem um grupo de enzimas com aplicações industriais, particularmente na indústria de alimentos para animais, mas também são utilizadas nas indústrias de polpa e papel (biobranqueamento) e processamento de alimentos (Xiong *et al.*, 2005). As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes que não foram degradados ou liberar nutrientes que permaneceram retidos por fibras. Isto resulta em diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento (Xiong *et al.*, 2005). Também são utilizadas para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999).

O interesse industrial por hemicelulases e por fungos produtores de xilanases extracelulares vem crescendo nas últimas décadas, principalmente nas indústrias químicas e farmacêuticas, na produção de biopolímeros catiônicos, hidrogéis e derivados de éster alquil de cadeias longas (Sun *et al.*, 2004).

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 (Collins *et al.*, 2006).

Para produção de xilanases e celulases, a escolha da fonte de carbono é uma importante variável. Os materiais lignocelulósicos parecem ser melhores substratos que a xilana para a produção de xilanases (Lenartovicz *et al.*, 2002; Papinutti & Forchiassin, 2007), enquanto a celulose é uma importante fonte de carbono para produção de celulases (Reis *et al.*, 2013). Adicionalmente, *T. reesei*, cultivado em celulose apresentou elevadas atividades de celulases e endoxilanases (Olsson *et al.*, 2003), sendo este efeito atribuído ao fato de que o regulador da produção de celulases ACEII também afeta a regulação da produção de

xilanases. Assim, a presença da celulose pode não somente induzir a produção de celulases, mas também a de xilanases (Aro *et al.*, 2001).

2.5 Conversão da biomassa lignocelulósica em etanol

Problemas sociais e ambientais associados ao uso inadequado de combustíveis fósseis e sua desenfreada exploração incentivam cada vez mais a busca por novas tecnologias para a conversão de biomassa em combustíveis alternativos (Ferreira *et al.*, 2009). A conversão de materiais lignocelulósicos em etanol combustível se tornou uma prioridade mundial para a produção de energia renovável a um preço razoável para o setor de transporte (Gírio, 2010).

O etanol é um dos biocombustíveis mais promissores a partir de recursos renováveis. Derivado de fermentação, ele pode ser produzido a partir de açúcar, amido ou biomassa lignocelulósica, no entanto, a sua produção a partir de açúcar e amido está longe de ser economicamente favorável (Krishna *et al.*, 2001; Sukumaran *et al.*, 2009). Além disso, o etanol, quando adicionado à gasolina, possibilita uma melhor oxidação de hidrocarbonetos por conter oxigênio em sua molécula e contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa para a atmosfera, visto que por meio da fotossíntese mantém o ciclo do carbono, não emitindo CO₂ na atmosfera, como ocorre quando há queima de petróleo (Hill *et al.*, 2006).

É possível produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos, desde que esses sofram hidrólise ácida ou hidrólise enzimática. Em ambos os processos ocorrem as mesmas etapas principais: hidrólise da celulose e da hemicelulose a monômeros de açúcares, fermentação, recuperação e concentração do produto por destilação (Galbe & Zacchi, 2002).

A conversão da biomassa em etanol inclui a hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos para açúcares redutores fermentáveis, e a fermentação dos açúcares em etanol. A hidrólise geralmente é catalisada por celulases e a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias. Os fatores que influenciam na hidrólise da celulose incluem porosidade (área de superfície acessível) dos materiais residuais, a cristalinidade da fibra de celulose e o conteúdo de lignina e hemicelulose (McMillan, 1994).

Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos nas frações celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol por via fermentativa. Entretanto, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros com elevado grau de pureza (Sun & Cheng, 2002). A remoção da lignina e da hemicelulose, a

redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade em processos de pré-tratamento podem melhorar significativamente a hidrólise (McMillan, 1994).

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 7 (Mosier *et al.*, 2005).

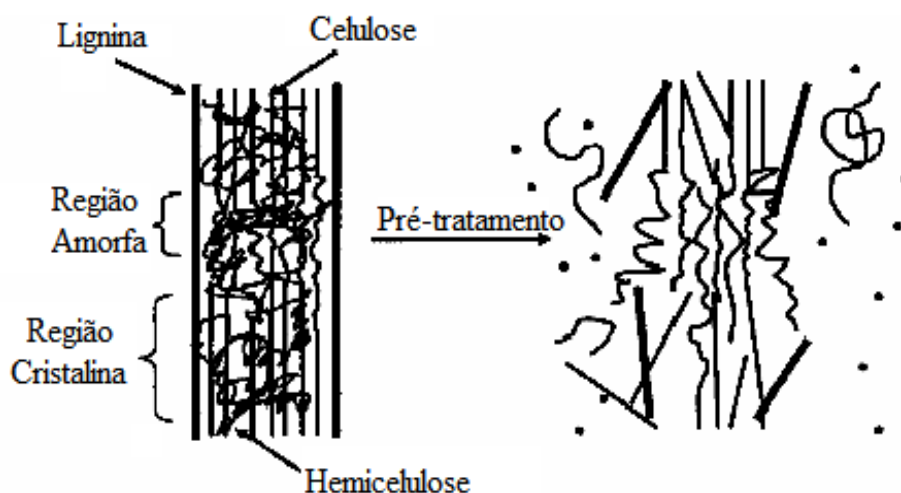


Figura 7: Esquema representando o efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico (Adaptado de Mosier *et al.*, 2005).

Para viabilizar processos econômicos de produção de etanol a partir de lignocelulose, alguns procedimentos têm sido estudados: (1) desenvolvimento de pré-tratamentos eficientes para remover hemicelulose e lignina; (2) melhoramento genético de linhagens; (3) adição de β -glicosidases provenientes de *Aspergillus* spp.; (4) desenvolvimento de processos mais eficientes de fermentação, como o uso de substratos de menor custo; (5) recuperação das celulases; (6) diminuição do efeito inibitório da glicose sobre as celulases, por meio de um processo, o qual em um único estágio envolva hidrólise e fermentação conjunta, podendo ainda o etanol ser retirado por vácuo ou por arraste pela indução do próprio CO_2 proveniente da fermentação (Dillon, 2004).

2.5.1 Métodos de pré-tratamento

O principal desafio na conversão de biomassa em etanol é a etapa de pré-tratamento. O pré-tratamento deve satisfazer os seguintes requisitos: (1) melhorar a formação de açúcares ou a capacidade de formar posteriormente açúcares por hidrólise enzimática, (2) evitar a degradação ou perda de carboidratos, (3) evitar a formação de subprodutos inibitórios para a subsequente hidrólise e processos de fermentação e (4) ser rentável (Sun & Cheng, 2002). Há a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento que amenize a interação entre os principais componentes da fitobiomassa e os torne suscetíveis à conversão em (bio) combustíveis e/ou insumos para a indústria química (Ramos, 2003).

Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes propriedades físico-químicas, é necessária a adoção de tecnologias de pré-tratamentos baseadas nas propriedades da biomassa lignocelulósica de cada matéria-prima. Além disso, a escolha do pré-tratamentos tem grande impacto em todas as etapas subsequentes no regime de conversão global, em termos de digestibilidade da celulose, geração de compostos tóxicos potencialmente inibitórios para a etapa de fermentação, a demanda de energia e o tratamento de águas residuais (Galbe & Zacchi, 2007). Além disso, deve-se considerar que o pré-tratamento é considerado uma das etapas mais onerosas do processo de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, dependendo da tecnologia empregada (Mosier *et al.*, 2005).

Os métodos de pré-tratamento podem ser agrupados em quatro tipos diferentes: físicos, químicos, biológicos e combinados. Os pré-tratamentos físicos são caracterizados pela fragmentação do material através de uma ação mecânica, como por exemplo a trituração (Schell & Harwood, 1994). A combinação de pré-tratamentos físicos e químicos torna-se mais eficiente para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (Satyanarayana *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2005).

Embora existam diversos tipos de pré-tratamentos, conforme exposto no Quadro 2, o pré-tratamento por explosão a vapor tem sido foco de inúmeros estudos, visando a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

Quadro 2. Sumário das vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (Alvira *et al.*, 2010).

Métodos de pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Biológico (uso de microrganismos para degradação preferencial da lignina)	- degrada lignina e hemicelulose - baixo consumo de energia	- baixa taxa de hidrólise
Moagem (triturar a biomassa)	- reduz a cristalinidade da celulose	- alto consumo de energia
Explosão a vapor (submeter a biomassa a temperaturas entre 150 a 250 °C por alguns minutos e posterior súbita despressurização)	- causa transformações na lignina e solubilização da hemicelulose - custo-benefício - maior produção de glicose e de hemicelulose no método de duas etapas	- geração de compostos tóxicos -degradação parcial da hemicelulose
Hidrotérmico (uso de água na forma líquida ou vapor)	- hidrólise seletiva da hemicelulose - degradação da lignina - baixo custo operacional	- geração de compostos inibitórios
Ammonia Fibre Expansion (AFEX) (tratamento da biomassa na presença de amônia)	- aumenta a área de superfície acessível - baixa formação de inibidores	- não é eficiente para matérias-primas com alto teor de lignina - alto custo pela grande quantidade de amônia
Explosão com CO₂ (idem a explosão a vapor, adicionando CO ₂)	- aumenta a área de superfície acessível - custo-benefício - não gera compostos tóxicos	- não afeta à lignina e hemiceluloses - exigência de alta pressão
Oxidação úmida (submeter a biomassa umedecida a elevadas concentrações de oxigênio)	- eficiente remoção de lignina - baixa formação de inibidores - reduz o consumo de energia (exotérmica)	- alto custo de oxigênio e catalisador alcalino
Ozonólise (pré-tratar a biomassa na presença de ozônio)	- reduz o teor de lignina - não gera compostos tóxicos	- alto custo pela grande quantidade de ozônio necessária
Organossolventes (utilizar solventes para dissolver a lignina)	- causa hidrólise de lignina e hemicelulose	- alto custo - solventes precisam ser drenados e reciclados
Ácido concentrado (utilizar concentrações elevadas de ácidos)	- alto rendimento de glicose - temperatura ambiente	- custo elevado dos ácidos e necessidade de recuperação - problemas de corrosão - formação de inibidores - necessidade de neutralização
Ácido diluído (utilizar baixas concentrações de ácidos)	- menos problemas de corrosão - menos formação de compostos inibidores	- geração de produtos de degradação - concentração baixa de açúcares no fluxo de saída
Alcalino (emprego de hidróxidos para a degradação de lignina)	- a reatividade da celulose para a posterior hidrólise é suficientemente aumentada - preservação de grande parte da hemicelulose em uma forma polimérica insolúvel	- alto custo do reagente - geração de grandes quantidades de efluentes - perda de massa - necessidade de neutralização

2.5.2 Explosão a vapor

O método por explosão a vapor tem sido reconhecido como um dos pré-tratamentos mais eficazes para a deslignificação da biomassa lignocelulósica (Ramos *et al.*, 1992; Viola *et al.*, 2008; Iroba *et al.*, 2014; Bauer *et al.*, 2014) apresentando-se como uma técnica promissora para o fracionamento e recuperação dos três principais componentes da célula vegetal (lignina, celulose e hemicelulose) com rendimentos elevados (Brugnago *et al.*, 2011).

A explosão a vapor é o método mais comumente usado para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (Mc Millan, 1994; Ruiz *et al.*, 2008). A diferença entre o pré-tratamento hidrotérmico e explosão a vapor é a despressurização rápida e o arrefecimento da biomassa no final da pré-explosão de vapor que a água causa na biomassa para explodir (Hendricks & Zeeman, 2009). Durante o pré-tratamento, a matéria-prima é colocada em um recipiente e, em seguida, mantido no vapor a temperatura e pressão elevadas (20-50 bar, até 240 °C), por alguns minutos. Depois de um tempo definido, o pré-tratamento é subitamente interrompido, o vapor é liberado e a biomassa é rapidamente arrefecida (Hendricks & Zeeman, 2009).

Conforme Pitarelo *et al.* (2012), o pré-tratamento por explosão a vapor pode ser realizado na presença ou ausência de um catalisador. Morjanoff & Gray (1987) também relatam aumento nos rendimentos da hidrólise enzimática, a diminuição da formação de compostos inibitórios, bem como a maior remoção da hemicelulose podem ser obtidos com o uso de H₂SO₄ (ou SO₂) ou CO₂ no pré-tratamento por explosão a vapor.

De acordo com Satyanarayana *et al.* (2004), diversas vantagens são obtidas com a otimização do método de explosão a vapor, considerando as propriedades químicas e a distribuição da lignina do material pré-tratado: maior estabilidade térmica, menor absorção da umidade, melhores propriedades de resistência e menor densidade de fibras. Ainda, segundo Pitarelo *et al.* (2012), a eficiência da sacarificação, fermentação e recuperação dos componentes da parede celular dependem diretamente das condições determinadas para o pré-tratamento por explosão a vapor, como temperatura, tempo de residência da matéria-prima no reator e o teor de umidade da mesma.

Ramos (2000) também descreve aspectos importantes sobre a viabilidade econômica do pré-tratamento por explosão a vapor, tais como:

a) o elevado custo e a baixa atividade específica das enzimas necessárias à sacarificação da celulose, ainda indispensáveis para acelerar a produção de açúcares fermentescíveis a partir do substrato;

b) a perspectiva de aumento do custo da fonte renovável, motivada pelo eventual

aumento da demanda e pelos problemas associados ao transporte destes materiais, geralmente bastante volumosos;

c) a inexistência de um modelo biológico que permita a fermentação simultânea e em alto rendimento dos açúcares gerados pela sacarificação química e/ou enzimática da biomassa (pentoses, hexoses e oligossacarídeos), e;

d) a falta de legislação no setor, particularmente no que se refere à questão ambiental.

Duff & Murray (1996) relataram que o pré-tratamento por explosão a vapor é favorecido em condições de temperaturas mais brandas e maior tempo de residência da biomassa no reator. Segundo Pitarelo *et al.* (2012), maiores temperaturas e tempos de residência no reator possibilitam consideráveis incrementos nos valores de sacarificação da celulose. No entanto, diminuem o rendimento da recuperação e promovem o acúmulo de inibidores no processo, devido aos altos níveis de decomposição da celulose e hemicelulose e de condensação de lignina.

Em comparação com outros métodos de pré-tratamento, as vantagens da explosão a vapor incluem impactos significativamente mais baixos ao ambiente, menores investimentos de capital e processos químicos menos perigosos. Por outro lado, a presença de produtos de degradação de lignina e açúcares é inevitável e deve ter seus efeitos negativos minimizados (Cantarella, 2004; Tengborg, 2001).

Muitos trabalhos relatam que a formação de furfural e hidroximetilfurfural por desidratação das pentoses e hexoses, durante o processo de pré-tratamento, inibe a ação dos microrganismos fermentativos, principalmente em processos que utilizam ácido mineral diluído (Liu *et al.*, 2005). Estes inibidores danificam as paredes e membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA, inibem a síntese de proteínas e RNA e, por conseguinte, reduzem a produção de etanol (Van Maris *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Para tornar viável a produção de etanol celulósico, estudos têm sido orientados à identificação de linhagens que sejam resistentes a inibidores gerados durante o pré-tratamento. Alvira *et al.* (2010) relatam que durante o pré-tratamento por explosão a vapor ocorre a formação de ácidos, sendo os principais o ácido acético, formado a partir dos grupos de ácido acético presentes na fração hemicelulósica, e os ácidos fórmico e levulínico, derivados de uma maior degradação do furfural e HMF.

Além disso, a geração de uma vasta gama de compostos fenólicos a partir da quebra da lignina e devido às diferentes composições das matérias-primas utilizadas exigem estudos sobre métodos que possam reduzir o efeito inibitório causado às enzimas e às leveduras. Abordagens como modificações genéticas, engenharia evolutiva ou adaptativa são estratégias

promissoras para a obtenção de leveduras mais tolerantes e para a redução de custos do processo (Liu *et al.*, 2005).

2.6 Hidrólise enzimática e fermentação

A etapa subsequente da realização do pré-tratamento consiste na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa, gerando açúcares fermentescíveis. A hidrólise da celulose gera glicose, que pode ser convertida em inúmeras substâncias químicas e bioquímicas, tal como o etanol; já o produto de hidrólise da hemicelulose é uma mistura de açúcares com predominância, na maioria dos casos, de xilose (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Apesar de muitos estudos, não estão totalmente compreendidas quais as características da matéria-prima que atribuem maior eficiência à hidrólise da celulose. Algumas das características mais influentes incluem a acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina (Palonen *et al.*, 2004). A hidrólise enzimática da celulose apresenta maiores rendimentos, além da reduzida formação de compostos tóxicos se comparada com a hidrólise ácida (Szengyel, 2000).

Para a hidrólise enzimática da celulose, são empregadas enzimas produzidas por microrganismos celulolíticos. As enzimas celulolíticas incluem endoglicanases individuais, atuantes sobre as regiões amorfas de celulose e em pontos aleatórios ao longo da cadeia de glicano, produzindo glicano-oligômeros; exoglicanases, que hidrolisam a celulose cristalina em cadeias de celobiose a partir da redução ou não redução das extremidades, produzindo um dímero de glicose (celobiose) e alguns trímeros de glicose; e β -glicosidades, que atuam sobre oligômeros de glicanos solúveis e na celobiose, para produzir monômeros de glicose (Samayam & Schall, 2010).

A hidrólise enzimática ocorre em três etapas: primeiramente, as enzimas adsorvem sobre a superfície da celulose, depois promovem a hidrólise da ligação glicosídica e, por fim, desorvem da superfície retornando à solução (Odega & Petri, 2011). A capacidade das celulasas de adsorver na superfície da celulose é uma importante característica, pois, para que ocorra a hidrólise da celulose, são necessárias a interação efetiva entre o substrato insolúvel e a enzima solúvel. A adsorção ocorre nas regiões NH_2 e COOH terminal da enzima, estando separado do domínio catalítico por segmentos ricos em prolina, treonina e serina (Linder & Teerei, 1997; Wilson, 2011). A remoção do módulo de ligação ao carboidrato (CBM) reduz sua eficiência hidrolítica sobre a celulose cristalina, mas não afeta a sua atividade sobre a celulose amorfa (Gray *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática da celulose de materiais lignocelulósicos é influenciada diretamente por diversos fatores, que embora distintos, estão estritamente interligados durante o processo da hidrólise, sendo os principais aqueles relacionados ao substrato e às enzimas (Alvira *et al.*, 2010). Dentre os fatores relacionados ao substrato, vale citar alterações em sua porosidade e área superficial durante a hidrólise (Sun *et al.*, 2009), o acúmulo de lignina no meio reacional (para substratos ricos em lignina) (Pan *et al.*, 2004) e mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose (Martín *et al.*, 2007). Já os fatores associados às enzimas correspondem à inibição retroativa devida ao acúmulo dos produtos de hidrólise (glucose e celobiose) no meio reacional (Kadam *et al.*, 2004; Cantarella *et al.*, 2004), à desnaturação térmica das enzimas em reações usualmente muito longas e o efeito da agitação mecânica (cisalhamento) sobre a atividade enzimática (Laureano-Perez *et al.*, 2005) e à adsorção irreversível das enzimas sobre a lignina e/ou complexos lignina-carboidrato (Lu *et al.*, 2002; Palonen *et al.*, 2004).

A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado por algumas bactérias e outros organismos. Ocorre com a degradação da glicose em piruvato, que depois é transformado em algum outro produto, como o etanol. Esse tipo de obtenção de energia não necessita do oxigênio como aceptor final de elétrons. Por isso, ocorre em anaerobiose. Porém, ele é dezoito vezes menos eficiente em termos de energia, gerando apenas dois ATPs por molécula de glicose (Lehninger *et al.*, 2000).

A fermentação alcoólica inicia-se com a glicólise, também conhecida como via de *Embden-Meyerhof-Parnas*, seguido pela conversão de piruvato em etanol. Um dos três destinos do piruvato produzido na glicólise depende do tipo de microrganismo e das rotas metabólicas. No caso da levedura, o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em duas etapas. Na primeira reação, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, devido à ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH. O NADH é um transportador de elétrons hidrossolúvel que se associa reversivelmente com as desidrogenases. Portanto, a levedura transforma glicose em etanol e CO₂, e não em lactato (Lehninger *et al.*, 2000).

Fermentação alcoólica é um processo anaeróbico catalisado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo, o etanol, tão somente, um subproduto desse processo (Lima *et al.*, 2001). Essas enzimas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes,

minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (Lehninger *et al.*, 2000).

O processo de fermentação alcoólica é a via mais importante de obtenção de etanol, tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósica (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

O microrganismo mais empregado na fermentação alcoólica é a levedura *S. cerevisiae*, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da biomassa lignocelulósica (Cunha-Pereira *et al.*, 2011). Este microrganismo converte facilmente a glicose em etanol e gás carbônico (CO₂) e apresenta alta tolerância ao etanol em comparação com outras leveduras (Santos *et al.*, 2010). Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de assimilar ou de fermentar pentoses como a xilose, o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa.

Na Figura 8 estão representadas as reações que ocorrem no processo fermentativo, e as enzimas responsáveis por cada uma delas.

As etapas de hidrólise enzimática e fermentação são comumente realizadas pelos processos a seguir.

No processo de sacarificação e fermentação (SF), a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas em reatores separados. A vantagem de realizar cada etapa separadamente é a possibilidade de melhor adequação das condições para a hidrólise enzimática a 45-50 °C e para a fermentação a 30 °C, enquanto o principal inconveniente da SF é a inibição causada sobre as enzimas pelos açúcares liberados durante a hidrólise (Galbe & Zacchi, 2002).

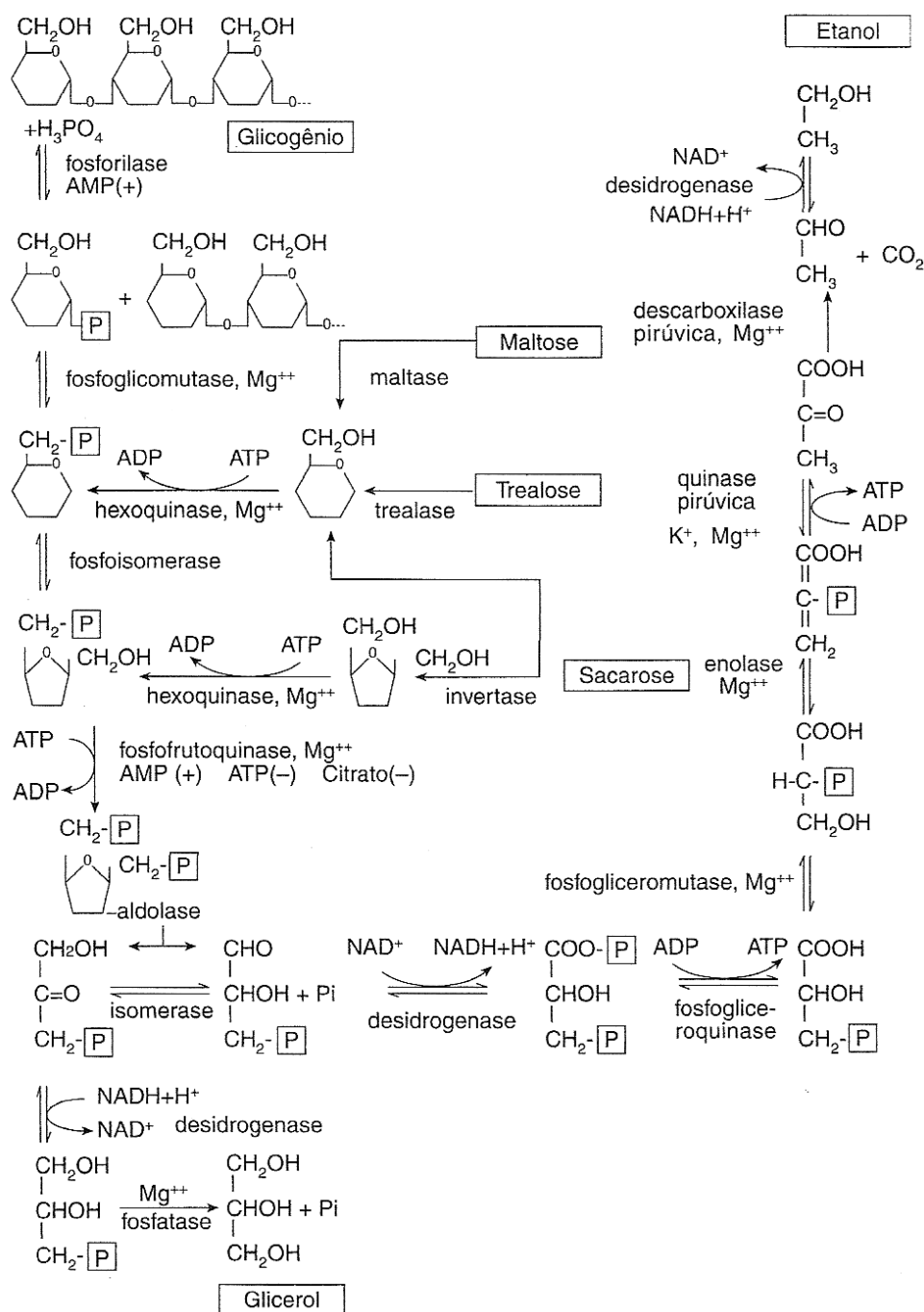


Figura 8. Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) e exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*. Fonte: Lima et al.(2001).

No processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SFS), a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas no mesmo reator. Assim, a glicose produzida é consumida imediatamente pelo microrganismo fermentador, por exemplo, a levedura *S. cerevisiae*, evitando a inibição da β -glicosidase pelo produto final, a glicose. Todavia, o etanol produzido também pode agir como um inibidor na hidrólise, mas não tão fortemente quanto a celobiose

ou a glicose (Galbe & Zacchi, 2002). Outra vantagem da SFS em relação à SF é a integração do processo, obtida quando a hidrólise e a fermentação são executadas em um único reator.

A presença de leveduras em conjunto com enzimas celulolíticas reduz a acumulação de açúcares que causam a inibição da atividade enzimática, aumentando assim o rendimento e a sacarificação. Além disso, a presença de etanol produzido pelas leveduras faz com que o meio seja menos vulnerável a invasão de microrganismos indesejáveis (Ballesteros *et al.*, 2004; Olofsson *et al.*, 2008).

A principal desvantagem da SFS é a dificuldade em reciclar e reutilizar as leveduras, pois estes microrganismos misturam-se com os resíduos da lignina (Grohmann, 1993; Krishna *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). A temperatura ideal para o SFS é em torno de 38 °C, ficando entre as temperaturas ideais para a hidrólise (45-50 °C) e a fermentação (30 °C) (Philippidis, 1996).

Um aspecto importante durante a fermentação é o modelo de processo fermentativo utilizado. A escolha do processo mais adequado dependerá das propriedades cinéticas dos microrganismos e tipo de material a ser fermentado, além dos aspectos econômicos (Chandel *et al.*, 2007). Para tornar viável a produção de etanol celulósico, estudos têm sido orientados à identificação de linhagens que sejam resistentes a inibidores gerados durante o pré-tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Para a produção de enzimas – celulasas e xilanases – foi utilizada a linhagem S1M29 obtida a partir da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942). Esta linhagem foi obtida a partir de mutagênese empregando peróxido de hidrogênio e seleção dos mutantes em meio com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do IB/UCS.

As culturas de *P. echinulatum* foram desenvolvidas em tubos de ensaio contendo o meio de crescimento (Dillon *et al.*, 2006), incubadas por sete dias a 28 °C até a formação de conídios. Os tubos foram estocados a 4 °C, ou diretamente utilizados para a preparação de suspensões de conídios usadas nos ensaios para produção de enzimas.

Para os experimentos de fermentação das hexoses utilizou-se a linhagem CAT-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP, gentilmente doada pelo professor Luiz Humberto Gomes. Esta é uma linhagem que predomina durante fermentações em usinas de produção de etanol no estado de São Paulo.

A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi mantida em meio YEPD contendo em g.L⁻¹ os seguintes componentes: 5 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 10 g de glicose e 20 g de ágar.

3.2 Biomassa lignocelulósica: capim-elefante

As amostras de capim-elefante foram obtidas na cidade de Nova Petrópolis-RS (29°21'39.18''S e 51°02'53.88''O, 619 m acima do nível do mar), e coletadas após 6 meses de plantio. As amostras coletadas pertencem à variedade Cameron.

Este material foi inicialmente desidratado a 60 °C durante três dias, triturado com um triturador forrageiro Trapp® 70, obtendo-se uma granulometria entre 0,075 e 4,75 mm (Menegol *et al.*, 2014). Em seguida, foi acondicionado em embalagens plásticas fechadas e mantido à temperatura ambiente na ausência de luminosidade.

3.3 Pré-tratamento da matéria-prima

O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado na Universidade Federal do Paraná – PR, no Centro de Pesquisa em Química Aplicada.

Para a realização dos pré-tratamentos, utilizou-se um reator de aço inox com capacidade para 10 L, provido de sensores para o acompanhamento da pressão e da temperatura, além de válvulas de controle para entrada de vapor e sua subsequente descompressão. Ao reator está acoplada uma caldeira geradora de vapor, um compressor de ar e um ciclone, empregado para descarga do material e escape de vapores. Foram introduzidos ao reator 600 g de amostra de capim-elefante não tratado, com 10 % de umidade (umidade natural), sendo empregadas diferentes condições de tempos e temperaturas, conforme apresentado no planejamento experimental (Delineamento Composto Central) da Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento fatorial 2² para realização de pré-tratamento por explosão a vapor das amostras de capim-elefante.

	Limites	Variáveis	
		Tempo (min)	Temperatura (°C)
	Limite inferior (-)		
	Ponto central (0)	6	180
	Limite superior (+)	8	190
		10	200
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (kgf/cm ³)*
1	-1 180°C	-1 6 min	13
2	+1 200 °C	-1 6	13
3	-1 180 °C	+1 10 min	17
4	+1 200 °C	+1 10 min	17
5	0 190 °C	-1 6 min	17
6	0 190 °C	0 8 min	21
7	0 190 °C	+1 10 min	21

*A pressão atingida nos experimentos não foi utilizada no planejamento experimental, pois está associada à temperatura.

O balanço de massa foi realizado para determinar a eficiência de cada condição empregada no pré-tratamento a partir da diferença de massa das amostras, antes e depois do pré-tratamento, considerando-se a umidade de cada amostra.

3.4 Produção de enzimas

3.4.1 Produção de celulasas e xilanases em cultivo em estado sólido (CES)

Os meios de produção de celulasas e xilanases foram constituídos de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (lavado e não lavado após o tratamento) ou capim-elefante não tratado e farelo de trigo (controles), embebidos em solução mineral (SM 20×). A solução mineral foi baseada na formulação de Mandels & Reese (1957) 20×, composta por: KH_2PO_4 (4 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,6 g); $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (0,6 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g); CaCl_2 (0,6 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,03 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,029 g); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,004 g). Estes sais foram dissolvidos em água destilada, sendo a solução autoclavada e armazenada a 4 °C.

Os CES foram conduzidos em frascos de 100 mL contendo quantidade de biomassa correspondente a 1g de substrato seco e 1 mL de solução mineral. Estes sistemas foram inicialmente autoclavados (121° C por 15 min). Após, cada sistema foi inoculado com 1×10^6 conídios.g⁻¹ de massa seca. Os sistemas foram mantidos em câmara com umidade relativa em torno de 95 % e temperatura de 28-30 °C, durante 5 dias, sendo coletadas amostras a partir de 48 h até 120 h.

Para a extração enzimática, inicialmente, 10 mL de água destilada em temperatura de 4 °C foram adicionados a cada sistema. O meio foi homogeneizado, o pH foi medido e, em seguida, foram acrescentados 17 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8. Estes meios foram mantidos sob agitação recíproca a 200 rpm, a 4 °C, durante 20 min. Os sólidos foram removidos por filtração e os filtrados centrifugados a $3000 \times g$, durante 10 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas. Os resultados de CES foram expressos em UI.g⁻¹ de massa seca. Todos os CES foram realizados em triplicata.

3.4.2 Produção de celulasas e xilanases em cultivos submerso (CS)

Para cada 100 mL de meio de produção de celulasas e xilanases foram utilizados: 10 mL da solução meio de sais (SM) (Mandels & Reese, 1957), 0,5 g de farelo de trigo, 0,2 g de farelo de soja, 0,05 g de Prodex[®], 0,1 mL de Tween 80[®], 1 g de fonte de carbono e 90 mL de água destilada (Camassola & Dillon, 2009). Como fonte de carbono foi empregado capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (lavado e não lavado após o pré-tratamento) e, como cultivos controles capim-elefante não tratado e celulose Celuloflok[®] (Cotia, São Paulo, Brasil).

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio líquido para a produção de celulasas e xilanases, foram autoclavados e inoculados com uma suspensão de conídios para

obter a concentração final de 1×10^5 conídios.mL⁻¹. Os frascos foram mantidos a 28 °C sob agitação recíproca de 180 rpm, sendo realizadas coletas de amostras a cada 24 h. As amostras foram filtradas, medidas em seu pH e, a partir do caldo enzimático, foram determinadas as atividades enzimáticas previstas. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 Caracterização do capim-elefante

3.5.1.1 Determinação da massa seca de materiais celulósicos

Foi colocada 1 g de amostra em cadinhos previamente pesados. Este material foi colocado em estufa a 105 °C por 2 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador, pesado e a massa seca foi calculada em relação à massa seca do material original.

3.5.1.2 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos

Quantidades de 300 mg de capim-elefante foram acondicionados em cadinho de porcelana, previamente limpo, seco e tarado, sendo então calcinados em mufla a uma temperatura de 575 °C por 2 h, segundo a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-TP-510-42621). O teor de cinzas foi determinado a partir da diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expresso em relação à quantidade de amostra inicial.

3.5.1.3 Determinação de extraíveis

Inicialmente, 1 g de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor foram submetidos a um processo de extração em um aparelho Tecnal TE-044-8/50, utilizando como solvente etanol 95 % (110 °C por 6 h), seguido por extração com água quente (110 °C por 4 h), segundo a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-TP-510-42619) para quantificação de extraíveis. Após a extração, o solvente foi recuperado e o resíduo foi seco em reboiler de vidro previamente tarado. Por diferença de massas, obteve-se o percentual do extrato em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

3.5.1.4 Análise química do capim-elefante

A composição química do capim-elefante pré-tratado e não tratado foi realizada de acordo com a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-TP-510-42618), com adaptações descritas em Menegol *et al.* (2014).

Uma quantidade conhecida de amostra seca (100 mg) foi tratada com 1 mL de ácido sulfúrico 72 % (v/v) a 30 °C por um período de 1 h 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 (121 °C) por 1 h para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso 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 de ultravioleta, através da Equação 1:

$$C \text{ (g/L)} = \frac{4,53 (A_l - A_c)}{300}$$

(Eq. 1)

onde A_l e A_c corresponde à absorvância em 210 e 280 nm (Dence & Lin, 1992).

Já a composição em carboidratos e grupos acetil dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante da determinação de Klason.

Alíquotas dos hidrolisados foram centrifugadas a $10000 \times g$, filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 μm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, degaseificador de fase móvel modelo DGU 20A3, 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 de 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 H_2SO_4 5 mmol.L^{-1} a uma vazão de 0,6 mL.min^{-1} . A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural, 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 fatores referentes ao hidroximetilfurfural e furfural, que foram de 0,70 e 0,64, respectivamente, serviram para converter estes compostos em seus respectivos carboidratos de origem (glicose e xilose e arabinose, respectivamente). Os resultados obtidos para anidroglicose (computados glicose, celobiose e hidroximetilfurfural nesta operação), anidroxilose, anidroarabinose (computados 50 % do valor correspondente ao furfural para cada anidroaçúcar) e grupo acetil foram, então, expressos em relação ao peso seco do material original.

Após o pré-tratamento, o material foi drenado, sendo que somente a parte sólida foi utilizada. Dessa fração sólida, parte foi lavada para a remoção de possíveis substâncias inibitórias para a produção de enzimas. Para a realização da lavagem empregou-se 5 % (m/v) da biomassa pré-tratada em água destilada, a 600 rpm por 1 h. As amostras foram então filtradas em tecido de poliéster, sendo que o excesso de líquido foi removido por filtração a vácuo. Em seguida, uma quantidade de amostra (em torno de 1g) foi utilizada para determinar o teor de umidade.

A fração líquida obtida após o processo de pré-tratamento e após o processo de lavagem da biomassa pré-tratada foi avaliada por HPLC, utilizando-se a coluna C18 (para detecção de inibidores) por detector UV/Vis SPD-20A (Shimadzu), a 30 °C, empregando fase móvel com ácido fórmico e metanol, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A solução da fase móvel continha 90 mL de ácido fórmico (0,1 %) e 10 mL de metanol + ácido fórmico (1 %). Para detecção de açúcares nas frações líquidas, empregou-se a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹.

3.5.1.5 Determinação de nitrogênio total e proteínas

A análise de proteínas totais foi realizada pelo Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA) da Universidade de Caxias do Sul, 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, foi realizada 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 M até atingir a cor violeta.

Foi feito um branco com os reagentes e sem amostra.

Para obtenção dos resultados, foi utilizada a Equação 2:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{(V - V_b) \cdot M \cdot f \cdot F \cdot 0,0140067 \cdot 100}{m} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

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

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

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

f= fator de correção à solução de ácido clorídrico 0,1 M;

m= massa da amostra em gramas;

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

3.5.2 Atividades enzimáticas

3.5.2.1 Determinação da atividade sobre papel filtro (FPA)

Para a dosagem de celulases, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), conforme Ghose (1987), com as modificações propostas por Camassola e Dillon (2012a). Em placas com 96 poços, foram adicionados 50 µL da amostra ou diluição apropriada e 100 µL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8. As placas foram colocadas em banho-maria a 50 °C, durante 10 min, com a finalidade de elevar o meio contendo a enzima até a sua temperatura ideal de hidrólise. Foram adicionados, em cada poço, 5 mg de papel-filtro Whatman nº1 em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 min em banho-maria a 50 °C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente DNS e as placas foram colocadas em banho-maria a 100 °C, por 5 min. Após resfriamento na temperatura ambiente, 100 µL da amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços para leitura óptica com a adição de 200 µL de água e absorbância foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de FPA presentes nas amostras foram determinadas através de curva padrão construída com soluções de glicose em concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg.mL⁻¹, por meio de regressão linear.

As unidades de FPA foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol.L⁻¹ de açúcar redutor por min (Miller, 1959). A solução para dosagens de açúcares

reduzidores utilizada foi descrita por Miller (1959), sendo composta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico (2,12 g), hidróxido de sódio (3,92 g), tartarato de sódio e potássio (61,20 g), fenol (1,52 g), metabissulfito de sódio (1,66 g) e água destilada (283,3 mL).

3.5.2.2 Determinação de endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases, segundo Ghose (1987) com modificações, foi realizada empregando-se de 10 μL da amostra diluída (1:9) e 40 μL de tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços, com volume total de 2 mL. A placa foi colocada em banho a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 10 min, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50 μL de solução de carboximetilcelulose 2 % (m/v), previamente aquecida a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, mantendo-se as placas por 30 min em banho a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL da solução do reagente DNS e a placa foi colocada em banho a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, por 5 min.

A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases procederam-se tal como para FPA.

Uma unidade de atividade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por min (Miller, 1959).

3.5.2.3 Determinação de β -glicosidases

Para a determinação da atividade de β -glicosidases foi utilizado o substrato p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo ($p\text{NPG}$). A determinação da atividade de β -glicosidases foi realizada empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional (100 μL) contendo 5 μL de água destilada, 5 μL de solução enzimática e 90 μL de p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo ($p\text{NPG}$ 4 mg.mL^{-1}) foi incubada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, sendo interrompida com a adição de 200 μL de uma solução 10 % (m/v) de Na_2CO_3 . A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância de $p\text{NPG}$ a 405 nm e a determinação da atividade foi determinada através de curva de calibração construída com soluções de p -nitrofenol ($p\text{NP}$) com concentrações de 0; 0,04; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mmol.L^{-1} , por meio de regressão linear.

Uma unidade de atividade de β -glicosidase utilizando-se como substrato o $p\text{NPG}$ foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $p\text{NPG}$ por min.

3.5.2.4 Determinação 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 μL de caldo enzimático juntamente com 50 μL de uma solução de xilana 1 % (m/v). A placa foi mantida em banho a 50 °C por 5 min. A reação foi interrompida adicionando-se 300 μL de DNS e a placa foi mantida em banho a 100 °C por 5 min.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μL de amostra em placa de 96 poços e adicionados 200 μL de água destilada e 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⁻¹ com concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, 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 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose por min.

3.5.3 Determinação das proteínas solúveis

Para a determinação quantitativa das proteínas solúveis, foi utilizado o método de Bradford (1976). Foi construída a curva de calibração, utilizando-se soluções padrão com albumina bovina com concentrações entre 0 e 70 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a determinação das proteínas das amostras, a reação foi realizada pela mistura de 100 μL da amostra diluída em 900 μL de água destilada com 500 μL do reagente de Bradford. Transcorridos 10 min, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 595 nm do complexo azul, formado pela ligação das proteínas do extrato enzimático ao corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250.

3.5.4 Estimativa da concentração fúngica

A biomassa fúngica foi estimada indiretamente a partir da massa de N-acetilglicosamina obtida após a hidrólise enzimática da quitina da parede celular, conforme descrito por Novello *et al.* (2014). Para tal procedimento, 1 mL das amostras provenientes do CS foi centrifugado a $8000 \times g$ por 15 min, o sobrenadante foi descartado e a centrifugação foi repetida adicionando 2 mL de água destilada. Para as amostras provenientes do CES, 1 g do material seco foi mantido em estufa (± 40 °C) por 24 h. Após, foram adicionados 3 mL de tampão citrato (pH 4,8; 0,05 mol.L⁻¹) e as amostras foram tratadas em ultrassom por 60 min. Em cada amostra foram adicionados 2 mL de enzima 30 % (v/v) (Viscozyme L[®],

Novozymes) por 24 h a 45 °C. Após este período, as amostras foram fervidas por 10 min para desativação da enzima. As amostras foram resfriadas e centrifugadas (4000 rpm), por 20 min.

Para a determinação do teor de N-acetil-D-glicosamina resultante da hidrólise da quitina foi utilizada a metodologia segundo Aidoo *et al.* (1981). Em tubos contendo 1 mL da amostra hidrolisada e centrifugada foi adicionado 1 mL da solução de acetilacetona (0,75 mL de acetilacetona e completar para 25 mL com uma solução de carbonato de sódio 1,25 mol.L⁻¹). As amostras foram fervidas por 20 min. Após o resfriamento, adicionou-se 6 mL de etanol e 1 mL de 4-dimetilaminobenzaldeído (3,2 g em 20 mL de etanol e 20 mL de HCl). Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 min e a absorbância lida a 530 nm. As concentrações de N-acetil-D-glicosamina foram obtidas a partir de curva padrão construída com padrões entre 0,5 a 1 mg.mL⁻¹.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura das amostras de capim-elefante foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCMAT) da Universidade de Caxias do Sul. Utilizou-se metodologia baseada no processo chamado *magnetron-sputtering* a plasma, mais conhecido como deposição física a vapor de ouro (PVD - *Physical Vapour Deposition*), utilizando um microscópio eletrônico de varredura, modelo Shimadzu Supercan SSX-550.

Alíquotas de amostras com capim-elefante não tratado e pré-tratadas por explosão a vapor foram depositadas em uma fita de carbono num *stub* de alumínio e estes colocados no dessecador para evitar a absorção de umidade.

Em seguida, as amostras foram mantidas em câmara sob vácuo até atingir a pressão base de 5×10^{-12} mbar. Durante a diminuição de pressão, o gás da câmara e das superfícies foi removido e, pela baixa pressão, componentes voláteis e água remanescentes também foram retirados das amostras.

Após injetou-se uma atmosfera rarefeita de argônio, alcançando pressão de trabalho de 1×10^{-1} mbar. A pressão parcial de argônio é a diferença entre a pressão de trabalho e a pressão de base.

A fonte de tensão e corrente foram ligadas, com corrente de 20 mA e tensão de 350 V. A atmosfera de argônio ionizou-se dando início ao processo de PVD, que durou 2,5 minutos. Os átomos arrancados de um alvo de ouro foram acelerados na direção da superfície da amostra, gerando camadas nanométricas, uniformes e condutivas de ouro metálico.

3.7 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com Menegol *et al.* (2014). Em frascos Duran[®] de 50 mL, foram adicionados 50 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mmol.L⁻¹) e diferentes amostras de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor sob condição de 190 °C / 8 min (lavado e não lavado após o processo). Estas foram incubadas com caldo enzimático. Como controle utilizou-se celulose Celuloflok[®] (Cotia, São Paulo, Brasil) e Avicel[®] PH101 Fluka (Buchs, Ireland). Esta mistura foi incubada a 50 °C, que é a condição ótima para a atividade enzimática de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004), sob agitação de 150 rpm. Volume de 1 mL foi coletado em diversos intervalos de tempo –, no início do processo, a cada 3 h e, depois, em intervalos de 12 h, até 48 h de hidrólise, para análises dos açúcares liberados. Foram determinadas as atividades do caldo enzimático que foi empregado na hidrólise e as hidrólises foram realizadas em triplicata.

Foram empregadas cargas enzimáticas de 10 FPU.g⁻¹ de capim-elefante, e concentrações de substrato de 4 % (m/v). As enzimas utilizadas na hidrólise foram produzidas de acordo com os ensaios de produção de enzimas, elegendo-se o pré-tratamento que proporcionou os maiores títulos enzimáticos.

Os açúcares redutores (AR) presentes nas soluções provenientes da hidrólise enzimática foram dosados pelo método de Miller (1959). Foi construída uma curva padrão com soluções e 0, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2, 3 e 4 mg.mL⁻¹ de glicose para a quantificação dos açúcares liberados.

Os açúcares das amostras correspondentes às coletas de 24 e 48 h de hidrólise enzimática também foram avaliadas por HPLC, empregando coluna Aminex HPX-87H por detector por índice de refração, a 60 °C, H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ (fase móvel), fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A escolha de 24 e 48 h de hidrólise para estas análises foram realizadas de acordo com os dados de AR, analisando todos os tempos de coleta.

3.8 Fermentação

Foi realizada fermentação alcoólica dos açúcares provenientes das amostras de 48 h de hidrólise enzimática de cada condição de pré-tratamento e dos controles (não tratado, celulose e avicel), em tubos de reação de 2 mL. Esse xarope foi suplementado com 50 µL de solução de extrato bruto de levedura (Prodex[®]) e (NH₄)₂SO₄, para obtenção de concentração final de 4 e 1 g.L⁻¹ respectivamente. Realizou-se o inóculo com 1×10⁸ células viáveis por mL

empregando-se a linhagem CAT-1 de *S. cerevisiae*. Essas amostras foram mantidas em banho a 28 °C.

Coletas foram realizadas em diferentes intervalos (0, 6, 12 e 24 h) para determinação de cinética de consumo dos açúcares e produção de etanol. Em cada coleta, três tubos de reação foram retirados e congelados (-80 °C) para interromper o metabolismo microbiano. Após, as amostras foram descongeladas a 4 °C, centrifugadas a $8000 \times g$ por 20 min à temperatura de 4 °C. Então, o sobrenadante foi filtrado em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) com poros de 0,2 µm e as concentrações de açúcares e etanol foram quantificadas por HPLC, empregando coluna Aminex HPX-87H por detector por índice de refração, a 60 °C, H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ (fase móvel), fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

A concentração de furfural e HMF foi realizada por HPLC, empregando coluna C18 por detector UV/Vis SPD-20A (Shimadzu), a 30 °C, empregando fase móvel com ácido fórmico e metanol, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A solução da fase móvel continha 90 mL de ácido fórmico (0,1 %) e 10 mL de metanol + ácido fórmico (1 %).

As análises em HPLC foram realizadas com a injeção de 10 µL de amostra.

3.9 Análise estatística

Os resultados dos cultivos submersos e de hidrólise enzimática foram analisados estatisticamente por análise de variância e pós-teste de *Tukey* para um $p < 0,05$, utilizando o *software PrismGraphPad*. O test T of Student foi realizado com *Microsoft Excel*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados os resultados e discussões referentes ao emprego de capim-elefante para a produção de celulases e xilanases em cultivos submersos e em estado sólido, utilizando a linhagem S1M29 de *P. echinulatum*. Além disso, serão apresentados os resultados obtidos a partir da hidrólise enzimática do capim-elefante e fermentação alcoólica dos açúcares liberados.

Os resultados foram organizados em três capítulos, compilados em três artigos a serem submetidos a periódicos.

1. Steam-explosion pretreated elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) as a carbon inducing source for cellulases and xylanases in submerged cultivation

Angélica Luisi Scholl, Daiane Menegol, Ana Paula Pitarelo, Roselei Claudete Fontana, Arion Zandoná Filho, Luiz Pereira Ramos, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola.

2. Emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a indução da secreção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos em estado sólido

Angélica Luisi Scholl, Daiane Menegol, Ana Paula Pitarelo, Roselei Claudete Fontana, Arion Zandoná Filho, Luiz Pereira Ramos, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola.

3. Hidrólise enzimática de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pré-tratado por explosão a vapor seguida de fermentação alcoólica

Angélica Luisi Scholl, Daiane Menegol, Ana Paula Pitarelo, Roselei Claudete Fontana, Arion Zandoná Filho, Luiz Pereira Ramos, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola.

Steam-explosion pretreated elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) as a carbon inducing source for cellulases and xylanases in submerged cultivation

Angélica Luisi Scholl^a, Daiane Menegol^a, Ana Paula Pitarelo^{b,c}, Roselei Claudete Fontana^a, Arion Zandoná Filho^b, Luiz Pereira Ramos^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^{a*}

^aUniversidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

Telephone/Fax: +55 54 3218 2149

E-mail: mcamassola@gmail.com

^bUniversidade Federal do Paraná – Departamento de Química, Centro de Pesquisa em Química Aplicada

[P. O. Box 19032 – Curitiba, PR, Brasil – CEP 81531-980](mailto:luiz.ramos@ufpr.br)

Tel: +55 41 3361 3175; Tel: +55 41 3361 3198

E-mail: luiz.ramos@ufpr.br

^cCentro de Tecnologia Canaveieira (CTC), Fazenda Santo Antônio, 13400-907 Piracicaba, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

Abstract

The use of elephant grass for the production of hydrolytic enzymes for second-generation ethanol is a promising alternative due to its high productivity, but it requires pretreatment. In this context, the steam-explosion method appears to be advantageous to cause structural changes in the lignocellulosic material, becoming the biomass more accessible to enzymatic action. The potential of steam-explosion pretreated elephant grass - at 180, 190 and 200 °C, with residence times of 6, 8 and 10 min - for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in submerged cultivation was evaluated. The biomass that was pretreated at 190 °C / 8 and 190 °C / 6 min showed a positive result for Filter Paper Activity (FPA), endoglucanase and β -glucosidase production. All of the pretreatments showed a negative result for xylanase productions. The results indicate that elephant grass that has been pretreated using steam-explosion can be used as a substrate for the production of enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass.

Keywords: steam-explosion, elephant grass, *Penicillium echinulatum*, submerged cultivation

1. Introduction

There has been a growing demand for energy in recent years due to the indiscriminate use of fossil fuels and the consequent increase in pollution and carbon emissions in the atmosphere. In this sense, projects focusing on fossil power generation can have significant and irreversible environmental impacts (Fontoura *et al.*, 2014).

The conversion of lignocellulosic materials into ethanol fuel has become a global priority for renewable energy production (Gírio, 2010). However, the pretreatment and enzymatic hydrolysis processes have negatively economic affect, becoming it more expensive compared to fossil fuels (Howard *et al.*, 2003). To reduce production costs, the focus in the development of new conversion technologies is centered on the use of waste materials, such as sugarcane straw and bagasse (Howard *et al.*, 2003), or energetic biomass, such as elephant grass (Fontoura *et al.*, 2014; Menegol *et al.*, 2014a).

Traditional forage species, such as elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.), are useful for the production of heat, electricity, ethanol and biogas. This grass has a high productivity compared to eucalyptus and sugarcane, producing approximately 40 tons of dry matter per hectare per year (Woodard and Prine, 1993). This biomass is also an alternative substrate for the production of enzymes, such as cellulases and xylanases, which can be employed in the lignocellulose hydrolysis (Menegol *et al.*, 2014b).

Among the cellulolytic complexes that have already been studied, *Trichoderma reesei* is the most well-known (Zeilinger *et al.*, 2000). However, this complex has no ideal ratio between FPA and β -glucosidase if is compared to the *P. echinulatum* enzyme complex, which secretes β -glucosidase levels that are superior to *T. reesei* (Martins *et al.*, 2008). This demonstrates its capability to process the complete saccharification of cellulose. As the processes for the production of these enzymes, submerged cultivations are widely known, studied and applied, and there are several parameters for conducting and maintaining this system.

Pretreatment of the biomass is required to expose the cellulose or to modify the porosity of the material, facilitating the access of the enzyme to its substrate. In this sense, steam-explosion pretreatment has been proposed as one of the most promising methods, presenting itself as a technique for the fractionation and high-yield recovery of the three main

components of the plant cell (lignin, cellulose and hemicellulose) (Brugnago *et al.*, 2011). In addition, this process has several advantages, such as significantly fewer environmental impacts, a low capital investment, and it is based on less dangerous chemical processes (Cantarella *et al.*, 2004). According to Pitarelo *et al.* (2012), the determination of the ideal conditions for the steam-explosion pretreatment, as temperature, residence time in the reactor, and moisture content of the raw material directly interfere with the recovery yield of the biomass, as well as the efficiency of the cellulose saccharification and the fermentation of the hydrolysates that are obtained.

In this work, the production of cellulases and xylanases by *P. echinulatum* S1M29 in submerged cultivations was evaluated using steam-explosion pretreated elephant grass as inducer and carbon source. The biomass was pretreated under different residence times and temperatures in order to select the most favorable pretreatment conditions for the production of cellulases and xylanases.

2. Material and methods

2.1 Microorganism

The xylanase and cellulase enzyme productions were realized by the S1M29 strain, which is derived from strain 9A02S1 of *P. echinulatum* (the microorganism was deposited at *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942). This strain was obtained by mutagenesis using hydrogen peroxide, followed by the selection of the mutants in medium containing 2-deoxyglucose (Dillon *et al.*, 2011). The S1M29 strain belongs to the microorganism collection at the Laboratory of Enzymes and Biomass, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, RS, Brazil. The *P. echinulatum* cultures were grown in test tubes containing the growth medium (Dillon *et al.*, 2006) and were incubated for seven days at 28 °C until the formation of conidia, then it was stored at 4 °C for the enzyme production.

2.2 Biomass and pretreatment

The elephant grass samples were obtained from Nova Petrópolis, RS, Brazil (29°21'39.18"S and 51°02'53.88"W, 619-m above sea level), ground in a Trapp® forage chopper to obtain a granulometry between 0.075 and 4.75 mm, and then subsequently dried at 60 °C for three days using air flux (Menegol *et al.*, 2014a).

The steam-explosion pretreatment was conducted at the University Federal of Paraná, Curitiba, PR, Brazil, using a stainless steel reactor with a 10-L capacity. 600 g sample of

untreated elephant grass containing 10 % humidity (natural moisture) was introduced to the reactor and pretreated for different times and at different temperature conditions that were defined in the experimental design (central composite design), which is shown in Table 1.

Table 1. Factorial design (2²) for steam-explosion pretreatment of the elephant grass

Limits		Variables	
Lower limit (-)		Time (min)	Temperature (°C)
Central point (0)		6	180
Upper limit (+)		8	190
		10	200
Test	Temperature (°C)	Time (min)	Pressure (kgf/cm³)*
1	-1	-1	13
	180 °C	6 min	
2	+1	-1	13
	200 °C	6 min	
3	-1	+1	17
	180 °C	10 min	
4	+1	+1	17
	200 °C	10 min	
5	0	-1	17
	190 °C	6 min	
6	0	+1	21
	190 °C	10 min	
7	0	0	21
	190 °C	8 min	

* The pressure that was reached in the experiments was not included in the experimental design, because it is associated with temperature.

A mass balance was performed to determine the efficiency of each pretreatment condition. The mass balance was determined by the difference in the sample mass before and after the pretreatment, considering the moisture content of each sample.

After the pretreatment, the material was drained, and only the solid part was used. A portion of the solid fraction was then washed to remove any possible substances that may inhibit the enzyme production. To perform the wash, 5 % (w/v) of the pretreated biomass in distilled water at 600 rpm for 1 h. The samples were then filtered through polyester fabric, and the excess liquid was removed using vacuum filtration. Then, a portion of the sample (approximately 1 g) was used to determine the moisture content.

2.3 Production of enzymes

It was used the media prepared with 10 mL (v/v) of salt solution (Mandels and Reese, 1957), 0.5 % (w/w) of wheat bran, 0.2 % (w/w) of soybean meal, 0.05 % (w/w) of crude yeast extract (Prodex[®]), 0.1 % (v/v) of Tween 80[®], 1 g (w/w) of the raw material or carbon source and 90 % (v/v) of distilled water. Steam-explosion pretreated elephant grass (either washed or unwashed after the pretreatment) was used as raw material. The control cultivations were prepared using untreated elephant grass or Celuloflok[®] cellulose (Cotia, SP, Brazil) as raw material or carbon source, respectively.

Five-hundred-milliliter Erlenmeyer flasks containing 100 mL of media were inoculated with a conidia suspension to a final concentration of 1×10^5 conidia.mL⁻¹. The flasks were maintained at 28 °C under reciprocal agitation at 180 rpm, and sample collections were performed every 24 h. The samples were then centrifuged at $4000 \times g$ for 20 min, and the pH and enzymatic activities were determined using the enzyme broth. All of the cultures were performed in triplicate.

2.4 Characterization of the elephant grass

2.4.1 Determination of the dry mass

One gram of sample was placed in a preweighed crucible. The material was then placed in an oven at 105 °C for 2 h to remove the moisture. Soon after, the material was cooled in a desiccator, weighed, and the dry mass was calculated relative to the dry mass of the original material.

2.4.2 Determination of ash content

The ash determination was performed via gravimetry, according to the methodology of the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42621), using 300 mg of elephant grass that was calcined in an oven at 575 °C for 2 h.

2.4.3 Determination of extractables

The extractables were determined via gravimetry according to the methodology of the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42619).

2.4.4 Chemical analysis

The chemical composition of the untreated and pretreated elephant grass samples was determined according to the methodology of the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42618). The composition of the solid fraction was determined after the pretreatment and washing. To determine the composition of the unwashed material, the components that were present in the wash water were added to the composition of the washed solid fraction.

2.4.5 Determination of total nitrogen and protein content

The total protein analysis was performed using the method from Kjeldahl-AOAC International (2011).

2.5 Scanning electron microscopy

The scanning electron microscopy (SEM) analysis (200×) of the elephant grass samples was performed at the Laboratory of Materials Characterization, University of Caxias do Sul. It was used a methodology that is based on a process known as magnetron-sputtering plasma deposition, which is also referred to as physical vapor gold (PVD - Physical Vapor Deposition), using a scanning electron microscope (Shimadzu Supercan SSX-550).

2.6 Enzymatic activities

To determine the total cellulase, a FPA was performed according to Ghose (1987), with modifications from Camassola and Dillon (2012). The FPA units were defined as the amount of enzyme required to releasing 1 μmol of reducing sugar per min.

To determine the endoglucanase activity, it was used the method described by Ghose (1987). One unit of endoglucanase activity was defined as the amount of enzyme required of releasing 1 μmol of reducing sugar per min.

For the β -glucosidase activity, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) was used as the substrate. One unit of β -glucosidase activity (using the substrate *p*NPG) was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μmol of *p*NPG per min.

To determine the xylanase activity, it was used the method described by Bailey *et al.* (1992), using 1 % oat xylan (w/v) as the substrate. One unit of xylanase activity was defined as the amount of enzyme required of releasing 1 μmol of xylose per min.

2.7 Determination of soluble proteins

The quantitative determination of the soluble protein levels was performed using the Bradford method (1976).

2.8 Estimate of fungal growth

The fungal biomass was determined indirectly via the enzymatic hydrolysis of the chitin in the cell walls as described by Novello *et al.* (2014). The concentrations of N-acetyl-D-glucosamine were obtained from a standard curve that was constructed using standards that ranged between 0.5 and 1 mg/mL.

2.9 Statistical analysis

The results of the submerged cultivations were statistically analyzed using ANOVA and Tukey's post-test at $p < 0.05$ using Prism GraphPad. The t-test was performed using Microsoft Excel.

3. Results and discussion

3.1 Mass balance and scanning electron microscopy

The production of enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass using a steam-explosion pretreatment is a promising alternative for reducing the production of second-generation ethanol costs. However, several factors influence the viability of the enzyme production, and different pretreatment conditions can influence a loss of mass and change the chemical composition of the biomass. As seen in Table 2, the temperature and pretreatment time directly interfered with the biomass recovery, and a progressive mass loss was observed as the processing time increased. Among the tested pretreatment conditions, there were biomass losses of up to 29 % (w/w) (at 190 °C / 10 min). These losses were primarily associated with the hemicellulose fraction, and the decreased percentages of anhydroxylose and anhydroarabinose can be seen in Table 3. Rocha *et al.* (2012) evaluated the mass balance of sugarcane bagasse following a steam-explosion pretreatment at the pilot scale. The authors concluded that considerable losses occur due to the degradation of the carbohydrates, the removal of volatile byproducts during the decompression of the reactor and during the washing of the solid fraction, which was also observed in this study.

Table 2. Percent of mass recovery of steam-explosion pretreated elephant grass under different conditions.

Untreated	Condition	Pretreatment (°C/min)						
		180/6	180/10	190/6	190/8	190/10	200/6	200/10
100	Unwashed (UW)	98.36	92.50	85.19	81.09	71.07	79.27	76.84
100	Washed (W)	98.34	92.38	84.99	81.00	71.03	79.22	76.80

Morphological analyses of the elephant grass using SEM were also performed, and the fragmentation of the samples subjected to pretreatments at higher temperatures and for longer time periods was analyzed (Figure 1). It was found that the untreated elephant grass contained a more compact structure, while all of the samples that were steam-explosion pretreated showed structural changes in the fibers. The 180 °C / 6 min condition showed less impact on elephant grass structure, since still showed compact structure and a smooth surface. The other conditions caused a greater degree of fragmentation of the lignocellulosic material that increased with the severity of the pretreatment, especially at 200 °C, which produced the greatest structural changes in the elephant grass. Han *et al.* (2010) found that the particle size of wheat straw tends to decrease as the temperature and the residence time of the steam-explosion pretreatment is increased, and a larger number of fibers and a more homogeneous appearance is observed with the use of more severe conditions. The results obtained by these authors corroborate the results obtained in this study, but for different raw material.

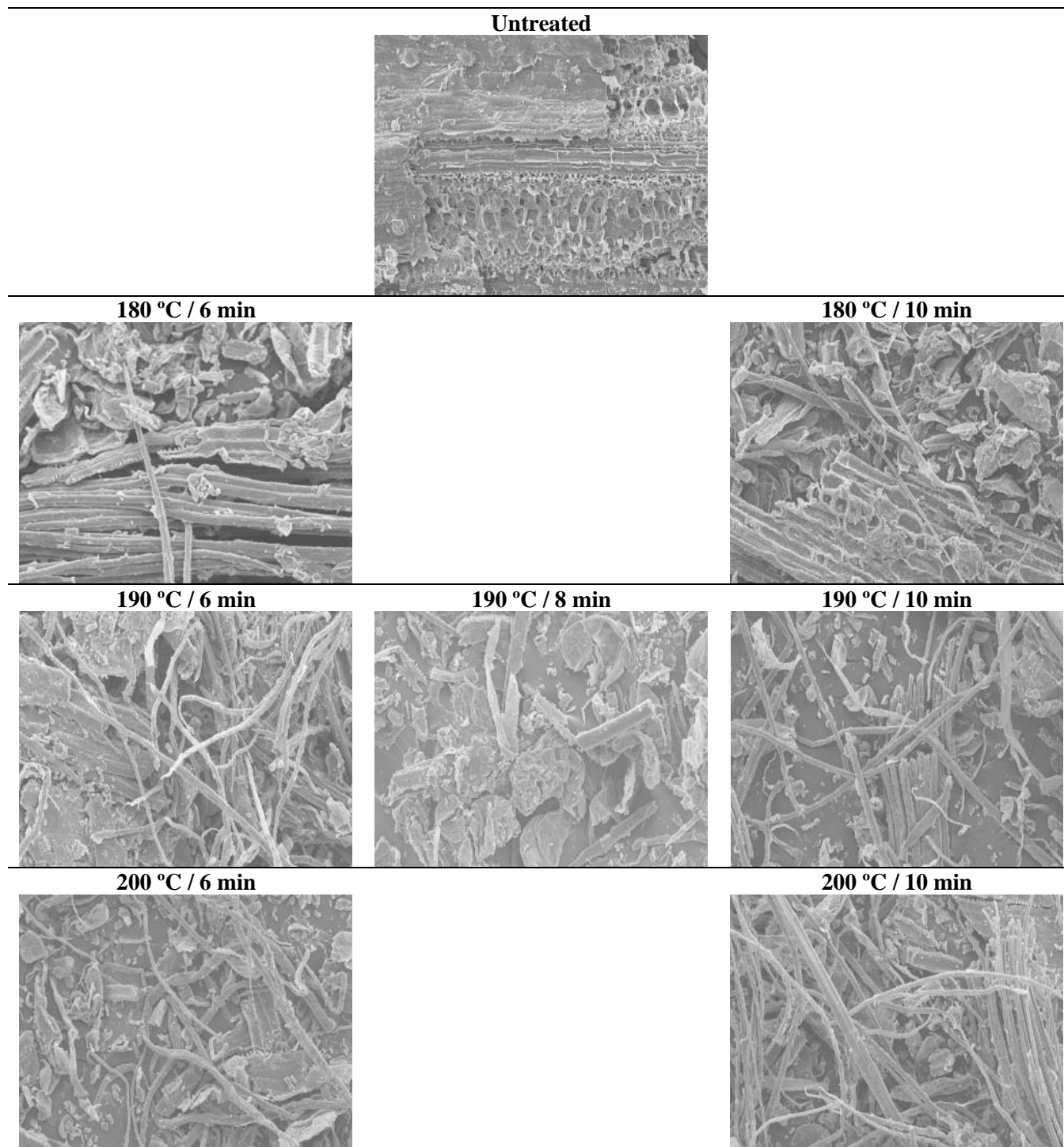


Figure 1. Scanning electron microscopy (200×) images of untreated elephant grass and steam-explosion pretreated elephant grass under different time and temperature conditions.

3.2 Chemical composition

Table 3 presents the percentages of protein, ash, soluble and insoluble lignin, acetyl groups and monomers that were derived from the native polysaccharides in the pretreated elephant grass.

In regards to the protein quantification, it was found that the unwashed pretreated elephant grass samples showed the highest protein levels compared to the samples that were washed in the same pretreatment condition. The highest protein levels were detected at 200 °C / 6 min (8.74 %) and at 200 °C / 10 min (8.38 %), for unwashed pretreated elephant grass. Conversely, lower protein levels were detected at 180 °C / 10 min (1.92 %) and at 190 °C / 8 min (1.63 %), both with and without the aqueous wash (Table 3).

In regards to the ash content, a maximum concentration of 9.44 % was obtained for the elephant grass that was pretreated at 190 °C / 10 min, while a minimum value of 2.77 % was recorded for an unwashed sample that was pretreated at 180 °C / 10 min. The elephant grass samples that were pretreated and subjected to washing showed significantly higher values compared to the unwashed samples at the same pretreatment conditions, but were not washed. This trend can be explained by the washing process, which removes salts from the biomass (Table 3).

The carbohydrate concentrations in the biomass of the untreated and pretreated elephant grass (washed and unwashed) were also analyzed (Table 3), and it was observed that anhydroglucose was the most abundant sugar in the samples, followed by sugars from the hemicellulose fraction (anhydroxylose and anhydroarabinose). In regards to the anhydroglucose concentration, it was found that the pretreated samples showed the highest percentage of this sugar compared to the untreated elephant grass (35.97 ± 1.06), which is likely due to the removal of the hemicellulose fraction from the biomass (Emmel *et al.* 2003). Still, it was observed that unwashed pretreated samples contained carbohydrate concentrations that were similar to or slightly higher than the samples that were washed following the same processing conditions.

Comparing the percentages of hemicellulose sugars (anhydroxylose and anhydroarabinose), it was found that the untreated elephant grass contained the greatest levels of these sugars compared to the pretreated samples (15.15 ± 0.21 and 5.36 ± 0.02 , respectively). The mildest pretreatment condition (180 °C / 6 min and 180 °C / 10 min) contained the highest concentration of anhydroxylose either washed or unwashed samples. The hemicellulose fraction is more likely to be affected by the steam explosion pretreatment, which explains the higher concentrations of this sugar at the lower processing temperatures. The highest levels of anhydroarabinose were detected at 180 °C, whereas in the other pretreated samples, this carbohydrate was only detected at low concentrations or was undetectable (Table 3).

The presence of acetyl groups was only observed in some of the pretreated solid fraction elephant grass samples (Table 3). In the other conditions, this compound was not detected in the pretreated fibers because acetyl groups are readily hydrolyzed, liberating acetic acid, which can be detected in the liquid fraction (Table 4). The untreated elephant grass contained 1.92 % of ash.

The untreated and pretreated elephant grass samples were also assessed for lignin content. In regards to the soluble lignin content, it was found that it increased in accordance with the severity of the pretreatment, but there was a decrease in the lignin content in the unwashed samples compared to the washed samples. As the residence time of the sample increased for each temperature condition, the lignin content decreased. In regards to the insoluble fraction, it was found that the majority of the samples contained higher percentages of insoluble lignin compared to the untreated elephant grass (19.65 ± 0.78), which is likely due to the removal of the hemicellulose fraction during the pretreatment and the hydrolysis of the amorphous cellulose (Emmel *et al.* 2003). The intermediate temperature of 190 °C produced the lowest concentrations of insoluble lignin compared to the other pretreatment conditions.

Table 3. Chemical composition, in percent, of untreated and steam-explosion pretreated elephant grass under different temperature and residence times either washed or unwashed samples.

Pretreated °C/min	Condition	Extractables	Anhydroglucose	Anhydroxylose	Anhydroarabinose	Acetyl Group	Soluble Lignin	Insoluble Lignin	Ash	Protein	Total
Untreated	-	8.84±0.83	35.97±1.06	15.15±0.21	5.36±0.02	1.92±0.01	1.12±0.02	19.65±0.78	8.53±0.23	5.55	102.09
180/6	W	-	43.37±0.76	11.56±0.38	3.09±0.23	n.d.	2.09±0.82	23.26±1.79	6.10±1.08	4.84	94.30
180/6	UW	-	43.46±0.77	11.76±0.39	3.22±0.43	n.d.	1.65±0.82	23.26±1.79	5.07±0.16	7.87	96.29
180/10	W	-	49.52±5.13	12.88±0.93	n.d.	n.d.	2.75±0.74	21.64±0.01	7.55±0.56	1.92	96.26
180/10	UW	-	49.59±5.13	12.95±0.96	0.07±0.02	n.d.	2.21±0.74	21.64±0.01	2.77±0.10	5.16	94.37
190/6	W	-	51.22±0.44	10.83±0.29	n.d.	n.d.	1.60±0.41	19.31±1.46	8.05±0.77	4.63	95.62
190/6	UW	-	51.29±0.44	11.07±0.29	0.05±0.00	0.10±0.01	1.18±0.41	19.31±1.46	4.70±0.83	6.90	94.49
190/8	W	-	58.54±3.12	10.96±0.60	n.d.	n.d.	1.62±0.15	19.95±0.86	8.10±0.02	1.63	100.80
190/8	UW	-	58.61±3.13	11.17±0.61	0.04±0.00	0.06±0.00	1.21±0.15	19.95±0.86	4.56±0.45	8.03	103.57
190/10	W	-	54.63±0.07	10.61±0.07	n.d.	n.d.	1.47±0.11	19.03±0.60	9.44±2.18	5.29	100.48
190/10	UW	-	54.69±0.07	10.66±0.09	0.05±0.01	n.d.	1.22±0.11	19.03±0.60	2.89±0.41	6.58	95.12
200/6	W	-	52.88±2.02	5.77±0.26	n.d.	n.d.	1.17±0.26	26.11±1.90	8.94±0.21	6.04	100.91
200/6	UW	-	52.95±2.02	5.98±0.26	0.04±0.00	0.08±0.00	0.84±0.26	26.11±1.90	4.87±0.08	8.74	99.53
200/10	W	-	52.90±1.09	10.64±0.32	1.76±0.02	n.d.	0.73±0.11	20.66±0.98	7.92±0.84	6.15	100.76
200/10	UW	-	53.03±1.09	10.67±0.33	1.80±0.02	0.17±0.01	0.53±0.11	20.66±0.98	4.01±0.28	8.38	99.08

UW – samples were not washed after the pretreatment

W – samples were washed after the pretreatment

n.d.: not detected

Table 4. Detected* substances in liquid obtained after washing of steam-explosion pretreated elephant grass under different temperature and time conditions.

Pretreatment °C/min	Detected substances (g.L ⁻¹)							
	Cellobiose	Glucose	Xylose	Arabinose	Glycerol	Acetic acid	HMF	Furfural
180/6	n.d.	0.11±0.00	0.22±0.01	0.15±0.02	0.02±0,00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
180/10	n.d.	0.07±0.00	0.07±0.03	0.07±0.02	0.02±0,00	0.01±0.01	0.01±0.00	0.02±0.00
190/6	n.d.	0.08±0.00	0.28±0.01	0.06±0.00	0.01±0,00	0.14±0.01	0.02±0.00	0.03±0.01
190/8	n.d.	0.08±0.00	0.24±0.01	0.05±0.00	0.01±0,00	0.09±0.01	0.02±0.00	0.05±0.01
190/10	n.d.	0.07±0.00	0.05±0.02	0.05±0.01	0.01±0,00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.04±0.00
200/6	n.d.	0.08±0.00	0.24±0.00	0.05±0.00	0.01±0,00	0.11±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00
200/10	0.03±0.02	0.07±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.01±0,00	0.02±0.01	0.01±0.00	0.02±0.00

* Detected using HPX-87H and C18 (HMF and furfural) columns.

n.d.: not detected

3.3 Enzyme production

3.3.1 Filter Paper Activity (FPA)

FPA analysis showed that the biomass that was pretreated by steam explosion was used by *P. echinulatum* S1M29 to produce similar or greater cellulase activities compared to the control supplemented with untreated elephant grass (Figure 2 A-F). When the elephant grass was pretreated at 180 °C and subsequently washed with water (Figure 2A), the enzymatic activities produced by *P. echinulatum* were lower than the other pretreatment conditions (Figure 2B and 2C). A similar situation was observed for the unwashed samples (Figure 2 D to F).

For the cultures that were produced using the samples that were pretreated at 190 °C and subjected to washing, the highest activities were obtained on the fourth and fifth cultivation days. On the fourth day, the cellulose control (0.34 ± 0.01 IU/mL) showed statistically equivalent activity compared to the samples that were pretreated for 8 min (0.25 ± 0.06 IU/mL), and the activity was higher than the other conditions. On the fifth day, the activities of all the media supplemented with pretreated biomass showed equal or above to the cellulose control. Similar to the 190 °C pretreatment condition, the 200 °C condition also showed the highest activities on the fourth and fifth days. On the fourth day, the samples that were pretreated for 10 min showed activities that were equal to the cellulose control, while on the fifth day, the sample that was pretreated for 6 min was superior to the other samples, reaching values of 0.37 ± 0.02 IU/mL.

For the cultures that were produced using unwashed samples for remove the possible inhibitors, the highest enzymatic levels were observed on the fourth and fifth days for all the times and temperatures that were tested (Figure 2D-F). On the fourth day, the values obtained from the cellulose-based media were higher than those that were obtained from the cultures supplemented with of the pretreated elephant grass (190 °C) and the control containing the untreated elephant grass (Figure 2D). However, on the fifth day, all of the cultures that were produced using the samples that were pretreated at 190 °C showed cellulose activities that were equal to those obtained for the control, indicating that steam-explosion pretreated elephant grass is capable of inducing FPA production in *P. echinulatum*.

Comparing the washed and unwashed substrates by Student's *t*-test, no significant differences were observed in the samples that were pretreated at 190 °C / 6 min until the third day of culture. The samples that were pretreated for 8 min and 10 min showed significant differences ($p < 0.05$). On the fourth day, only the samples that were pretreated for 10 min showed a statistically significant difference, while on the fifth day, all of the samples were

significantly different, indicating the positive effect of washing on the FPA production. Although it was not been verified if one considers the weight loss during pretreatment, (Table 2), the pretreatment the 190 °C / 8 min is the most promising condition.

The cultures that were prepared using elephant grass pretreated at 200 °C, in some situations, were similar or even superior to the cellulose control, especially for the washed samples (Tukey's test $p < 0.05$). The effect of washing was greater in the samples that were pretreated at 200 °C than in those that were pretreated at 190 °C Both for times of 6 and 10 minutes, but there was no significant difference (Student's t -test $p < 0.05$); the overall effect of the washing was positive though the biomass recoveries were lower.

The positive effect of washing can be attributed to the removal of potential inhibitors that are generated during the steam-explosion pretreatment, such as acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF). Table 4 presents the substances that were removed from the pretreated biomass by washing and detected in the liquid obtained from this process. In general, it appears that the more severe the pretreatment condition, the greater the formation of these inhibitors and consequently, their removal during the wash step. Furthermore, sugars such as glucose, xylose and arabinose were only detected at low concentrations in the liquid obtained from washing the pretreated samples, indicating that the cleaning process does not cause large losses of these sugars; instead, they are lost during the pretreatment process, where the losses are larger, especially for the sugars from the hemicellulose biomass fraction.

A comparison of these activities with the literature data (Table 5) showed that the biomass of elephant grass has a lower positive effect on the production of FPA compared to sugarcane bagasse. Nonetheless, the activities obtained in this study were superior to other studies that were performed using other fungi and steam-explosion pretreated biomass.

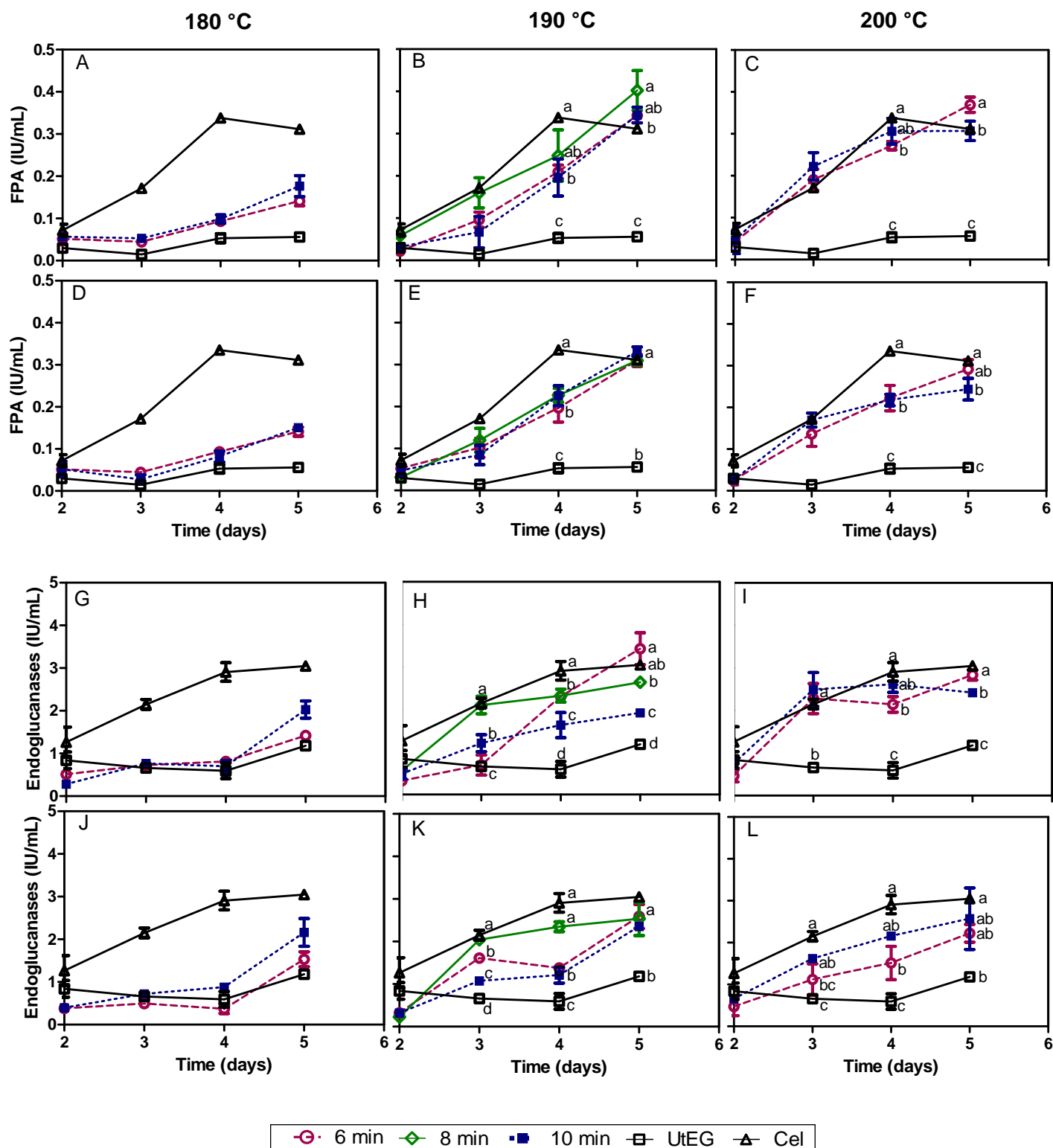


Figure 2. Filter Paper Activity (A - F) and endoglucanases activity (G - L) of *Penicillium echinulatum* S1M29 grown in submerged cultivations using 1% (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A - C and G - I) or unwashed (D - F and J - L) after the pretreatment. The controls are represented by cultivating either 1% (w/v) untreated elephant grass (UtEG) or 1% (w/v) cellulose (Cel). The values that are denoted by the same letter on the same day of cultivation have no significant difference (Tukey's test ($p > 0.05$)).

Table 5. Comparison of enzymatic activities of different fungi grown in submerged cultivations using different steam-explosion lignocellulosic materials

Microorganism	Substrate/ Concentration	Enzymatic activity (IU/mL)				Reference
		Production time				
		FPA *	β - glucosidase	Endoglucanase **	Xylanase ***	
<i>Penicillium echinulatum</i> S1M29	Elephant grass 10 g/L	0.402 120 h	1.40 ⁽²⁾ 96 h	3.48 120 h	9.98 120 h	This work
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Sugar cane bagasse 10 g/L	0.69 120 h	1.19 ⁽²⁾ 120 h	5.29 120 h	28.5 120 h	Schneider <i>et al.</i> (2014)
<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	Sugar cane bagasse 30 g/L	0.48 48 h	0.48 ⁽¹⁾ 48 h	3.24 72 h	0.64 48 h	Camassola & Dillon (2012b)
<i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888	Spruce 35.8 g/L – 20 g/L cellulose	0.59 165 h	3.5 ⁽²⁾ 165 h	19 165 h	0.4 165 h	Jørgensen & Olsson (2006)
<i>Trichoderma reesei</i> Rut C30	Spruce 15 g/L	0.53 96 h	0.2 ⁽²⁾ 96 h	n.d.	n.d.	Kovacs <i>et al.</i> (2009)
<i>Trichoderma atroviride</i> TUB F-1663	Spruce 15 g/L	0.38 96 h	7.1 ⁽²⁾ 96 h	n.d.	n.d.	Kovacs <i>et al.</i> (2009)
<i>T. atroviride</i> TUB F-1505	Spruce 15 g/L	0.31 96 h	4.9 ⁽²⁾ 96 h	n.d.	n.d.	Kovacs <i>et al.</i> (2009)
<i>T. atroviride</i> TUB F-1741	Willow (whole slurry) 15 g/L	0.68 72 h	9.83 ⁽²⁾ 72 h	n.d.	n.d.	Kovacs <i>et al.</i> (2008)
<i>T. atroviride</i> TUB F-1724	Willow (whole slurry) 15 g/L	0.61 72 h	11.70 ⁽²⁾ 72 h	n.d.	n.d.	Kovacs <i>et al.</i> (2008)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Steam-pretreated spruce 10 g/L	0.79 92 h	0.18 ⁽²⁾ 92 h	n.d.	n.d.	Szengyel <i>et al.</i> (2000)

* Determined using Whatman no. 1 filter paper.

** Determined using carboxymethylcellulose (CMC).

*** Determined using xylan.

n.d.: Not determined.

⁽¹⁾Salicine; ⁽²⁾p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside

3.3.2 Endoglucanase

Similar to the observations for FPA, the pretreatments that were performed at 190 °C and 200 °C had a positive effect on the endoglucanase production, as the pretreatments that were performed at 180 °C were not as efficient at producing this enzyme (Figure 2G-L). At 190 °C, the cultivations that were carried out using both the washed and unwashed samples (Figure 2H and K), the medium that was formulated using the biomass that was pretreated for

8 min showed equal activity to the cellulose control on the third day of cultivation. On the fourth day, all of the samples that were pretreated at 190 °C showed higher activity compared to the untreated samples, whereas at 190 °C / 8 min, the unwashed sample was statistically equivalent (Tukey's test $p < 0.05$) to the cellulose control. On the fifth day, all of the unwashed samples showed endoglucanase activities that were equal to the cellulose control, while among the washed samples, the 190 °C / 6 min condition showed activities that were statistically equivalent to the cellulose control. For the samples that were pretreated at 200 °C (Figure 2I and L), all of the washed samples showed activities that were equal to the cellulose control on the third day of cultivation, while among the unwashed samples, the enzymatic activities were mostly lower. Throughout the experiment, the washed samples displayed enzymatic activity at the beginning of the cultivation and maintained their activities or presented only small decreases, while the unwashed samples displayed increasing enzyme activities, although the production was slower. This delay in the unwashed cultivations can be explained by the presence of inhibitory substances that were formed during the pretreatment (Table 4). For the 200 °C pretreatment, the washing step was found to be advantageous because the samples showed activities that were equal to the cellulose control on the third day of cultivation.

By comparing the endoglucanase yields obtained in this study with the literature data (Table 5), it was found that sugarcane bagasse has a higher potential for the production of this enzyme, possibly due to the chemical composition of bagasse, which contains a greater cellulose and hemicellulose content. Furthermore, it should be noted that sugarcane bagasse cannot be produced in all regions, while elephant grass can be grown in a wide range of soils and climatic conditions.

3.3.3 β -glucosidase

In Figure 3 (A to F), the activities of β -glucosidase in the cultures that were produced using media formulated with pretreated elephant grass (washed and unwashed) are shown. It is worth noting that for this enzyme, all of the pretreatment conditions showed activities that were greater than or equal to the control from the fourth day of process, in both the washed and unwashed elephant grass samples. When the elephant grass was pretreated at 200 °C and washed with water (Figure 3C), the highest enzyme activities were obtained on the fourth day (1.03 ± 0.02 IU/mL and 1.02 ± 0.01 IU/mL) in the samples that were pretreated for of 6 min and 10 min, respectively. At 180 °C (Figure 3A and D), both pretreatment conditions favored the secretion of β -glucosidase compared to the controls on the fourth day of cultivation.

Among the cultivations that were produced using the pretreated and unwashed elephant grass, the media formulated with steam-explosion pretreated elephant grass by 6 and 8 min produced the highest enzymatic levels, especially at 190 °C, on the fourth day of cultivation (1.39 ± 0.03 IU/mL and 1.28 ± 0.08 IU/mL, respectively). Additionally, at this temperature condition, there were similarities between the pretreatment profiles for the different pretreatment times. By comparing the washed and unwashed samples that were pretreated at 190 °C (Student's *t*-test), it was found that there was a significant difference on the fourth and fifth days for all of the pretreatment times, and the unwashed samples showed the highest activities, showing that the washing steps is not required to induce the production of β -glucosidase. At 200 °C, the difference was significant for all of the conditions, with the exception of the medium that was produced using the biomass that was pretreated for 6 min on the fourth day of cultivation. According to Vaheri *et al.* (1979), β -glucosidases are detected only at the end of the enzymatic production process, when cell lysis occurs. This is consistent with the results obtained in this study, where the major activity of this enzyme was observed on the fourth and fifth days of culture.

By performing comparisons with the literature data (Table 5), it was found that the β -glucosidase activities obtained using *P. echinulatum* are higher than those obtained for *T. reesei* Rut C30 but are lower than those of obtained using different strains of *T. atroviride* on different steam-explosion pretreated biomass.

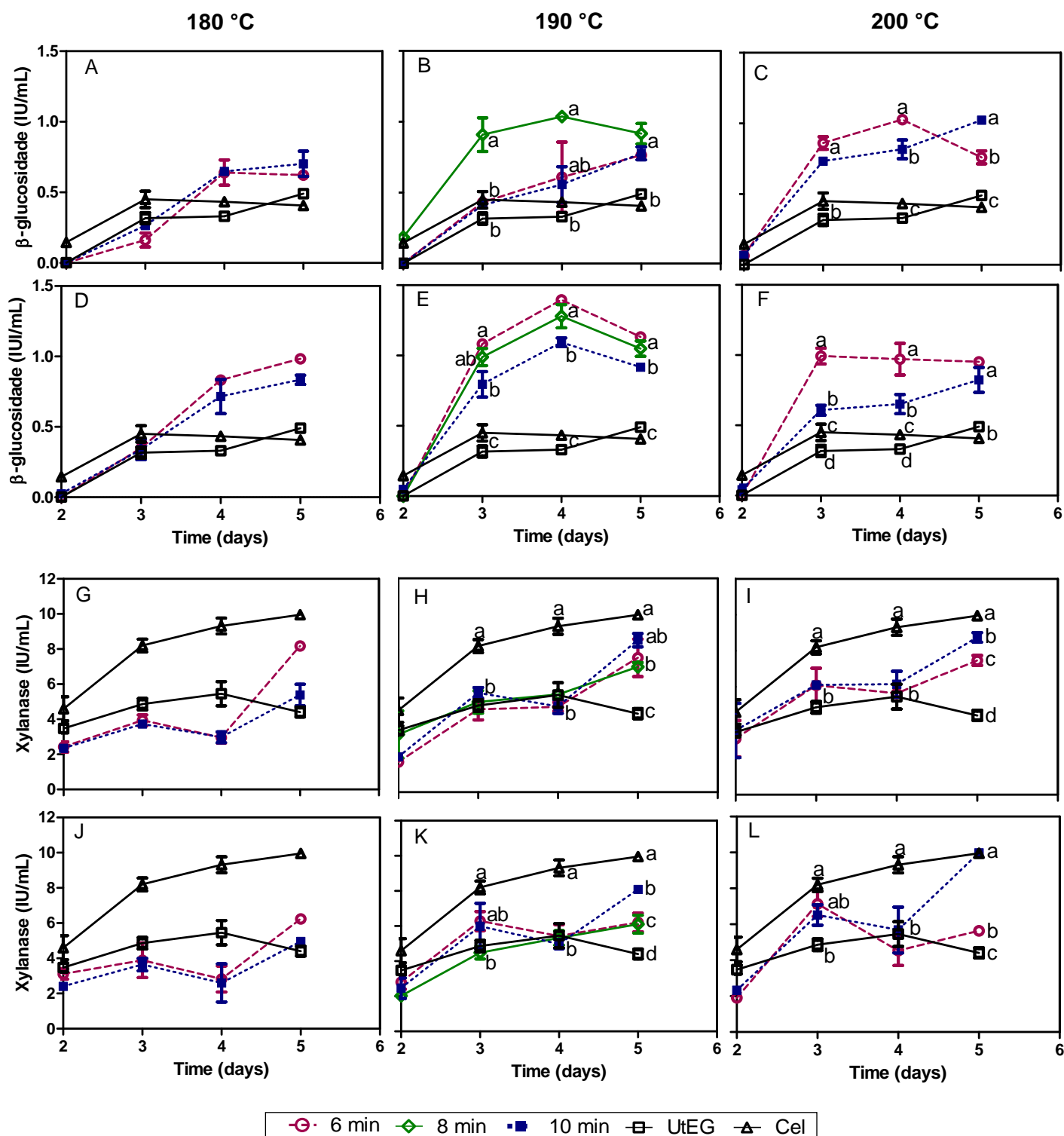


Figure 3. β -glucosidase (A - F) and xylanase (G - L) activities from *Penicillium echinulatum* S1M29 grown in submerged cultivations using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A - C and G - I) or unwashed (D - F and J - L) after the pretreatment. The controls are represented by cultivating either 1 % (w/v) untreated elephant grass (UtEG) or 1 % (w/v) cellulose (Cel). The value that are denoted by the same letter on the same day of cultivation have no significant difference (Tukey's test ($p > 0.05$)).

3.3.4 Xylanase

Xylanase activities are shown in Figure 3 (G to U), where it can observe that the control cultivation using cellulose, in most cases, enabled the highest enzymatic activities compared to the samples that used the pretreated elephant grass (washed and unwashed). For the cultures that were produced using samples that were pretreated at 180 °C, the steam-explosion pretreatment was found to have a negative effect on the production of xylanases, whereas the untreated control showed higher average activities on the third and fourth days (Figure 3G and J), with the exception of the sample that was pretreated for 6 min, which showed an increase in xylanase activity on the fifth day of culture (8.17 ± 0.21 IU/mL). For the media that was produced using the samples that were pretreated at 190 °C and 200 °C (washed and unwashed), there was no difference between the results obtained on the third and fourth days in relation to the cultivation medium that was produced using the untreated elephant grass. At 200 °C, on the fifth day, the medium produced using the biomass that was pretreated for 10 min showed activity levels that were equal to half of that observed in the cellulose control.

The Student's *t*-test showed that washing has a negative effect on xylanase activity. The cultivations that were produced using the elephant grass that was pretreated at 190 and 200 °C and were not washed showed the best activities, with the exception of the medium that was produced using the biomass that was pretreated at 190 °C / 10 min, in which both the washed and unwashed samples showed similar activities. However, the sample that was washed after the pretreatment at 180 °C / 6 min showed a lower activity (8.17 ± 0.21 IU/mL) compared with unwashed pretreatment at 200 °C / 10 min (9.97 ± 0.15 IU/mL). However, after taking into account the level of biomass recovery following the pretreatment (Table 2), the recovery was 98.34 % at 180 °C, while the other condition showed only a 76.84 % biomass recovery .

The lower xylanase activity in the pretreated samples compared to the control may be due to the loss of inducing sugars, which can be explained by the removal of hemicellulose and lignin during the steam-explosion pretreatment. As seen in Table 2, the anhydroxylose and anhydroarabinose content (constituents of the hemicellulose fraction) in all of the pretreated samples was reduced, although it has already been noted that the presence of cellulose may also trigger the induction of xylanases (Aro *et al.* 2001, Novello *et al.* 2014). Upon comparing the xylanase production data obtained in this study with the literature data (Table 5), it was found that *P. echinulatum* shows potential for the simultaneous production of xylanases and cellulases.

Table 6 shows a comparison of the enzymatic activities obtained in this study, including the highest value cultivation, the times and the highest activities that were obtained. It was observed that depending on the substrate or pretreatment condition used, the production of various important enzymes for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass can be induced.

Table 6. Comparison of the maximum enzyme activities obtained from the submerged cultivation using steam-explosion pretreated elephant grass under different temperature and time conditions.

Enzymes	Condition	Pretreatment (°C/min)	Activity time _{max} (day)	Activity _{max} (IU/mL)
FPA	Cellulose	-	4°	0.34±0.01
	Untreated EG	-	5°	0.06±0.01
	Washed	190/8	5°	0.40±0.05
	Unwashed	190/10	5°	0.33±0.01
Endoglucanase	Cellulose	-	5°	3.05±0.05
	Untreated EG	-	5°	1.18±0.02
	Washed	190/6	5°	3.43±0.38
	Unwashed	190/6	5°	2.59±0.28
β-glucosidase	Cellulose	-	3°	0.45±0.06
	Untreated EG	-	5°	0.49±0.02
	Washed	190/8	4°	1.04±0.01
	Unwashed	190/6	4°	1.39±0.03
Xylanase	Cellulose	-	5°	9.96±0.05
	Untreated EG	-	4°	5.46±0.69
	Washed	200/10	5°	8.75±0.27
	Unwashed	200/10	5°	9.97±0.15

3.4 Soluble Protein

Figure 4 (A to F) illustrates the protein concentrations that were detected in the culture media produced using the pretreated elephant grass and in the control cultures that were prepared using untreated elephant grass or cellulose. In general, the protein concentrations were greater in all of the cultures that contained samples that were pretreated for a shorter period of time. At 180 °C, both the unwashed and washed samples (Figure 4A and D) that were pretreated under the different time conditions (6 and 10 min) did not show any protein concentrations that were higher than the control cultivations using either untreated elephant grass or cellulose until the third and fourth days of cultivation. On the fifth day, there was no significant difference between the washed pretreated samples and the controls, whereas the

cellulose control showed a higher protein concentration compared to the untreated elephant grass control and the unwashed pretreated elephant grass samples. The highest protein concentrations were identified in the cellulose-based media, and the values correlated with the titres that were obtained when the same control condition was used for the induction of FPA, xylanase and the endoglucanases, suggesting that the protein levels correspond to the enzyme levels. For the higher temperatures (190 and 200 °C), the majority of the pretreatments contained protein concentrations that were statistically equivalent to the proteins in the control sample, confirming the enzymatic activities of cellulase, β -glucosidase and xylanase are equivalent to the higher steam-explosion temperatures. Upon comparing the protein concentrations using the Student's *t*-test ($p < 0.05$), it was found that all of the samples that were steam-explosion pretreated showed no significant differences, with the exception of the 6- and 10-min at 190 °C.

3.5 pH

As shown in Figure 4 (G to L), the pH varies during the five days of cultivation. All of the cultures decreased in pH on the second or third day, which was then followed by an increase from the third day. The decrease in the pH can be explained by the intense metabolism, which affects the release of H^+ ions into the culture media due to the use of NH_3 by the cells (Sternberg & Dorval, 1979). A similar situation was observed by Botella *et al.* (2007) and Blandino *et al.* (2002) during the production of enzymes by *Aspergillus awamori*. In general, the pH values varied between 4 and 8.

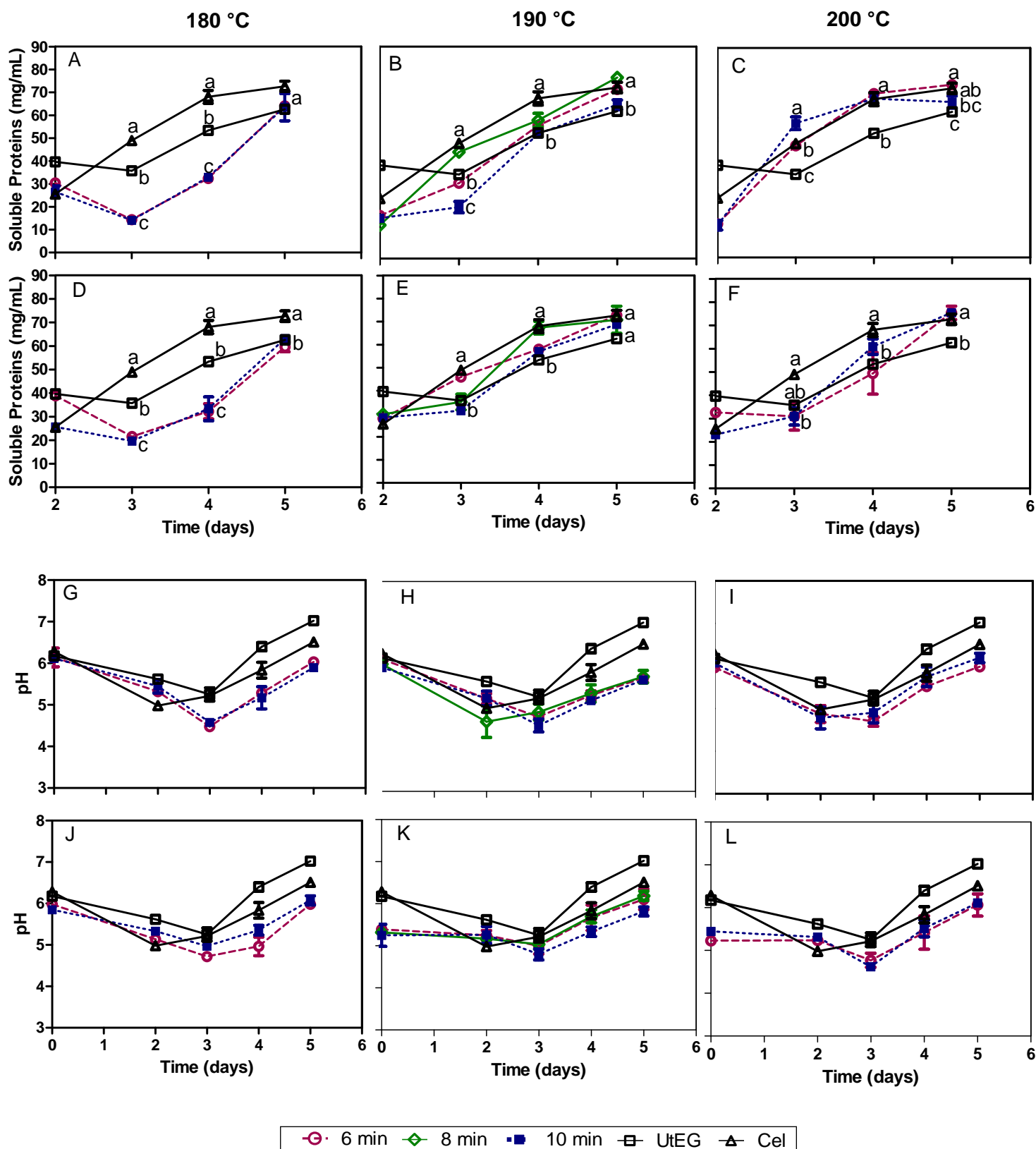


Figure 4. Soluble protein concentration (A - F) and pH variation (G - L) in *Penicillium echinulatum* S1M29 broth from the submerged cultivations using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A - C and G - I) or unwashed (D - F and J - L) after the pretreatment. The controls are represented by cultivating either 1 % (w/v) untreated elephant grass (UtEG) or 1 % (w/v) cellulose (Cel). The values that are denoted by the same letter on the same day of cultivation have no significant difference (Tukey's test ($p > 0.05$)).

3.6 Mycelial growth

Figure 5 shows the mycelial growth at the end of cultivation. The largest increases were observed in the samples that were obtained at lower temperatures and pretreatment times (180 °C / 6 min, 180 °C / 10 min, 190 °C / 6 min) and washed with water, and for the samples unwashed 190 °C / 10 min and 200 °C / 10 min that showed mycelial mass was equal to formed using cellulose. The other cultures had lower mycelial growth than the above mentioned samples, but the mycelial mass was statistically equivalent to mycelial growth in the medium produced using the untreated elephant grass. These differences may be related to the presence of compounds generated during the inhibitory process that are related to mycelial growth (Table 4).

Upon comparing the enzyme activities with the mycelial growth, it was found that there was a direct correlation between the amount of mycelia and the enzyme activities in the washed and unwashed samples.

In general, the enzyme yield using the pretreated elephant grass showed potential as carbon source for different microorganisms, and in some cases it produced higher enzymatic titrations those observed using other types of biomass (Table 5).

In natural environments, the decomposition of vegetal biomass can inhibit microbial growth, particularly in grasses. According to Joh *et al.* (2011), the phenolic compounds present in elephant grass are toxic to *Acidothermus cellulolyticus*; therefore, it is necessary to perform a hot water (55 °C) treatment to remove any microbial inhibitors (Vandergheynst, 2010). The data in this study showed a similar trend for the majority of the enzymes, and the untreated elephant grass showed lower enzymatic titers, possibly due to the presence of these inhibitors in the culture media, which may have inhibited fungal growth.

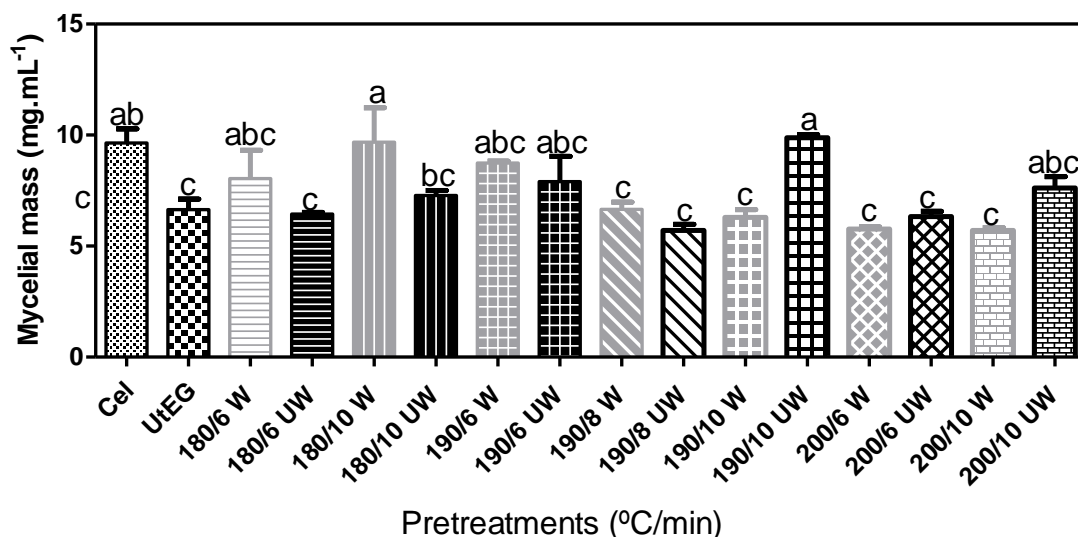


Figure 5. Determination of mycelial growth of *Penicillium echinulatum* S1M29 grown in submerged cultivations, on the fifth day of cultivation, using 1 % (w/v) elephant grass that was pretreated via steam explosion under different time and temperature conditions and was either washed (A) or unwashed (B) after the pretreatment. The graphical representations indicate the pretreatment conditions compared to the controls, which are represented by cultivating either 1 % (w/v) cellulose (Cel) or 1 % (w/v) untreated elephant grass (UtEG). The values (averages) that are denoted by the same letter have no significant difference (Tukey's test ($p > 0.05$)).

4 Conclusion

The data in this study indicate that steam explosion can be used as a pretreatment method for the production of enzymes from elephant grass, and even the most severe pretreatment conditions produced enzyme activities that were equal or superior to the cellulose control. The washing step after the pretreatment proved to be advantageous for the production of endoglucanase and FPA, whereas washing showed a negative effect on the production of β -glucosidase and xylanase.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial and technical support from UCS, CAPES (scholarship), CNPq (310590/2009-4), and FAPERGS (10/1972-5).

References

- 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, 24309-24314.

- Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257-270.
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D., Webb, C., 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* in wheat in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 164–169.
- Botella, C., Diaz, A. B., Wang, R., Koutinas, A., Webb, C., 2009. Particulate bioprocessing: a novel process strategy for biorefineries. *Process Biochem.* 44 (5), 546–555.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brugnago, R.J., Satyanarayana, K.G., Wypych, F., Ramos, L.P. (2011). The effect of steam explosion on the production of sugarcane bagasse/polyester composites. **Composites: Part A.** 42: 364–370.
- Camassola, M., Dillon, A. J. P., 2012a. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. *J. Anal. Bioanal. Techniq.* 1,125.
- Camassola, M., Dillon, A. J. P., 2012b. Steam-Exploded Sugar Cane Bagasse for On-Site Production of Cellulases and Xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Energ. Fuels.* 26, 5316-5320.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F., 2004. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochem.* 39, 1533–42.
- 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.
- 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 b-glucosidase activities. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 70, 470-476.
- Emmel, A., Mathias, A.M., Wypych, F., Ramos, L.P., 2003. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresour. Technol.* 86, 105–115.
- Fontoura, C.F., Brandão, L.E., Gomes, L.L., 2014. Elephant Grass Biorefineries: Towards a cleaner Brazilian energy matrix? *J. Clean. Product.* 1-9.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59: 257-268.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R.,

2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800.
- Hames, B. R., 2011. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications. *Biofuels. Methods and Protocols Series: Methods Mol. Biol.* 581, 145-167.
- Han, G., Deng, J., Zhang, S., Bicho, P., Wu, Q., 2010. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. *Ind. Crop Prod.* 31, 28–33.
- Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L., Howard, S., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afric. J. Biotechnol.* 602-619.
- Joh, L. D., Rezaei, F., Borabote, R. D., 2011. Effects of phenolic monomers on growth of *Acidothermus cellulolyticus*. *Biotechnol. Progr.* 27(1).
- Jørgensen, H., Olsson, L., 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* BT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 381–390.
- Kovács, K., Megyeri, L., Szakacs, G., Kubicek, C. P., Galbe, M., Zacchi, G., 2008. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and beta-glucosidase on pretreated willow. *Enzyme Microb Technol.* 43, 48-55.
- Kovács, K., Szakacs, G., Zacchi, G., 2009. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. *Bioresour. Technol.* 100, 1350-1357.
- Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J. P., Ramos, L. P., 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.*, 99, 1417-24.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M., 2014a. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. *Energ Convers Manage.* DOI: 10.1016/j.enconman.2014.02.071.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M., 2014b. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. *Fuel.* 133, 232–240.
- 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.
- Pitarelo, A. P., Silva, T. A., Peralta-Zamora, P. G., Ramos, L. P., 2012. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Quím Nova.* 35(8), 1502-1509.

- Ramos, L. P., 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quím. Nova.* 26, 863-871.
- Ramos, L.P., Breuil, C., Saddler, J. N., 1992. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34-35, 37-48.
- Rocha, G. J. M., Martín, C., Silva, V. F. N., Gómez, E. O., Gonçalves, A. R., 2012. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. *Bioresour. Technol.* 111, 447–452.
- 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.* 1-10.
- Sternberg, D., Dorval, S., 1979. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 181-191.
- Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., Reczey, K., 2000. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C 30 using steam-pretreated spruce – Hydrolytic potential of cellulases on different substrates. *Appl Biochem Biotechnol.* 84–6, 679-691.
- Vaheri, M. P., Leisola, M., Kaupinnen, V., 1979. Transglycosilation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Lett.* 1, 41-46.
- VanderGheynst, J. S., Rezaei, F., Dooley, T. M., Berry, A. M., 2010. Switchgrass leaching requirements for solid-state fermentation by *Acidothormus cellulolyticus*. *Biotechnol. Progr.* 26, 622–626.
- Woodard, K. R., Prine, G. M., 1993. Dry matter accumulation of elephant grass, energy cane and elephant millet in a subtropical climate. *Crop Science.* 33, 818–824.
- Zeilinger, S., Haller, M., Mach, R., Kubicek, C. P., 2000. Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jecorina*. *Biochem Biophys Res Commun.* 277, 581-588.

Emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a indução da secreção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos em estado sólido

Angélica Luisi Scholl^a, Daiane Menegol^a, Ana Paula Pitarelo^{b,c}, Roselei Claudete Fontana^a, Arion Zandoná Filho^b, Luiz Pereira Ramos^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^{a*}

^aUniversidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

Telefone/Fax: +55 54 3218 2149

E-mail: mcamassola@gmail.com

^bUniversidade Federal do Paraná – Departamento de Química, Centro de Pesquisa em Química Aplicada

P. O. Box 19032 – Curitiba, PR, Brasil – CEP 81531-980

Tel: +55 41 3361 3175; Tel: +55 41 3361 3198

E-mail: luiz.ramos@ufpr.br

^cCentro de Tecnologia Canavieira (CTC), Fazenda Santo Antônio, 13400-907 Piracicaba, São Paulo, Brazil.

* Autor correspondente

Resumo

Um dos gargalos para a produção de etanol de segunda geração é o elevado custo das enzimas utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. Uma forma de reduzir os custos é a utilização de biomassas regionais como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é vantajoso pela elevada produtividade (40-45 ton/ha/ano massa seca) e por ser adaptável a diversos tipos de solo, sendo uma alternativa para regiões onde a cana-de-açúcar não apresenta elevada produção. Todavia, para o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos um pré-tratamento é necessário. Entre os pré-tratamentos que vêm sendo estudados, explosão a vapor tem se mostrado mais eficiente. Nesse trabalho, foi avaliada a produção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivos em estado sólido, utilizando capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor em diferentes temperaturas (180, 190 e 200 °C) e tempos de residência (6, 8 e 10 min). Nos meios de cultivo, foi utilizado 100 % de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (lavado e não lavado após o processo) ou em

associação ao farelo de trigo (50 %). Verificou-se que o capim-elefante não tratado foi superior ao farelo de trigo para Filter Paper Activity, com valores de FPA de $23,38 \pm 0,10$ UI.g^{-1} . A substituição de 50 % do farelo de trigo por capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor lavado favoreceu a produção de enzimas com máximas atividades de $32,93 \pm 0,58$ UI.g^{-1} para Filter Paper Activity, de $205,83 \pm 6,85$ UI.g^{-1} para endoglucanases e de $148,96 \pm 0,00$ UI.g^{-1} para β -glicosidasases. Para a produção de xilanases, o capim-elefante não tratado mostrou ser mais eficaz, enquanto a combinação de substratos propiciou a obtenção de maiores atividades enzimáticas com amostra não submetida à lavagem, atingindo valores de $571,74 \pm 27,14$ UI.g^{-1} .

Palavras-chave: capim-elefante, *Penicillium echinulatum*, produção de enzimas, explosão a vapor, cultivo em estado sólido

1. Introdução

Com a crescente demanda energética, a busca por fontes energéticas alternativas aos combustíveis fósseis vem ganhando espaço, sendo que a biomassa lignocelulósica possui grande destaque, pois é uma fonte que pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis, especialmente o etanol (Dwivedi *et al.*, 2009). O combustível derivado da biomassa tem sido foco de interesse em pesquisas por suas vantagens sobre os combustíveis fósseis (Gray *et al.*, 2006; Xuan *et al.*, 2009; Cardona *et al.*, 2014; Menegol *et al.*, 2014). Porém, para a conversão da biomassa lignocelulósica a etanol, uma etapa de pré-tratamento é necessária. Essa é requerida para alterar a estrutura da biomassa, permitindo que a celulose fique mais acessível às enzimas que hidrolisam os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (Mosier *et al.*, 2005). Todavia o pré-tratamento é considerado uma das etapas mais onerosas do processo de conversão (Mosier *et al.*, 2005). O pré-tratamento por explosão a vapor pode hidrolisar eficientemente a hemicelulose (parcialmente), modificar a lignina, aumentar a área de superfície e reduzir a cristalinidade da celulose e o grau de polimerização da celulose (Ramos, 2003). Além do custo do pré-tratamento, o custo do complexo enzimático a ser utilizado na hidrólise enzimática deve ser levado em consideração.

O cultivo em estado sólido (CES) pode oferecer diversas vantagens em relação ao cultivo submerso (CS), incluindo alta concentração de produto, equipamentos simples de

fermentação, baixa geração de efluentes e requisitos limitados de aeração e agitação para a produção de enzimas (Camassola & Dillon, 2010; Viniestra-González *et al.*, 2003).

A utilização de biomassas energéticas com alta produtividade, como o capim-elefante, também pode contribuir com a diminuição dos custos de produção de etanol. O capim-elefante tem potencial de produção de cerca de 40 toneladas de matéria seca por hectare por ano (Woodard e Prine, 1993), sendo uma alternativa de substrato para a produção de enzimas, como as celulases e xilanases, as quais são empregadas na hidrólise de lignocelulósicos (Menegol *et al.*, 2014).

Entre as linhagens com potencial para serem empregadas para a produção de celulases e hemicelulases encontram-se os mutantes da linhagem 2HH de *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2011) por apresentarem títulos de FPA (2 UI.ml⁻¹) em cultivo submerso e em torno de 35 UI.g⁻¹ em cultivo no estado sólido (Camassola & Dillon, 2010).

Nesse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a produção de celulases e xilanases em CES, usando capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor associado com farelo de trigo (FT) como fonte de carbono indutora. O microrganismo utilizado para a produção de enzimas foi a linhagem S1M29 de *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2011). Além disso, a biomassa empregada foi pré-tratada sob diferentes condições de tempo e temperatura, a fim de avaliar a eficácia desse pré-tratamento para a produção de celulases e xilanases.

2. Material e métodos

2.1 Microrganismo

A produção de enzimas celulases e xilanases foi realizada utilizando-se a linhagem S1M29, obtida a partir da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*- DSM 18942). Essa linhagem foi obtida por mutagênese empregando peróxido de hidrogênio seguido de seleção dos mutantes em meio contendo 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem S1M29 pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do IB/UCS. As culturas de *P. echinulatum* foram desenvolvidas em tubos de ensaio contendo o meio de crescimento (Dillon *et al.*, 2006), incubadas por sete dias a 28 °C até a formação de conídios e estocadas a 4 °C para, posteriormente, ser empregada na produção de enzimas.

2.2 Biomassa e pré-tratamento

As amostras de capim-elefante, obtidas na cidade de Nova Petrópolis-RS, Brasil (29°21'39.18''S e 51°02'53.88''O, 619 m acima do nível do mar), foram trituradas em triturador forrageiro Trapp® 70 obtendo-se granulometria entre 0,075 e 4,75 mm sendo posteriormente, desidratadas a 60 °C por três dias (Menegol *et al.*, 2014a). As amostras coletadas pertencem à variedade Cameron.

O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado na Universidade Federal do Paraná, utilizando um reator de aço inox com capacidade para 10 L. Foram introduzidos no reator 600 g de capim-elefante não tratado com 10 % de umidade natural, sendo empregadas diferentes condições de tempo e de temperaturas conforme apresentado no planejamento experimental (Delineamento Composto Central) da Tabela 1. A severidade do pré-tratamento foi calculada de acordo com a Equação 1 (Petersen *et al.*, 2009):

$$\log R_0 = t \times \exp\left(\frac{T - 100}{14,75}\right)$$

(Eq. 1)

onde t corresponde ao tempo (min) e T corresponde à temperatura (°C) .

Tabela 1. Planejamento fatorial 2² para realização de pré-tratamento por explosão a vapor de capim-elefante.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	-1	+1	-1	+1	0	0	0
	180°C	200 °C	180 °C	200 °C	190 °C	190 °C	190 °C
Tempo (min)	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0
	6 min	6 min	10 min	10 min	6 min	10 min	8 min
Pressão (kgf/cm ²)*	13	13	17	17	17	21	21
Severidade*	3,13	3,35	3,43	3,55	3,65	3,72	3,94

*A pressão atingida nos experimentos e a severidade calculada não foram utilizadas no planejamento experimental.

Após o pré-tratamento, o material foi drenado, sendo que somente a parte sólida foi utilizada. Dessa fração sólida, parte foi lavada para a remoção de possíveis substâncias inibitórias para a produção de enzimas. Para a realização da lavagem empregou-se 5 % (m/v) da biomassa pré-tratada em água destilada, a 600 rpm por 1 h. As amostras foram então

filtradas em tecido de poliéster, sendo que o excesso de líquido foi removido por filtração a vácuo. Em seguida, uma quantidade de amostra (em torno de 1g) foi utilizada para determinar o teor de umidade.

2.3 Produção de celulases e xilanases

Para a produção de celulases e xilanases em CES, foram avaliadas as seguintes condições: capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (submetido ou não à lavagem após o processo) em diferentes condições de temperaturas e tempo de residência, e com ou sem associação ao farelo de trigo (WB). Os controles foram formulados com 100 % de farelo de trigo (WB) e com 100 % de capim-elefante não tratado (UtEG). Foi utilizada uma solução mineral baseada na formulação de Mandels & Reese (1957) 20× (m/v), composta por: KH_2PO_4 (4 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,6 g); $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (0,6 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g); CaCl_2 (0,6 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,03 g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,029 g); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,004 g). Esses sais foram dissolvidos em água destilada, sendo a solução autoclavada e armazenada a 4°C.

Os CES foram conduzidos em frascos de 100 mL contendo quantidade de biomassa correspondente a 1g de substrato seco e 1mL de solução mineral. Esses sistemas foram inicialmente autoclavados (121° C por 15 min). Após, cada sistema foi inoculado com 1×10^6 conídios.g⁻¹ de massa seca. Os sistemas foram mantidos em câmara com umidade relativa do ar em torno de 95 % e temperatura de 28-30 °C, durante 5 dias, sendo coletadas amostras a partir de 48 h até 120 h.

Para a extração enzimática, inicialmente, 10 mL de água destilada em temperatura de 4 °C foram adicionados a cada sistema. O meio foi homogeneizado, o pH foi medido e, em seguida, foram acrescentados 17 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8. Esses meios foram mantidos sob agitação recíproca a 200 rpm, a 4 °C, durante 20 min. Os sólidos foram removidos por filtração e os filtrados centrifugados a 3000 × g durante 10 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas. Os resultados de CES foram expressos em UI.mg⁻¹ de massa seca. Todos os CES foram realizados em triplicata.

2.4 Caracterização do capim-elefante

A caracterização da composição química do capim-elefante foi realizada conforme as metodologias propostas pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-TP-510-42618,

NREL-TP-510-42619, NREL-TP-510-42621), com adaptações descritas por Menegol *et al.* (2014b).

2.5 Atividades enzimáticas

Para a dosagem de celulases foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA) conforme Ghose (1987), com as modificações propostas por Camassola & Dillon (2012). As unidades de FPA foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por min.

A determinação da atividade de endoglicanases foi realizada segundo Ghose (1987). Uma unidade de atividade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por min.

Para a determinação da atividade de β -glicosidases foi utilizado o substrato ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (ρ NPG) (Daroit *et al.*, 2008). Uma unidade de atividade de β -glicosidase, utilizando-se como substrato o ρ NPG, foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ρ -nitrofenol (ρ NP) por min. A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992), utilizando-se xilana 1 % (m/v) como substrato. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por min. Todas as atividades enzimáticas foram expressas em UI.g^{-1} (massa seca).

2.6 Determinação das proteínas solúveis

A determinação quantitativa das proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford (1976). As concentrações de proteínas totais foram expressas em mg.g^{-1} (massa seca).

2.7 Estimativa do crescimento fúngico

A biomassa fúngica foi estimada indiretamente a partir da massa de N-acetilglicosamina obtida após a hidrólise enzimática da quitina da parede celular, conforme descrito por Novello *et al.* (2014). As concentrações de N-acetil-D-glicosamina foram obtidas a partir de curva padrão construída com concentrações entre 0,5 a 1mg.mL^{-1} . As concentrações de micélio foram expressas em mg.g^{-1} (massa seca).

3 Resultados e discussão

3.1 Análise química da fração sólida

As amostras de capim-elefante não tratadas, pré-tratadas por explosão a vapor (lavadas e não lavadas após o processo) foram quimicamente caracterizadas (Figura 1). Nos dados para o capim-elefante não tratado verifica-se composição equivalente a 8,84 % (m/m) de extraíveis, 35,97 % (m/m) de anidroglicose, 15,15 % (m/m) de anidroxilose, 5,36 % (m/m) de anidroarabinose, 1,92 % (m/m) de grupo acetil, 1,12 % (m/m) de lignina solúvel, 19,65 % (m/m) de lignina insolúvel, 8,53 % (m/m) de cinzas e 5,55 % (m/m) de teor de proteínas, valores semelhantes aos observados anteriormente por Menegol *et al.* (2014).

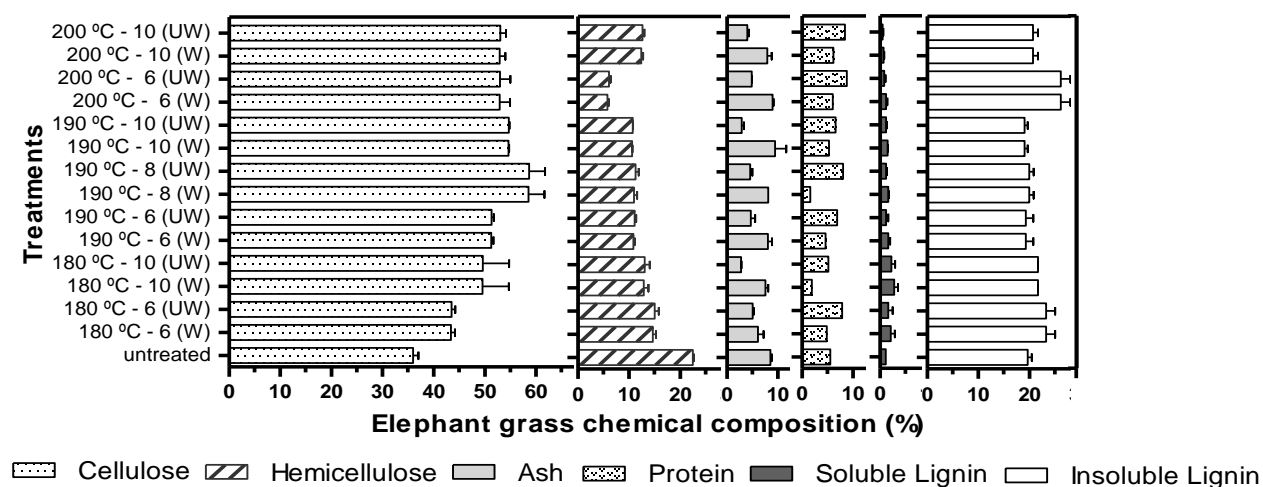


Figura 1. Composição química de capim-elefante não tratado (UtEG) e pré-tratado por explosão a vapor, sob diferentes condições de tempo e de temperatura. As amostras de capim-elefante pré-tratadas foram submetidas à lavagem (W) ou não submetidas à lavagem (UW).

Ainda, na Figura 1, verifica-se que a realização dos pré-tratamentos por explosão a vapor acarretou em diversas modificações na composição química das amostras em comparação à amostra não tratada. Evidenciou-se claramente o aumento na percentagem da fração celulósica em todas as amostras pré-tratadas, o que pode ser atribuído principalmente à perda constatada de componentes hemicelulósicos. Verificou-se menores perdas de hemicelulose na menor condição de temperatura (180 °C) como descrito anteriormente por

Peterson *et al.* (2009) que verificaram superiores recuperações de hemicelulose utilizando pré-tratamento da palha de trigo a 185 °C / 6 min. Além disso, houve redução das concentrações de cinzas e em alguns casos, de proteínas.

Quanto à lignina insolúvel, houve manutenção ou aumentos da percentagem, sendo que os incrementos são diretamente relacionados à diminuição percentual de hemicelulose, como fica evidente, especialmente, para o pré-tratamento realizado a 200 °C por 6 min. Destaca-se que a composição química do capim-elefante varia de acordo com o genótipo, idade de colheita e solo onde foi cultivado (Basso *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2014). Esses autores compararam a composição química do capim-elefante sob diferentes métodos de pré-tratamento, obtendo 31,3 % de celulose, 29,0 % de hemicelulose, 15,8 % de lignina e 8,7 % de cinzas para as amostras pré-tratadas por explosão a vapor sob 180 °C / 5 min. Verifica-se que mesmo na ausência de pré-tratamento, a biomassa utilizada nesse trabalho apresentou maiores concentrações de celulose em relação aos dados anteriores. (Figura 1).

Comparando-se as amostras pré-tratadas por explosão a vapor em uma mesma condição de pré-tratamento submetidas ou não à lavagem após o processo, verificou-se pouca variação na composição dessas no que se refere ao conteúdo de carboidratos, grupo acetil e quanto ao conteúdo de lignina solúvel e insolúvel presente nas amostras. Como esperado, observou-se que o teor de carboidrato proveniente da fração celulósica (anidroglicose) foi maior nas amostras não submetidas à lavagem. Além disso, essa mesma tendência foi observada para os conteúdos de anidroxilose e anidroarabinose.

Comparando-se diferentes condições de pré-tratamento (tempo e temperatura), percebeu-se que a condição a 190 °C / 8 min foi a que proporcionou a obtenção de maior concentração de celulose na amostra não submetida à lavagem (58,61 %) enquanto que a condição a 200 °C / 6 min com amostra lavada proporcionou a maior remoção de anidroxilose (5,77 %) dentre as condições de pré-tratamentos testadas (Figura 1). Segundo Pitarelo *et al.* (2012) o rendimento de recuperação de celulose, hemicelulose e lignina estão diretamente associados às condições do pré-tratamento (tempo de residência, temperatura e umidade) utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar, assim como a severidade do pré-tratamento que afeta diretamente na recuperação dos componentes da biomassa (Petersen *et al.*, 2009). Ambas as observações se aplicam aos pré-tratamentos de capim-elefante por explosão a vapor.

Com relação ao grupo acetil (Figura 1), apesar de ter sido detectado somente em algumas amostras pré-tratadas e não lavadas após o processo, o maior percentual desse composto foi observado na amostra não tratada (1,92 %), o que pode ser explicado pela possível remoção do grupo acetil durante o processo de lavagem da biomassa pré-tratada.

Quanto ao teor de lignina solúvel, observou-se que as amostras lavadas apresentaram maior teor de lignina quando comparadas às amostras não lavadas, notando-se também uma redução nos conteúdos de lignina solúvel conforme aumentava-se a severidade das condições do pré-tratamento por explosão a vapor (Figura 1).

Na quantificação de cinzas (Figura 1) verificou-se que para uma mesma condição de pré-tratamento, as amostras submetidas à lavagem apresentaram maior percentual de cinzas quando comparadas às não lavadas contendo concentrações entre $2,77 \pm 0,10$ % (180 °C – 10 min UW) até $9,44 \pm 2,18$ % (190 °C – 10 min W). Assim, alguns valores de cinzas obtidos para capim-elefante são semelhantes ou pouco superiores aos encontrados por Oliveira *et al.* (2013) em pré-tratamentos por explosão a vapor porém para bagaço de cana-de-açúcar, nas mesmas condições de temperatura testadas neste trabalho (3,5 %, 5,2 % e 5,2 % de cinzas para 180 °C, 190 °C e 200 °C respectivamente).

Já a quantificação de proteínas delineou um perfil contrário. As amostras não lavadas apresentaram as maiores concentrações (Figura 1), com destaque para a condição a 200 °C por 6 min que apresentou percentual proteico igual a 8,74 %, o que pode ser explicado pela solubilidade das proteínas que foram extraídas durante a lavagem.

Relatos indicam a eficiência do pré-tratamento por explosão a vapor com uso de diferentes lignocelulósicos. Rocha *et al.* (2012) utilizaram o pré-tratamento por explosão a vapor com diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar, sob condição de 190 °C por 15 min, obtiveram média de composição química para celulose (57,5 %) semelhante a encontrada nesse trabalho, onde o capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor sob condição de 190 °C por 8 min com amostra não lavada foi empregado (58,61 %). Oliveira *et al.* (2013) também descreveram a utilização do pré-tratamento por explosão a vapor (180 °C, 190 °C e 200 °C por 15 min) com palha de cana-de-açúcar, obtendo para as respectivas condições equivalentes percentuais de celulose (47,8 %, 48,6 %, 48,7 %). Os percentuais descritos anteriormente foram inferiores aos obtidos no presente trabalho.

3.2 Atividades enzimáticas de celulasas, β -glicosidasas e xilanases

Os cultivos em estado sólido foram realizados empregando-se meios formulados somente com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor como fonte e carbono (Figura 2A) ou com misturas de capim-elefante pré-tratado (50 % m/m) e farelo de trigo (50 % m/m) (Figura 2B). Capim-elefante não tratado e farelo de trigo isoladamente foram utilizados como controles.

Observa-se, na Figura 2A, que o capim elefante não tratado é superior em relação ao farelo de trigo para a produção de FPA, chegando a valores de $23,38 \pm 0,10 \text{ UI.g}^{-1}$ no 5º dia de processo. Esses valores são superiores aos observados por Mo *et al.* (2004) e Fujian *et al.* (2002) que referiram respectivamente FPA de $17,7 \text{ UI.g}^{-1}$ e $20,4 \text{ UI.g}^{-1}$ (massa seca) com o fungo *Penicillium decumbens* utilizando uma combinação de palha de trigo e farelo de trigo. Dutta *et al.* (2008) registraram FPA igual a $1,72 \text{ UI.ml}^{-1}$, empregando o fungo *P. citrinum* com farelo de trigo em cultivo em estado sólido. Entretanto, o valores de FPA de $23,38 \pm 0,10 \text{ UI.g}^{-1}$ foram inferiores aos obtidos também para *P. echinulatum* com a linhagem 9A02S1 (Camassola & Dillon, 2010).

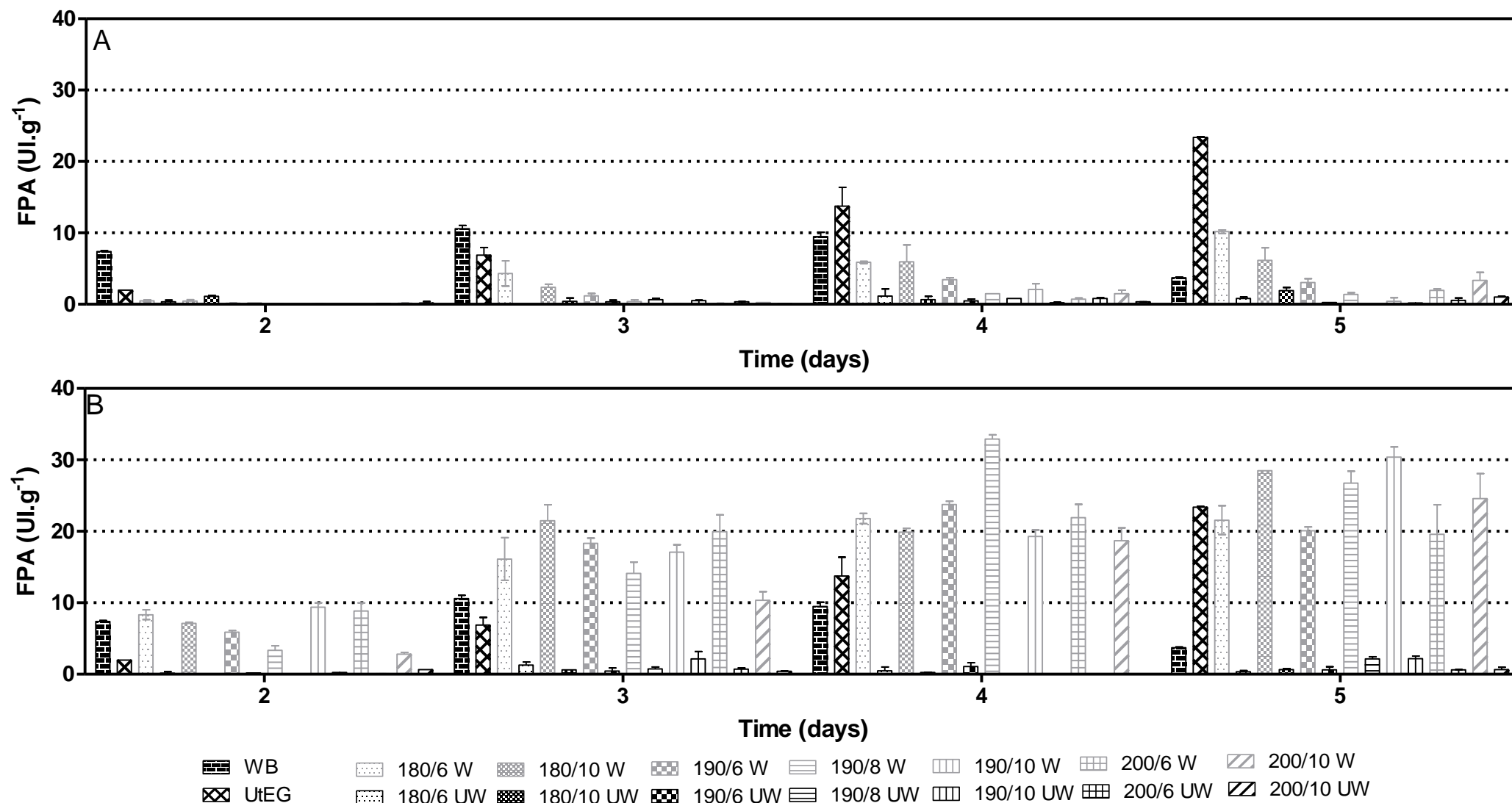


Figura 2. Atividade sobre papel filtro de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura. As amostras de capim-elefante foram submetidas a pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (W) ou não submetidas à lavagem (UW). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

Com relação aos valores de FPA nos CES com uso de 100 % de amostras de capim-elefante pré-tratadas (Figura 2A), observou-se que os valores foram inferiores aos controles e que a lavagem das amostras pré-tratadas por explosão a vapor favoreceu a atividade de FPA. Destacam-se as maiores atividades obtidas no meio formulado com o capim-elefante não tratado, indicando ser uma biomassa apropriada para a produção de enzimas sem a necessidade de pré-tratamento. Este fato pode estar relacionado à presença de proteínas e sais minerais em sua composição (Basso *et al.*, 2014), o que contribui para a redução dos custos de produção destas enzimas, visto que o processo de pré-tratamento por explosão a vapor requer gastos energéticos. Com relação ao WB, as elevadas produções podem estar relacionadas à composição nutricional deste constituinte, que possui celulose, hemicelulose, amido, pectina, além de proteínas (Camassola & Dillon, 2010).

Na Figura 2B, verifica-se que, a partir do 3º dia, os meios formulados com a mistura de farelo de trigo e amostras lavadas de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor apresentaram atividades enzimáticas superiores aos controles e aos meios constituídos de misturas onde o capim-elefante pré-tratado não foi lavado, alcançando valores de $32,93 \pm 0,58$ UI.g⁻¹ para FPA no 4º dia de cultivo, na condição de 190 °C / 8 min para explosão a vapor. As maiores atividades nos meios formulados com misturas de substratos em relação aos formulados com 100 % das amostras pré-tratadas poderiam ser explicadas pela presença de indutores para produção de enzimas presentes que foram gerados nas amostras pré-tratadas, que se adicionaram aos nutrientes do farelo de trigo para a maior secreção de celulasas, enquanto só as amostras pré-tratadas não foram suficientes para permitir altas secreções de FPA.

Embora haja citações na literatura de atividades superiores as obtidas nesse trabalho para *P. echinulatum*, como os referidos em Camassola & Dillon (2010), que empregaram bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo em cultivo em estado sólido com a linhagem 9A02S1, registrando pico de atividade no 3º dia para FPA de $45,82 \pm 1,88$ U.g⁻¹, destaca-se a presença de substâncias fenólicas capazes de inibir o metabolismo microbiano na composição do capim-elefante (Rezaei *et al.*, 2011). A presença desses compostos poderia justificar, pelo menos em parte, a menor atividade enzimática com relação ao bagaço de cana-de-açúcar. Mas se comparados com dados obtidos por outros autores empregando substratos e microrganismos diferentes, os dados obtidos neste trabalho são promissores, principalmente nos cultivos formulados com substratos pré-tratados a 190 °C / 8 e 190 °C / 10 min, e submetidos à lavagem, os quais possibilitaram atividades superiores a 30 FPU.g⁻¹ de substrato.

Os dados indicam a presença de inibidores que foram formados durante o pré-tratamento por explosão a vapor. A formação de substâncias inibidoras do metabolismo microbiano, geradas durante os pré-tratamentos, tais como furfural, HMF, ácido acético e compostos fenólicos derivados da degradação da lignina, tem sido reportada (Saha *et al.*, 2005; Cardona *et al.*, 2014), porém associado à inibição do metabolismo de leveduras durante a produção de etanol ou de outros microrganismos associados à bioconversão de açúcares provenientes de biomassa pré-tratada por explosão a vapor e hidrolisada (Saha *et al.*, 2005).

Na Figura 3, são apresentados os dados referentes às atividades de endoglicanases. Quando empregou-se somente capim-elefante pré-tratado como fonte de carbono indutora (Figura 3A), tal como foi constatado para FPA, maiores produções enzimáticas foram observadas para as amostras de capim-elefante submetidas à lavagem.

Ao empregar 50 % de capim-elefante pré-tratado e 50 % de farelo de trigo para a produção de endoglicanases (Figura 3B), observa-se claramente que as amostras pré-tratadas e lavadas após o processo favoreceram a produção dessas enzimas, sendo produzidas em maior quantidade nos 4º e 5º dias de cultivo em ambas as condições de pré-tratamento. As maiores atividades enzimáticas foram constatadas no 5º dia de cultivo para a condição a 200 °C / 6 min utilizando capim-elefante lavado após o pré-tratamento. Essa mesma condição de pré-tratamento proporcionou a obtenção de $169,47 \pm 10,33 \text{ UI.g}^{-1}$ já no 3º dia de cultivo (Figura 3B). No geral, quando utilizou-se 50 % de capim-elefante e 50 % de farelo de trigo, percebeu-se que, a partir do 3º dia de cultivo, a maioria das condições de pré-tratamento submetidas à lavagem apresentou valores superiores aos controles, enquanto que as amostras não lavadas apresentaram valores significativamente inferiores. Conclui-se que para endoglicanases, o processo de lavagem é essencial para a remoção de inibidores gerados no processo de pré-tratamento visto que as maiores atividades foram observadas somente para as amostras lavadas, mesmo quando o material pré-tratado foi misturado com farelo de trigo.

Em experimentos em CES com a linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum*, substituindo-se parte do bagaço de cana-de-açúcar por farelo de trigo, Camassola & Dillon (2010) alcançaram picos de atividades nos 4º e 5º dias para endoglicanase ($290,47 \pm 43,57$ e $276,84 \pm 15,47 \text{ UI.g}^{-1}$ de massa seca), respectivamente. Tais resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho onde para a maioria das enzimas a combinação de substratos possibilitou as maiores atividades enzimáticas. Delabona *et al.* (2012) também observaram incrementos nas atividades de endoglicanases com a combinação de substratos como a casca de laranja e o farelo de trigo de $18,42 \text{ UI.g}^{-1}$ para $32,92 \text{ UI.g}^{-1}$, apontando que o uso de farelo de trigo

associado a outros substratos é efetivo para a produção enzimática empregando *Aspergillus fumigatus*.

As maiores atividades de endoglicanases detectadas para o capim-elefante não tratado podem estar relacionadas com a composição desta biomassa, conforme relata Basso *et al.* (2014).

Na Figura 4 estão plotadas as atividades de β -glicosidases para cultivos realizados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (Figura 4A) e com 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (Figura 4B). Com relação ao emprego de 100 % (m/m) de biomassa pré-tratada, verificou-se que os controles formulados somente com capim-elefante não tratado e farelo de trigo foram consideravelmente superiores, com destaque para o farelo de trigo que obteve pico de atividade no 5º dia de cultivo ($118,92 \pm 0,00 \text{ UI.g}^{-1}$). Dentre as condições de pré-tratamento, observou-se que a condição a $190 \text{ }^\circ\text{C} / 6 \text{ min}$ obteve atividade de $26,54 \pm 2,19 \text{ UI.g}^{-1}$ (5º dia), ao passo que o controle com capim-elefante não tratado obteve atividade de $25,94 \pm 0,07 \text{ UI.g}^{-1}$ no 4º dia de cultivo.

Ao avaliar-se a produção de β -glicosidase a partir do emprego de 50 % de farelo de trigo e 50 % de capim-elefante pré-tratado (Figura 4B), observa-se novamente o efeito positivo da lavagem após o pré-tratamento por explosão a vapor, uma vez que essas amostras apresentaram incrementos nas atividades a partir do 3º dia de cultivo. A maior atividade de β -glicosidase ($148,90 \pm 0,00 \text{ UI.g}^{-1}$) foi obtida no 5º dia de cultivo para a amostra na condição a $180 \text{ }^\circ\text{C} / 6 \text{ min}$ e lavada após o processo. A detecção de maiores atividades enzimáticas ao final do cultivo corrobora os resultados obtidos por Vaheri *et al.* (1979), que relatam que as β -glicosidases são liberadas somente ao final do processo de produção enzimática, quando ocorre a lise celular, mas também podem ser referentes a enzimas secretadas que são expressas tardiamente.

Para os meios formulados com as associações de ambas as fontes de carbono (Figura 4B), verificou-se que para β -glicosidases todas as condições de pré-tratamento submetidas à lavagem foram superiores ao controle formulado somente com capim-elefante não tratado e por vezes ao controle com farelo de trigo. De acordo com Rezaei *et al.* (2011) compostos fenólicos apresentam efeito inibitório em *switchgrass* para o crescimento de *Acidothermus cellulolyticus*. Além disso, a presença de lignina na biomassa pode influenciar negativamente na produção de enzimas quando o material lignocelulósico é utilizado como fonte de carbono indutora (Jørgensen & Olsson, 2006).

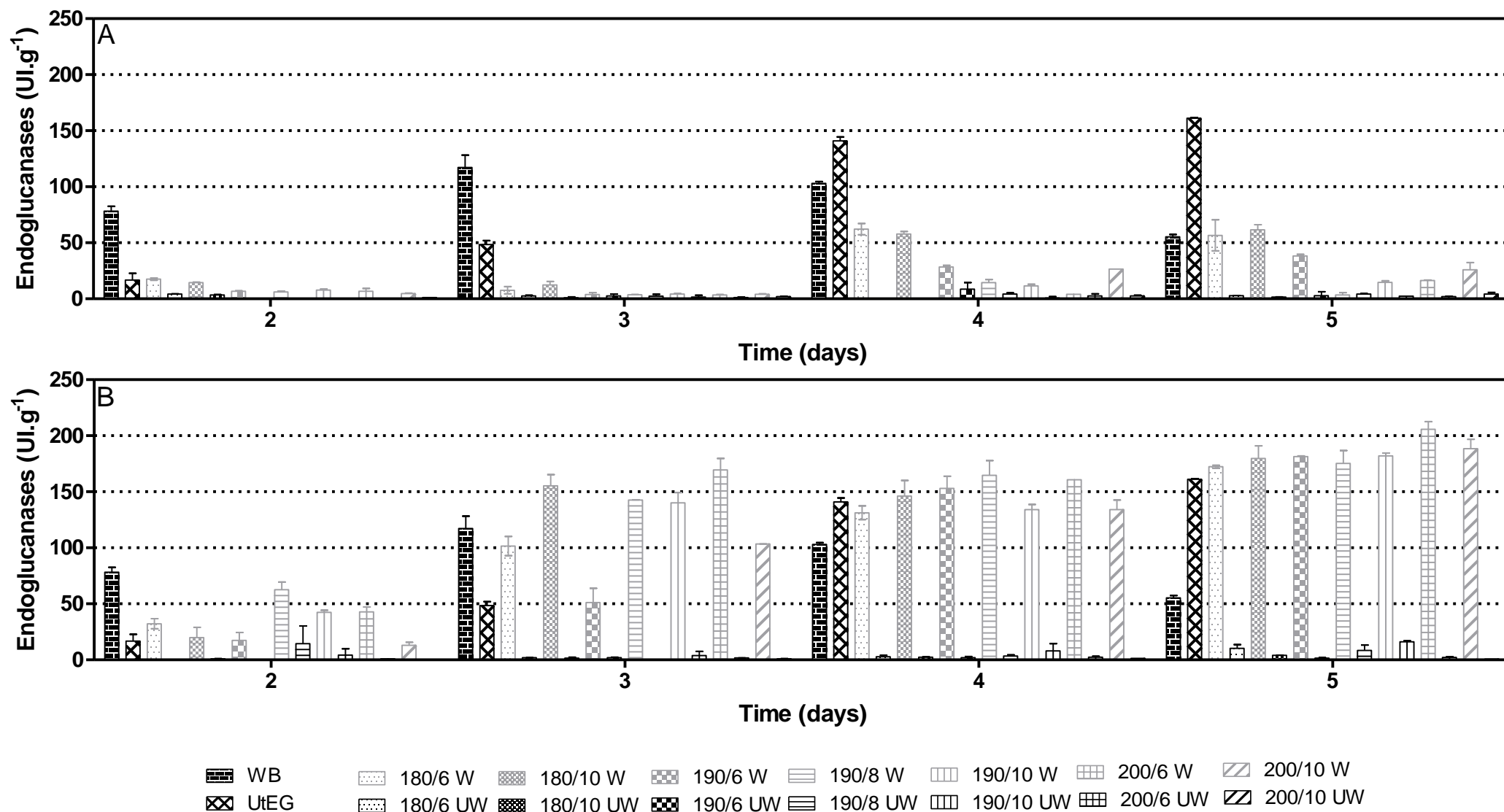


Figura 3. Atividade de endoglucanases de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura. As amostras de capim-elefante foram submetidas a pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (W) ou não submetidas à lavagem (UW). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

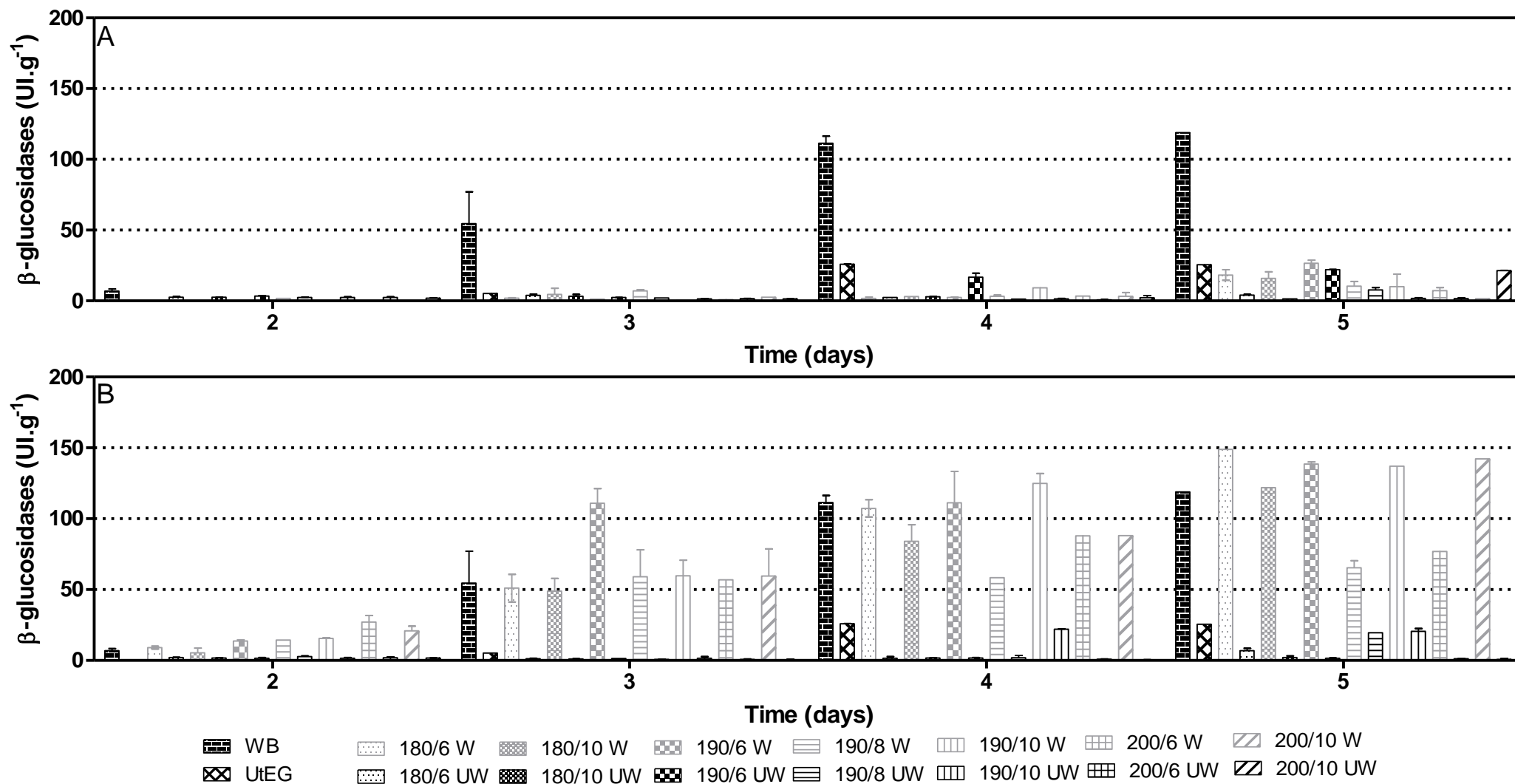


Figura 4. Atividade de β -glucosidases de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura. As amostras de capim-elefante foram submetidas a pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (W) ou não submetidas à lavagem (UW). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

Na Figura 5 estão apresentados os resultados de xilanases obtidos a partir da utilização de 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, lavado e não lavado após o processo (Figura 5A) e a partir de 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (lavado e não lavado) e 50 % (m/m) de farelo de trigo (Figura 5B) para a produção dessas enzimas.

Num aspecto geral, a formulação com 50 % (m/m) de cada fonte de carbono foi mais vantajosa para a produção de xilanases, assim como observado para as demais enzimas testadas. Ainda, os inibidores gerados no processo de pré-tratamento e, portanto, presentes nos meios de cultivo, não influenciaram tanto quanto para as outras enzimas avaliadas, visto que no geral as amostras lavadas e não lavadas não apresentaram diferenças expressivas de atividades enzimáticas, principalmente quando empregou-se 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (Figura 5A). Porém, nessa condição, nessa última formulação, pode ser evidenciado que as maiores atividades foram detectadas quando utilizou-se capim-elefante não tratado como substrato indutor, tendo pico de atividade no 5º dia ($505,95 \pm 39,23 \text{ UI.g}^{-1}$), seguido pelo pré-tratamento realizado a 200 °C por 10 min e não lavado após o processo ($428,76 \pm 52,94 \text{ UI.g}^{-1}$). Tratando-se da condição em que a biomassa foi lavada após o processo, verifica-se que a temperatura de 180 °C foi a que possibilitou atividades mais próximas ao controle com FT, no 5º dia, num tempo de 6 min, com $166,35 \pm 13,95 \text{ UI.g}^{-1}$.

Já para a produção de xilanases com 50 % (m/m) de cada substrato (Figura 5B) a condição de pré-tratamento que proporcionou a liberação dos maiores títulos enzimáticos foi 180 °C / 6 min, novamente quando a biomassa não foi submetida ao processo de lavagem e no 5º dia de cultivo ($571,74 \pm 27,14 \text{ UI.g}^{-1}$). Em estudos de produção de enzimas com a utilização de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, Camassola & Dillon (2007) obtiveram atividade de xilanases em torno de 10 UI.g^{-1} (massa seca) em cultivos com a linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum*, precursora da linhagem S1M29. Soni *et al.* (2010) também observaram incrementos nas atividades de xilanases (1722 UI.g^{-1} para 2782 UI.g^{-1}) a partir da combinação de palha e farelo de trigo com *Aspergillus fumigatus*. Pode-se relacionar as maiores atividades de xilanases nas condições de 200 °C / 10 min (Figura 5A), de 180 °C / 6 min (Figura 5B), e no controle formulado somente com capim-elefante não tratado com a composição dessas biomassas (Figura 1). A concentração de hemicelulose nessas amostras era superior as demais, sendo $12,40 \pm 0,34 \%$, $14,98 \pm 0,82 \%$ e $22,43 \pm 0,24 \%$ respectivamente, o que possivelmente levou à indução de maiores concentrações de xilanases.

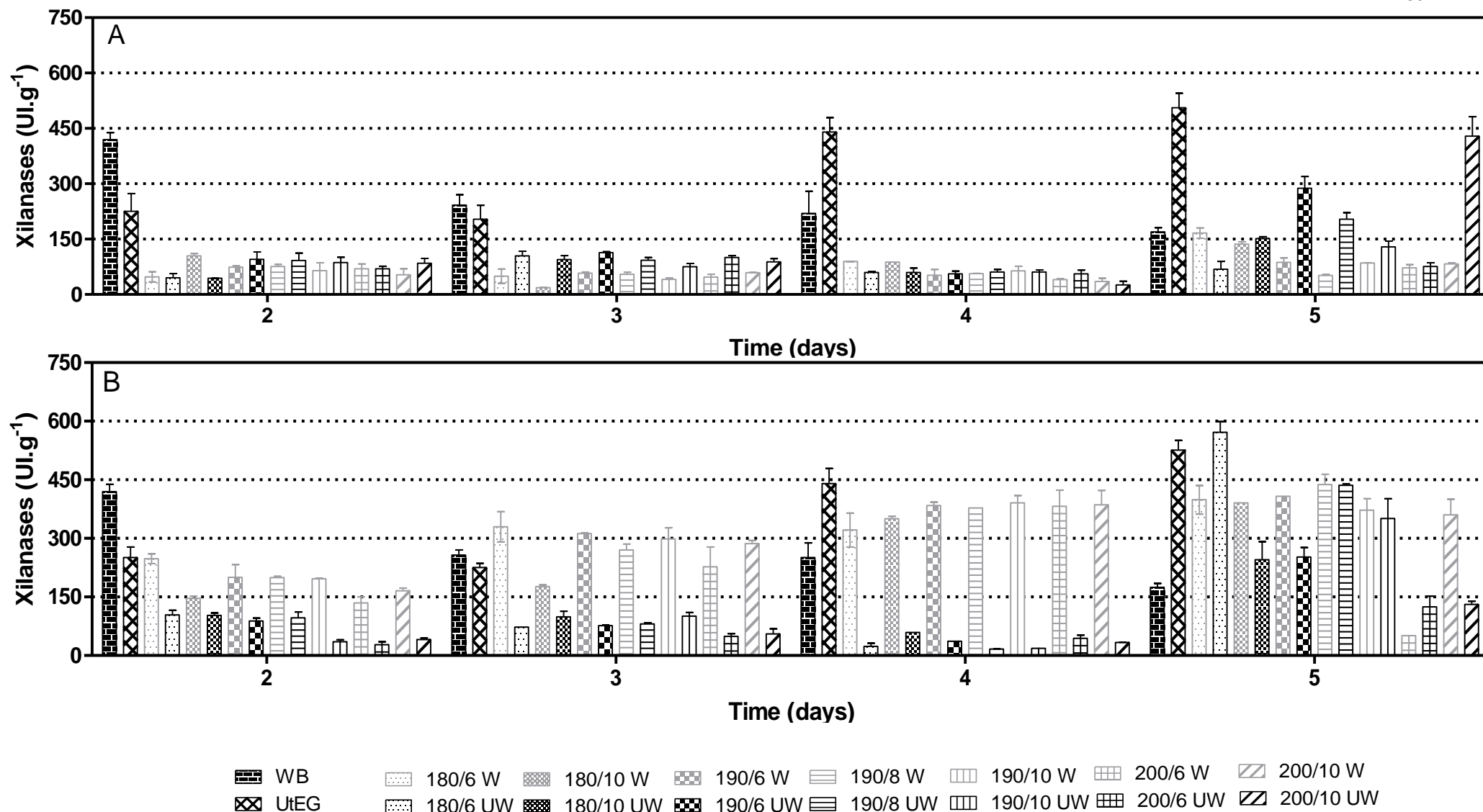


Figura 5. Atividade de xilanases de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando meios de cultivo formulados com 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (B) sob diferentes condições de tempo e de temperatura. As amostras de capim-elefante foram submetidas a pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (W) ou não submetidas à lavagem (UW). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

A Figura 6 contém os dados de concentração de proteínas solúveis detectadas nos ensaios dos cultivos em estado sólido com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor. Observou-se, de modo geral, que os controles formulados somente com farelo de trigo ou capim-elefante não tratado tiveram as maiores concentrações de proteínas no decorrer dos cinco dias de cultivo, obtendo pico de concentração no 5º dia, $168,44 \pm 3,90 \text{ mg.g}^{-1}$ e $161,04 \pm 2,10 \text{ mg.g}^{-1}$ respectivamente. Não foram observadas diferenças consideráveis entre a concentração de proteínas entre as amostras lavadas e não lavadas após o pré-tratamento por explosão a vapor.

Para os meios formulados com 100% (m/m) de biomassa pré-tratada (Figura 6 A-F), verificou-se que as concentrações de proteínas apresentaram um perfil semelhante em todos os dias de cultivo. Nota-se que, com capim-elefante pré-tratado e não lavado (Figura 6 D-F), tanto para 180 °C como para 190 °C, o tempo de 6 min foi o que proporcionou a mensuração das maiores concentrações de proteínas no 5º dia, sendo $105,22 \pm 1,08 \text{ mg.g}^{-1}$ para a menor temperatura e $101,60 \pm 2,41 \text{ mg.g}^{-1}$ para a temperatura intermediária.

Para os meios formulados com 50 % (m/m) de FT e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado, referente ao capim-elefante lavado (Figura 6 G-I) verifica-se que ambas as condições de temperatura obtiveram as maiores concentrações de proteínas no 3º dia de cultivo, sendo que os picos das concentrações foram evidenciados em 180 °C / 6 min ($100,62 \pm 1,41 \text{ UI.mL}^{-1}$), 190 °C / 8 min ($110,15 \pm 0,64 \text{ UI.mL}^{-1}$) e em 200 °C / 6 min ($104,73 \pm 2,00 \text{ UI.mL}^{-1}$), nesse mesmo dia. Para as amostras pré-tratadas e não lavadas (Figura 6 J-L), constatou-se que as concentrações de proteínas foram semelhantes aos controles quando comparadas às amostras lavadas, sendo que a maior liberação foi mensurada no 4º dia de cultivo, na condição 180 °C / 6 min ($117,83 \pm 3,19 \text{ UI.mL}^{-1}$). Esses dados indicam que o fungo produziu diferentes proteínas de acordo com a presença de inibidores nas amostras não lavadas em relação aos meios formulados com as amostras submetidas ao processo de lavagem após o pré-tratamento.

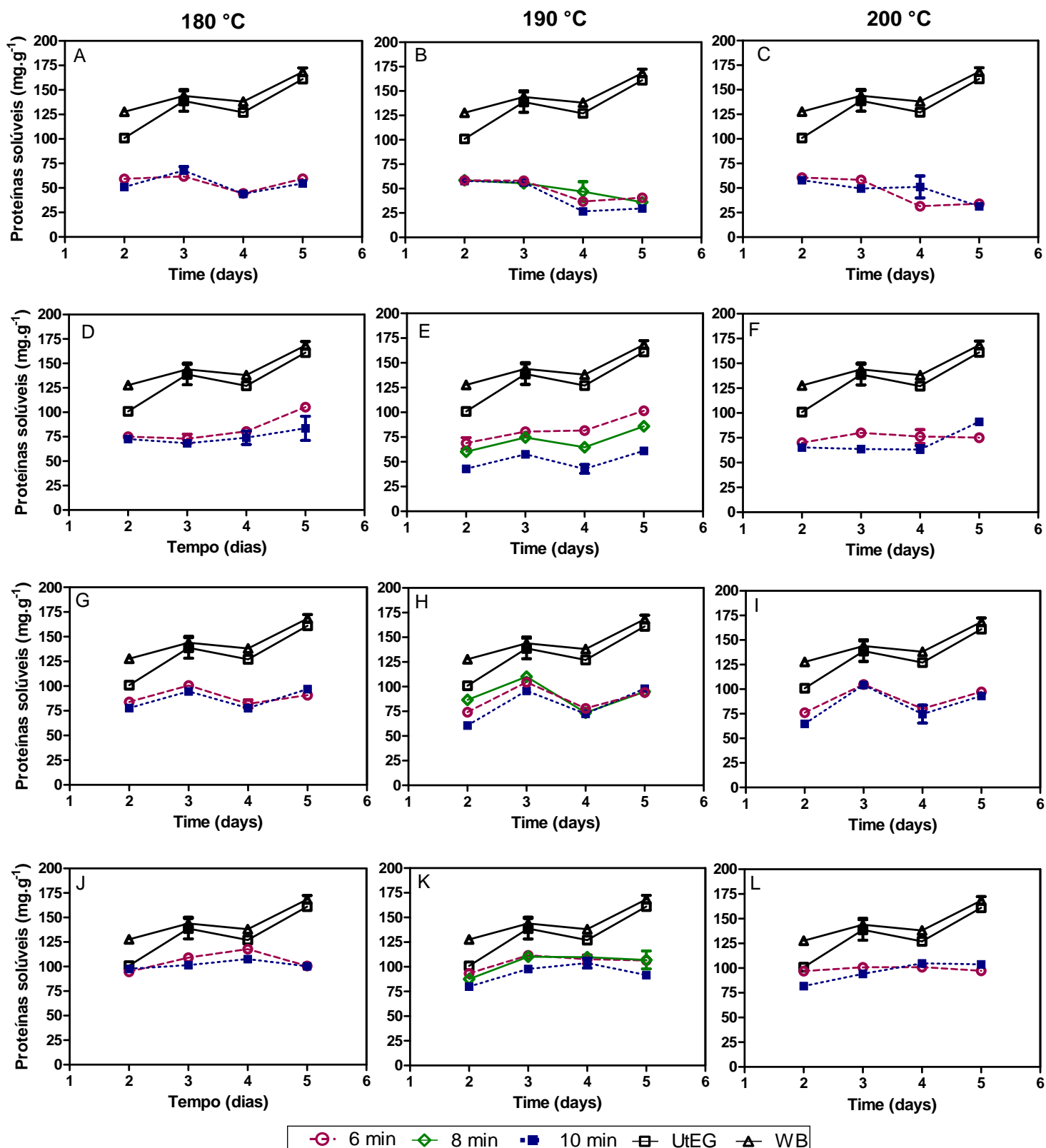


Figura 6. Concentração de proteínas solúveis detectada nos caldos enzimáticos de *Penicillium echinulatum* S1M29 obtidos em cultivo em estado sólido, utilizando 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A – F) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (G – L). As amostras de capim-elefante foram submetidas pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (A, B, C, G, H e I) ou não submetidas à lavagem (D, E, F, J, K e L). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

Referente à concentração de massa micelial das formulações com amostras de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (100 % m/m) e com a substituição de 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor por 50 % de farelo de trigo (m/m) (Figura 7), verificou-se que o controle com farelo de trigo registrou a maior concentração de massa micelial no cultivo quando comparado com o controle formulado com capim-elefante não tratado e com as amostras pré-tratadas sob diferentes condições. As amostras de capim-elefante pré-tratadas por explosão a vapor e submetidas à lavagem (Figura 7 A-C e G-I) apresentaram concentrações de massa micelial pouco superiores quando comparadas às amostras não lavadas (Figura 7 D-F e J-L).

Possíveis inibidores tais como furfural, HMF, ácido acético, presentes nos meios de cultivo podem ter influenciado no crescimento micelial, corroborando com as maiores atividades enzimáticas obtidas quando empregou-se amostras pré-tratadas e lavadas após o processo. Além disso, a substituição de 50 % (m/m) do capim-elefante pré-tratado por 50 % (m/m) de farelo de trigo mostrou-se favorável para a obtenção de maiores quantidades de micélio, porém sendo esses valores ainda inferiores aos obtidos para o controle formulado somente com farelo de trigo. Analisando os dados obtidos, não é possível relacionar diretamente o crescimento micelial com a produção enzimática nos diferentes dias de cultivo.

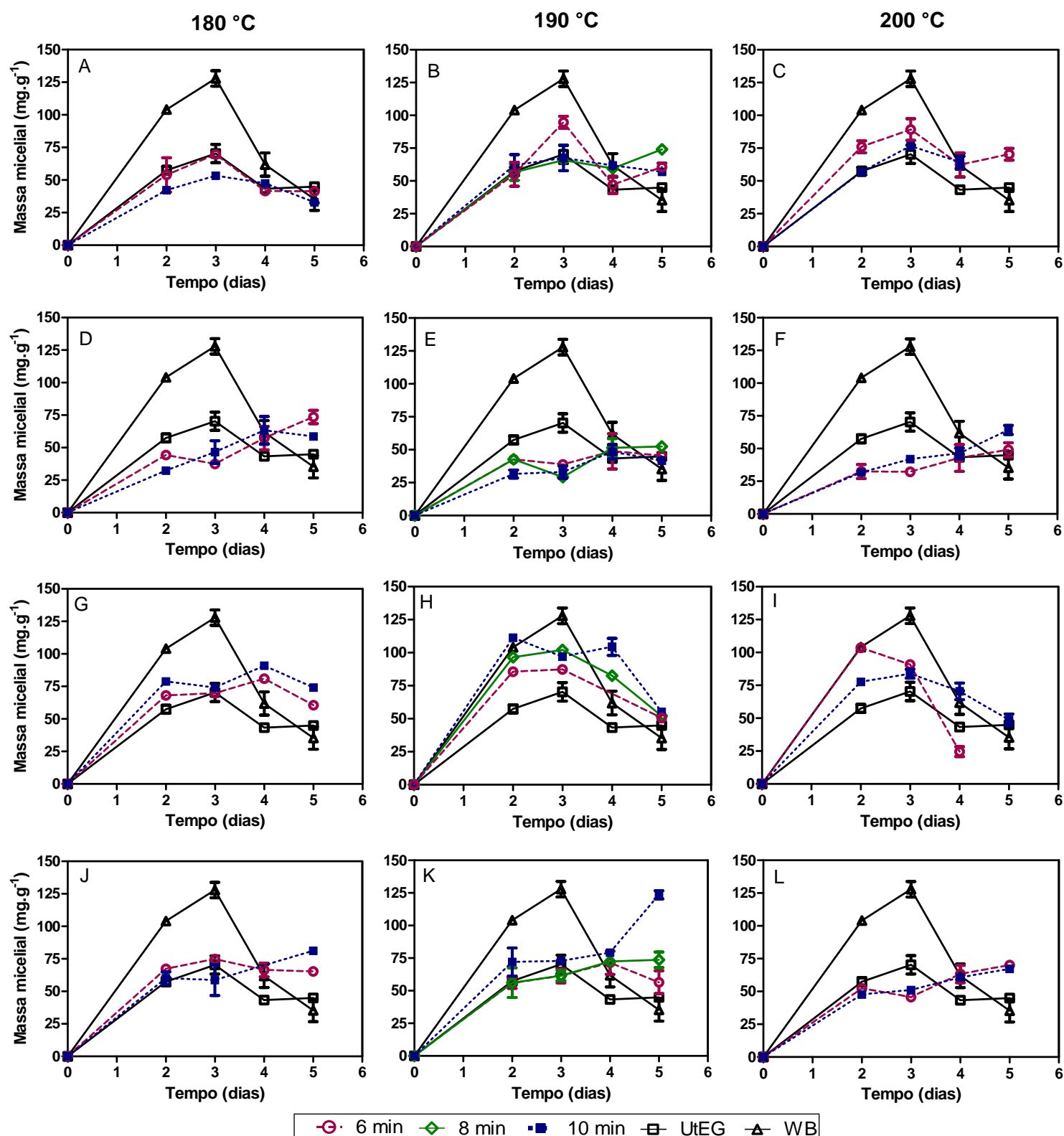


Figura 7. Estimativa do crescimento micelial de *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo em estado sólido, utilizando 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A – F) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (G – L). As amostras de capim-elefante foram submetidas a pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (A, B, C, G, H e I) ou não submetidas à lavagem (D, E, F, J, K e L). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

A Figura 8 apresenta as variações dos valores de pH dos caldos enzimáticos obtidos a partir dos cultivos em estado sólido utilizando capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, em comparação aos controles formulados somente com capim-elefante não tratado e farelo de trigo. Observa-se que o controle formulado com 100 % de farelo de trigo foi o que apresentou os maiores valores de pH, tendo após queda no 2º dia, um aumento gradual até o último dia de cultivo.

Para os meios formulados com 100 % de capim-elefante pré-tratado (Figura 8 A-F), verificou-se que ambas as condições de pré-tratamento resultaram em valores inferiores de pH quando comparadas aos controles, no entanto, apresentando pouca variação nos diferentes dias de cultivo para as amostras pré-tratadas e não lavadas (Figura 8 D-F). Já para as amostras pré-tratadas e lavadas, observou-se queda expressiva dos valores de pH no 2º ou 3º dias de cultivo, correlacionando-se com as maiores atividades enzimáticas obtidas quando as mesmas foram utilizadas para a formulação dos meios de cultivo.

Com relação às amostras formuladas com capim-elefante pré-tratado e farelo de trigo na proporção 50 % (m/m):50 % (m/m) (Figura 8 G-L), verificou-se que as amostras pré-tratadas e não lavadas (Figura 8 J-L) apresentaram pouca variação dos valores de pH, assim como observado para essa mesma condição, porém utilizando-se 100 % de biomassa. Já para as amostras lavadas (Figura 8 G-I), observou-se que as condições de pré-tratamento propiciaram valores semelhantes a ambos os controles, permanecendo na faixa intermediária entre os valores obtidos para farelo de trigo e para o capim-elefante não tratado. Dentre as condições de pré-tratamento, os maiores valores de pH foram detectados na condição a 180 °C (Figura 8G).

A detecção de uma fase ácida mais prolongada observada para a maioria das condições de cultivo indica um aumento do metabolismo celular do fungo. Segundo Sternberg & Dorval (1979), o metabolismo é paralelamente acompanhado pela utilização de NH_3 pela célula, resultando em liberação de H^+ no meio, tendo como consequência queda dos valores de pH.

Sugere-se, dessa forma, a associação do farelo de trigo com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a produção das enzimas desejadas e para diminuição do custo de produção das mesmas.

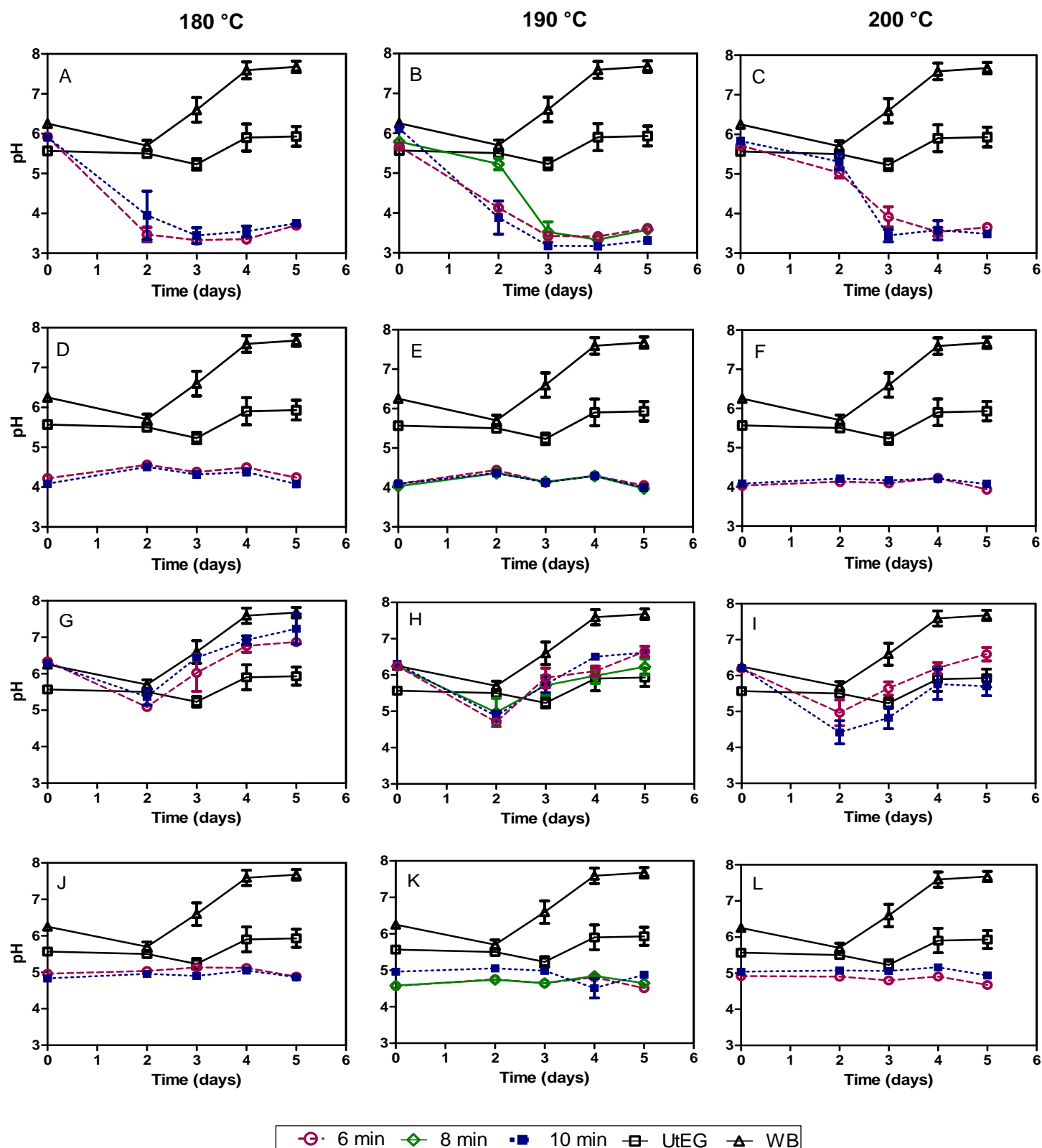


Figura 8. Variação do pH em cultivo em estado sólido, utilizando 100 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado (A – F) e 50 % (m/m) de capim-elefante pré-tratado e 50 % (m/m) de farelo de trigo (G – L). As amostras de capim-elefante foram submetidas a pré-tratamento por explosão a vapor e submetidas à lavagem (A, B, C, G, H e I) ou não submetidas à lavagem (D, E, F, J, K e L). Os cultivos controles estão representados por 100 % (m/m) de capim-elefante não tratado (UtEG) e por 100 % (m/m) de farelo de trigo (WB).

4 Conclusões

A partir dos dados obtidos neste trabalho, verificou-se que o capim-elefante não tratado por explosão a vapor tem potencial para a produção de FPA, endoglicanases e xilanases pelo fungo *P. echinulatum*, apresentando atividades superiores aos cultivos formulados com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor. O emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor para a produção de enzimas é eficiente se as amostras forem submetidas ao processo de lavagens após o pré-tratamento e se for suplementado com farelo de trigo. Os dados indicam a possibilidade de emprego de capim-elefante como matéria-prima para a produção de celulasas e xilanases em CES.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade de Caxias do Sul (UCS) para o apoio financeiro deste trabalho.

Referências bibliográficas

- Archana, A., Satyanarayana, T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 21: 12–17.
- Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23, 257-270.
- Basso, V., Machado, J., Ledo, F., Carneiro, J., Fontana R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M. (2014). Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrate for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. **Biomass Bioenerg.** 10.1016/j.biombioe.2014.10.011
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254.
- 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.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2010). Cellulases e xilanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162:1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by

- Penicilliumechinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **J. Appl. Microbiol.** 103:2196-2204.
- Cardona, E., Rios, J., Peña, J., Rios, Luis. (2014). Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel.** 118: 41–47.
- Daroit, D. J., Simonetti, A., Hertz, P. F., Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18(5):933-941.
- Delabona, P. da S., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldi, C. R., Rodrigues, A., Farinas, C. S. (2012). Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass Bioenerg.** 37: 243-250.
- 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.
- 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, 470-476.
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S. S., Bhattacharjee, A., Ghosh, S. (2008). Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 275-82.
- Dwivedi, P.; Alavalapati, J. R. R.; Lal, P. (2009). Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. **Energy for Sustainable Development.** 13: 174–182.
- Fujian, X., Hongzhang, C., Zuohu, L. (2002). Effect of periodically dynamic changes of air on cellulose production in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 45-8.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M. (2006). **Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.** 10:141-146.
- Jørgensen, H.; Olsson, L. (2006). Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* BT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme Microb. Tech.** 38: 381–390.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced

- by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Menegol, D., Scholl, A. L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M. (2014a). Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel.** 133: 232–240.
- Mo, H., Zhang, X. and Li, Z. (2004). Control of gas phase for enhanced cellulose production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochem.** 39: 1293-1297.
- 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.
- 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
- Oliveira, F. M. V; Pinheiro, I. O; Souto-Maior, A. M; Martin, C; Gonçalves, A. R; Rocha, G. J. M. (2013). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresour. Technol.** 130: 168–173.
- Petersen, M. Ø., Larsen, J., Thomsen, M. H. (2009). Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass Bioenerg.** 33: 834–840.
- Pitarelo, A. P., Silva, T. A., Peralta-Zamora, P. G., Ramos, L. P. (2012). Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Quím Nova.** 35(8), 1502-1509.
- Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím Nova.** 26: 863-871.
- Rezaei, F., Joh, L. D., Berry, A. M., Vanderghyest, J. S. (2011). Xylanase and cellulase production by *Acidothermus cellulolyticus* grown on switchgrass in solid-state fermentation. **Biofuels.** 2(1): 21-32.
- Rocha, G. J. M; Gonçalves, A. R; Oliveira, B. R; Oliveira, E. G; Rossell, C. E. V. (2012). Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Ind. Crop. Prod.** 35: 274– 279.
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y.V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic

- saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochem.** 40: 3693–3700.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. J. W. (2008). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. **Technical.** Report NREL/TP-510-42621.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. **Technical.** Report NREL/TP-510-42619.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. D. C. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical.** Report NREL/TP-510-42618.
- Soni, R., Nazir, A., Chandha, B. S. (2010). Optimization of cellulose production by a versatile *Aspergillus fumigatus* Fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solkaflor and bagasse. **Ind. Crop. Prod.** 31: 277-83.
- Sternberg, D., Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Vaheri, M. P., Vaheri, M. E. O., Kauppinen, V. S. (1979). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 8: 73-80.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.d.J., Díaz-Godínez, G., Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochem. Eng. J.** 13: 157-167.
- Woodard, K.R.; Prine, G.M. (1993). Dry matter accumulation of elephant grass, energy cane and elephant millet in a subtropical climate. **Crop. Science.** 33: 818–824.
- Xuan, J.; Leung, M.K.H.; Leung, D.Y.C.; Ni, M. (2009). A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. **Renew. Sust. Energy Rev.** 13: 1301-1013.

Hidrólise enzimática de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pré-tratado por explosão a vapor seguida de fermentação alcoólica

Angélica Luisi Scholl^a, Daiane Menegol^a, Ana Paula Pitarello^{b,c}, Roselei Claudete Fontana^a, Arion Zandoná Filho^b, Luiz Pereira Ramos^b, Aldo José Pinheiro Dillon^a, Marli Camassola^{a*}

^aUniversidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassa

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil

Telefone/Fax: +55 54 3218 2149

E-mail: mcamassola@gmail.com

^bUniversidade Federal do Paraná – Departamento de Química, Centro de Pesquisa em Química Aplicada

P. O. Box 19032 – Curitiba, PR, Brasil – CEP 81531-980

Tel: +55 41 3361 3175; Tel: +55 41 3361 3198

E-mail: luiz.ramos@ufpr.br

^cCentro de Tecnologia Canavieira (CTC), Fazenda Santo Antônio, 13400-907 Piracicaba, São Paulo, Brazil.

* Autor correspondente

Resumo

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma gramínea perene com alto potencial para a produção de etanol de segunda geração e que, após submetido a pré-tratamentos, como explosão a vapor, pode ser hidrolisado enzimaticamente para liberação de açúcares fermentescíveis. Neste trabalho avaliou-se a hidrólise enzimática de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor e a fermentação dos açúcares liberados para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. A maior liberação de açúcares redutores foi obtida a partir da hidrólise de capim-elefante pré-tratado 200 °C / 10 min, e não lavado após o pré-tratamento ($863,42 \pm 62,52 \text{ mg.g}^{-1}$). As maiores liberações de glicose foram obtidas para as amostras lavadas, pré-tratadas a 190 °C / 8 min ($243,29 \pm 6,19 \text{ mg.g}^{-1}$) e 10 min ($248,34 \pm 6,27 \text{ mg.g}^{-1}$) e a 200 °C / 10 min ($246,00 \pm 9,60 \text{ mg.g}^{-1}$), após 48h de hidrólise. Para etanol, as amostras lavadas pré-tratadas a 200 °C / 6 min possibilitaram as maiores produções, atingindo valores de 110,45 mL/kg de substrato pré-tratado, considerando-se a perda de massa no pré-

tratamento. Os dados obtidos indicam a necessidade de remoção de substâncias inibidoras formadas durante o pré-tratamento, por meio de lavagem aquosa para produção de etanol.

Palavras-chave: capim-elefante, hidrólise enzimática, pré-tratamento, fermentação alcoólica

1. Introdução

Biomassas lignocelulósicas são consideradas fontes de açúcares, produtos orgânicos e etanol (Singh *et al.*, 2009).

A utilização de biomassa lignocelulósica vem ganhando grande destaque como fonte para a produção de combustíveis, sendo essa considerada uma das principais alternativas para a diversificação energética e para a redução da utilização de combustíveis fósseis (CENBIO, 2001, Menegol *et al.*, 2014a,b).

Contudo, existem diversos gargalos para conversão de lignocelulósicos em etanol, um destes é a necessidade de uma etapa de pré-tratamento da biomassa (Liew *et al.*, 2014). Com esse processo ocorre alteração na estrutura do material, permitindo que a celulose fique mais acessível às enzimas que convertem os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (Mosier *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2012).

Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma espécie tropical com alta produtividade (45 t/ha/ano) quando comparado a outras espécies (Somerville *et al.*, 2010). Essa gramínea é plantada da mesma forma que a cana-de-açúcar, exigindo poucos nutrientes complementares para o seu crescimento (Osava, 2007). Portanto esse lignocelulósico poderia ser uma excelente matéria-prima a ser somada ao bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol, ou mesmo açúcares de alto valor agregado.

A fim de reduzir os custos da produção de etanol de segunda geração, o uso de biomassa lignocelulósica como o capim-elefante justifica-se já que essa é uma gramínea que apresenta metabolismo C4. Plantas C4 apresentam maior eficiência fotossintética, sendo, portanto, mais produtivas em termos de matéria seca (Valle, 2001).

Dentre os métodos de pré-tratamento disponíveis, explosão a vapor tem sido reconhecido como um dos mais eficazes (Ramos *et al.*, 1992; Ramos, 2000; Mosier *et al.*, 2005), apresentando-se como uma técnica promissora para o fracionamento e recuperação dos três principais componentes da parede celular vegetal (lignina, celulose e hemicelulose) com altos rendimentos (Brugnago *et al.*, 2011). Segundo Liw *et al.* (2014), a biomassa

lignocelulósica pode ser convertida em vários produtos após o processo de pré-tratamento, através de processos de conversão física, biológica e termoquímica.

Entre os complexos enzimáticos com potencial para serem utilizados para a hidrólise enzimática de lignocelulósicos encontram-se os produzidos por linhagens mutantes de *Penicillium echinulatum*, que secretam altos títulos de FPA (Dillon *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2013) apresentam uma maior relação entre β -glucosidase e FPA, comparativamente ao *T. reesei* (Martins *et al.*, 2005) e dispõem de FPA e β -glicosidases estáveis a 50 °C (Camassola *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes condições de tempos de residência e temperaturas de pré-tratamento por explosão de vapor para a hidrólise enzimática de capim-elefante, utilizando celulasas e xilanasas produzidas por *Penicillium echinulatum* S1M29, e posterior fermentação alcoólica dos açúcares liberados das amostras de capim-elefante por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1.

2 Material e métodos

2.1 Microrganismos

Para a produção de enzimas - celulasas e xilanasas foi utilizada a linhagem S1M29 obtida a partir da linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do IB/UCS.

Para os experimentos de fermentação das hexoses utilizou-se a linhagem CAT-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP, gentilmente doada pelo professor Luiz Humberto Gomes.

2.2 Crescimento e manutenção das linhagens

As culturas de *P. echinulatum* foram desenvolvidas em tubos de ensaio contendo o meio de crescimento conforme descrito por Dillon *et al.* (2006), incubadas por sete dias a 28 °C até a formação de conídios. Os tubos foram estocados a 4 °C, ou diretamente utilizados para a preparação de suspensões de conídios usadas nos ensaios para produção de enzimas.

A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi mantida em meio YEPD contendo, em g/L, os seguintes componentes: 5 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 10 g de glicose e 20 g de ágar.

2.3 Biomassa e pré-tratamento

As amostras de capim-elefante, obtidas na cidade de Nova Petrópolis-RS, Brasil (29°21'39.18''S e 51°02'53.88''O, 619 m acima do nível do mar), foram trituradas em triturador forrageiro Trapp® 70 obtendo-se granulometria entre 0,075 e 4,75 mm sendo posteriormente, desidratadas a 60 °C por três dias (Menegol *et al.*, 2014a). As amostras coletadas pertencem à variedade Cameron.

O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado na Universidade Federal do Paraná utilizando-se um reator de aço inox com capacidade para 10 L. Foram introduzidos ao reator 600 g de amostra de capim-elefante não tratado com 10 % de umidade (umidade natural), sendo empregadas diferentes condições de tempo e de temperaturas, conforme apresentado no planejamento experimental (Delineamento Composto Central), na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento fatorial 2², desenvolvido para identificar as condições mais adequadas de pré-tratamento por explosão a vapor para capim-elefante.

Variáveis			
Tempo (min)	Temperatura (°C)		
6 (-1)	180 (-1)		
8 (0)	190 (0)		
10 (+1)	200 (+1)		
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (kgf/cm ³)*
1	-1	-1	13
2	+1	-1	13
3	-1	+1	17
4	+1	+1	17
5	0	-1	17
6	0	+1	21
7	0	0	21

*A pressão atingida nos experimentos não foi utilizada no planejamento experimental, pois está associada à temperatura.

O balanço de massas foi realizado para determinar a eficiência de cada condição empregada no pré-tratamento a partir da diferença de massa das amostras, antes e depois do pré-tratamento, considerando-se a umidade de cada amostra.

Após o pré-tratamento, o material foi drenado e a fração sólida foi utilizada para a realização dos experimentos deste trabalho. Parte da fração sólida foi submetida a lavagem para a remoção de possíveis substâncias inibitórias para a produção de enzimas e para o processo fermentativo. Para a realização da lavagem empregou-se 5 % (m/v) da biomassa pré-tratada com água destilada a 600 rpm por 1 h. As amostras foram então filtradas em tecido de

poliéster, sendo que o excesso de líquido foi removido por filtração a vácuo. Em seguida, uma quantidade determinada (em torno de 1g) foi utilizada para determinar a umidade das amostras.

2.4 Produção de enzimas para a hidrólise

As enzimas – celulasas e xilanasas – foram produzidas em cultivos submersos. O meio de produção que foi empregado foi formulado com 10 % (v/v) de solução meio de sais (SM) (Mandels & Reese, 1957), 0,5 % (m/v) de farelo de trigo, 0,2 % (m/v) de farelo de soja, 0,05 % (m/v) de Prodex[®], 0,1 % (v/v) de Tween 80[®], 1 (m/v) % de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor sob temperatura de 190 °C / 8 min, não lavado após o processo de pré-tratamento e 90 mL de água destilada. A produção foi realizada em Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio. Inoculou-se os meios com suspensão de conídios de *P. echinulatum* S1M29 para obter a concentração final de 1×10^5 conídios.mL⁻¹. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca a 180 rpm, a 28 °C, por 5 dias. Após, o conteúdo foi centrifugado e a partir do caldo enzimático foi realizada a dosagem de celulasas, por meio da análise sobre papel filtro (FPA)*, conforme Ghose *et al.* (1987), com as modificações propostas por Camassola e Dillon (2012). As unidades de FPA foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por min (Miller, 1959).

*Para a escolha da condição de pré-tratamento mais adequada para a obtenção de enzimas para a hidrólise enzimática, optou-se por avaliar as atividades de FPA, visto que essa atividade expressa o conjunto das enzimas envolvidas na hidrólise enzimática.

2.5 Métodos Analíticos

2.5.1 Caracterização do capim-elefante

A caracterização da composição química do capim-elefante foi realizada conforme as metodologias propostas pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-TP-510-42618, NREL-TP-510-42619, NREL-TP-510-42621), com adaptações descritas por Menegol *et al.* (2014b). A fração líquida obtida após o processo de pré-tratamento e após o processo de lavagem da biomassa pré-tratada foi avaliada por HPLC, utilizando-se a coluna C18 e a coluna Aminex HPX-87H.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura (50 e 1000×) das amostras de capim-elefante foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCMAT) da Universidade de Caxias do Sul. Utilizou-se metodologia baseada no processo chamado *magnetron-sputtering* a plasma, mais conhecido como deposição física a vapor de ouro (PVD – *Physical Vapour Deposition*), utilizando um microscópio eletrônico de varredura, modelo Shimadzu Supercan SSX-550.

2.7 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com Menegol *et al.* (2014a), usando diferentes amostras de capim-elefante pré-tratadas por explosão a vapor (lavado e não lavado). Como controle utilizou-se capim-elefante não tratado, celulose Celuloflok[®] (Cotia, São Paulo, Brasil) e Avicel[®] PH101 Fluka (Buchs, Ireland). Foram determinadas as atividades do caldo enzimático que foi empregado na hidrólise e as hidrólises foram realizadas em triplicata. Foram empregadas concentrações enzimáticas de 10 FPU.g⁻¹ de capim-elefante e concentrações de substrato de 4 % (m/v).

Os açúcares redutores (AR) presentes nas soluções provenientes da hidrólise enzimática foram dosados pelo método de Miller (1959). Os açúcares das amostras de 24 e 48 h de hidrólise enzimática também foram avaliadas por HPLC, empregando coluna Aminex HPX-87H por detector por índice de refração, a 60 °C, H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ (fase móvel), fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

2.8 Fermentação

A fermentação alcoólica foi realizada com as amostras de 48 h de hidrólise enzimática em tubos de reação de 2mL, empregando-se a linhagem CAT-1 de *S. cerevisiae* na concentração de 1x10⁸ células viáveis por mL, suplementado com 50 µL de solução de Prodex[®] e (NH₄)₂SO₄, para obtenção de concentração final de 4 e 1 g/L de Prodex[®] e (NH₄)₂SO₄, respectivamente, por 24 h a 28 °C.

Coletas foram realizadas em diferentes intervalos para determinação de cinética de consumo dos açúcares e produção de etanol. Os açúcares liberados e a concentração de etanol foram analisados por HPLC, empregando coluna Aminex HPX-87H por detector por índice de refração, a 60 °C, H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹(fase móvel), fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

A concentração de inibidores (furfural e hiroximetilfurfural) do processo fermentativo produzidos durante o pré-tratamento da biomassa, foi analisada por HPLC, empregando coluna C18 por detector UV/Vis detector SPD-20A (Shimadzu), a 30 °C, 90 mL de ácido fórmico (0,1 %) e 10 mL de metanol e ácido fórmico (1 %) (fase móvel), fluxo de 0,5 mL/min.

3 Resultados e discussão

3.1 Balanço de massa

Deve-se levar em consideração que durante o processo de pré-tratamento, perdas de massa consideráveis ocorrem devido à remoção de hemicelulose, lignina ou até mesmo de parte da celulose, dependendo do tipo de pré-tratamento empregado e o tipo de biomassa. Na Tabela 2 pode ser verificado que a severidade do pré-tratamento influencia na porcentagem de perda de massa, sendo que quando comparados os diferentes tempos de residência da biomassa para uma mesma condição de temperatura, uma perda progressiva de material é observada de acordo o aumento do tempo. Os pré-tratamentos realizados a 180 °C / 6 min foram os que apresentaram as menores perdas de massa, correspondendo à condição mais branda (1,64 % para amostras não submetidas à lavagem e 1,66 % para amostras submetidas ao processo de lavagem após o pré-tratamento).

Tabela 2. Percentual de perda de massa das amostras de capim-elefante submetidas a diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor.

Pré-tratamento (°C/min)	Não lavado (NL)	Lavado (L)
Não tratado	-	-
180/6	1,64	1,66
180/10	7,50	7,62
190/6	14,81	15,01
190/8	18,91	19,00
190/10	28,93	28,97
200/6	20,73	20,78
200/10	23,16	23,20

L: Amostra lavada após o pré-tratamento

NL: Amostra não submetida à lavagem após o pré-tratamento

Especificamente para o processo de explosão a vapor, essas perdas estão associadas principalmente à degradação de hemicelulose majoritariamente, como visto para esse pré-tratamento quando aplicado para palhas de cevada e de cana-de-açúcar (Iroba *et al.*, 2014, Oliveira *et al.*, 2013), respectivamente. Esses dados são observados na Figura 1 onde verifica-se a redução dos percentuais de anidroxilose e anidroarabinose. Segundo Pitarelo *et al.* (2012), perdas na recuperação da biomassa e volatilização de subprodutos (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)), após e durante o pré-tratamento por explosão a vapor, são tendências justificadas pela combinação dos fatores tempo e temperatura nesse processo.

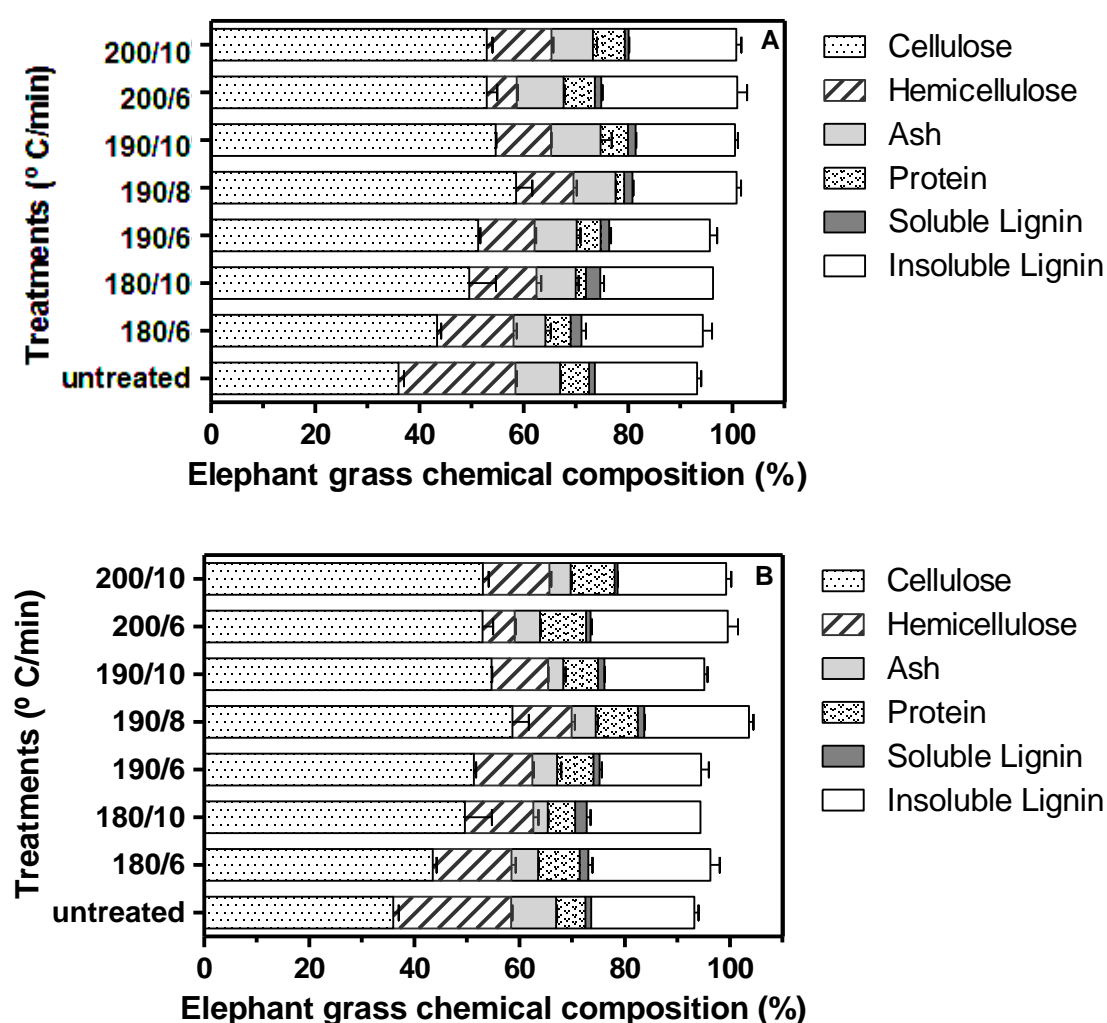


Figura 1. Composição química (%) das amostras de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor lavado após o pré-tratamento (A) e não lavado após o pré-tratamento (B).

3.2 Composição química da fração sólida de capim-elefante

A análise da Figura 1 permite constatar que o pré-tratamento por explosão a vapor altera as proporções dos componentes da fração sólida do capim-elefante, principalmente diminuindo a proporção de hemicelulose como visto anteriormente para o mesmo pré-tratamento realizado em *Eucalyptus grandis* por Emmel *et al.* (2003). A diminuição da fração de pentose é ainda aumentada quando o material foi lavado. A diminuição da fração hemicelulósica repercutiu em aumento da proporção de celulose (35,97 %), situação que pode ser observada também quando o material foi lavado. Essa informação corrobora o fato que a hemicelulose é mais afetada pelo pré-tratamento por explosão a vapor e por isso, explica as maiores concentrações desses açúcares nas condições com temperaturas mais amenas.

Segundo Liu *et al.* (2012), maiores níveis de conversão de celulose e hemicelulose são obtidos quando a biomassa é submetida a altas temperaturas e longos tempos de retenção de pré-tratamento.

Ainda a análise da Figura 1 permite verificar que a maior porcentagem de cinzas foi registrada nas amostras submetidas à lavagem, nas diferentes condições de tempo e temperatura testadas. A condição de pré-tratamento que obteve a maior concentração de cinzas foi a de 190 °C / 10 min (9,44 %), ao passo que a menor concentração foi registrada sob 180 °C / 10 min (2,77 %). O capim-elefante não tratado contém um teor de 8,53 % de cinzas em sua composição. O aumento do teor de cinzas decorrente do aumento da severidade do pré-tratamento por explosão a vapor poderia ser explicado pela presença de minerais associados diretamente ou indiretamente à lignina e à celulose.

Com relação aos dados de proteínas da Figura 1, o capim-elefante não tratado apresentou 5,55 % de teor de proteínas. As amostras não submetidas à lavagem (Figura 1A) apresentaram as maiores concentrações quando comparadas às amostras lavadas. O maior percentual (8,74 %) foi obtido na condição a 200 °C / 6 min (amostra não lavada) (Figura 1B), enquanto o menor teor (1,63 %) foi verificado com tratamento a 190 °C / 8 min (amostra lavada) (Figura 1A).

O conteúdo de lignina solúvel (Figura 1) foi inferior nas amostras não lavadas (Figura 1B) nas diferentes condições de pré-tratamento. Além disso, conforme aumentou-se a severidade das condições do processo físico, houve redução nos conteúdos de lignina solúvel. Segundo Menardo *et al.* (2013) o conteúdo de lignina é afetado pelo pré-tratamento por explosão a vapor, reduzindo conforme aumenta-se a severidade do mesmo. Os menores teores de lignina solúvel foram detectados na condição sob 200 °C / 10 min, tanto para a amostra lavada (0,73 %) (Figura 1A) como não lavada após o pré-tratamento (0,53 %) (Figura 1B).

Com relação ao teor de lignina insolúvel, observou-se que a maioria das amostras pré-tratadas obteve percentuais superiores ao capim-elefante não tratado (19,65 %), isto deve-se à perda de massa principalmente de hemicelulose, refletindo no aumento da proporção de lignina. Valores semelhantes aos obtidos neste trabalho também foram obtidos por del-Río *et al.* (2012) que analisaram separadamente a composição química do córtex e da medula de capim-elefante não tratado, observando que os conteúdos de lignina solúvel variavam entre 1,5 % e 1,6 % no córtex e na medula respectivamente, enquanto os teores de lignina insolúvel variavam entre 18,5 % (córtex) e 15,5 % (medula) na amostra não tratada. Dentre as diferentes condições de processo, as amostras pré-tratadas na temperatura intermediária (190 °C) em diferentes tempos de residência (6, 8 e 10 min) obtiveram os menores teores de lignina insolúvel quando comparadas as demais condições.

Incrementos nas concentrações de celulose em outras biomassas também foram verificados por outros autores que empregaram pré-tratamento por explosão a vapor. Brugnago *et al.* (2011) caracterizaram o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor a 203 °C / 3 min (impregnado com 0,3 mol L⁻¹ de H₃PO₄) e obtiveram 38,8 % de celulose, 24,1 % de lignina, 27,6 % de hemicelulose e 3,80 % de teor de cinzas. Zheng *et al.* (2014) caracterizaram a composição de carboidratos do sabugo de milho pré-tratado por explosão a vapor a 205 °C / 5 min, observando 55,4 % de glicose, 22,8 % de xilose, 2,4 % de arabinose, 0,6 % de galactose e 0,3 % de manose.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Além da influência da severidade do pré-tratamento sobre as perdas de massa e sobre a composição química do capim-elefante, alterações também podem ser observadas na estrutura física da biomassa pré-tratada por explosão a vapor. A Figura 2 apresenta uma comparação morfológica do capim-elefante pré-tratado e não tratado, por microscopia eletrônica de varredura. Verifica-se que as amostras pré-tratadas nas temperaturas mais elevadas sofreram maiores fragmentações das amostras. Essas mudanças estruturais nas amostras pré-tratadas podem favorecer a exposição da celulose. Além disso, a modificação do lignocelulósico pode estar diretamente relacionada com as perdas de massa (Tabela 2). Uma vez que o tamanho da partícula da biomassa diminui conforme o aumento da temperatura e o tempo de processo, diversas substâncias podem ser perdidas e detectadas na fração líquida do pré-tratamento, como observado nesse trabalho. Observou-se que as concentrações de xilose e arabinose aumentaram de acordo com o aumento da temperatura e do tempo de residência (Tabela 3A).

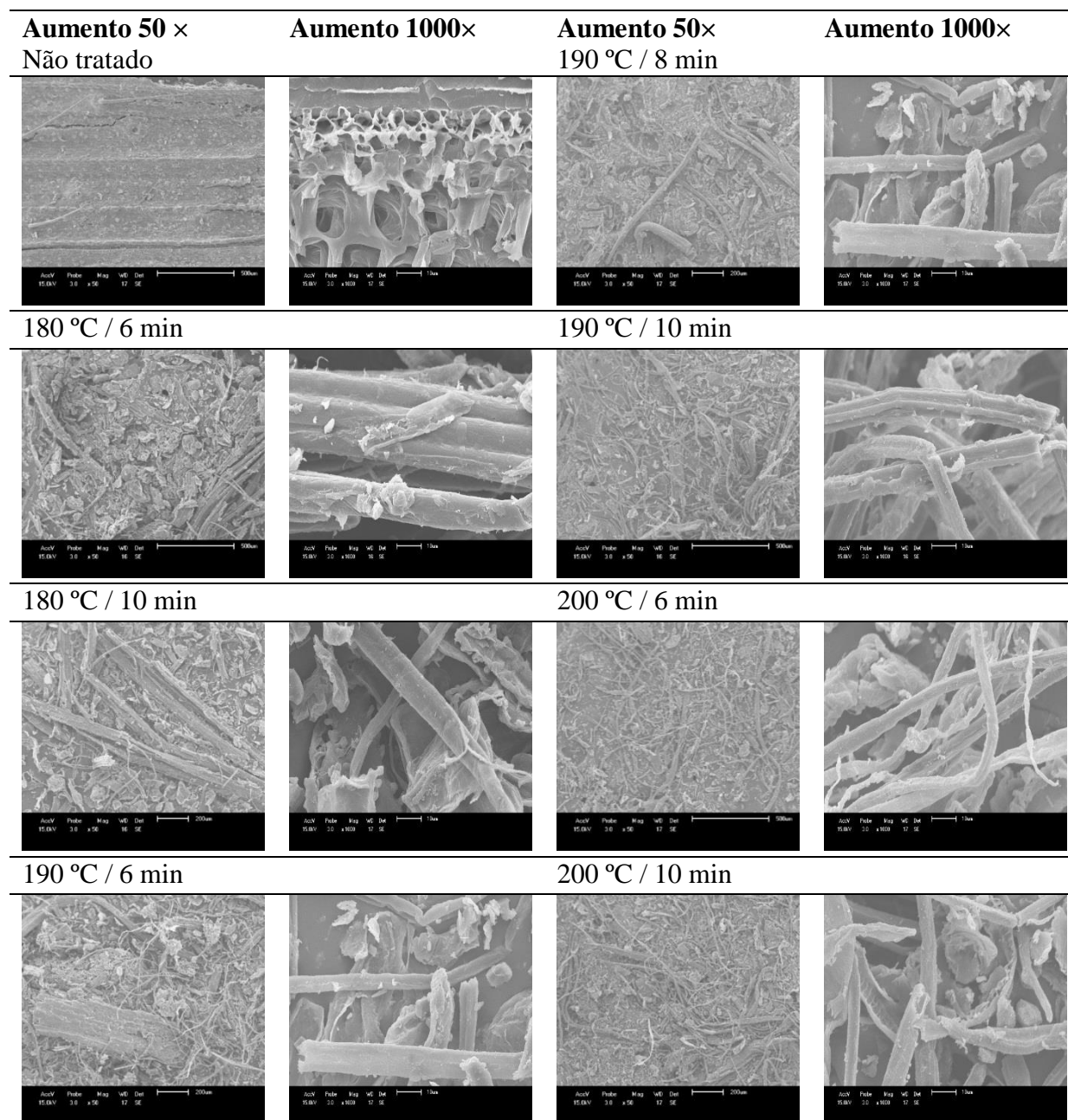


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura ($\times 50$ e $\times 1000$) de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor em diferentes condições de tempo e temperatura.

Tabela 3. Substâncias detectadas* no líquido obtido após o pré-tratamento por explosão a vapor (A) e na água de lavagem (B) das amostras de capim-elefante, em diferentes condições de tempo de residência e temperatura.

	Pré-tratamento (°C/min)	Substâncias detectadas (g/L)							
		Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Glicerol	Ácido Acético	HMF	Furfural
A	180/6	n.d.	0,43±0,00	1,04±0,00	0,29±0,00	0,04±0,00	0,57±0,00	0,05±0,01	0,03±0,00
	180/10	0,86±0,00	1,49±0,00	4,54±0,00	0,83±0,00	0,66±0,05	3,90±0,02	0,22±0,03	0,18±0,01
	190/6	0,93±0,13	1,70±0,15	5,99±0,66	0,80±0,10	1,06±0,14	7,58±0,38	0,37±0,05	0,44±0,05
	190/8	0,62±0,11	1,36±0,23	5,07±0,76	0,94±0,06	0,80±0,02	5,40±1,92	0,32±0,12	0,44±0,12
	190/10	0,68±0,19	1,40±0,36	5,14±0,92	0,61±0,29	0,54±0,58	5,59±3,21	0,21±0,04	0,40±0,06
	200/6	n.d.	1,62±0,06	5,68±0,18	0,81±0,03	0,93±0,01	7,75±0,46	0,47±0,02	0,45±0,01
	200/10	n.d.	1,27±0,00	4,40±0,04	0,65±0,02	0,70±0,02	5,67±0,13	0,34±0,01	0,38±0,01
B	180/6	n.d.	0,11±0,00	0,22±0,01	0,15±0,02	0,02±0,01	0,00±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
	180/10	n.d.	0,07±0,00	0,07±0,03	0,07±0,02	0,02±0,00	0,01±0,01	0,01±0,00	0,02±0,00
	190/6	n.d.	0,08±0,00	0,28±0,01	0,06±0,00	0,01±0,00	0,14±0,01	0,02±0,00	0,03±0,01
	190/8	n.d.	0,08±0,00	0,24±0,01	0,05±0,00	0,01±0,00	0,09±0,01	0,02±0,00	0,05±0,01
	190/10	n.d.	0,07±0,00	0,05±0,02	0,05±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,04±0,00
	200/6	n.d.	0,08±0,00	0,24±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,11±0,00	0,02±0,00	0,05±0,00
	200/10	0,03±0,02	0,07±0,00	0,04±0,01	0,04±0,00	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,00

*Detectadas com as colunas HPX87H e C18 (HMF e furfural)

3.4 Caracterização da fração líquida do pré-tratamento

Para o pré-tratamento a 180 °C / 6 min observou-se menores concentrações de xilose e de arabinose na fração líquida obtida a partir do processo de pré-tratamento. Essa menor extração de pentoses é explicável, pois esta condição causou menor impacto na composição da biomassa, mantendo-se mais semelhante ao capim-elefante não tratado (Figura 1). Para as demais condições, observa-se um aumento na concentração de xilose e arabinose na fração líquida obtida a partir do pré-tratamento com relação à condição mais amena (Tabela 3A). Ainda pode ser verificado que a maior proporção de perda de açúcares foi detectada no líquido do pré-tratamento já que após o processo de lavagem, menores concentrações desses compostos foram detectadas no líquido obtido após a lavagem (Tabela 3B). Para a glicose, especificamente, observaram-se perdas, porém em menor proporção do que a xilose, visto que a celulose permaneceu na fração sólida da biomassa, como pode ser observado na Figura 1.

Compostos inibitórios que são gerados durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor, como o ácido fórmico, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural, podem ser tóxicos para os microrganismos e causar efeitos negativos sobre os posteriores processos de hidrólise e fermentação (Lu *et al.*, 2010). Nota-se que menores concentrações desses inibidores foram detectadas nas amostras pré-tratadas por 180 °C, enquanto que quando aumentou-se a temperatura para 190 e 200 °C, maiores concentrações de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural foram detectadas (Tabela 3A). De acordo com Palmqvist & Hahn-Hägerdal (2000), quando altas condições de temperatura e pressão são utilizadas no pré-tratamento, a xilose e a glicose podem ser degradadas respectivamente em furfural e HMF, que irão ser degradados também, posteriormente, em ácido fórmico e levulínico. Pode-se observar que a maior parte desses compostos formados foram perdidos no líquido do pré-tratamento (Tabela 3A), e em menor proporção no líquido obtido na água de lavagem (Tabela 3B), não ficando, em sua maioria, retidos na fração sólida da biomassa.

3.5 Hidrólise enzimática e fermentação

Na Figura 3, são apresentados e discutidos os dados de concentração de AR obtidos a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão a vapor, lavado (Figura 3A a C) ou não lavado (Figura 3D a F) após o processo de pré-tratamento. Os controles foram realizados com capim-elefante não tratado. Também avaliou-se a capacidade da mesma solução enzimática sobre celulose e Avicel[®].

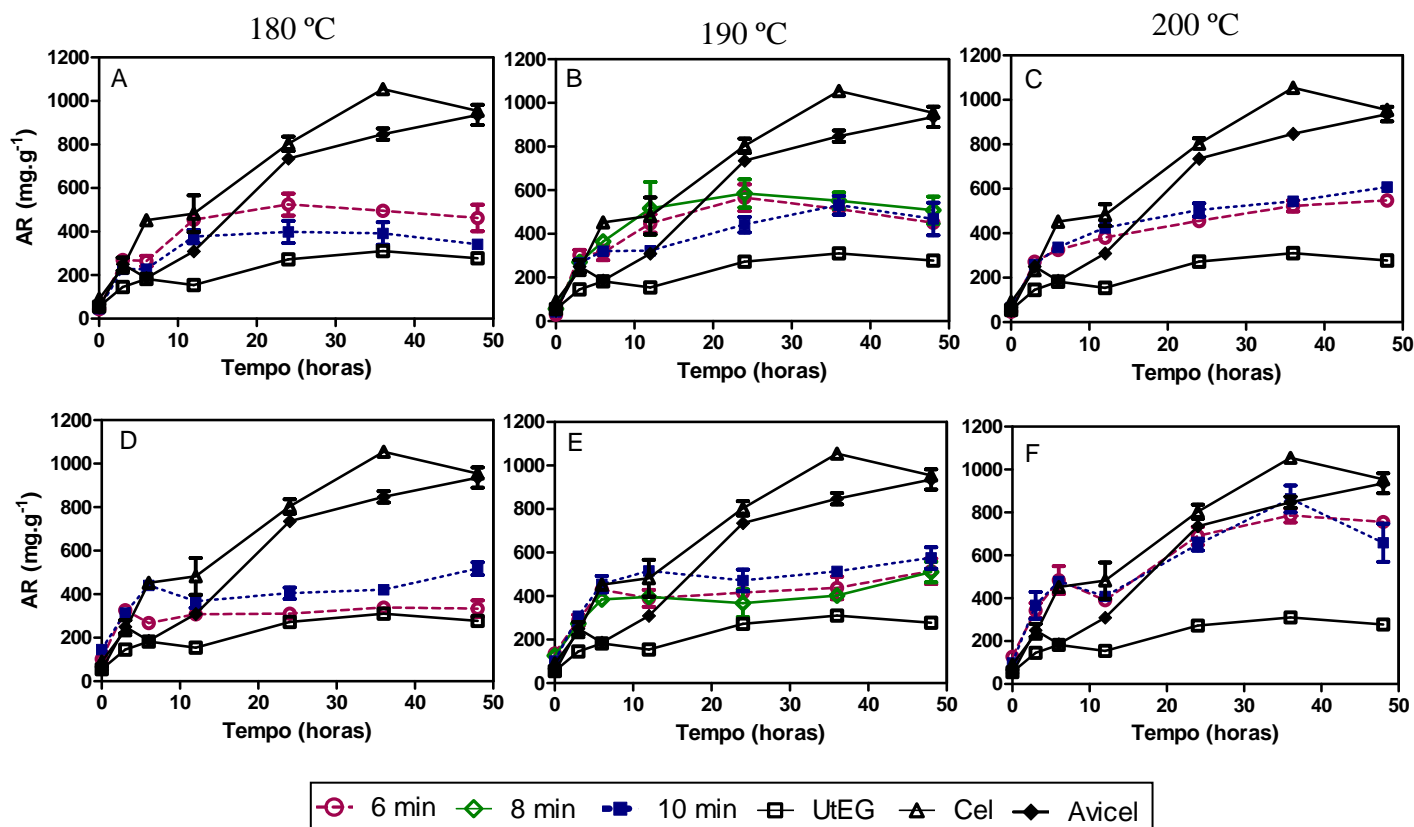


Figura 3: Concentração (mg.g^{-1}) de açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática de celulose, Avicel, capim-elefante não tratado e pré-tratado por explosão, lavado (A a C) e não lavado (D a F), sob diferentes condições de tempo e temperatura, utilizando 4 % de substrato e 10 FPU.g^{-1} de substrato.

As hidrólises contendo material pré-tratado por explosão a vapor que foi lavado (Figura 3A a C) ou não lavado (Figura 3D a F) liberaram maiores concentrações de açúcares redutores (AR) em relação ao capim-elefante não tratado, porém valores inferiores às liberadas nas hidrólises de celulose e Avicel[®] – substratos compostos basicamente por celulose. A hidrólise com celulose apresentou pico de liberação de AR em 36 h, com $1054,82 \pm 16,11 \text{ mg.g}^{-1}$ (massa seca). A hidrólise de Avicel[®] atingiu a maior liberação de AR somente no final da hidrólise (48 h), chegando a $935,96 \pm 46,33 \text{ mg.g}^{-1}$ (massa seca). Como esperado o capim-elefante não tratado, a partir de 12 h de hidrólise, apresentou liberações de AR inferiores às demais hidrólises, atingindo maior concentração de AR em 36 h ($310,10 \pm 3,12 \text{ mg.g}^{-1}$ massa seca).

Com relação às hidrólises utilizando substratos obtidos nas diferentes condições de pré-tratamentos, verifica-se que apresentaram um perfil semelhante de liberação de AR, tanto para as amostras lavadas (Figura 3A a C) como para as amostras não lavadas (Figura 3D a F). A hidrólise de amostras pré-tratadas por 200 °C e não lavada (Figura 3F) liberaram em 36 h

valores de AR de $863,42 \pm 62,52 \text{ mg.g}^{-1}$ para tratamento $200 \text{ }^\circ\text{C} / 10 \text{ min}$ (Figura 3F) e $785,73 \pm 31,81 \text{ mg.g}^{-1}$ para $200 \text{ }^\circ\text{C} / 6 \text{ min}$ (Figura 3F), próximos aos valores da hidrólise de celulose e Avicel[®]. De forma geral, constatou-se que o pré-tratamento, de fato, favoreceu a liberação de AR durante a hidrólise enzimática a partir de modificações estruturais da biomassa (Figura 2) e modificações de sua composição química (Figura 1), uma vez que o pré-tratamento torna a biomassa mais acessível ao ataque das enzimas. Menegol *et al.* (2014b) utilizando capim-elefante pré-tratado com NaOH 2 % (m/v) e com uso de Triton X-100 obtiveram $717,02 \pm 5,70 \text{ mg.g}^{-1}$ de AR, após 8 h de hidrólise enzimática.

Na Tabela 4, são apresentadas as substâncias detectadas por HPLC e na Figura 4 pode-se observar a liberação de glicose e xilose, especificamente. As amostras de celulose e Avicel[®] apresentaram liberações superiores ao controle com capim-elefante não tratado e também às amostras pré-tratadas nas diferentes condições testadas (Figura 4). Menegol *et al.* (2014a) verificaram durante a hidrólise de capim-elefante não tratado, uma liberação máxima de $127,80 \pm 2,17 \text{ mg.g}^{-1}$ de glicose e para a melhor condição de pré-tratamento (NaOH 3 % m/v) foi obtida a concentração de $504,52 \pm 26,66 \text{ mg.g}^{-1}$ de glicose, ambos em 48 h de hidrólise e utilizando-se carga enzimática de 15 FPU.g^{-1} . Já nesse trabalho, as maiores liberações de glicose ocorreram para a condição de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor a $190^\circ / 10 \text{ min}$ em 48 h de hidrólise ($248,34 \pm 6,27 \text{ mg.g}^{-1}$), utilizando carga enzimática de 10 FPU.g^{-1} . Na hidrólise de Avicel[®] não foi detectada a presença de xilose (Figura 4B), ao contrário do que foi observado para a hidrólise de celulose. Com relação aos pré-tratamentos, verificou-se que, de modo geral, as amostras submetidas à lavagem apresentaram concentrações de glicose semelhantes ou superiores às amostras não lavadas (Figura 4A), enquanto que para xilose, foi observado um perfil inverso, onde as maiores concentrações de xilose foram detectadas nas amostras não submetidas à lavagem. Isso pode ser devido ao fato de que a xilose foi removida durante o processo de lavagem em maior proporção do que a glicose (Tabela 3B).

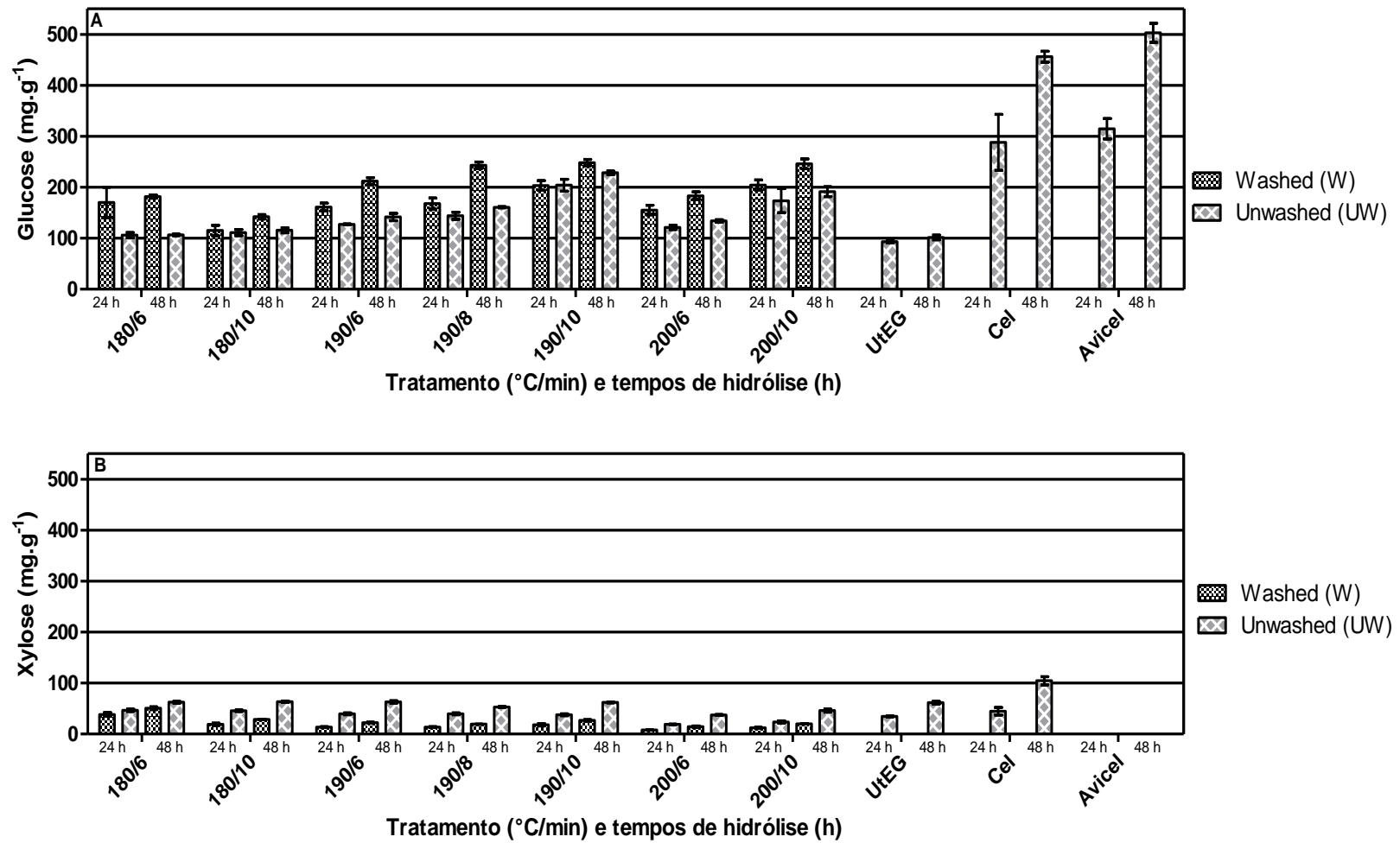


Figura 4. Concentração (mg.g^{-1}) de glicose (A) e xilose (B) liberadas a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante não tratado, pré-tratado por explosão a vapor, celulose e Avicel[®], em 24 e 48h de processo, para amostras lavadas (L) e não lavadas (NL).

Avaliando-se as liberações de glicose nas amostras pré-tratadas por explosão a vapor, observou-se que para a condição de capim-elefante não lavado, as maiores liberações foram observadas para a condição a 190 °C / 10 min ($228,31 \pm 3,32 \text{ mg.g}^{-1}$) e para as amostras lavadas, as maiores concentrações de glicose foram detectadas nas condições de 190 °C / 8 e 190 °C / 10 min ($243,29 \pm 6,19 \text{ mg.g}^{-1}$ e $248,34 \pm 6,27 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente) e 200 °C / 10 min ($246,00 \pm 9,60 \text{ mg.g}^{-1}$), em 48 h de hidrólise. A partir da liberação de glicose na hidrólise de palha de milho pré-tratada por explosão a vapor, Lu *et al.* (2010) verificaram que a maior liberação desse açúcar ocorreu em 96 h de processo ($103,3 \text{ g.L}^{-1}$ com 30 % de concentração de substrato), quando utilizou-se a palha pré-tratada e lavada, enquanto que para a amostra não lavada obteve-se $85,1 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração de glicose.

As concentrações de possíveis inibidores detectados no processo de hidrólise em 48h, tanto para as amostras lavadas como não lavadas estão apresentados na Tabela 4. As concentrações de HMF foram avaliadas a partir dos controles e das amostras pré-tratadas (lavadas e não lavadas). Observou-se que as amostras não lavadas apresentaram as maiores concentrações desse composto quando comparadas às amostras lavadas, sendo que a maioria das condições de pré-tratamento tiveram a presença dessa substância nos dois tempos avaliados, exceto para a condição a 190 °C / 10 min. Somente no controle com capim-elefante não tratado não foi detectada a presença de HMF, em 48 h. Já para as concentrações de furfural nas amostras lavadas e não lavadas, em 48h de hidrólise, observou-se que esse inibidor não foi detectado nas condições controle, bem como as amostras das condições de 180 °C / 6 e 180 °C / 10 min. Nas condições de temperatura a 190 °C e 200 °C, a concentração de furfural foi superior nas amostras não submetidas à lavagem. Somente as condições a 190 °C / 6 e 190 °C / 8 min apresentaram concentrações de furfural em ambas as amostras (lavada e não lavada), em 48h de hidrólise enzimática. Ewanick & Bura (2011) também observaram em seu estudo baixas concentrações de HMF e furfural em amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas por explosão a vapor e justificaram os baixos níveis desses compostos devido à mínima degradação de açúcares durante o processo de pré-tratamento, o que reduziria a inibição microbiana e aumentaria os rendimentos de etanol.

Tabela 4. Substâncias detectadas (g/L) a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante não tratado, pré-tratado por explosão a vapor, celulose e Avicel®.

Treatments (°C/min)	T (h)		Celobiose	Arabinose	Xilitol	Glicerol	Ác. Ac	HMF	Furfural
180/6	24	L	n.d.	0,08± 0,01	n.d.	0,02± 0,00	0,07± 0,01	-	-
		NL	n.d.	0,41 ± 0,15	n.d.	0,06 ± 0,00	0,46 ± 0,04	-	-
	48	L	0,14± 0,06	0,07± 0,00	n.d.	0,10± 0,13	0,09± 0,01	0,00 ± 0,00	n.d.
		NL	n.d.	0,51 ± 0,03	n.d.	0,04 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,00 ± 0,00	n.d.
180/10	24	L	0,23± 0,02	0,05± 0,00	n.d.	0,01± 0,00	n.d.	-	-
		NL	0,31 ± 0,02	0,10 ± 0,00	n.d.	0,03 ± 0,00	0,52 ± 0,01	-	-
	48	L	n.d.	0,04± 0,00	n.d.	0,02± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	n.d.
		NL	0,26 ± 0,01	0,55 ± 0,01	n.d.	0,15 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,04 ± 0,00	n.d.
190/6	24	L	0,55± 0,02	0,25± 0,02	n.d.	0,02± 0,00	n.d.	-	-
		NL	0,25 ± 0,07	0,07 ± 0,00	n.d.	0,04 ± 0,01	0,77 ± 0,0	-	-
	48	L	0,27 ± 0,09	n.d.	0,01± 0,01	0,02± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		NL	0,47 ± 0,07	0,59 ± 0,12	n.d.	0,05 ± 0,03	0,92 ± 0,3	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01
190/8	24	L	0,55± 0,11	0,25± 0,02	n.d.	0,02± 0,00	n.d.	-	-
		NL	0,43 ± 0,11	0,13 ± 0,06	n.d.	0,06 ± 0,02	0,59 ± 0,06	-	-
	48	L	0,31± 0,16	n.d.	0,09 ± 0,16	0,03± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
		NL	0,23 ± 0,01	0,52 ± 0,03	n.d.	0,05 ± 0,01	0,76 ± 0,18	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,01
190/10	24	L	0,57± 0,02	0,30± 0,04	n.d.	0,01± 0,00	n.d.	-	-
		NL	0,51 ± 0,03	0,07 ± 0,00	n.d.	0,07 ± 0,00	0,35 ± 0,02	-	-
	48	L	0,34± 0,01	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.
		NL	0,54 ± 0,02	0,48 ± 0,01	n.d.	0,05 ± 0,00	0,51 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,01
200/6	24	L	0,67± 0,06	0,26± 0,08	n.d.	0,02± 0,00	n.d.	-	-
		NL	0,38 ± 0,03	0,14 ± 0,00	n.d.	0,17 ± 0,01	0,66 ± 0,03	-	-
	48	L	0,41± 0,04	0,25± 0,15	0,02± 0,00	0,02± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	n.d.
		NL	0,35 ± 0,05	0,54 ± 0,02	n.d.	0,05 ± 0,01	0,79 ± 0,12	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00
200/10	24	L	0,84± 0,17	0,38± 0,13	n.d.	0,02± 0,01	n.d.	-	-
		NL	0,40 ± 0,05	0,11 ± 0,05	n.d.	0,12 ± 0,04	0,47 ± 0,11	-	-
	48	L	0,49± 0,03	0,04± 0,00	0,02± 0,01	0,02± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	n.d.
		NL	0,35 ± 0,03	0,40 ± 0,06	n.d.	0,04 ± 0,01	0,59 ± 0,24	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01
UtEG	24		n.d.	0,24± 0,01	n.d.	0,02± 0,00	n.d.	-	-
	48		0,05± 0,04	0,46± 0,02	0,11± 0,01	0,03± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.
Cel	24		0,94± 0,18	0,04± 0,00	n.d.	0,01± 0,00	n.d.	-	-
	48		1,50± 0,35	0,07± 0,09	n.d.	0,01± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	n.d.
Avicel	24		0,84± 0,04	n.d.	0,02± 0,00	0,01± 0,00	n.d.	-	-
	48		1,12± 0,07	n.d.	0,01± 0,01	0,01± 0,00	n.d.	0,00 ± 0,00	n.d.

L: Amostra lavada após o pré-tratamento

NL: Amostra não submetida à lavagem após o pré-tratamento

n.d.: não detectado

(-): Amostras não avaliadas por HPLC

Com relação ao ácido acético detectado nas amostras de hidrólise (Tabela 4), observou-se que as alíquotas não submetidas ao processo de lavagem apresentaram maiores concentrações desse composto, tanto em 24 h como em 48 h, quando comparadas às amostras lavadas após o pré-tratamento. No controle com capim-elefante não tratado, nas hidrólises de celulose e Avicel[®] não foi detectado esse composto em nenhum dos tempos de hidrólise analisados. Verificou-se, ainda, que somente a condição a 180 °C / 6 min, tanto em 24 como em 48 h, apresentou concentrações de ácido acético tanto nas amostras lavadas como nas não lavadas. Nas demais condições de pré-tratamento, esse composto não foi detectado em nenhum dos tempos de hidrólise nas amostras submetidas à lavagem, possivelmente devido a maior remoção de hemicelulose conforme aumentou-se a severidade do pré-tratamento (Figura 1).

Com relação às concentrações de glicerol (Tabela 4), observou-se que todas as amostras pré-tratadas e os controles (celulose e Avicel[®]) apresentaram essa substância em ambos os tempos de hidrólise avaliados, tanto nas amostras lavadas como nas não lavadas, sendo que na maioria dos casos, os maiores valores foram registrados para as amostras não submetidas à lavagem. O xilitol (Tabela 4), de maneira geral, não foi detectado na maioria das condições, sendo que nas amostras em que o mesmo foi detectado, a identificação desse composto ocorreu em 48 h de hidrólise nas amostras lavadas de cada pré-tratamento, exceto para o controle com celulose onde valores foram registrados em ambos os tempos. Quanto à detecção de açúcares (arabinose e celobiose) nas amostras, verificou-se que ambos foram detectados na maioria das condições de pré-tratamento e controles avaliados, tanto nas amostras lavadas como nas não lavadas, em 24 e 48 h de hidrólise.

A Figura 5 apresenta as concentrações de açúcares (glicose e xilose) e as concentrações de etanol produzidas a partir da fermentação alcoólica dos hidrolisados de 48 h de capim-elefante, nas amostras controle (capim-elefante não tratado, celulose e Avicel[®]) e nas diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor empregadas. Avaliando-se as diferentes condições de amostras pré-tratadas, observou-se que os maiores rendimentos em etanol foram obtidos quando se utilizou as amostras submetidas à lavagem, no tempo de 12 h de fermentação, na condição a 200 °C / 6 e 200 °C / 10 min ($4,27 \pm 0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $4,25 \pm 0,20 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente). Após esse período, algumas condições como 180 °C / 6 min, 190 °C / 8 min e 190 °C / 10 min apresentaram uma queda expressiva na concentração de etanol, enquanto as demais mantiveram-se constantes. Assim como observado por Lu *et al.*

(2010), as concentrações de etanol a partir da fermentação de palha de milho pré-tratada por explosão a vapor e submetida à lavagem apresentaram maiores incrementos no início do processo e após, mantiveram-se constantes. Já com relação aos rendimentos em etanol obtidos a partir do uso de amostras pré-tratadas e não submetidas à lavagem após o processo, observou-se um perfil semelhante nos diferentes tempos de fermentação quando comparado ao uso das amostras lavadas, embora na condição a 190 °C / 10 min, o uso da amostra não lavada tenha possibilitado os maiores rendimentos de etanol em 24 h de fermentação, quando comparado com a amostra lavada nessa mesma condição.

Verificou-se que, na maioria das condições, o maior consumo de glicose ocorreu nas primeiras 6h de fermentação, tanto quando foram utilizadas as amostras lavadas como quando utilizou-se as amostras não lavadas. Os decréscimos na concentração de glicose coincidem com os aumentos em etanol. Na maioria das condições de pré-tratamento observou-se que as quantidades de glicose disponíveis eram superiores nas amostras lavadas do que nas não lavadas, o que justifica os maiores rendimentos em etanol para esse tipo de condição. Além disso, observou-se que após as 6 h de processo, o consumo de glicose manteve-se estável até se esgotar no meio, bem como os rendimentos de etanol também permaneceram estáveis. Quanto aos teores de xilose (Figura 5) verifica-se que as concentrações desse açúcar mantiveram-se constantes durante o processo de fermentação, em ambas as amostras pré-tratadas, tanto para as condições submetidas ou não à lavagem, visto que a levedura utilizada não fermenta xilose. Quanto às quantidades de xilose disponíveis, observou-se que as amostras pré-tratadas e não lavadas apresentavam, geralmente, valores superiores quando comparados às amostras lavadas.

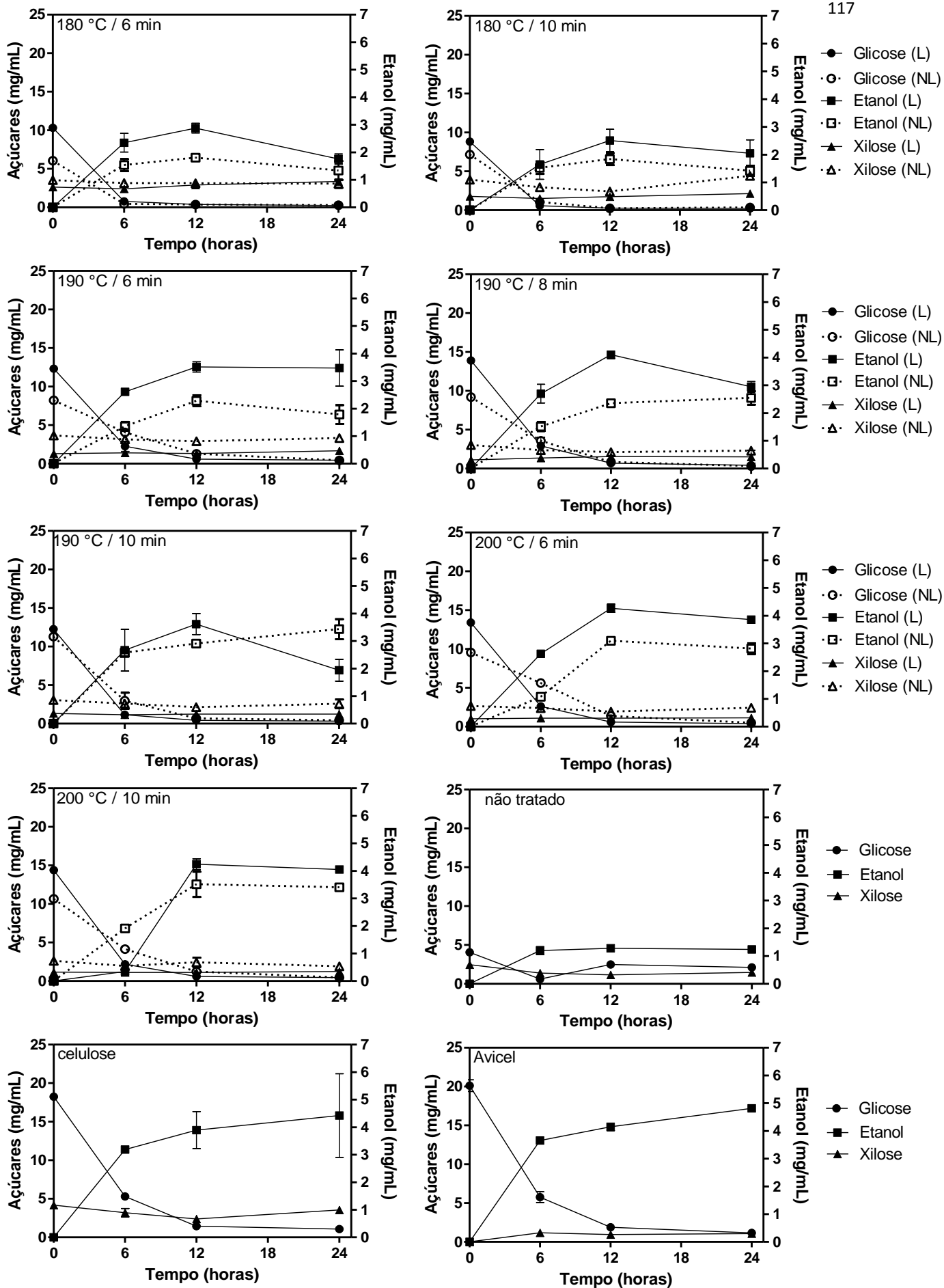


Figura 5. Concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de açúcares (glicose e xilose) e as concentrações ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de etanol produzidas a partir da fermentação alcoólica dos hidrolisados de 48h de capim-elefante, nas amostras controle (capim-elefante não tratado, celulose e Avicel[®]) e nas diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor.

Devido à redução da concentração de glicose após a maior produção de etanol verificada até 12 h de fermentação, ocorreu diminuição na concentração de etanol, possivelmente pelo fato das leveduras consumirem esse álcool (Maleszka & Schneider, 1982).

Com relação aos controles empregados, observou-se que o controle formulado com capim-elefante não tratado apresentou rendimentos inferiores aos demais controles, comprovando a eficácia e a importância do pré-tratamento da biomassa por explosão a vapor para a produção de etanol. Além disso, as fermentações realizadas com os açúcares liberados das hidrólises de celulose e Avicel[®] tiveram perfis semelhantes entre si, apresentando maiores rendimentos de etanol em 24 h de fermentação ($4,42 \pm 1,52 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $4,82 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente), comprovando a capacidade hidrolítica das enzimas – celulasas e hemicelulasas de *P. echinulatum* sobre diferentes substratos. Deve-se considerar que o controle com capim-elefante não tratado apresentou quantidades inferiores de glicose no início da fermentação ($4,06 \pm 0,18 \text{ mg.mL}^{-1}$) quando comparado aos fermentados dos açúcares provenientes de celulose ($18,24 \pm 0,44 \text{ mg.mL}^{-1}$ de glicose) e Avicel[®] ($20,12 \pm 0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ de glicose), o que está diretamente relacionado aos rendimentos de etanol obtidos em cada uma dessas condições.

A Tabela 5 apresenta os analitos detectados e quantificados por HPLC, a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor (lavado e não lavado), não tratado, celulose e Avicel[®]. Verificou-se que a arabinose foi detectada na maioria das amostras e geralmente, apresentou-se em maiores concentrações nas amostras não lavadas. Já com relação à celobiose, não foi possível estabelecer uma relação entre os valores e as condições em que os mesmos foram detectados. Quanto à detecção de ácido acético nas amostras avaliadas, observou-se que as maiores concentrações desse composto foram registradas nas amostras onde utilizou-se capim-elefante pré-tratado e não lavado após o processo como substrato, assim como foi observado para os valores de ácido acético nas amostras de hidrólise (Tabela 4). Em algumas condições de pré-tratamento, esse analito não foi detectado em amostras pré-tratadas e lavadas, em 0 h de fermentação. Lu *et al.* (2010) verificaram em seu trabalho que concentrações de $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético e 145 mg.L^{-1} de furfural foram consideradas inibitórias para o processo fermentativo de palha de milho pré-tratada por explosão a vapor, enquanto no presente estudo, concentrações mínimas desses compostos foram detectadas.

Tabela 5. Substâncias detectadas (g/L) a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-efefante não tratado, pré-tratado por explosão a vapor, celulose e Avicel[®]

Treatments (°C/min)	T (h)		Celobiose	Arabinose	Xilitol	Glicerol	Ác. Ac	HMF	Furfural
180/6	0	L	0,14 ± 0,06	0,07 ± 0,00	n.d.	0,10 ± 0,13	0,09 ± 0,01	0,00±0,00	n.d.
		NL	n.d.	0,51 ± 0,03	n.d.	0,04 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,00±0,00	n.d.
	6	L	n.d.	0,08 ± 0,01	n.d.	0,24 ± 0,03	0,13 ± 0,04	-	-
		NL	n.d.	0,52 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,64 ± 0,82	0,43 ± 0,07	-	-
	12	L	n.d.	0,29 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,26 ± 0,018	0,17 ± 0,02	-	-
		NL	n.d.	0,56 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,46 ± 0,05	-	-
24	L	n.d.	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,23 ± 0,04	0,34 ± 0,04	-	-	
	NL	n.d.	0,55 ± 0,10	n.d.	0,22 ± 0,04	0,44 ± 0,09	-	-	
180/10	0	L	n.d.	0,04 ± 0,00	n.d.	0,02 ± 0,00	n.d.	0,00±0,00	n.d.
		NL	0,26 ± 0,01	0,55 ± 0,01	n.d.	0,15 ± 0,20	0,46 ± 0,02	0,03±0,00	n.d.
	6	L	n.d.	0,13 ± 0,07	0,05 ± 0,00	0,20 ± 0,02	0,04 ± 0,02	-	-
		NL	0,28 ± 0,04	0,44 ± 0,04	0,43 ± 0,58	0,14 ± 0,01	0,50 ± 0,07	-	-
	12	L	n.d.	0,13 ± 0,08	0,06 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,07 ± 0,05	-	-
		NL	0,17 ± 0,00	0,27 ± 0,12	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,36 ± 0,10	-	-
24	L	n.d.	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,30 ± 0,00	-	-	
	NL	n.d.	0,12 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,13 ± 0,05	0,46 ± 0,03	-	-	
190/6	0	L	0,27 ± 0,09	n.d.	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,00±0,00	0,00±0,00
		NL	0,47 ± 0,07	0,59 ± 0,12	n.d.	0,05 ± 0,03	0,92 ± 0,35	0,05±0,00	0,06±0,01
	6	L	0,21 ± 0,15	0,11 ± 0,03	0,23 ± 0,06	0,26 ± 0,05	0,07 ± 0,02	-	-
		NL	0,44 ± 0,17	0,41 ± 0,12	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	1,08 ± 0,42	-	-
	12	L	n.d.	0,37 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,31 ± 0,03	0,06 ± 0,02	-	-
		NL	0,31 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,90 ± 0,06	-	-
24	L	n.d.	0,07 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,30 ± 0,06	0,05 ± 0,02	-	-	
	NL	n.d.	0,29 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,89 ± 0,07	-	-	
190/8	0	L	0,31 ± 0,16	n.d.	0,28 ± 0,00	0,03 ± 0,00	n.d.	0,01±0,00	0,01±0,00
		NL	0,23 ± 0,01	0,52 ± 0,03	n.d.	0,05 ± 0,01	0,76 ± 0,18	0,05±0,00	0,08±0,01
	6	L	0,35 ± 0,17	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,05 ± 0,01	-	-
		NL	0,38 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,35 ± 0,43	0,12 ± 0,03	0,52 ± 0,14	-	-
	12	L	n.d.	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,035	0,32 ± 0,01	0,11 ± 0,07	-	-
		NL	n.d.	0,18 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,55 ± 0,09	-	-
24	L	n.d.	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,32 ± 0,17	0,19 ± 0,00	-	-	
	NL	n.d.	0,27 ± 0,19	0,14 ± 0,02	0,42 ± 0,37	2,07 ± 2,24	-	-	
190/10	0	L	0,34 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	n.d.	n.d.
		NL	0,54 ± 0,01	0,48 ± 0,01	n.d.	0,045 ± 0,00	0,51 ± 0,05	0,03±0,00	0,07±0,01
	6	L	0,09 ± 0,01	0,23 ± 0,15	n.d.	0,25 ± 0,06	0,04 ± 0,02	-	-
		NL	0,47 ± 0,11	0,38 ± 0,05	0,09 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,54 ± 0,23	-	-
	12	L	n.d.	0,08 ± 0,08	0,04 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,06 ± 0,02	-	-
		NL	n.d.	0,22 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,56 ± 0,29	-	-
24	L	n.d.	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,24 ± 0,12	0,16 ± 0,01	-	-	
	NL	n.d.	0,43 ± 0,11	0,17 ± 0,05	0,30 ± 0,08	0,53 ± 0,31	-	-	
200/6	0	L	0,41 ± 0,04	0,25 ± 0,15	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,00±0,00	n.d.
		NL	0,35 ± 0,05	0,54 ± 0,02	n.d.	0,05 ± 0,01	0,79 ± 0,12	0,06±0,00	0,08±0,00
	6	L	0,29 ± 0,13	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,08	0,29 ± 0,03	0,01 ± 0,00	-	-
		NL	0,33 ± 0,18	0,33 ± 0,15	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,05	0,91 ± 0,40	-	-
	12	L	n.d.	0,17 ± 0,03	0,06 ± 0,00	0,34 ± 0,02	0,05 ± 0,01	-	-
		NL	0,20 ± 0,07	0,28 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,78 ± 0,47	-	-
24	L	n.d.	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,33 ± 0,08	0,06 ± 0,05	-	-	
	NL	n.d.	0,51 ± 0,08	0,21 ± 0,03	0,35 ± 0,05	0,95 ± 0,19	-	-	
200/10	0	L	0,49 ± 0,03	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	n.d.	0,00±0,00	n.d.
		NL	0,35 ± 0,03	0,40 ± 0,06	n.d.	0,04 ± 0,01	0,59 ± 0,24	0,04±0,01	0,07 ± 0,01
	6	L	0,39 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,04 ± 0,00	-	-
		NL	0,34 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,40 ± 0,05	-	-
	12	L	n.d.	0,16 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,04 ± 0,01	-	-
		NL	0,22 ± 0,00	0,37 ± 0,14	0,12 ± 0,05	0,21 ± 0,09	0,79 ± 0,59	-	-
24	L	n.d.	0,14 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,37 ± 0,07	0,07 ± 0,07	-	-	
	NL	n.d.	0,37 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,31 ± 0,01	0,76 ± 0,10	-	-	

(Continuação Tabela 5):

UtEG	0	-	0,08 ± 0,00	0,46 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00	n.d.	n.d.
	6	-	n.d.	0,50 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,21 ± 0,02	0,07 ± 0,01	-	-
	12	-	n.d.	0,46 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,44 ± 0,43	0,05 ± 0,03	-	-
	24	-	n.d.	0,57 ± 0,04	n.d.	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,02	-	-
Cel	0	-	1,50 ± 0,35	0,07 ± 0,09	n.d.	0,02 ± 0,00	n.d.	0,00±0,00	n.d.
	6	-	1,27 ± 0,05	0,04 ± 0,00	n.d.	0,51 ± 0,26	0,05 ± 0,01	-	-
	12	-	0,49 ± 0,13	0,15 ± 0,14	0,06 ± 0,05	0,38 ± 0,10	n.d.	-	-
	24	-	n.d.	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,55 ± 0,18	0,11 ± 0,06	-	-
Avicel	0	-	1,12 ± 0,07	n.d.	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	n.d.	0,00±0,00	n.d.
	6	-	1,13 ± 0,16	0,12 ± 0,00	n.d.	0,35 ± 0,07	0,00 ± 0,00	-	-
	12	-	0,42 ± 0,03	n.d.	n.d.	0,39 ± 0,03	n.d.	-	-
	24	-	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,01	0,61 ± 0,15	0,05 ± 0,06	-	-

L: Amostra lavada após o pré-tratamento

NL: Amostra não submetida à lavagem após o pré-tratamento

n.d.: não detectado

(-): Amostras não avaliadas por HPLC

Na Tabela 6 percebe-se claramente a influência positiva da realização do pré-tratamento visto que todas as amostras pré-tratadas possibilitaram significativos aumentos na produção de etanol. Outro fator que também contribuiu positivamente foi a realização da lavagem da biomassa após o processo de pré-tratamento, indicando que essa etapa é imprescindível para incrementar a produção de etanol.

Tabela 6. Produção de etanol (mL/kg) empregando diferentes amostras de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor.

Pré-tratamento (°C/min)	Etanol (mL/kg)	
	Amostras não submetidas à lavagem	Amostras submetidas à lavagem
Não tratado	39,94	-
180/6	55,53	88,53
180/10	53,52	72,85
190/6	62,25	95,48
190/8	61,89	107,72
190/10	70,48	87,62
200/6	80,06	110,45
200/10	89,11	107,68

Os dados são de mL por quilograma de biomassa pré-tratada, considerando as perdas de massa durante o pré-tratamento.

4 Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho verificou-se que maiores temperaturas de pré-tratamento por explosão a vapor proporcionaram os maiores rendimentos tanto de açúcares a

partir da hidrólise como de etanol. Ainda, verificou-se que a lavagem da amostra após o pré-tratamento foi favorável, uma vez que removeu parte dos inibidores gerados durante o processo de pré-tratamento e possibilitou incrementos na produção de etanol. Em trabalhos futuros, há a necessidade de utilização de maiores concentrações de substrato para tornar o processo economicamente viável.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade de Caxias do Sul (UCS) para o apoio financeiro deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Brugnago, R. J., Satynarayana, K. G., Wypych, F., Ramos, L. P. (2011). The effect of steam explosion on the production of sugar cane bagasse/polyester composites. **Composites: Part A**. 3: 64–370.
- 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.
- CENBIO (Centro Nacional de Referência em Biomassa). Conceituando Biomassa. São Paulo (SP): CENBIO, [s.d.]. **Disponível online em 7 de janeiro de 2013:** <http://cenbio.iee.usp.br/saibamais/conceituando.htm>.
- 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.
- 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: 470-476.
- Emmel, A., Mathias, A. L., Wypych, F., Ramos, L. P., 2003. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresour. Technol.** 86: 105–115.
- Ewanick, S., Bura, R., 2011. The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 102:

2651–2658.

- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59: 257-268.
- Iroba, K. L., Tabil, L. G., Sokhansanj, S., Dumonceaux, T. (2014) Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. **Biomass Bioenerg.** 66: 286-300.
- Liew, W. H.; Hassim, M. H.; Ng, D. K. S., (2014). Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **J. Clean. Prod.** 71: 11-29.
- Liu, S., Abrahamson, L.P., Scott, G. M. (2012). Biorefinery: ensuring biomass as a sustainable renewable source of chemicals, materials, and energy. **Biomass Bioenerg.** 39: 1-4.
- Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S., 2010. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 160: 360–369.
- Maleszka, R., Schneider, H. (1982). Concurrent Production and Consumption of Ethanol by Cultures of *Pachysolen tannophilus* Growing on D-Xylose. **Appl. Environmental Microbiol.** 44(4): 909-912.
- Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J. P., Ramos, L. P., 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99, 1417-24.
- Menardo, S., Bauer, A., Theuretzbacher, F., Piringer, G., Nilsen, P. J., Balsari, P., Pavliska, O., Amon, T. (2013). Biogas Production from Steam-Exploded Miscanthus and Utilization of Biogas Energy and CO₂ in Greenhouses. **Bioenerg. Res.** 6:620–630.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M. (2014a). Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel.** 133: 232–240.
- Menegol, D., Scholl, A. L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M. (2014b). Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energ. Conv. Manag.**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2014.02.071>.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chemis.** 31: 426-428.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.

- Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2011). EUA, 18ª edição, 4ª revisão. Método 2001.11
- Ohgren, K., Zacchi, G., Galbe, M., 2005. Optimisation of steam pretreatment of SO₂-impregnated corn stover for fuel ethanol production. **Appl. Biochem. Biotech.** 121–124, 1055–1067.
- Oliveira, F. M. V. Pinheiro, I. O., Souto-Maior, A. M., Martin, C., Gonçalves, A. R., Rocha, G. J.M. (2013). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresour. Technol.** 130: 168-173.
- Osava, M. (2007). Elephant Grass for Biomass. **Inter. Press Service News Agency**. October 10.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour. Technol.** 74: 25-33.
- Pitarelo, A. P., Silva, T. A., Peralta-Zamora, P. G., Ramos, L. P. (2012). Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Quím Nova.** 35(8), 1502-1509.
- Ramos, L. P.; Carpes, S. T.; Silva, F. T.; Ganter, J. L. M. S. (2000). Comparison of the susceptibility of two hardwood species, *Mimosa scabrella* Benth and *Eucalyptus viminalis* Labill, to steam explosion and enzymatic hydrolysis. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** 43: 185-206.
- Ramos, L.P.; Breuil, C.; Saddler, J.N. (1992). Comparison of steam pretreatment of *eucalyptus*, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 34-35: 37-48.
- 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* SIM29 in batch and fed-batch culture. **Bioresour. Technol.** 146: 597-603.
- del Río, J. C., Prinsen, P., Rencoret, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Ralph, J., Martínez, A. T., Gutiérrez, A. (2012). Structural Characterization of the Lignin in the Cortex and Pith of Elephant Grass (*Pennisetum purpureum*) Stems. **J. Agric. Food Chem.** 60: 3619–3634.
- Rocha, G. J. M., Gonçalves, A. R., Oliveira, B. R.; Olivares, E.G, Rossell, C. E. V. (2012).

- Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Ind. Crop. Prod.** 35: 274–279.
- Singh, R.; Varma, A. J.; SeetaLaxman, R.; Rao, M. (2009). Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulose. **Bioresour. Technol.** 100:6679–6681.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. J. W. (2008). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. **Technical**. Report NREL/TP-510-42621.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. **Technical**. Report NREL/TP-510-42619.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. D. C. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical**. Report NREL/TP-510-42618.
- Somerville, C.; Youngs, H.; Taylor, C.; Davis, S.C.; Long, S.P. (2010). Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. **Science**. 329: 790-792.
- Valle, C.B.; Euclides, V.P.B.; Macedo, M.C.M. (2001). Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. **In: Simpósio sobre Manejo de Pastagem**, 17. Anais. FEALQ. Piracicaba. 458 p.
- Zheng, J., Choo, K., Bradt, C., Lehoux, R., Rehmann, L. (2014). Enzymatic hydrolysis of steam exploded corn cob residues after pretreatment in a twin screw extruder. **Biotechnol. Reports**. 3: 99–107.

DISCUSSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos utilizando-se capim-elefante como substrato para a indução da secreção de enzimas em cultivos submersos, verificou-se que essa biomassa pode ser empregada para a produção de enzimas, evidenciando-se como uma alternativa promissora para amenizar um dos gargalos da produção de etanol de segunda geração.

Para os meios formulados em CS não se observou inibição na produção de enzimas por compostos gerados durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor, possivelmente porque estes foram diluídos no meio de cultura a concentrações que não interferiram no metabolismo microbiano. Evidenciou-se o efeito positivo da utilização da biomassa pré-tratada para obtenção de maiores produções de FPA, endoglucanases e β -glucosidases, sendo os pré-tratamentos realizados com temperaturas intermediárias (190 °C / 8 min e 190 °C / 6 min) os mais promissores. Já para a produção de xilanases verificou-se um comportamento contrário, uma vez que o pré-tratamento não favoreceu a produção dessas enzimas. Quanto ao efeito da lavagem da biomassa após o pré-tratamento por explosão a vapor, observou-se a eficiência dessa etapa para a produção de FPA e endoglucanases, enquanto que para as demais enzimas avaliadas observou-se efeito negativo da lavagem.

Para os cultivos em estado sólido formulados somente com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor foram obtidas baixas atividades enzimáticas, evidenciando inviabilidade de utilização de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor como único substrato para a produção de enzimas, mesmo sendo um substrato que contém percentuais de proteínas entre 1,63 a 8,38 % (m/m). Mas quando os cultivos em estado sólido foram formulados empregando-se 50 % de farelo de trigo, houve produções enzimáticas superiores ao cultivo controle formulado com 100 % (m/m) de farelo de trigo. Estes dados indicam que as substâncias inibitórias ao metabolismo microbiano, tais como furfural, HMF e ácido acético apresentaram influência negativa na produção de enzimas. A diversidade de nutrientes no meio de cultivo também é necessária para a efetiva produção de enzimas para hidrólise de lignocelulósicos.

A substituição de 50 % (m/m) do farelo de trigo por capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor e lavado após o processo favoreceu, especialmente, a produção de FPA em condições de 190 °C / 8 min, endoglucanases (200 °C / 6 min) e β -glucosidases (180 °C / 6 min), enquanto que para a produção de xilanases o capim-elefante não tratado mostrou-se mais vantajoso considerando-se o tempo de processo.

As maiores atividades de xilanases obtidas nos cultivos formulados com capim-elefante não tratado podem estar relacionadas com a presença de maior porcentagem da fração hemicelulósica presente nas amostras, uma vez que houve diminuição desse componente nas amostras pré-tratadas, com relação ao material original (não tratado). Já as maiores produções de celulasas e β -glicosidasas podem estar possivelmente relacionadas a maior quantidade de celulose nas amostras submetidas ao processo de pré-tratamento, e, também, por modificações estruturais da biomassa causadas durante o pré-tratamento por explosão a vapor.

Para os cultivos realizados em estado sólido os maiores títulos enzimáticos observados para FPA foram de 32,93 UI.g⁻¹ (massa seca) para o meio de cultivo formulado com capim-elefante pré-tratado a 190 °C / 8 min, lavado após o pré-tratamento e suplementado com 50 % de WB. Também verificou-se produções de 23,38 UI.g⁻¹ (massa seca) para o meio formulado somente com capim-elefante não tratado. Já para os cultivos submersos, foram produzidas 40 FPU.g⁻¹ (massa seca), inferindo-se que em termos de quantidades totais de enzima produzida, o cultivo submerso mostrou-se mais vantajoso. Além disso, a produção de enzimas em cultivo submerso pode ser vantajosa por apresentar facilidade de controle de parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, agitação e aeração, o que acarretaria em produções ainda maiores do que as obtidas em frascos mantidos sob agitação, como realizado neste trabalho.

Pode-se verificar ainda que para ambos os processos de produção de enzimas, tanto em CES como em CS, a condição de pré-tratamento a 190 °C / 8 min foi a mais favorável, indicando que temperaturas e tempos intermediários foram mais promissores para a produção das enzimas de interesse neste trabalho. Por outro lado, deve-se ressaltar que o CES, apesar de apresentar menores títulos enzimáticos que o CS, favoreceu a produção da maioria das enzimas utilizando-se capim-elefante não tratado, o que tornaria o processo mais econômico.

Avaliando-se a hidrólise enzimática de capim-elefante com o emprego de enzimas produzidas em cultivos submersos, verificou-se que os maiores rendimentos foram obtidos com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor a 200 °C / 10 min e não lavado após o processo ($863,42 \pm 62,52$ mg.g⁻¹). Para glicose, especificamente, as maiores liberações foram obtidas para as amostras lavadas, pré-tratadas durante 10 min, a uma temperatura de 190 °C ($248,34 \pm 6,27$ mg.g⁻¹), após 48 h de hidrólise. A maior concentração de açúcares redutores pode ser explicada pela presença de interferentes presentes na amostra não lavada que podem ter sido detectados como açúcar, enquanto que tal interferência não é observada na detecção de glicose por HPLC.

Quanto à produção de etanol a partir dos hidrolisados de capim-elefante, constatou-se que as amostras pré-tratadas por explosão a vapor a 200 °C por 6 min e lavadas após o processo possibilitaram os resultados mais promissores. Obteve-se o volume de 110,45 mL.kg⁻¹ (12 h) considerando-se as perdas de massas que ocorrem durante o processo de pré-tratamento, empregando 40 g/L de capim-elefante pré-tratado. Apesar de ter sido verificado que as fibras do capim-elefante, após o pré-tratamento, são suscetíveis à hidrólise enzimática, esta condição ainda precisa ser melhorada, visando à obtenção de xaropes com concentrações mais elevadas, pois nesta condição, para cada litro de etanol produzido, são gerados cerca de 225 litros de efluente.

Avaliando o efeito da lavagem das amostras pré-tratadas, verificou-se a necessidade da remoção de substâncias inibidoras formadas durante o pré-tratamento por explosão a vapor por meio de lavagem aquosa para a produção de etanol, embora ainda seja necessária a utilização de maiores concentrações de substrato para tornar o processo viável.

Os resultados dos ensaios descritos no presente trabalho, embora preliminares, indicam a capacidade da linhagem S1M29 de *P. echinulatum* de produzir celulasas e xilanasas em CS em meios suplementados com capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor, indicando que essa forma de condução do processo de produção de enzimas pode ser mais efetiva para a produção de etanol de segunda geração.

Finalmente, o microrganismo e as metodologias empregadas, as quais fizeram uso de materiais economicamente viáveis, como o capim-elefante, apontam a possibilidade de produção de enzimas capazes de hidrolisar resíduos lignocelulósicos, visando a produção de produtos biotecnológicos, como o etanol.

5 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- o pré-tratamento por explosão a vapor promoveu alterações na estrutura da biomassa, sendo que quanto maior o tempo de residência e temperatura empregada, maior foi a fragmentação do material;

- houve alterações na composição química em todas as amostras pré-tratadas por explosão a vapor;

- ocorreram incrementos variando entre cerca de 10 a 40 % na concentração de celulose nas amostras pré-tratadas;

- houve perda de hemicelulose variando entre cerca 30 a 70 % durante o processo de pré-tratamento das amostras;

- os conteúdos de lignina insolúvel foram mantidos ou incrementados em até 20 % durante o pré-tratamento;

- a realização do processo de lavagem após o pré-tratamento por explosão não apresentou interferência sobre a composição química das amostras;

- é possível a utilização de capim-elefante como matéria-prima para produção de enzimas para hidrólise de lignocelulósicos por *P. echinulatum*;

- a realização do pré-tratamento por explosão a vapor é necessária para o emprego de capim-elefante como fonte de carbono e indutora para a produção de celulasas e β -glicosidasas em CS;

- para produção de xilanases, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas com a condição a 200 °C por 10 min, com as amostras não submetidas à lavagem;

- o processo de lavagem do capim-elefante após o pré-tratamento por explosão a vapor não apresentou vantagens para a produção de celulasas e xilanases, em CS;

- em CS os pré-tratamentos realizados com temperaturas intermediárias (190 °C por 8 e 6 min) foram os mais promissores para produção de FPA, endoglucanases e β -glucosidasas;

- em CES, o emprego de capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor como única matéria-prima para a produção de celulasas e xilanases não foi efetiva;

- em CES, a produção de FPA, endoglucanases e xilanases foi efetiva empregando-se somente capim-elefante não tratado;

- o processo de lavagem do capim-elefante após o pré-tratamento foi essencial para incrementos na produção de celulases e β -glicosidases, em CES;
- em CES as maiores produções de xilanases foram obtidas com o capim-elefante não tratado;
- a associação de farelo de trigo e capim-elefante pré-tratado por explosão e lavado após pré-tratamento foi eficiente para a produção de celulases e β -glicosidases, em CES;
- em CES, em associação com o farelo de trigo, as maiores produção de FPA ocorreram a 190 °C / 8 min, para endoglucanases (200 °C / 6 min) e β -glucosidases (180 °C / 6 min), utilizando-se amostras lavadas;
- não foi possível estabelecer relações entre a produção enzimática e o crescimento, tanto em CS como em CES;
- o CS foi mais vantajoso para a produção de enzimas por quantidade de substrato empregada que o CES;
- na hidrólise enzimática, as amostras pré-tratadas a 190 °C / 8 min e 190 °C / 10 min e 200 °C / 10 min, submetidas à lavagem apresentaram as maiores liberações de glicose;
- nos processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, o uso de amostras pré-tratadas por explosão a vapor e lavadas é requerido para obtenção de maiores quantidades de produtos;
- para etanol, as maiores produções foram verificadas quando empregadas amostras pré-tratadas a 200 °C / 6 min e submetidas ao processo de lavagem.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade do trabalho e desenvolvimento de tecnologias associadas aos dados obtidos, sugere-se:

- utilizar catalisadores durante o processo de pré-tratamento por explosão a vapor;
- realizar o escalonamento da produção de enzimas em cultivo submerso, empregando as condições selecionadas no trabalho;
- realizar hidrólises enzimáticas empregando maiores concentrações de capim-elefante;
- realizar estudos de rentabilidade total e o impacto na tecnologia de produção de etanol de capim-elefante por hidrólise enzimática;
- realizar a conversão das pentoses obtidas no processo de hidrólise enzimática do capim-elefante para produção de etanol ou outros produtos biotecnológicos;
- desenvolver tecnologias para o aproveitamento dos resíduos de lignina após o processo de hidrólise e fermentação.

7 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Abreu, J. G., Evangelista, A. R., Souza, I. T., Rocha, G. P., Soares, L. Q., Santarosa, L. C. (2006). Glyphosate e nitrogênio no controle de *Brachiaria decumbens* stapf em capineiras estabelecidas. **Ciência e Agrotecnologia**. 30(5): 977-987.
- 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.
- Aidoo, K.E., Hendry, R., Wood, B.J.B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiol. Biotechnol.** 12: 6-9.
- Alvira, P.; Tom´s-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour. Technol.** 101: 4851:4861.
- Andreas, J. (2001). A aplicação de celulases em processos de desbotamento. **Quím.Têxtil.** 64: 5-18.
- Andreoli, C. (2008). Convergence of agriculture and Energy: I. cellulosic biomass production for biofuels and electricity. **Econ. Energy.** 66: 3-14.
- 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: 24309-24314.
- Ávila, F. (2014). Renewable Energy and Jobs – Annual Review 2014, Agência Internacional de Energias (IRENA). **Disponível online em 22 de novembro de 2014.** (<http://www.institutocarbonobrasil.org.br/noticias3/noticia=737062>)
- Ávila, F. (2014). Renewable Energy and Jobs – Annual Review 2014, Agência Internacional de Energias (IRENA). **Disponível online em 22 de novembro de 2014.**

<http://www.esquerda.net/artigo/pela-primeira-vez-co2-na-atmosfera-fica-acima-de-400-ppm-durante-um-mes/32478>)

- Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23, 257-270.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M.N., Manzanares, P., Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry.** 39: 1843–1848.
- Bauer, A., Lizasoain, J., Theuretzbacher, F., Agger, J.W., Rincón, M., Menardo, S., Saylor, M.K., Enguídanos, R., Nielsen, P.J., Potthast, A., Zweckmair, T., Gronauer, A., Horn, S.J. (2014). Steam explosion pretreatment. **Bioresour Technol.** 166: 403-410.
- 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.
- 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.
- Bisaria, V.S.; Ghose, T.K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-104.
- Buckeridge, M., Santos, W.D., De Souza, A. P. (2009). As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B. P; Karp, S. G; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Leitão, V. F.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A; Bom, E. P. da S.; Moraes, L. M. P. de.; Araújo, J. de A.; Torres, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresour Technol.** 101: 4820–4825.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal.Biochem.** 72, 248-254.
- Camassola, M.; Bittencourt, L.R.; Shenem, N.T.; Andreus, 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., 2012a. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. **J. Anal. Bioanal. Techniq.** 1,125.
- Camassola, M., Dillon, A. J. P., 2012b. Steam-Exploded Sugar Cane Bagasse for On-Site Production of Cellulases and Xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Energ. Fuels.** 26: 5316-5320.
- Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980). Solid-state fermentation systems. **Process Biochem.** 28: 2-7.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F. (2004). Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. **Process Biochem.** 39:1533–42.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M.J., Castro, E. (2006). Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam-explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry** 41: 423–429.
- Cardona, A.A.; Sánchez, O.J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresour. Technol.** 98: 2415-2457.
- Cardona, E., Rios, J., Peña, J., Rios, Luis. (2014). Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel** 118: 41–47.
- Caulfield, D., Moore, W.E. (1974). Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymic

- hydrolysis. *Wood Sci.* 6 (4), 375–379. In: Hendriks, A.T.W.M.; Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 100: 10–18
- CENBIO (Centro Nacional de Referência em Biomassa). Conceituando Biomassa. São Paulo (SP): CENBIO, [s.d.]. Disponível online em 07 de janeiro de 2013. <http://cenbio.iee.usp.br/saibamais/conceituando.htm>.
- Chandel, A. K.; Es, C.; Rudravaram, R.; Narasu, M. L.; Rao, L. V.; Ravindra, P. (2007). **Biotechnol and Molecular Biology**. vol. 2, p. 14.
- Chahal, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environm. Microbiol.** 49: 205-210.
- 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.
- Considine, P.J.; Hackett, T.J.; Coughlan, M.P. (1987). Solid-state cultivation of cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. **Biotecnol. Lett.** 9: 131-134.
- Cortez, L.A.B., Lora, E.E.S., Gómez, E.O., (2008). Biomassa para Bioenergia. UNICAMP, Campinas. In: Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B. P; Karp, S. G; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Leitão, V. F.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A; Bom, E. P. da S.; Moraes, L. M. P. de.; Araújo, J. de A.; Torres, F. A. G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technol.** 101: 4820–4825.
- Daroit, D. J., Simonetti, A., Hertz, P. F., Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of na extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18(5):933-941.

- Dence, C. W.; Lin, S. Y. (1992). *Methods in lignin chemistry*. New York: **Springer Verlag**.
- Deresz, F. (2001). Influência do período de descanso da pastagem de capim elefante na produção de leite de vacas mestiças holandês x zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa. 30(2): 461-469.
- Dillon, A.J.P. (2004). Cellulases. In.: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. **Editora Legis Summa**, 243-269.
- 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.
- 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: 470-476.
- Duff, S.J.B., Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 55:1-33.
- Dwivedi, P.; Alavalapati, J. R. R.; Lal, P. (2009). Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. **Energy for Sustainable Development.** 13: 174-182.
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K. - E. L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1151-1158.
- EPE. (2007). *Brazilian National Energy Plan 2030 e Thermoelectric Generation (Biomass)*. Brasília.

- EPE. (2013). Brazilian Energy Balance 2013 Year 2012. Rio de Janeiro.
- 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.
- FAO (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Disponível online em 8 de fevereiro de 2010.**
<http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afris/es/Data/137.HTM>.
- Fengel, D.; Wegener, G (1989). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter. 613.
- Fontoura, C.F., Brandão, L.E., Gomes, L.L. (2014). Elephant Grass Biorefineries: Towards a cleaner Brazilian energy matrix? **J. Clean. Product.** 1-9.
- Galbe, M., Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 108: 41–65.
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 618–628.
- Galdeano, M. C. (2001). Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technol.** 101: 4775–4800.
- Glass, N.L; Schmoll, M; Cate, J.H; Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annu. Rev. Microbiol.** 67:477-498.

- Goldemberg, J. (2010). Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz Energética.
- Gomide, J.L.; Demuner, B.J. (1986). Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. **O Papel**. 47: 36-38.
- Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M. (2006). **Bioethanol Curr Opin Chem Biol**. 10:141-146.
- Grohmann, K. (1993). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol. In: Saddler JN (ed) Bioconversion of forest and agricultural plant residues. **CAB**, Wallingford, UK. 183-209.
- Hendricks, A.T.W.M.; Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol**. 100: 10–8.
- Henriksson, G; Johansson, G; Pettersson, G. (2000). A critical review of cellobiose dehydrogenases. **J. Biotechnol**. 78: 93-113.
- Hill, J.; Nelson, E.; Tilman, D.; Polasky, S.; Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **PNAS**. 103: 11206–11210. In: Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**. 101: 4775–4800.
- Horn, S.J.; Vaaje-Kolstad, G; Westereng, B.; Eijsink, V.G.H. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels**. 5:45.
- Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnol**. pp. 602-619.
- IBGE, 2002. Mapa do Clima do Brasil. Brazil's Institute of Geography and Statistics, Rio de Janeiro.

Instituto de Energia Renovável da Alemanha (IWR). **Disponível em 17 de julho:**

<http://g1.globo.com/natureza/noticia/2012/11/emissoes-mundiais-de-co2-sobem-em-2011-e-batem-recorde-diz-instituto.html>

Iroba, K. L., Tabil, L. G., Sokhansanj, S., Dumonceaux, T. (2014). Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. **Biomass Bioenerg.** 66: 286-300.

Kadam, K. L., Rydholm, E.C., McMillan, J.D. (2004). Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnol Progr.** 20(3): 698–705.

Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris B.J. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresour. Technol.** 86: 207-213.

Krishna, S.H.; Reddy, T.J.; Chowdary, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresour. Technol.** 77: 193-196.

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. Tech.** 15: 90-99.

Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 411-456.

Laser, M.; Schulman, D.; Allens, S. G.; Lichwa, J.; Antal Jr, M. J.; Lynd, L.R. (2002). A Comparison of Liquid Hot Water and Steam Pretreatments of Sugar Cane Bagasse for Bioconversion to Ethanol. **Bioresour. Technol.** 81: 33-44.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000). Princípios de bioquímica. 2. ed. São

Paulo: Sarvier.

Lenartovicz, V.; Souza, C.G.M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. (2002) Temperature effect in the production of multiple xylanases by *Aspergillus fumigatus*. **J. Basic Microbiol.** 42: 388-395.

Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. **Appl Biochem and Biotechnol.** 121–124:1081–1099.

Lima, U.A., Basso, L.C., Amorim, H.V. (2001). Produção de Etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Edgard Blücher. 3.

Liu, Z.L., Ma, M., Song, M. (2009). Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics Genomics.** 282: 233-244.

Liu, Z.L., Slininger, P.J., Gorsich, S.W. (2005). Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Appl Biochem Biotechnol.** 121-124:451-60.

Liu, W.; Lu, Y.; Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo-b-xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochem.** 34: 67-72.

Lu, Y., Yang, B., Gregg, D., Saddler, J.N., Mansfield, S.D. (2002). Cellulase Adsorption and an Evaluation of Enzyme Recycle During Hydrolysis of Steam-Exploded Softwood Residues. **Appl Biochem Biotechnol.** 98–100.

Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.

MAPA. (2013). Degradated Area Recuperation. Ministry of Agriculture Livestock and

Food Supply.

- Martín, C., Klinke, H.B., Thomsen, A.B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and microbial technology**. 40: 426-432.
- Martins, L. F.; Camassola, M.; Dillon, A. J.; Ramos, L. P. (2005). Perfil hidrolítico das celulasas de *Penicillium echinulatum*; **SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**.
- McCleary, B. V. (1986). Enzymatic modification of plant polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.** 8: 349-354.
- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M. E.; Baker, J.O.; Overend, R. P. (Eds), Enzymatic conversion of biomass for fuels production. **American Chemical Society**. 292-324.
- Medve, J. (1997). Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II. Lund, Sweden. 49 f.. **Doutorado em Bioquímica** – Department of Biochemistry, Lund University.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M., 2014a. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energ Convers Manage**. DOI: 10.1016/j.enconman.2014.02.071.
- Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M., 2014b. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel**. 133, 232–240.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

Anal. Chemis. 31: 426-428.

Morjanoff, P.J.; Gray, P.P. (1987). Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnol. Bioeng.** 29, 733–741.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzaple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAAA). **Disponível online em julho de 2014:** www.noaa.gov.

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.

Odega, T.L., Petri, D.F.S. (2011). Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quím. Nova** [online]. 33(7): 1549-1558. ISSN 0100-4042.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2011). EUA, 18ª edição, 4ª revisão. Método 2001.11

Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol for Biofuels.** 1:7 doi:10.1186/1754-6834-1-7

Olsson, L.; Christensen, T.M.I.E.; Hansen, K.P.; Palmqvist, E.A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 612-619.

Osava, M. (2007). Elephant Grass for Biomass. Inter Press Service News Agency, October

10. Disponível *online* em 29 de novembro de 2011:

<http://www.mwglobal.org/ipsbrasil.net/nota.php?idnews=3292>

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.

Pan, Z., Arritt, R.W., Takle, E.S., Gutowski, J., Anderson, C.J., Segal, M. (2004). Altered hydrologic feedback in a warming climate introduces a “warming hole”. **Geophysical Research Letters**. 31. doi:10.1029/2004GL020528.

Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochem.** 27: 109–117.

Papinutti, V.L.; Forchiassin, F. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerdermeus* growing in solid-state fermentation. **J. Food Eng.** 81: 54-59.

Patel, M.A.; Ou, M.S.; Ingram, L.O.; Shanmugam, K.T. (2005). Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. **Biotechnol. Prog.** 21: 1453-1460.

Pereira Jr, N., Couto, M.A.P.G, Santa Anna, L. M. M. (2008). Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro. 2: 45.

Pereira, F.C., Hickert, L., Sehnem, N.T., Souza Cruz, P.B., Rosa, C.A., AYUB, MAZ . (2011). Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technol.** 102: 4218-4225.

- 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.
- Pérez-Boada, M., Prieto, A., Prinsen, P., Gomez, M. P. F., del Río, J. C., Gutiérrez, A., Martínez, Á. T., Faulds, C. B. (2014). Enzymatic degradation of Elephant grass (*Pennisetum purpureum*) stems: Influence of the pith and bark in the total hydrolysis. **Bioresource Technol.** 167: 469–475.
- Philippidis, G. P. (1996). Cellulose bioconversion technology. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington, DC. 253–285.
- Pitarelo, A. P., Silva, T. A., Peralta-Zamora, P. G., Ramos, L. P. (2012). Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Quím Nova.** 35(8): 1502-1509.
- Polizeli, M. L. T. M., Corrêa, E. C. P., Polizeli, A. M., Jorge, J. A. (2011). Hydrolases from Microorganisms used for Degradation of Plant Cell Wall and Bioenergy. In: Buckeridge, M. S., Goldman, G. H. (Eds.). Route to Cellulosic Ethanol. New York: Springer. 5(1): 53-59.
- Ramos, L.P. (2000). Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. **Disponível online em 30 de novembro de 2011:**
(http://blog.cca.ufscar.br/lamam/files/2010/07/artigo_pretratamento.pdf)
- Ramos, L.P.; Breuil, C.; Saddler, J.N. (1992). Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 34-35: 37-48.
- Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic

- materials. **Química Nova**. 26: 863-871.
- Ramos, L. P., Martins, L. F., Satyanarayana, K. G. (2005). Conversion of lignocellulosics to fuels, chemicals and environmentally-friendly materials. **Met Mater Proc**. 17: 299–318.
- 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.
- Rigon, L.; Vencato, A.; Corrêa, S.; Reetz, E.; Rosa, G.R.; Beling, R.R. (2007). Com a mão na biomassa. **An. Bras. Agroenerg**. 10-54.
- Rodrigues, L.R.A; Monteiro, F.A.; Rodrigues, T.J.D. Capim Elefante. In: Peixoto, A.M., Pedreira, C.G.S, Moura, J.V. Faria, V.P. (2001). Simpósio sobre manejo de pastagens, 17, Piracicaba. 2ª ed. Anais.Piracicaba: FEALQ. 203-224. **Disponível online em 29 de novembro de 2011:**
<http://www.gestaouniversitaria.com.br/index.php?view=article&catid=175:194&id=21082:capim-elefante-fonte-de-energia-alternativa&format=pdf>
- Rolle, R.S. (1998). Review: Enzyme applications for agroprocessing in developing countries: an inventory of current and potential applications. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 14: 611-619.
- Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. (2008). **Enzyme and Microbial Technology**. 42: 160–166.
- Ryu, D.Y.; Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol**. 2: 91-102.
- 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**.

35-36.

Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyysönen, E.; Bhatia, A.;

Ward, M.; Penttilä, M. (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.

Samayam, I.P., Schall, C.A. (2010). Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. **Bioresour. Technol.** 101(10): 3561–3566.

Santos, J.R.A. dos., Souto-Maior, A.M., Gouveia, E.R., Martin, C. (2010). Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Quím. Nova** [online]. 33(4): 904-908. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000400027>.

Sarkanen, K. V.; Hergert, H. L. Em Lignins-occurrence, formation, structure and reaction; Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H., eds.; John Wiley: New York, 1971, cap. 2.

Satyanarayana, K. G. (2004). Steam explosion – a boon for value addition to renewable resources. *Metal News*. 22: 35–40.

Schell, D.J.; Harwood, C. (1994). Milling of lignocellulosic biomass: Results of pilot-scale testing. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 45-46, 159-168.

Schmidell, W. , Facciotti, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. (2001). In: Schmidell, W. , Lima, U.A. , Aquarone, E. , Borzani, W. (Eds.). **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. 2.: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.** 1-10.

Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D.

- J. W. (2008). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. **Technical**, Report NREL/TP-510-42621.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. **Technical**, Report NREL/TP-510-42619.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. D. C. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical**, Report NREL/TP-510-42618.
- Smits, J.P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Van Sonsbeek, H.M.; Knol, W. (1996). Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46: 489-496.
- Socol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B. P.; Karp, S. G.; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Leitão, V. F.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; Bom, E. P. da S.; Moraes, L. M. P. de.; Araújo, J. de A.; Torres, F. A. G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresour Technol.** 101: 4820–4825.
- Somerville, C.; Youngs, H.; Taylor, C.; Davis, S.C.; Long, S.P. (2010) Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. **Science.** 329: 790-792.
- Stebbins, G. L.; Crampton, B. (1961). A suggested revision of the grass genera of temperate North America. In: Recent advances in botany. Toronto, Canada.
- Strezov, V., Evans, T. J., Hayman C. (2008). Thermal conversion of elephant grass (*Pennisetum purpurum* Schum.) to bio-gas, bio-oil and charcoal. **Bioresour Technol.** 99: 8394-9.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., Mathew, G. M. Pandey, A. (2009). Cellulase production

- using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy for Sustainable Development in the Asia Pacific Region**. 34: 421–424
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** 83: 1-11.
- Sun, J.X.; Sun, X.F.; Sun, R.C.; Su, Y.Q. (2004). Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carb. Polyme.** 56: 195-204.
- Sun, N., Rahman, M., Qin, Y., Maxim, M.L., Rodriguez, H., Rogers, R.D. (2009). Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. **Green Chem.** 11(5): 646-655.
- Sunna, A.; Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17: 39-67.
- Szengyel, Z. (2000). Ethanol from wood cellulase enzyme production. PhD Tesis. **Lund University**. Sweden 54p.
- Teeri, T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech.**, 15: 160-167.
- Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G. (2001). Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme Microb Technol.** 28: 835–44.
- Tengerdy, R. P. (1985). Solid substrate fermentation. **Trends Biotechnol.** 3: 96-99.
- Urquiaga, S.C.; Alves, B.; Boddey, R. (2006). Capim Elefante: Uma Nova Fonte Alternativa de Energia. **Disponível online em 8 de novembro de 2014.**
:http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/capimelefante/Index.htm
- Van Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., Van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2006). Alcoholic

fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 90: 391-418.

Vicente, N. G. M. (2007). Jornada Madeira Energética- Capim Elefante como fonte de energia no Brasil: Realidade Atual e Expectativas. IPT-BNDS - Rio de Janeiro, 2007.

Disponível online em 18 de novembro de 2009:

(<http://www.gestaouniversitaria.com.br/index.php?view=article&catid=175:194&id=21082:capim-elefante-fonte-de-energia-alternativa&format=pdf>)

Viola, E., Cardinale, M., Santarcangelo, R., Villone, A., Zimbardi, F. (2008). Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis. **Biomass Bioenergy**. 32: 613–618.

Wang, D., Poss, J.A., Donovan, T.J., Shannon, M.C., Lesch, S.M. (2002). Biophysical properties and biomass production of elephant grass under saline conditions. **J. Arid Environ**. 52: 447-456.

Wilson, B.D. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current opinion in Microbiology**. 4: 259-263.

Woodard, K.R.; Prine, G.M. (1993). Dry matter accumulation of elephant grass, energy cane and elephant millet in a subtropical climate. **Crop Science**. 33: 818–824.

Xiong, H.; Weymarn, N.; Leisola, M.; Turunen, O. (2004). Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Process Biochem**. 39: 729-733.

Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinen, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technol**. 96: 753-759.

Xuan, J.; Leung, M.K.H.; Leung, D.Y.C.; Ni, M. (2009). A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. **Renew. Sust. Energy Rev**. 13: 1301-1013.

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.

Zheng, Y.; Pan, Z.; Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **Int J Agric & Biol Eng.** 2: 51 – 68

Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Zhang, X.; Wang, C.; Yu, F.; Jin, S.; Zhao, Y.; Tu, S.; Xue, Y. (2005). Simultaneous Saccharification and Fermentation of Microwave/Alkali Pre-treated Rice Straw to Ethanol. **Biosys. Eng.** 92: 229–235.